



(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)



1-0034105

(51)⁷ A61K 38/16; A61K 39/395; A61K 39/00 (13) B

- (21) 1-2018-00667 (22) 13/07/2016
(86) PCT/US2016/042074 13/07/2016 (87) WO2017/011544 A1 19/01/2017
(30) 62/192,269 14/07/2015 US; 62/197,966 28/07/2015 US; 62/277,201 11/01/2016 US
(45) 25/11/2022 416 (43) 25/10/2018 367A
(73) IMMUNEXT, INC. (US)
16 Cavendish Court, Lebanon, New Hampshire 03766, US
(72) ROTHSTEIN Jay (US); HOLGATE Robert George Edward (GB); HEARN Arron (GB).
(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD154 HOẶC ĐOẠN KHÁNG THỂ VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Các kháng thể kháng CD154 được cải tiến được đề xuất ở đây mà có tiềm năng điều trị, thời gian bán hủy *in vivo* và việc gắn FcR được cắt bỏ và/hoặc sự kích hoạt/gắn bổ sung được cải thiện. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng các kháng thể này để tạo dung nạp và điều trị các bệnh miễn dịch bao gồm tự miễn, viêm, cho người nhận cấy ghép, xơ hóa và các rối loạn dị ứng. Sáng chế cũng bộc lộ được phẩm chứa kháng thể kháng CD154.

Chuỗi nặng

Vùng biến đổi được in đậm

Các CDR được bôi vàng

Các phần dư được tạo đột biến trường thành ái lực được gạch chân

Các đột biến Fc (E đến R và K đến A) được in đỏ

10	20	30	40	50	60
EVQLQESGPG	LVKPSETLSL	TCTVSGDSIT	NGFWIWIRKP	PGNKLEYMGY	ISYSGSTYYN
70	80	90	100	110	120
PSLKSRLSIS	RDTSKNQFSL	KLSSVTAADT	GVYYCAYRSY	GRTPIYFDYW	GQGTTLTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSVVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKAEP	KSCDKHTTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLPPPKP	KDTLMISRTF	EVTGVVVDVS	HPDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCAVSNKA	LPAPIEKTIK	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVRGFYPSDI	AVENESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFCSSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK			

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng CD154 (CD154) được cải tiến có độc tính được giảm bớt và các đặc tính chức năng và ứng dụng của chúng trong các liệu pháp miễn dịch, đặc biệt là trong điều trị các rối loạn viêm, dị ứng, tự miễn, cấy ghép, và ung thư. Cụ thể là sáng chế bộc lộ các kháng thể kháng CD154 ái lực cao có ái lực và hoạt động chức năng được cải thiện mà không tạo huyết khối hoặc các phản ứng đông máu in vivo, và tạo ra các đặc tính điều trị mong muốn ví dụ như tạo ra sự dung nạp miễn dịch và chặn miễn dịch thể dịch.

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng CD154 (CD154) được cải tiến có độc tính được giảm bớt và các đặc tính chức năng và ứng dụng của chúng trong các liệu pháp miễn dịch, đặc biệt là trong điều trị các rối loạn viêm, dị ứng, tự miễn, cấy ghép, và ung thư. Cụ thể là sáng chế bộc lộ các kháng thể kháng CD154 ái lực cao có ái lực và hoạt động chức năng được cải thiện mà không tạo huyết khối hoặc các phản ứng đông máu in vivo, và tạo ra các đặc tính trị liệu mong muốn ví dụ như tạo ra sự dung nạp miễn dịch và chặn miễn dịch thể dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD40L (CD154) là mục tiêu trị liệu có giá trị và có tính hợp pháp cao trong tự miễn, đào thải mảnh ghép và các bệnh liên quan đến miễn dịch khác ở chuột, động vật linh trưởng không phải người (NHP) và người. Trong nhiều thử nghiệm lâm sàng pha II, α CD154 đã thể hiện một cách hiệu quả việc chặn các hoạt động của CD154 in vivo và cải thiện bệnh. α CD154 khác với tất cả các liệu pháp khác ở ảnh hưởng của nó lên phản hồi miễn dịch; nó là một trong các liệu pháp duy nhất mà có thể đem lại dung nạp miễn dịch chức năng, như được thể hiện cả ở chuột và khỉ. Ở chuột, hầu như tất cả các mô hình bệnh tự miễn có thể được cải thiện bằng liệu pháp α CD154 (Noelle, R. J., Mackey, M., Foy, T., Buhlmann, J. và Burns, C., "CD40 and its ligand in autoimmunity". *Ann N Y Acad Sci* 1997. 815: 384-391; Mackey, M. F., Barth, R. J., Jr. và Noelle, R. J., "The role of CD40/CD154 interactions in

the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells", *J Leukoc Biol* 1998. 63: 418-428; Noelle, R. J., "CD40 and its ligand in cell-mediated immunity". *Agents Actions Suppl* 1998. 49: 17-22; và Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. và Noelle, R. J., "CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity". *Annu Rev Immunol* 2004. 22: 307-328), với sự thuyên giảm lâu dài quan sát được.

Trong NHP, dung nạp ghép cùng loài vĩnh viễn có thể đạt được sử dụng các khóa điều trị có bao gồm α CD154 (Kenyon, N. S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J. L., Kirk, A. D., Harlan, D. M., Burkly, L. C. và Ricordi, C., "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154". *Proc Natl Acad Sci., USA* 1999. 96: 8132-8137; Kirk, A. D., Burkly, L. C., Batty, D. S., Baumgartner, R. E., Berning, J. D., Buchanan, K., Fechner, J. H., Jr., Germond, R. L., Kampen, R. L., Patterson, N. B., Swanson, S. J., Tadaki, D. K., TenHoor, C. N., White, L., Knechtle, S. J. và Harlan, D. M., "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates". *Nat Med* 1999. 5: 686-693).

Ngoài ra, thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II ở người đã chỉ ra rằng α CD154 có hiệu quả trong SLE (Sidiropoulos, P. I. và Boumpas, D. T., "Lessons learned from anti-CD154 treatment in systemic lupus erythematosus patients", *Lupus* 2004. 13: 391-397), bệnh đa xơ cứng (xem dữ liệu sơ bộ) và bệnh giảm tiểu cầu tự phát (Sidiropoulos, P. I. và Boumpas, D. T., "Lessons learned from anti-CD154 treatment in systemic lupus erythematosus patients", *Lupus* 2004. 13: 391-397). Như vậy, α CD154 là loại thuốc độc nhất mà cho phép can thiệp ngắn hạn với lợi ích lâm sàng dài hạn. Thất bại của nó không phải ở hiệu quả, mà là do tính độc không lường trước được.

Đầu những năm 1990 hãng dược IDEC Pharmaceuticals and Biogen Inc. (nay là hãng Biogen Idec) đã đưa ra hai α CD154 mAbs khác nhau vào nhiều thử nghiệm lâm sàng pha I/II. Kháng thể được phát triển bởi IDEC (IDEC-131) là IgG1 được người hóa có nguồn gốc từ kháng thể kháng nhân chuột CD154 được phát triển tại đại học Dartmouth. Kháng thể này và các biến thể được người hóa được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 6,001,358; số 6,440,418; số 6,506,383; số 7,074,406; và số 7,122,187, nội dung của chúng được kết hợp ở đây để tham khảo. Trong khi các chỉ định ban đầu chứng minh rằng thuốc có hiệu quả cao,

độc tính của một kháng CD154 khác đã ngăn cản việc tiếp tục phát triển lâm sàng. Trong thử nghiệm, độc tính quan sát được được bao gồm sự cảm ứng các hiện tượng tạo huyết khối trong bệnh nhân. Trên cơ sở các lo ngại về độc tính, tất cả các thử nghiệm đều bị đình chỉ và các nỗ lực được hướng tới việc tái kỹ thuật mAbs để duy trì hiệu quả và giảm độc tính.

Trong khi đã đạt được sự giảm về độc tính, lại có sự giảm sút đáng kể về hiệu quả của khả năng tạo dung nạp của α CD154 mAbs (Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. và Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge". *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594).

Biogen-Idec và UCB gần đây đã báo cáo về việc phát triển các kháng thể kháng CD154 với độ an toàn đã được cải thiện. Cụ thể là họ đã báo cáo về việc sản xuất CD154 Fab kháng nhân được gắn kết (Pegylated anti-human CD154 Fab) được gọi là CDP-7657 hoặc ruplizumab. Do Fabs có thời gian bán hủy *in vivo* ngắn (nghĩa là, khoảng từ 4 đến 8 giờ) Fab này được cải thiện các đặc tính dược động học của nó. Tuy nhiên, trong khi hiệu quả lâm sàng được báo cáo là tốt, kháng thể này trong báo cáo thể hiện tiềm năng thấp. Ngoài ra, Bristol Meyers Squib đã báo cáo về việc phát triển protein dung nạp miễn kháng thể Fc bao gồm tính đặc hiệu với CD154. Được báo cáo rằng protein dung nạp này đã thể hiện hiệu quả trên các mô hình bệnh ở chuột, cụ thể là mô hình thách thức KLH và mô hình NZB $\times$ NZW SLE (lupus).

Mặc dù với những báo cáo nêu trên, vẫn có nhu cầu đáng kể trong lĩnh vực về các kháng thể kháng CD154 được cải tiến, nghĩa là, những kháng thể an toàn và hiệu quả, và những kháng thể có tiềm năng và các đặc tính dược động học tốt. Sáng chế này đạt được những mục tiêu đó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng CD154 có hiệu quả, độ an toàn và các dược động học được cải thiện để sử dụng trong liệu pháp cho con người.

Cụ thể hơn mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng CD154 người được người hóa chứa (i) polypeptit miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chứa polypeptit có trình tự được lựa chọn từ SEQ ID NO: 15, 17 và 18 được thể hiện trên các hình 2A đến 2C, và (ii) và polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chứa polypeptit có trình tự được lựa chọn từ SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 và 31 được thể hiện trên các hình 2A đến 2C, với điều kiện rằng kháng thể kháng CD154 người được người hóa không bao gồm polypeptit miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO:15 và polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO:20.

Ngoài ra, mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng CD154 người được người hóa chứa (i) polypeptit miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm hoặc chứa polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1 như được thể hiện trên các hình 1A-C, và (ii) và polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chứa polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 2 được thể hiện trên các hình 1A-C.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất kháng thể kháng CD154 người như được đề cập trên 3 đoạn nêu trên mà chứa các miền hằng định IgG1, IG2, IgG3 hoặc IgG4 thiếu khả năng gắn C1Q và gắn vào Fc γ R2 và/hoặc Fc γ R3.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất kháng thể kháng CD154 người như được đề cập trên 4 đoạn nêu trên mà chứa các miền hằng định IgG1 người thiếu khả năng gắn C1Q và gắn vào Fc γ 2 và/hoặc Fc γ 3.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất kháng thể kháng CD154 người như được đề cập trên 5 đoạn nêu trên mà chứa các miền hằng định IgG1 người chứa các đột biến E269R và K322A (đánh số theo Kabat).

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất kháng thể kháng CD154 người được người hóa theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên chứa các miền hằng định nặng và nhẹ IgG1 có trình tự SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:2 được thể hiện trên các hình 1A-C.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất kháng thể kháng CD154 người được người hóa theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, trong đó kháng thể là IgG1 isotype và vùng Fc của kháng thể ngoài ra còn được tạo đột biến để thêm ít nhất một đột biến khác mà ảnh hưởng đến chức năng tác động ví dụ như đột biến làm suy yếu việc gắn FcRn, đột biến làm suy yếu

hoặc hạn chế sự glycosyl hóa hoặc một đột biến khác làm suy yếu khả năng của kháng thể gắn vào FcR ví dụ như FcγR2 hoặc FcγR3 hoặc một FcR khác hoặc làm suy yếu việc gắn vào bề mặt.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất kháng thể kháng CD154 người được người hóa theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, trong đó kháng thể là IgG1 isotype và vùng Fc của kháng thể được tạo đột biến để còn thêm đột biến E223P và/hoặc D265A hoặc bất kỳ trong số các đột biến Fc được xác định trong bảng 1, 2 hoặc 3.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất kháng thể kháng CD154 người được người hóa theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, trong đó kháng thể là IgG1 isotype và vùng Fc của kháng thể được tạo đột biến để thêm đột biến E233P.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất kháng thể kháng CD154 người được người hóa theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, trong đó vùng Fc của kháng thể ngoài ra còn được tạo đột biến để thêm một hoặc nhiều đột biến khác để cải thiện thời gian bán hủy in vivo.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất được phẩm chứa một lượng hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa của ít nhất một kháng thể kháng CD154 người được người hóa theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất được phẩm chứa một lượng hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa của ít nhất một kháng thể kháng CD154 người được người hóa theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, ngoài ra còn chứa kháng nguyên, tế bào, mô, hoặc cơ quan.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất được phẩm chứa một lượng hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa của ít nhất một kháng thể kháng CD154 người được người hóa theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, ngoài ra còn chứa tự kháng nguyên, chất dị ứng, tác nhân gây viêm, thuốc, hoặc tế bào hiến (không phải của người) xeno hoặc (allo) tương thích không-HLA.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp ức chế miễn dịch hoặc liệu pháp miễn dịch sử dụng kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị đối tượng với bệnh dị ứng, viêm, hoặc tự miễn dịch hoặc người nhận cấy ghép bằng cách dùng kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa GVHD trong đối tượng bằng cách dùng kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên từ trước, trong hoặc sau khi ghép mô, cơ quan hoặc các tế bào hiến tặng mà một cách tùy ý có thể được biến đổi gen ví dụ, CAR-T (các thụ thể tế bào T kháng nguyên chimeric) hoặc các tế bào NK (ăn mồi tự nhiên).

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp tạo sự dung nạp hoặc ức chế miễn dịch cụ thể kháng nguyên kéo dài bằng cách dùng kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, trong đó phương pháp được tùy chọn ngoài ra còn bao gồm dùng tế bào, kháng nguyên, mô, hoặc cơ quan mà chứa kháng nguyên mà đối với nó sự dung nạp hoặc ức chế miễn dịch kéo dài cần được tạo ra.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp liệu pháp gen, tế bào, mô hoặc cơ quan mà bao gồm việc dùng kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị tình trạng được lựa chọn từ bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, viêm buồng trứng, lupus hoặc SLE, tiểu đường, IBD, bệnh Crohn, ITP, viêm tuyến giáp, viêm khớp dạng thấp, bệnh nhược cơ năng, lupus ban đỏ hệ thống, bệnh Graves, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, thiếu máu tan huyết, đái tháo đường, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, các bệnh tự miễn do thuốc gây ra, hoặc lupus do thuốc gây ra bằng cách dùng kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị tủy xương, cơ quan hoặc các tế bào miễn dịch mà được sử dụng trong liệu pháp tế bào hoặc ghép tạng hoặc ghép tủy bao gồm bước ủ tủy xương, cơ quan, mô hoặc các tế bào miễn dịch đã nêu với kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, ví dụ, trong đó tủy xương, mô, cơ quan hoặc các tế bào miễn dịch đã được xử lý bao gồm các tế bào T của người nhận và/hoặc người hiến tặng.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp tạo dung nạp mà không tạo ra các sự kiện huyết khối trong bệnh nhân cần điều trị bao gồm bước dùng cho bệnh nhân một lượng hiệu quả kháng thể hoặc theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, mà tùy chọn ngoài ra còn

bao gồm việc dùng kháng nguyên ví dụ, tự kháng nguyên, chất dị ứng, tác nhân gây viêm, thuốc, hoặc tế bào cho (allo) tương thích không-HLA.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp tạo dung nạp, miễn dịch kéo dài hoặc ngăn chặn tế bào B hoặc T ở bệnh nhân cần nhận hoặc đã nhận các tế bào, cơ quan hoặc mô được ghép, ví dụ, trong đó thuốc có nguồn gốc sinh học ví dụ như kháng thể trị liệu, thụ thể, protein dung nạp, hormone, tác nhân sinh trưởng hoặc cytokine.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị rối loạn tự miễn do tế bào T bằng cách dùng một lượng hiệu quả kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị rối loạn tự miễn do tế bào B bằng cách dùng một lượng hiệu quả kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị bệnh tự miễn được lựa chọn từ viêm khớp dạng thấp, bệnh nhược cơ năng, lupus ban đỏ hệ thống, bệnh Graves, bệnh Huntington, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, thiếu máu tan huyết, đái tháo đường, bệnh Parkinson, bệnh vẩy nến, bệnh Addison, bệnh đa xơ cứng, lupus, và các bệnh tự miễn do thuốc gây ra, ví dụ, lupus do thuốc gây ra bằng cách dùng một lượng hiệu quả kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên mà bao gồm việc dùng kháng nguyên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa GVHD, ghép tủy xương (BMT), bệnh đa xơ cứng, lupus, ITP, viêm khớp dạng thấp, hen, IBD hoặc một rối loạn viêm ruột khác bằng cách dùng một lượng hiệu quả kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất phương pháp điều trị tình trạng, rối loạn hoặc bệnh ở người được trung gian toàn bộ hoặc một phần bởi việc truyền tín hiệu CD40, hoặc triệu chứng bất kỳ nêu trên, phương pháp bao gồm bước dùng một lượng hiệu quả kháng thể hoặc chế phẩm theo đoạn mô tả bất kỳ nêu trên, ví dụ, trong đó tình trạng, rối loạn hoặc bệnh ở người là viêm, dị ứng, hoặc phản hồi tự miễn dịch hoặc xơ hóa hoặc tình trạng, rối

loạn hoặc bệnh ở người được lựa chọn từ viêm thận, viêm khớp dạng thấp, lupus ban đỏ hệ thống, viêm đốt sống, lupus ban đỏ do thuốc gây ra, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh vẩy nến và bệnh đa xơ cứng hoặc tình trạng, rối loạn hoặc bệnh ở người được lựa chọn từ viêm da tiếp xúc dị ứng, rụng lông tóc toàn thân, hen ban xuất huyết dị ứng, hen nặng, hen chuyển hóa, hen dị ứng, viêm da dị ứng, viêm da dạng mụn rộp, ban đỏ nổi cục rần, ban đỏ có bờ, ban đỏ đa dạng; ban đỏ nút, u hạt dị ứng, u hạt hình vòng, chứng giảm bạch cầu hạt, viêm phổi quá mẫn, viêm giác mạc, hội chứng hư thận, hội chứng chồng lấp, bệnh của người nuôi bò câu, viêm đa thần kinh tự phát, mày đay, viêm màng bồ đào, viêm bì cơ ở trẻ em, và lang ben hoặc tình trạng, rối loạn hoặc bệnh ở người được lựa chọn từ viêm phế quản phổi dị ứng do nhiễm nấm aspergillosis; thiếu máu tan huyết tự miễn; bệnh gai đen; viêm da tiếp xúc dị ứng; bệnh Addison; viêm da dị ứng; rụng tóc từng vùng; rụng lông tóc toàn thân; chứng thoái hóa dạng tinh bột; ban xuất huyết dị ứng; phản ứng phản vệ; thiếu máu không tái tạo; phù mạch, di truyền; phù mạch, tự phát; viêm đốt sống dạng thấp; viêm động mạch, sọ; viêm động mạch, tế bào khổng lồ; viêm động mạch, Takayasu; viêm động mạch, tạm thời; hen; mất điều hòa giãn mạch; viêm buồng trứng tự miễn; viêm tinh hoàn tự miễn; thất bại đa nội tiết tự miễn; bệnh Behçet; bệnh Berger; bệnh Buerger; bong pemphigut; bệnh nấm candida, bệnh niêm mạc da mạn tính; bệnh Caplan; hội chứng sau nhồi máu cơ tim; hội chứng sau mở màng ngoài tim; viêm tim; bệnh không hấp thu gluten; bệnh Chagas; hội chứng Chédiak-Higashi; bệnh Churg-Strauss; hội chứng Cogan; bệnh ngưng kết tổ lạnh; hội chứng mào; bệnh Crohn; crioglobulin huyết; viêm xơ phế nang vô căn; viêm da dạng mụn rộp; viêm bì cơ; đái tháo đường; hội chứng Diamond-Blackfan; hội chứng DiGeorge; lupus ban đỏ hình đĩa; viêm mạc ưa eosin; viêm thượng củng mạc; ban đỏ nổi cục rần; ban đỏ có bờ; ban đỏ đa dạng; ban đỏ nút; sốt Địa Trung Hải; hội chứng Felty; xơ phổi; viêm cầu thận, phản vệ; viêm cầu thận, tự miễn; viêm cầu thận, sau nhiễm liên cầu khuẩn; viêm cầu thận, sau cấy ghép; bệnh tiểu cầu thận, thuộc màng; hội chứng Goodpasture; bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ; chứng giảm bạch cầu hạt, do miễn dịch gây ra; u hạt hình vòng; bệnh u hạt, dị ứng; bệnh u hạt viêm cơ; bệnh basedow; viêm tuyến giáp Hashimoto; bệnh tiêu máu ở trẻ sơ sinh; bệnh nhiễm sắc tố sắt mô, tự phát; ban xuất huyết Henoch-Schönlein; viêm gan, mạn tính chủ động và mạn tính tiến triển; bệnh tổ chức bào x; hội chứng tăng bạch cầu ái toan; ban xuất huyết giảm tiểu cầu ngẫu phát; hội chứng

nghe nghiệp; viêm bì cơ ở trẻ em; viêm khớp dạng thấp ở trẻ em (viêm khớp mạn tính ở trẻ em); bệnh Kawasaki; viêm giác mạc; viêm giác kết mạc khô; hội chứng landry-guillain-barre-strohl; bệnh phong; hội chứng Loeffler; hội chứng Lyell; bệnh Lyme; bệnh u hạt lympho; bệnh tế bào mast, toàn thân; bệnh mô liên kết hỗn hợp; viêm đơn dây thần kinh đa ổ; hội chứng Muckle-Wells; hội chứng hạch lympho niêm mạc da; hội chứng hạch lympho niêm mạc da; mô bào thể lưới đa nhân; bệnh đa xơ cứng; bệnh nhược cơ năng; u sùi dạng nấm; viêm mạch hoại tử, hệ thống; hội chứng hư thận; hội chứng chồng lấp; viêm mô mỡ dưới da; huyết cầu tố niệu kích phát cảm lạnh; huyết cầu tố niệu kích phát ban đêm; dạng pemphigut; pemphigut; pemphigut ban đỏ; pemphigut tróc; pemphigut thông thường; bệnh của người nuôi bồ câu; viêm phổi, quá mẫn; viêm đa động mạch kết nối; đau cơ dạng thấp; viêm đa cơ; viêm đa thần kinh, tự phát; bệnh đa thần kinh Bò Đào Nha; chứng kinh giật/tiền kinh giật; xơ mật xơ cấp; xơ cứng hệ thống tiến triển (bệnh cứng bì); bệnh vẩy nến; viêm khớp vẩy nến; bệnh tích protein phế nang; xơ hóa phổi, hội chứng/hiệu ứng Raynaud; viêm tuyến giáp Reidel; hội chứng Reiter, viêm đa sụn tái phát; bệnh sốt thấp khớp; viêm khớp dạng thấp; bệnh sacoit; viêm củng mạc; viêm đường mật xơ cứng; bệnh huyết thanh; hội chứng Sézary; hội chứng Sjögren; hội chứng Stevens-Johnson; bệnh Still; viêm tiền não xơ hóa bán cấp; viêm mắt đồng cảm; lupus ban đỏ hệ thống; sự đào thải mô ghép; viêm ruột kết mạn loét; bệnh mô liên kết không phân biệt; mày đay, mạn tính; mày đay, lạnh; viêm màng bồ đào; lang ben; bệnh Weber-Christian; bệnh u hạt Wegener; và hội chứng Wiskott-Aldrich.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình 1A đến 1C thể hiện các trình tự axit amin của kháng thể kháng CD154 mới mà có nguồn gốc từ IDEC-131. Trên hình vùng có thể cải biến có mặt trong cả các polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được in đậm, các CDR được bôi vàng và các phần dư đột biến trưởng thành ái lực được gạch chân và các đột biến Fc (E□R và K□A) được thể hiện bằng màu đỏ và được gạch chân.

Các hình 2A đến 2C so khớp các miền hằng định IgG1 được cải biến khác nhau và các trình tự chuỗi nặng và nhẹ được cải biến có nguồn gốc từ IDEC-131 và kháng thể chuột bố mẹ của chúng.

Hình 3 chứa các kết quả của các thử nghiệm gắn BIAcore so sánh với việc gắn kháng thể kháng CD154 người được người hóa mới (được gọi trong hình và trong đơn sáng chế này là "INX021") vào IDEC-131 về khả năng gắn CD154 biểu hiện các tế bào Jurkat của chúng. Như được thể hiện, kháng thể cải tiến tăng khoảng 5 lần về ái lực gắn đối với CD154 (được biểu hiện trên các tế bào Jurkat) khi so sánh với IDEC-131.

Hình 4 chứa các kết quả thử nghiệm thể hiện rằng kháng thể cải tiến ("INX021") có nhiều tiềm năng để kích hoạt tế bào B được dẫn động CD154 bởi tế bào T hơn so với IDEC-131.

Hình 5 chứa các kết quả thử nghiệm thể hiện rằng các đột biến FcR của các kháng thể CD154 kháng chuột IgG người chứa cùng các đột biến như INX021 (K322A và E269R) tạo dung nạp trong mô hình dung nạp da.

Hình 6 chứa các kết quả thử nghiệm thể hiện rằng các phức hợp miễn dịch của INX201 không kích thích sự kết tụ hoặc sự hoạt hóa các tiểu cầu người và chuột *in vitro*.

Các hình 7A đến 7D chứa các kết quả thử nghiệm thể hiện rằng INX021 không tạo ra sự kích hoạt tiểu cầu hoặc các hiệu quả khác lên các tiểu cầu khi so sánh với kháng thể đối chứng dương. Hình 7A thể hiện nó không tạo ra sự căng thẳng huyết khối, hình 7B thể hiện rằng nó không kích thích sự kết tụ tiểu cầu hoặc đông máu với bằng chứng là không quan sát thấy các vật nghẽn mạch phổi, hình 7C thể hiện rằng nó không làm ảnh hưởng đến số lượng các tiểu cầu lưu thông và hình 7D tóm tắt các ưu điểm quan sát được của kháng thể này được quan sát ở chuột FcγRIIa Tg.

Các hình 8A và 8B thể hiện rằng các kháng thể CD154 IgG1 kháng chuột chứa các đột biến Fc mà làm giảm hoặc hạn chế việc gắn FcR và hoạt động bổ sung (các đột biến E2669R và K322A được chứa trong INX021) là sự ức chế miễn dịch trong các mô hình động vật. Hình 8A thể hiện rằng kháng thể kháng CD154 chứa các đột biến này ngăn chặn EAE và hình 8B thể hiện rằng kháng thể kháng CD154 chứa các đột biến này ngăn chặn miễn dịch thể dịch và tạo dung nạp phản hồi lại myelin/oligodendrocyte glycoprotein ("MOG").

Hình 9 so sánh các hiệu quả của các biến thể kháng thể khác nhau của IDEC-131 bao gồm INX021 đối với sự kích hoạt tế bào B được kích thích bởi tế bào T dựa trên sự biểu

hiện CD86. Các hiệu quả của nó là thay đổi thể hiện rằng ái lực gắn được tăng không nhất thiết liên quan đến tiềm năng tốt hơn, nghĩa là, hoạt động ức chế miễn dịch.

Các hình 10A và 10B so sánh các hiệu quả của INX021 và kháng thể 5c8 chimeric đối với sự sản xuất các kháng thể IgG và IgM trong thử nghiệm KLH. Hình 10A so sánh các hiệu quả của chúng trên IgG và hình 10B so sánh các hiệu quả của chúng trên IgM.

Các hình 11A và 11B so sánh các hiệu quả của phương tiện, INX021 và kháng thể 5c8 trên các điểm tâm phôi. Hình 11A thể hiện sự so sánh điểm tâm phôi và hình 11B chứa biểu đồ so sánh số lượng và mức độ di động của các điểm tâm phôi trong lá lách và các hạch lympho (các LN) của các động vật được điều trị.

Hình 12 tổng kết tần suất tổn thương quan sát được thành các kết quả được công bố với một kháng thể kháng CD154 khác (Pegylated α CD154 Fab của Biogen/UCB).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi bộc lộ chi tiết sáng chế các phần mô tả sau đây được cung cấp. Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về.

Thuật ngữ "kháng thể" như được sử dụng ở đây theo sáng chế, bao gồm kháng thể được phân lập, tái tổ hợp hoặc tổng hợp được người hóa, kháng thể liên hợp hoặc kháng thể dẫn xuất. Thuật ngữ "kháng thể" thông thường là để nhằm bao gồm đoạn kháng thể, bao gồm đoạn gắn kháng nguyên, trừ khi được nêu khác đi hoặc được hiểu khác đi theo nội dung. Đoạn gắn kháng nguyên cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn về việc gắn đặc hiệu. Thông thường xem, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. 1989%). Các đoạn gắn kháng nguyên có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách cắt các kháng thể nguyên vẹn bằng hóa chất hoặc bằng enzym. Trong một số phương án, các đoạn gắn kháng nguyên bao gồm Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, Fv, miền các kháng thể (dAb), các đoạn đơn và đôi khác, các đoạn vùng xác định bổ sung (complementarity determining region - CDR), các kháng thể đơn chuỗi (ví dụ, scFv, scFab, và scFab δ C), các kháng thể chimeric, các đoạn kháng thể đôi (diabodies), các đoạn kháng thể ba (triabodies), các tiểu đoạn kháng thể (minibodies), các đoạn kháng thể siêu nhỏ (nanobodies), và các polypeptit mà chứa ít nhất một phần của kháng thể mà đủ để cho

phép gắn kháng nguyên đặc hiệu vào polypeptit; và các dung nạp và các dẫn xuất của chúng. Xem, ví dụ, Holliger và Hudson, *Nature Biotechnology* 23: 1126-1136 (2005) và Hust và cộng sự, *BMC Biotech* 7: 142007).

Trừ khi được nêu khác đi hoặc được bao hàm trong nội dung, "kháng thể" theo sáng chế bao gồm toàn bộ các kháng thể và các đoạn gắn kháng nguyên bất kỳ của nó, các dẫn xuất hoặc các cải biến kháng thể mà có thể chứa một hoặc nhiều cải biến (ví dụ, chèn, xóa, thế, cải biến sau dịch mã axit amin hoặc sự thiếu hụt chúng, v.v.), bao gồm các liên hợp kháng thể (nghĩa là, kháng thể hoặc đoạn gắn kháng nguyên của nó được liên hợp vào hoặc được kết hợp với liên minh chức năng). Các dẫn xuất kháng thể, bao gồm các liên hợp kháng thể, có thể là trên cơ sở hoặc có thể chứa đoạn gắn kháng nguyên theo sáng chế mà gắn đặc hiệu CD154. Ngoài ra, các phương án kháng thể được đề cập ở trên có thể là các liên hợp, các dẫn xuất, các đoạn, các kháng thể người hoàn toàn, được người hóa, lai của chuột, hamster, dê, thỏ. Cần hiểu rằng trong các khía cạnh nhất định theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể" có thể không bao gồm một hoặc nhiều phương án kháng thể được liệt kê ở trên; ví dụ như các trường hợp mà là hiển nhiên với chuyên gia trong lĩnh vực.

Thuật ngữ "chức năng tác động" là để chỉ khả năng chức năng của Fc hoặc miền hằng định của kháng thể để gắn các protein và/hoặc các tế bào của hệ thống miễn dịch. Các kháng thể có chức năng tác động được giảm và các phương pháp để thiết kế các kháng thể này là đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực (xem, ví dụ, tài liệu WO 05/18572, WO 05/03175, và sáng chế Mỹ số 6,242,195) và được mô tả chi tiết hơn ở đây. Các chức năng tác động điển hình bao gồm khả năng gắn protein bổ sung (ví dụ, protein bổ sung C1q), và/hoặc thụ thể Fc (FcR) (ví dụ, FcγRI, FcγRII, FcγRIIa, FcγRIII, và/hoặc FcγRIIIb). Các hậu quả chức năng của việc có thể gắn một hoặc nhiều nguyên tử nêu trên bao gồm, mà không giới hạn, cố định opsonin, thực bào, gây độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên (antigen-dependent cellular cytotoxicity - ADCC), gây độc phụ thuộc bổ sung (complement-dependent cytotoxicity - CDC) và/hoặc điều biến tế bào hiệu lực (effector). Sự giảm về chức năng tác động là để chỉ sự giảm về một hoặc nhiều hoạt động tế bào hoặc hóa sinh được gây ra ít nhất một phần bằng việc gắn Fc với thụ thể nhận dạng của nó hoặc với protein bổ sung hoặc tế bào hiệu lực, trong khi duy trì hoạt động gắn kháng nguyên của vùng có thể cải biến của kháng thể (hoặc đoạn kháng thể), mặc dù với ái lực gắn được giảm,

tương tự, đồng nhất, hoặc tăng. Các kháng thể cụ thể theo sáng chế thể hiện chức năng tác động giảm. Giảm về chức năng tác động, ví dụ, việc gắn Fc với cụ thể Fc hoặc protein bổ sung, có thể được thể hiện dưới dạng số lần giảm (ví dụ, giảm 1,5 lần, 2 lần, và tương tự) và có thể được tính toán dựa vào, ví dụ, phần trăm giảm về hoạt động gắn được xác định bằng cách thực hiện các thử nghiệm gắn đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực (xem, ví dụ, tài liệu WO 05/18572).

Trừ khi được yêu cầu khác đi bởi nội dung, các thuật ngữ số ít cũng bao hàm cả số nhiều và các thuật ngữ số nhiều cũng bao hàm cả số ít.

Xuyên suốt bản mô tả này và các yêu cầu bảo hộ, từ "gồm," hoặc các biến thể ví dụ như "chứa" hoặc "bao gồm" sẽ được hiểu là bao hàm sự có mặt của các đối tượng hoặc nhóm đối tượng đã được xác định nhưng không giới hạn bất kỳ đối tượng hoặc nhóm đối tượng nào khác.

Thuật ngữ "CD154" là để chỉ phối tử được biểu hiện trên các tế bào T được hoạt hóa. CD154 được biết đến bằng một số tên khác trong lĩnh vực, ví dụ như phối tử CD40 (CD40L), thụ thể đối CD40 (CD40CR), gp39, T-BAM, phân tử hoạt hóa tế bào T (T-Cell Activating Molecule), TRAF, protein hoạt hóa liên quan đến TNF (TNF-Related Activation Protein - TRAP), và thành viên siêu nhóm phối tử yếu tố hoại tử khối u 5 (Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 5 - TNFSF5) (Gauchat và cộng sự, 1993 *FEBS Lett.* 315: 259-266; Graf và cộng sự 1992, *Europ. J. Immun.* 22: 3191-3194; Hollenbaugh và cộng sự, 1992 *EMBO J.* 11: 4313-4321). Các thuật ngữ này được sử dụng hoán đổi xuyên suốt đơn sáng chế này. Các protein gắn CD154, bao gồm các kháng thể, theo sáng chế gắn đặc hiệu vào CD154 người và có thể phản ứng chéo và do đó gắn đặc hiệu vào CD154 của các loài khác. Trong các phương án nhất định, các protein gắn CD154, bao gồm các kháng thể, theo sáng chế gắn đặc hiệu vào CD154 của người, CD154 của chuột hoặc CD154 của linh trưởng không phải con người.

Thuật ngữ "kháng thể kháng CD154" cũng bao gồm kháng thể tổng hợp được người hóa hoặc kháng thể tái tổ hợp mà được tạo ra sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp, chẳng hạn như, ví dụ, kháng thể được biểu hiện bởi thể thực khuẩn (bacteriophage). Thuật ngữ "kháng thể kháng CD154" cũng cần được giải thích là bao gồm kháng thể mà được tạo ra bằng việc

tổng hợp phân tử ADN mã hóa kháng thể và phân tử ADN biểu hiện protein kháng thể, hoặc trình tự axit amin quy định kháng thể, trong đó DNA hoặc trình tự axit amin đã được thu sử dụng công nghệ ADN tổng hợp được người hóa hoặc công nghệ trình tự axit amin mà có sẵn và được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực.

"Đột biến hoặc các đột biến mà hạn chế hoặc làm giảm việc gắn FcR và hạn chế độc tính" ở đây là để chỉ đột biến hoặc các đột biến mà hạn chế hoặc loại trừ bệnh giảm lượng tiểu cầu tự miễn hoặc chứng huyết khối hoặc đông tụ máu *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Các vị trí trong Fc hoặc các miền hằng định của các loại kháng thể người khác nhau bao gồm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 người mà có thể được cải biến để loại trừ hoặc làm giảm việc gắn FcR và tác động đến (làm yếu hoặc tăng cường) các chức năng tác động Fc khác đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực. Các đột biến ví dụ mà có thể được cải biến trong IgG1 Fc người hoặc miền hằng định được xác định trong các bảng từ 1 đến 3 và trong các ví dụ bên dưới.

"Đột biến hoặc các đột biến mà loại trừ hoặc làm giảm chức năng bổ sung và duy trì các đặc tính tạo dung nạp" là để chỉ đột biến hoặc các đột biến ở các kháng thể được người hóa, lai tạo hoặc của người chứa các miền hằng định của người, tốt hơn là các miền hằng định IgG1 hoặc IgG3 của người, trong đó vùng Fc của nó đã được tạo đột biến ở một hoặc nhiều điểm nhằm loại trừ hoặc giảm bớt đáng kể việc gắn bổ sung. Tốt hơn là các đột biến này sẽ không làm ảnh hưởng đáng kể đến khả năng của kháng thể để tạo dung nạp *in vivo*. Việc này có thể được thiết lập sử dụng các mô hình dung nạp thích hợp ví dụ như mô hình ghép da. Các vị trí trong Fc hoặc các miền hằng định của các loại kháng thể người khác nhau bao gồm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người mà có thể được cải biến để mà có thể được cải biến để loại trừ hoặc giảm bớt việc gắn bổ sung và có thể ảnh hưởng đến (làm yếu hoặc tăng cường) các chức năng tác động Fc khác đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực. Các vị trí ví dụ mà có thể được cải biến trong IgG1 được xác định trong các bảng từ 1 đến 3 và các ví dụ dưới đây.

"Bệnh nhân" có thể là con người hoặc động vật không phải người, tốt hơn là động vật có vú. Trong các phương án ưu tiên sáng chế này tạo ra các kháng thể kháng CD154 người thích hợp cho liệu pháp dành cho con người chứa các miền hằng định IgG1 hoặc IgG3 được đột biến, trong đó các đột biến này loại trừ hoặc ngăn chặn phần lớn độc tính hoặc các lo ngại về độ an toàn ví dụ như bệnh giảm lượng tiểu cầu tự miễn hoặc chứng huyết khối hoặc

các phản ứng đông máu hoặc độc tính có liên quan đến các phản ứng bổ sung và tốt hơn là trong đó các kháng thể như vậy giữ lại khả năng tạo dung nạp hoặc sự ức chế thể dịch kéo dài *in vivo*.

Như được sử dụng ở đây, "đối tượng", là để chỉ sinh vật hoặc mẫu tế bào, mẫu mô hoặc mẫu cơ quan có nguồn gốc từ đó, bao gồm, ví dụ, các dòng tế bào được nuôi cấy, mẫu sinh thiết, mẫu máu, hoặc mẫu dịch chứa tế bào. Trong nhiều trường hợp, đối tượng hoặc mẫu có nguồn gốc từ đó chứa nhiều loại tế bào. Trong một phương án, mẫu bao gồm, ví dụ, hỗn hợp của các tế bào bình thường và các tế bào khối u. Trong một phương án, mẫu chứa ít nhất 10%, 15%, 20%, và tăng hơn nữa đến, 90%, hoặc 95% các tế bào khối u. Sinh vật có thể là động vật, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, động vật, ví dụ như bò, lợn, chuột, chuột nhắt, gà, mèo, chó, v.v., và thường là động vật có vú, ví dụ như con người.

Thuật ngữ "điều trị" trong các cấu trúc ngữ pháp khác nhau trong sáng chế là để chỉ việc ngăn ngừa (nghĩa là ngăn ngừa bằng thuốc), chữa bệnh, đảo ngược, làm yếu, làm giảm bớt, giảm tối thiểu, xóa bỏ, hoặc tạm ngừng các tác động nguy hại của trạng thái bệnh, sự tiến triển bệnh, tác nhân gây bệnh (ví dụ vi khuẩn hoặc vi rút), hoặc tình trạng bất thường khác. Ví dụ, điều trị có thể bao gồm việc làm giảm bớt một triệu chứng (nghĩa là, không nhất thiết là tất cả các triệu chứng) của bệnh để làm suy yếu sự tiến triển của bệnh.

"Điều trị hoặc ngăn ngừa tự miễn" hoặc "điều trị hoặc ngăn ngừa" một tình trạng bệnh khác ví dụ như ung thư, nhiễm trùng, viêm, dị ứng, cấy ghép, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ và các tình trạng khác trong đó các kháng thể kháng CD154 là có tiềm năng về lợi ích điều trị như được sử dụng ở đây, là để chỉ một phần hoặc toàn bộ việc ngăn chặn, làm trễ, hoặc ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh. Trong trường hợp bệnh ung thư điều này có nghĩa là điều trị hoặc ngăn chặn di căn ung thư; ngăn chặn, làm trễ, hoặc ngăn ngừa sự tái phát của ung thư bao gồm cả di căn ung thư; hoặc ngăn ngừa sự khởi phát hoặc sự phát triển của ung thư (ngăn ngừa bằng thuốc) ở động vật có vú, ví dụ, con người. Ngoài ra, các phương pháp theo sáng chế có thể được tiến hành để điều trị các bệnh nhân là người bị bệnh ung thư. Tuy nhiên, cũng có khả năng rằng các phương pháp cũng có hiệu quả trong việc điều trị ung thư ở các động vật có vú khác. Trong các phương án ưu tiên các kháng thể đối tượng được sử dụng để điều trị tự miễn, dị ứng, viêm, cấy ghép, GVHD, ghép tủy xương (BMT), và để tạo dung nạp kháng nguyên đặc hiệu hoặc ngăn miễn dịch kháng nguyên đặc

hiệu được kéo dài, việc ngăn chặn cụ thể sự phân hóa, hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của tế bào T và/hoặc tế bào B trong các đối tượng cần được điều trị. Các mục tiêu ưu tiên bao gồm bệnh đa xơ cứng, lupus hoặc SLE, ITP, IBD, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh vẩy nến, viêm màng bồ đào, viêm khớp dạng thấp, hen, GVHD, ghép tủy xương, tiểu đường, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh vẩy nến, cấy ghép tế bào, cấy ghép mô, cấy ghép cơ quan, ghép tủy xương, liệu pháp tế bào và gen, viêm buồng trứng và viêm tuyến giáp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lượng hiệu quả điều trị" là nhằm để định lượng lượng điều trị trong khuôn khổ điều trị cần thiết để điều trị tình trạng ví dụ, tự miễn, dị ứng, viêm, GVHD hoặc cấy ghép hoặc làm giảm hoặc loại trừ phản hồi miễn dịch, đặc biệt là phản hồi kháng thể tế bào B hoặc tế bào T chống lại kháng nguyên ví dụ như kháng nguyên tự động, dị ứng nguyên, tác nhân gây viêm, tế bào, mô, hoặc cơ quan được ghép hoặc chống lại thuốc ví dụ như có nguồn gốc sinh học, ví dụ, kháng thể điều trị, protein dung nạp Ig, hocmon, tác nhân sinh trưởng, hoặc protein hoặc polypeptit điều trị khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lượng hiệu quả dự phòng" là nhằm để định lượng lượng điều trị trong khuôn khổ điều trị cần thiết để dự phòng tình trạng, hoặc tiến trình và các triệu chứng của bệnh ví dụ, tự miễn, dị ứng, viêm, GVHD hoặc chống cấy ghép, thuốc hoặc phản hồi đào thải.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD154 được cải tiến để sử dụng trong liệu pháp cho con người mà có nguồn gốc từ kháng thể được người hóa IDEC-131 được phát triển bởi hãng dược IDEC Pharmaceuticals (hiện giờ là hãng BiogenIDEC). IDEC-131 là kháng thể ái lực cao mà được phát hiện bởi BIAcore tại 25° C gắn với CD154 người với K_D bằng 151 pm.

IDEC131 là kháng thể kháng CD154 được người hóa IgG1 isotype ở người mà có nguồn gốc từ kháng thể kháng CD154 người ở chuột (24-31), mà đã được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 5,747,037. Dòng tế bào lai giải phóng 24-31 mà đã được khai thác thương mại được lưu giữ tại Trung tâm tập hợp loại mô Hoa Kỳ và dòng tế bào được lưu giữ được gắn số đăng ký ATCC HB1712.

Trình tự của IDEC-131, và việc sử dụng chúng trong điều trị các đích điều trị dị ứng, tự miễn, viêm khác nhau và để ngăn chặn các phản hồi miễn dịch có nguồn gốc từ tế bào T và B đã được bộc lộ trong các sáng chế Mỹ số 6,001,358; 6,440,418; 6,506,383; 7,074,406 và 7,122,187. Dựa trên các đặc tính của nó bao gồm các hiệu quả ngăn ngừa miễn dịch tiềm năng trên miễn dịch tế bào T và B và IDEC-131 ái lực cao được tiến hành trong các thử nghiệm lâm sàng ở người. Cụ thể là, IDEC-131 đã được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng ở người được tài trợ bởi IDEC để điều trị 2 đích điều trị tự miễn, nghĩa là, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát ("ITP") và ngừng/tái phát bệnh đa xơ cứng ("RR-MS"). Trong khi các thử nghiệm lâm sàng này với IDEC-131 đã thể hiện một số hiệu quả lâm sàng (ngay cả rất sớm ở tương đối ít bệnh nhân), chúng đã bị tạm dừng sau khi có báo rằng một kháng thể kháng CD254 kháng nhân IgG1 khác được phát triển bởi Biogen, cũng có nguồn gốc từ kháng thể kháng CD154 người ở chuột, (kháng thể 5c8 ở chuột được phân lập bởi Seth Lederman của đại học Columbia) đã gây ra các tác dụng ngược cho các bệnh nhân ở người. Cụ thể là, khi Biogen tổ hợp khác loài kháng thể 5c8 được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng đã xuất hiện hiện tượng tạo huyết khối ngược ("TE's") mà gây nên đột quỵ và tử vong ở một số bệnh nhân trong thử nghiệm lâm sàng. Sáng chế giải quyết các vấn đề này bằng cách tạo ra các ưu điểm dược động học khác liên quan đến IDEC-131.

Ngược lại, sáng chế đề xuất một biến thể được người hóa của kháng thể kháng CD154 người có nguồn gốc từ IDEC-131, mà giống IDEC-131 ở chỗ là thuộc isotype IgG1 của người, tuy nhiên, vùng Fc của nó đã được thiết kế để loại trừ cả việc liên kết FcR lẫn sự kích hoạt bổ sung. Cụ thể là, miền hằng định được thiết kế để chứa các đột biến E269R và K322A (trong đó các phần dư đột biến này được đánh số theo hệ thống số kháng thể Kabat). Các đột biến này làm giảm một cách tương ứng việc gắn C1g và FcγRIIa. Cụ thể là kháng thể được cải biến sản phẩm có việc gắn FcR/C1q được hạn chế, nghĩa là, nó không gắn vào FcRγ2 hoặc vào FcRγ3 trên các tiểu cầu và không gắn hoặc hoạt hóa bổ sung. Ngược lại việc gắn vào FcRn của nó không bị ảnh hưởng. Như được bộc lộ *dưới đây*, và được chứng minh bởi dữ liệu thử nghiệm được bộc lộ ở đây các kháng thể kháng CD154 IgG1 chứa các đột biến này khi được thử nghiệm trong các mô hình thử nghiệm khác nhau không thể hiện bất cứ hoạt động tiền huyết khối có thể xác định được nào *in vitro* hoặc *in vivo* trên các tiểu cầu người hoặc chuột.

Ngoài ra, các trình tự nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của IDEC-131 được thiết kế thêm sự trưởng thành ái lực. Sự trưởng thành ái lực được thực hiện với hi vọng tăng cường ái lực gắn của kháng thể kháng CD154 người sản phẩm khi so sánh với IDEC-131 trong khi vẫn duy trì các đặc tính ngăn ngừa miễn dịch mong muốn của nó. Tuy nhiên, kết quả này vẫn còn lâu mới được đảm bảo do IDEC-131 được đề cập đã có ái lực gắn mạnh với CD154 của người (161 pm) và có tiềm năng ngăn ngừa miễn dịch trong các mô hình khác nhau (các mô hình EAE, ngăn ngừa miễn dịch ở người và dung nạp khác loài).

Sau nhiều thử nghiệm và các phương pháp sàng lọc kế tiếp các phiên bản đột biến của các chuỗi nặng và nhẹ có thể được cải biến của IDEC-131 được thu đã tạo ra các kháng thể được người hóa (bao gồm INX021) có ái lực được cải thiện so với IDEC-131. Cụ thể là INX021 được thu cùng với 12 biến thể khác. Các biến thể được người hóa này được đánh giá và INX021 được lựa chọn làm ứng cử viên chính cho liệu pháp ở người dựa trên việc gắn có lợi của nó ($\approx$ với CD154 của người có ái lực lớn gấp 5 lần so với IDEC-131) và nó cũng thể hiện các đặc tính chức năng (ngăn ngừa miễn dịch) tốt hơn khi so sánh với IDEC-131 và khi so sánh với cả các biến thể khác.

Như được thể hiện trên các hình 1A-C (mà chứa các trình tự của kháng thể kháng CD154 người IgG1 được người hóa được cải tiến, INX021), kháng thể này chứa hai đột biến trong chuỗi nặng CDR3, ba đột biến trong chuỗi nhẹ CDR1 và hai đột biến trong chuỗi nhẹ CDR3 (khi so sánh với IDEC-131). Do đó, tổng cộng 7 phần dư CDR được cải biến. Bất ngờ như được thể hiện *dưới đây*, kháng thể kháng CD154 người được người hóa sản phẩm gắn vào CD154 của người với ái lực lớn gấp khoảng 5 lần so với kháng thể bố mẹ mà được ghi nhận trước tự gắn nó với CD154 của người với ái lực rất lớn. Việc này gây bất ngờ do ngay chỉ một cải biến CDR cũng có thể có các ảnh hưởng mạnh mẽ đến ái lực gắn kháng thể. Ngoài ra, không thể dự đoán được rằng ái lực của các kháng thể đã có ái lực tương đối cao cũng được cải thiện.

Kháng thể được người hóa được cải biến này khi được thử nghiệm trong các mô hình *in vitro* và *in vivo* khác nhau thể hiện các đặc tính ngăn ngừa miễn dịch rất tiềm năng. Cụ thể là, INX021 có tiềm năng ngăn ngừa miễn dịch thể dịch, EAE và nó tạo dung nạp khác loài hoặc việc không phản hồi kháng nguyên đặc hiệu tế bào T kéo dài. Như được thể hiện

dưới đây, INX021 tạo ra tiềm năng ức chế mạnh hơn sự hoạt hóa tế bào B được dẫn bởi CD154 tế bào T khi so sánh với IDEC-131.

Do đó, kháng thể cải tiến (khi được so sánh với IDEC-131):

- (i) thể hiện ái lực gắn với CD154 ở người lớn gấp 5 lần so với IDEC-131,
- (ii) nó tạo ra các hoạt động ngăn ngừa miễn dịch tiềm năng hơn khi so với IDEC-131,
- (iii) giống như IDEC-131 nó ngăn ngừa miễn dịch (thể dịch) T và B, ví dụ nó ngăn ngừa EAE và nó tạo ra sự dung nạp khác loài, và
- (iv) nó biểu hiện độ an toàn được cải thiện khi so sánh với IDEC-131 do các đột biến trong vùng Fc mà giảm bớt đáng kể liên kết FcR và C1q và kết quả là nó không biểu hiện bất kỳ hoạt động tiền huyết khối có thể phát hiện nào in vitro hoặc in vivo trên các tiểu cầu của người và chuột.

Dựa vào các đặc tính được kết hợp này đối tượng kháng thể kháng CD154 người là hoàn toàn phù hợp để sử dụng trong liệu pháp cho con người do nó biểu hiện độ an toàn được tăng cường và có tiềm năng hơn và do đó có hiệu quả hơn so với IDEC-131. Được dự đoán rằng ái lực gắn được tăng cường của kháng thể này sẽ tạo điều kiện cho việc sử dụng nó qua liệu tiêm dưới da. Việc này là có lợi bởi tiềm năng sử dụng của nó trong việc điều trị các mục tiêu chữa bệnh mạn tính ở người.

Ngoài ra, vì kháng thể đối tượng nguyên vẹn, nghĩa là, chứa đầy đủ độ dài của IgG1, nên nó có thể thể hiện được động học và các ưu điểm về độ an toàn với Pegylated Fab đang được phát triển bởi hãng Biogen/UCB và với kháng nguyên đặc hiệu CD154 đang được phát triển bởi hãng Bristol Meyers Squibb.

Ngoài ra, do kháng thể đối tượng thể hiện tiềm năng cao hơn, việc này còn có thể giúp tăng cường độ liều nên kháng thể có thể được dùng ít thường xuyên hơn. Điều này là quan trọng do hầu hết các ứng dụng của kháng thể đối tượng là dùng để điều trị các đích điều trị tự miễn ở người mạn tính, dị ứng hoặc viêm trong đó liều lặp lại sẽ là cần thiết cho bất kỳ khuôn khổ điều trị có hiệu quả nào. Cụ thể là, kháng thể cải tiến là hoàn toàn phù hợp cho các điều trị trong đó việc ngăn ngừa miễn dịch tế bào B hoặc T là việc trị liệu mong muốn.

Do đó, trong đơn sáng chế này tác giả đề xuất các kháng thể kháng CD154 người được người hóa được cải tiến và có tính mới để sử dụng trong điều trị miễn dịch ở người có ái lực được và các đặc tính được động học khác được cải thiện, mà không tạo độc tính cho các bệnh nhân là con người, cụ thể là các kháng thể này không tạo ra sự kết tụ tiểu cầu hoặc sự kiện huyết khối ở các đối tượng con người, và hơn nữa, do khả năng không gắn và bổ sung hoạt hóa của chúng, chúng không gián tiếp gây độc tế bào mà trung gian từ ADCC hoặc CDC. Như được thể hiện trong các ví dụ kháng thể cải tiến thể hiện các đặc tính được động học và chức năng được cải thiện đáng kể liên quan đến IDEC131 và với một kháng thể CD154 khác được sử dụng trước đây trong liệu pháp ở người. Do đó, kháng thể này thể hiện các lợi ích lâm sàng khi được sử dụng trong liệu pháp ở người.

Trong khi kháng thể cải tiến INX021 chứa 2 đột biến mà tương ứng giảm bớt việc gắn FcR γ 2 và 3, và việc gắn C1q, còn được hình dung thêm rằng các đột biến khác trong vùng Fc có thể được bổ sung mà có thể làm giảm bớt thêm nữa việc gắn với các thụ thể Fc khác hoặc các chức năng tác động thay thế hoặc bổ sung khác. Các ví dụ về các đột biến này đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực, ví dụ, Shields RL, Namenuk AK, Hong K, và cộng sự, "High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for Fc for Fc γ RI, Fc for Fc γ RII, Fc for Fc γ RIII, and FcRn" báo cáo về thiết kế các biến thể IgG1 với việc gắn vào Fc cho Fc γ R được giảm. *J Biol. Chem.* 2001; 276: 6591-604) Ngoài ra, các tài liệu US20070237767 và US20100104564) mô tả sự phát sinh đột biến Fc để loại trừ việc gắn FcR. Ngoài ra, các đột biến Fc cụ thể và các hiệu quả của nó được liệt kê trong bảng từ 1 đến 3 dưới đây. Các đột biến này chỉ nhằm mục đích ví dụ mà không loại trừ các đột biến và các tổ hợp khác của nó đã được biết đến là thúc đẩy hoặc suy yếu các chức năng tác động Fc ví dụ như việc gắn FcR, gắn bổ sung, sự glycosyl hóa, hoạt động ADCC, hoạt động CDC, việc gắn FcRn, trong số các loại khác.

Bảng 1 (từ Shields và cộng sự, "High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for Fc for Fc γ RI, Fc for Fc γ RII, Fc for Fc γ RIII, and FcRn", *J Biol Chem* 2001; 276: 6591-604.

Đột biến Fc	Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIIa	FcRn
E233P	0,12	0,08	0,12	0,04	0,54

D265A	0,16	0,07	0,13	0,09	1,23
D265N		0,02	0,03	0,02	
D270N		0,03	0,05	0,04	
N297A	0,15	0,05	0,1	0,03	0,8
S298N		0,05	0,08	0,06	
P329A	0,48	0,08	0,12	0,21	0,8
D270A	0,76	0,06	0,1	0,14	1,05

Bảng 2 (từ US20100104564)

Đột biến Fc	FcγR I	FcγRIIa (H131)	FcγRIIa (R131)	FcγRII b	FcγRIIIa (V158)	FcγIIIa (F158)
K326V	0,52	0,01	0,01	0,02	0,87	2,34
V369R	0,79	0,01	0,02	0,03	0,93	1,64
F405K	1,52	0,02	0,02	0,02	1,08	2,55
L410P	1,27	0,01	0,01	0,01	0,99	1,75
V427R	1,69	0,03	0,05	0,03	1,27	0,59

Bảng 3 (từ US20070237767)

Biến thể #	Đột biến Fc	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIc	FcγRIIIa	C1q	FcRn
113	L234N	0,1	0,19	2,05		0,49	1,18	1,06

744	G237M	0,07	0,14	0,57	0,66	0,1	1,8	1,74
88	S239F	0,28	0,02	0,33		0,1	0,95	0,85
826	V262E	1,03	0,16	0,92	36,47		2,85	9,27
76	V264F	0,43	0,05	0,22		0,06	1,87	1,07
143	V266T	0,28	0,1	0,16	0,18		1,21	0,53
228	S267N	0,72	0,08			0,27	3,18	0,85
148	E269R	0,07	0,07	0,13	0,06	0,05	1,15	0,72
779	N286E		0,07	0,38	0,37	0,01	0	2,12
858	N297R	0,01	0,01	0,01	0,06	0,01		0,45
80	T299A	0,01	0,1	0,56	72,84	0,06	2,31	0,82
870	R301D	0,87	0,11	0,06	0,04	0,03	1,58	0,5
84	N325L	0,42	0,04	1,46		0,03	2,18	0,91
161	N325E	1,34	0,09	0,05	0,03	<0,02	0,86	0,55
473	L328R	0,07	0,1	0,88	0,37	0,11	1,21	1,82

Dựa vào kết hợp này về độ an toàn, các đặc tính dược động học và chức năng, các kháng thể CD154 IgG1 kháng nhân được người hóa cải tiến này có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các tình trạng trong đó việc ngăn ngừa hoạt hóa, biệt hóa và tăng sinh tế bào T và/hoặc B là được mong muốn để điều trị ví dụ như các tình trạng dị ứng, tự miễn, cấy ghép (cấy ghép mô, tế bào, cơ quan cùng loài hoặc khác loài) và viêm. Các ví dụ cụ thể không nhằm giới hạn của chúng bao gồm ví dụ như bệnh đa xơ cứng, lupus ban đỏ hệ thống (SLE), các dạng lupus khác, giảm lượng tiểu cầu tự miễn (ITP), ghép thận, ghép da và mô đảo, viêm khớp dạng thấp, bệnh sáo, viêm khớp vẩy nến, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, COPD, hen, tiểu đường, viêm tuyến giáp, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, cấy ghép tế bào gốc sinh huyết hoặc tủy xương (BM), và vữa xơ động mạch. Một số

biến thể khác bao gồm INX021 cũng thể hiện hiệu quả tiềm năng, bao gồm khả năng tạo dung nạp *in vivo*.

Như được chứng minh bằng dữ liệu thử nghiệm ứng dụng được chiêm nghiệm cụ thể của các kháng thể cải tiến bao gồm INX021 là để giảm bớt hoặc ngăn ngừa các phản ứng kháng thuốc, đặc biệt các phản ứng tạo việc chống lại các thuốc khác và các vật chất sinh học ví dụ như các kháng thể điều trị, các protein dung nạp, các hormone, các tác nhân sinh trưởng, các enzym, các peptit, các chất kháng sinh, các chất kháng vi rút, và tương tự. Việc này giúp các thuốc này có thể được dùng trong khoảng thời gian được kéo dài hơn, có thể tăng số lượng bệnh nhân phản ứng với thuốc, và/hoặc có thể tạo điều kiện cho hiệu quả đối với các bệnh nhân được điều trị bằng thuốc.

Như được thảo luận ở đây, các điểm khác trong vùng Fc của IgG1 của người và các miền hằng định khác ở người là đã được biết đến là tham gia vào việc gắn bổ sung và/hoặc việc hoạt hóa cũng như việc gắn FcR. Theo đó, các đột biến được mô tả là ví dụ về các đột biến thích hợp trong vùng Fc của IgG1 hoặc IgG3 hoặc các kháng thể khác mà có kết quả là việc mất một hoặc cả hai sự gắn bổ sung và gắn FcR.

Việc tạo dung nạp hoặc các hiệu quả ngăn ngừa miễn dịch (T hoặc B) được kéo dài của các biến thể α CD154 đột biến gắn bổ sung hoặc các biến thể của nó có thể được đánh giá trong mẫu đã được nghiên cứu kỹ về những trường hợp sống sót sau cấy ghép da không tương thích haplo, trong đó sự dung nạp dài hạn được tạo ra bằng cách sử dụng α CD154 và kháng nguyên allo. Tuy nhiên, các mô hình dung nạp khác có thể được sử dụng thay thế để thể hiện khả năng thiếu hụt bổ sung α CD154 và/hoặc các biến thể thiếu hụt FcR (chứa vùng Fc được đột biến) để tạo dung nạp.

Các hoạt động huyết khối của FcR được đột biến α CD154 có thể được thử nghiệm trên mô hình chuột biểu hiện thụ thể Fc γ RIIA ở người mà sản sinh ra các sự kiện quan sát thấy trong (Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. và Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge". *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594). Trong loài chuột như vậy, điều trị bằng α CD154 (CD154 kháng chuột) gây ra

thuyên tắc phổi; do đó sự giảm về việc gắn FcR trong các kháng thể kháng CD154 chứa các vùng Fc đột biến ở người (các miền hằng định IgG1 được đột biến) loại trừ hoặc giảm bớt đáng kể sự tạo thành các huyết khối. Sử dụng mô hình này hoặc các mô hình có thể so sánh các hiệu quả của các biến dạng Fc cụ thể về độc tính liên quan đến liệu pháp α CD154 có thể được xác định.

Một lần nữa, các kháng thể đặc hiệu CD154 được đột biến của sáng chế mà có nguồn gốc từ IDEC-131, có thể được sử dụng để điều trị và dự phòng tình trạng bất kỳ trong đó sự chống lại các hiệu quả của CD154 bao gồm tạo tín hiệu CD154/CD40, hoặc chặn hoặc ngăn ngừa việc gắn CD154 với CD40 là có hiệu quả điều trị, và có thể giảm bớt các triệu chứng của bệnh. Các ví dụ của nó bao gồm điều trị dị ứng, tự miễn, ung thư, cấy ghép, GVHD, viêm và các tình trạng khác, đặc biệt là các điều kiện trong đó sự làm dung nạp và/hoặc sự ngăn ngừa miễn dịch thể dịch hoặc miễn dịch tế bào T là được mong muốn để điều trị. Các ví dụ cụ thể bao gồm bệnh đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, viêm tuyến giáp, lupus ban đỏ, giảm lượng tiểu cầu tự miễn, tiểu đường, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, liệu pháp tế bào, cơ quan và cấy ghép mô, ví dụ, da, thận, tụy, tủy xương, vữa xơ động mạch, và các tình trạng khác ở đó việc ngăn ngừa tế bào T hoặc dịch thể là mong muốn.

Các kháng thể đối tượng mà nhắm đến CD154 thể hiện các đặc tính an toàn được cải thiện là có tiềm năng điều trị lớn do CD154 là mục tiêu cực kỳ hấp dẫn cho việc can thiệp miễn dịch trong phổ rộng lớn của tự miễn dịch, và các bệnh liên quan đến mảnh ghép. Tất cả các mô hình ảo của bệnh tự miễn ở chuột được thử nghiệm cho đến nay được cải thiện điều trị bằng điều trị α CD154. Ngoài việc chặn tương tác CD154-CD40 đơn giản, liệu pháp α CD154 dẫn đến việc tạo sự dung nạp miễn dịch (Ngăn ngừa sự đào thải mô ghép bằng cách chặn các tương tác CD40-CD154 đã được báo cáo nhiều lần để tạo ra sự dung nạp dài hạn với da, Gordon, E. J., Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Rossini, A. A. và Greiner, D. L., "Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody", *Diabetes* 1998. 47: 1199-1206; Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. và Rossini, A. A., "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand", *Transplantation*

1997. 64: 329-335; Jarvinen, L. Z., Blazar, B. R., Adeyi, O. A., Strom, T. B. và Noelle, R. J., "CD154 on the surface of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance", *Transplantation* 2003. 76: 1375-1379; Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. và Noelle, R. J., "Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation", *Blood* 2003. 102: 1920-1926; Frleta, D., Lin, J. T., Quezada, S. A., Wade, T. K., Barth, R. J., Noelle, R. J. và Wade, W. F., "Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice" *J Immunother* 2003. 26: 72-84; Quezada, S., Eckert, M., Schned, A., Noelle, R. J. và Burns, C., "Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis" *Arth Rheum.* 2003.; Elster, E. A., Xu, H., Tadaki, D. K., Montgomery, S., Burkly, L. C., Berning, J. D., Baumgartner, R. E., Cruzata, F., Marx, R., Harlan, D. M. và Kirk, A. D., "Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates, *Transplantation*", 2001. 72: 1473-1478, các mô đảo (Benda, B., Ljunggren, H. G., Peach, R., Sandberg, J. O. và Korsgren, O., "Co-stimulatory molecules in islet xenotransplantation: CTLA4Ig treatment in CD40 ligand-deficient mice", *Cell Transplantation* 2002. 11: 715-720) tủy xương (Wekerle, T. và Sykes, M., "Mixed chimerism and transplantation tolerance", *Annual Review of Medicine* 2001, 52: 353-370), và vô số các cơ quan được cấy ghép khác (Camirand, G., Caron, N. J., Turgeon, N. A., Rossini, A. A. và Tremblay, J. P., "Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation", *Transplantation* 2002. 73: 453-461; Tung, T. H., Mackinnon, S. E. và Mohanakumar, T., "Long-term limb allograft survival using anti-CD154 antibody in a murine model", *Transplantation*" 2003. 75: 644-650). Hơn thế nữa, α human CD154 trong NHP đã thể hiện tạo dung nạp dài hạn với các cấy ghép da cùng loài.

Phần mô tả chung về các phương pháp mới để sản xuất các kháng thể cải tiến

Phương pháp ví dụ để tổng hợp các kháng thể cải tiến

ADN mã hóa V_H và V_L của α murine CD154 hoặc IDEC-131 loài hamster hoặc biến thể như được bộc lộ ở đây được nhân bản và được dung hợp với ADN mã hóa vùng γ 1 CH1, CH2, CH3 ở người hoặc với các biến thể IgG1 được bộc lộ ở đây. Các trình tự

nucleotit được thay xác định sử dụng máy phân tích trình tự Megabace™. Vector biểu hiện plasmit, pEE12 chứa cả chuỗi nặng và nhẹ của mỗi biến thể MR1 được biến nạp vào các tế bào NS0 và các sản phẩm được tinh sạch bởi phép sắc ký tế bào A.

Việc gắn các kháng thể cải tiến vào CD154

So sánh với hoạt động gắn các biến thể kháng thể CD154 được xác định bằng việc gắn chúng với các tế bào CHO được chuyển nhiễm với CD154 của chuột. Các tế bào CHO biểu hiện CD154 sẽ được ủ với α CD154 được dán nhãn biotin với sự có mặt của các biến thể chuỗi nặng α CD154 không được dán nhãn hoặc các kháng thể được tương thích isotype trong 1 giờ ở 4°C. Việc gắn MR1 được biotin hóa sẽ được phát hiện sử dụng chất có huỳnh quang được liên hợp streptavidin và việc đo lường tế bào trôi sẽ được thực hiện. Phần trăm ức chế bởi các biến thể có thể được xác định bằng việc ghi lại các suy giảm bằng cường độ huỳnh quang của các tế bào MR1 được nhuộm.

Thời gian bán hủy kháng thể sử dụng ELISA

ELISA hoặc Biacore có thể được sử dụng để xác định thời gian bán hủy *in vivo* của các biến thể α human IgG1. Các nồng độ huyết thanh của hIgG1 có thể được xác định tại thời gian được thiết đặt, ví dụ, 1 tháng sau khi dùng.

Việc gắn các biến thể vào các FcR.

Việc gắn biến thể IgG1 mAbs vào FcR có thể được xác định bởi thử nghiệm pha rắn. Các đĩa Briefly, Maxisorb ELISA có thể được phủ bằng Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, hoặc Fc γ RIIIA ở người hoặc chuột (Các hệ thống R & D). Các phiên bản được biotinyll hóa của các biến thể có thể được sản xuất. Việc gắn có thể được xác định bằng việc phát hiện màu sử dụng avidin được gắn enzym. Sự suy giảm việc gắn được xác định cho cải biến được so sánh với nguyên tử WT.

Việc gắn α CD154 mAbs vào C1q ở người

Việc này có thể được tác động sử dụng các phương pháp đã biết hoặc như được mô tả ở đây. C1q của người đã được tinh sạch có thể được chia vào các giếng trong đó các biến thể IgG1 của MR1 hoặc IDEC-131 đã được hấp thụ trên các đĩa Maxisorb ELISA. Liên kết C1q sẽ được phát hiện với kháng C1q HRP của gà. Tất cả các biến thể sẽ được so sánh với

việc gắn của C1q lên WT IgG1 MR1, như được mô tả (Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. và Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge", *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594.; và Taylor, P. A., Lees, C. J., Wilson, J. M., Ehrhardt, M. J., Campbell, M. T., Noelle, R. J. và Blazar, B. R., "Combined effects of calcineurin inhibitors or sirolimus with anti-CD40L mAb on alloengraftment under nonmyeloablative conditions", *Blood* 2002. 100: 3400-3407).

Tạo dung nạp với α CD154 mAbs đột biến.

Khả năng của thể kháng CD154 để tạo dung nạp hoặc ngăn ngừa miễn dịch kéo dài có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết và được mô tả cụ thể ở đây. CD154 kháng chuột ở hamster mà được sản xuất trong phòng thí nghiệm của chúng tôi MR1 tạo ra hàng ngày dung nạp mảnh ghép dài hạn, như chúng tôi đã thể hiện (Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. và Noelle, R. J., "Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation", *Blood* 2003. 102: 1920-1926; Quezada, S. A., Bennett, K., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Sakaguchi, S. và Noelle, R. J., "Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy và immune regulation", *J Immunol* 2005. 175: 771-779; Rossini, A. A., Parker, D. C., Phillips, N. E., Durie, F. H., Noelle, R. J., Mordes, J. P. và Greiner, D. L., "Induction of immunological tolerance to islet allografts", *Cell Transplant* 1996. 5: 49-52).

Dung nạp được tạo ra bằng cách dùng chung kháng thể cùng loài (dưới dạng các tế bào lách được hiến) và α CD154. Đã được thể hiện rằng dạng IgG1 được người hóa của MR1 cũng tạo dung nạp mảnh ghép 24, và do đó biến thể WT γ 1 sẽ đóng vai trò là đối chứng dương cho việc tạo dung nạp. Các phiên bản đột biến của MR1 mà đã mất khả năng bổ sung gắn sẽ được kiểm tra khả năng tạo dung nạp mảnh ghép.

Việc ghép da được thực hiện là cải biến của kỹ thuật được sử dụng bởi Markees và cộng sự (12). Một cách ngắn gọn, chuột CB6F1 đực đủ độ tuổi sẽ được sử dụng làm đối tượng hiến cả các tế bào lách (DTS) và các mảnh ghép da. Chuột C57BL/6 là đối tượng

nhận sẽ được tiêm 500 μ L dung dịch muối được cân bằng Hanks chứa hoặc không chứa 5×10^7 DST tế bào bằng cách tiêm ở mạch tai (tiêm tĩnh mạch) và 500 μ g WT hoặc α CD154 đột biến hoặc immunoglobulin đối chứng, hamster hoặc người, (HIgG1) trong hỗn hợp nước muối đệm phosphat (PBS) trong màng bụng vào các ngày 3, 5 và 7. Chuột sẽ được điều trị với kháng thể phù hợp (250 μ g/ lần tiêm) 3 lần mỗi tuần, sau đó trong khoảng thời gian thử nghiệm. Vào ngày 0, chuột nhận sẽ được gây mê bằng 50 μ g mỗi trong số ketamin và xylazin được tiêm trong màng bụng mỗi gam trọng lượng cơ thể (15 mg/mL trong PBS), và các mảnh ghép da CB6F1 sẽ được chuẩn bị sử dụng các phương pháp đã được thiết lập. Sự đào thải sẽ được xác định vào ngày còn lại ít hơn 20% số mảnh ghép da. Các động vật sẽ được đánh giá về hiện tượng không tiếp nhận ghép da trong 100 ngày. Ngoài ra, đối với mỗi nhóm dung nạp, các mảnh ghép da sẽ được lấy vào ngày 100 và được đánh giá bằng phương pháp mô học về xâm nhập bạch cầu và được chấm điểm dựa vào số lượng tế bào/khu vực được đo. Cuối cùng, việc cấy ghép bên thứ ba (da H-2K) sẽ được cấy ghép trên chuột đã được tạo dung nạp (trên các nhóm được chọn) để đảm bảo rằng sự dung nạp được tạo ra là đặc hiệu kháng nguyên, như đã được công bố trước đây trong hệ thống này (Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. và Rossini, A. A., "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand", *Transplantation* 1997. 64: 329-335, Markees, T., Phillips, N., Gordon, E., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. và Rossini, A. A., "Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody", *Transplant Proc* 1998. 30: 2444-2446; Markees, T. G., Appel, M. C., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. và Rossini, A. A., "Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation", *Transplantation Proceedings* 1996. 28: 814-815) của miễn dịch thể dịch với α CD154 mAbs đột biến.

Ngoài việc đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung và các đột biến FcR với sự dung nạp, ảnh hưởng của việc điều trị kháng thể với sự phát triển của các phản hồi miễn dịch thể dịch sơ cấp và thứ cấp cũng sẽ được thử nghiệm như được mô tả từ trước. Một cách sơ lược, chuột (4 cá thể một nhóm) sẽ được tạo miễn dịch với ovalbumin của gà trên CFA (200 μ g/chuột) và được điều trị bằng các biến thể MR1 (200 μ /chuột x 3 lần/tuần). Vào các ngày

7, 14 và 21, IgM và IgG kháng OVA sẽ được đo bằng các kháng OVA ELISA được chuẩn hóa và các nồng độ huyết thanh của kháng OVA sẽ được định lượng.

Các nghiên cứu về độc tính với α CD154 mAbs cải tiến.

Hoạt động tạo huyết khối của α CD154 đã được minh họa trên mô hình chuột sử dụng chuột mà biểu hiện Fc γ RIIA ở người. Mô hình này song song với các phát hiện về độc tính trong NHP sử dụng cả các dạng được aglycosylat hóa và dạng nguyên vẹn của kháng CD154 người. Một cách sơ lược, chuột sẽ được tiêm các phức hợp miễn dịch (IC) được thể hiện của sCD154 (các hệ thống R & D) và mỗi biến thể của α CD154 (138 μ g mAb và 50 μ g Ag, xấp xỉ 500nM IC ở tỷ lệ hóa học lượng pháp 1:3 (mAb/Ag)). Sau khi tiêm, nếu hỗn hợp tan huyết khối, chuột sẽ biểu hiện hiện tượng mất phương hướng, thờ ơ, và khả năng chuyển động bị hạn chế kéo dài. Việc này thể hiện rằng hoạt động này sẽ khiến giảm đáng kể lượng tiểu cầu. Sau 60 phút, phổi sẽ được thu thập, được cố định bằng formalin, phẫu thuật và được nhuộm H&E. Các phần phổi của chuột sẽ được đánh giá để đưa ra các bằng chứng về chứng huyết khối (như được đo bằng huyết khối nội mạch) và số lượng huyết khối/phần sẽ được đếm. Đối với mỗi chuột, 10 phần sẽ được đếm và tổng số huyết khối được so sánh chéo giữa tất cả các nhóm được điều trị bằng các biến thể IgG1 MR1 khác nhau. Ngoài ra, tổng lượng tiểu cầu (được thu thập bằng cách châm kim tại thời điểm gây chết), sẽ được đánh giá bằng cách đo lường tế bào trôi, và được mong đợi là giảm đến 80% sử dụng các kháng thể này mà tạo huyết khối. Các tìm kiếm này sẽ xác định biến thể MR1 nào (việc gắn FcR (N325L, K326V, E269R) tạo huyết khối và nếu sự thay thế việc gắn FcR thay thế hoạt động này.

Việc chặn sự phát triển của bệnh tự miễn có nguồn gốc từ tế bào T, viêm não tủy tự miễn thử nghiệm (EAE).

Chuột C57BL/6 cái từ 5 đến 8 tuần tuổi sẽ được tạo miễn dịch dưới da bằng 200 μ g MOG35–55 peptit được nhũ tương hóa trong CFA được bổ sung 5 mg/ml khuẩn mycobacterium tuberculosis. Chuột sẽ được tiêm ở ổ bụng 250 ng độc tố pertussis tại thời điểm tạo miễn dịch và 48 giờ sau. Sau 7 ngày, chuột sẽ nhận liều miễn dịch tăng cường giống hệt với MOG/CFA mà không có độc tố pertussis. Bệnh lâm sàng thường đến giữa ngày 16 và ngày 20 sau khi tạo miễn dịch. Chuột sẽ được dùng mỗi trong số các biến thể

MR1, IgG người (là đối chứng cho các biến thể), Ig hamster (là đối chứng cho MR1) hoặc MR1 hamster (200 µg/chuột 3x/tuần) trong suốt thời gian thử nghiệm (50 ngày).

Đánh giá lâm sàng. Chuột sẽ được chấm điểm bốn lần mỗi tuần như sau: 0, không phát hiện các dấu hiệu của EAE; 0,5, đuôi vẩy yếu; 1, đuôi hoàn toàn yếu; 1,5, đuôi và chi sau yếu; 2, liệt đơn phương chi sau một phần; 2,5, liệt song song chi sau một phần; 3, liệt song song chi sau hoàn toàn; 3,5, liệt chi sau hoàn toàn và liệt chi trước đơn phương; 4, hoàn toàn liệt cả chi trước và chi sau; 5, tử vong. Chuột chấm điểm lớn hơn 4 nhưng nhỏ hơn 5 sẽ được gây chết nhân đạo.

Sự xác định độc tính

Kháng thể mong muốn theo sáng chế không có độc tính hoặc độc tính được giảm mạnh trong mô hình huyết khối động vật. Sử dụng các mô hình được mô tả ở trên, sẽ thể hiện rằng các kháng thể IgG1 kháng CD154 trong đó chuỗi nặng của các miền hằng định chứa đột biến E269R và đột biến K322A (theo thang điểm Kabat) không tạo sự kết tụ tiểu cầu.

Sự xác định về công hiệu

Công hiệu (việc tạo sự dung nạp) sẽ được thử nghiệm trong các mô hình dung nạp mảnh ghép da như được mô tả ở trên.

Các ứng dụng chẩn đoán và dược phẩm của kháng thể kháng hCD154 cải tiến

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154, hoặc dược phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn phản hồi miễn dịch trong đối tượng. Kháng thể theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế, được sử dụng cho đối tượng với lượng ngăn chặn hiệu quả.

Trong các phương án nhất định, "lượng ngăn chặn hiệu quả" của kháng thể kháng CD154, hoặc dược phẩm chứa kháng thể, là lượng bất kỳ mà có hiệu quả khi ngăn chặn tương tác CD154-CD40 trong đối tượng mà nó được dùng với. Các phương pháp xác định "lượng ngăn chặn" là đã được biết đến bởi chuyên gia trong lĩnh vực và phụ thuộc vào các tác nhân bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: loại đối tượng tham gia, kích thước và tuổi của đối tượng, và các đặc tính dược động học của tác nhân điều trị cụ thể được cung cấp.

Trong một phương án cụ thể hơn theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn phản hồi miễn dịch bằng cách ngăn chặn tương tác CD154-CD40.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn viêm. Đối với các mục đích theo sáng chế, các phản hồi viêm được tạo khác biệt ở đỏ, sưng, nóng và đau, là các hậu quả của dẫn nở mao mạch do phù và sự di chuyển của các bạch cầu thực bào. Một số ví dụ về phản hồi viêm bao gồm: viêm khớp, viêm da tiếp xúc, hội chứng hyper-IgE, bệnh viêm ruột, hen dị ứng, và bệnh viêm tự phát. Bệnh viêm tự phát bao gồm, ví dụ, bệnh vẩy nến và lupus (ví dụ, lupus ban đỏ hệ thống (SLE), lupus ban đỏ do thuốc gây ra, và viêm thận). Xem, ví dụ, Gallin 1989. *Fundamental Immunology*, Chapter 26, Raven Press, 2d Ed., pp. 721-733, New York. Sáng chế này đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa triệu chứng của lupus ban đỏ hệ thống (SLE) trong cá thể, phương pháp bao gồm bước dùng kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, cho cá thể với lượng hiệu quả để điều trị hoặc ngăn ngừa triệu chứng SLE.

Một số ví dụ về viêm khớp bao gồm: viêm khớp dạng thấp, viêm khớp không phải dạng thấp, viêm khớp liên quan đến bệnh Lyme và viêm xương khớp. Một số ví dụ về bệnh viêm tự phát bao gồm: bệnh vẩy nến và lupus toàn thân. Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn sự đào thải cơ quan được cấy ghép bởi đối tượng.

Trong một phương án cụ thể hơn theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn sự đào thải đối tượng tim, thận, gan, da, các tế bào đảo tụy hoặc tủy xương.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ trong đối tượng.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn các phản hồi dị ứng, trong đối tượng--ví dụ, hay sốt hoặc dị ứng với penicillin hoặc các thuốc khác.

Trong một phương án đối tượng các kháng thể kháng CD154 bao gồm INX021 là hữu dụng để giảm bớt hoặc ngăn ngừa các phản ứng kháng thuốc, đặc biệt là các phản ứng chống lại các vật chất sinh học và các thuốc khác ví dụ như các kháng thể trị liệu, các protein dung nạp, các hormone, các tác nhân sinh trưởng, các enzyme, các peptit, các chất kháng sinh, các chất kháng vi rút, và tương tự. Việc này có thể cho phép các thuốc này được dùng với thời gian kéo dài hơn, có thể tăng số lượng bệnh nhân phản ứng với thuốc, và/hoặc có thể tạo điều kiện cho công hiệu của thuốc với các bệnh nhân được điều trị bằng thuốc. Các ví dụ về chúng đã được biết đến trong lĩnh vực bao gồm Humira, Enbrel, Rituxan, Xolair, Herceptin, và Avastin.

Các ví dụ khác về các kháng thể trị liệu trong đó các kháng thể kháng CD154 đối tượng có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc làm giảm nhẹ phản ứng kháng thuốc bao gồm các kháng thể dưới đây: 3F8, 8H9, Abagovomab, Abciximab, Abituzumab, Abrilumab, Actoxumab, Adalimumab, Adecatumumab, Aducanumab, Afasevikumab, Afelimomab, Afutuzumab, Alacizumab pego, ALD518, Alemtuzumab, Alirocumab, Altumomab pentetate, Amatuximab, Anatumomab mafenatox, Anetumab ravtansine, Anifrolumab, Anrukinzumab, Apolizumab, Arcitumomab, Ascrinvacumab, Aselizumab, Atezolizumab, Atinumab, Atlizumab (= tocilizumab), Atorolimumab, Avelumab, Bapineuzumab, Basiliximab, Bavituximab, Bectumomab, Begelomab, Belimumab, Benralizumab, Bertilimumab, Besilesomab, Bevacizumab, Bezlotoxumab, Biciromab, Bimagrumab, Bimekizumab, Bivatuzumab mertansine, Bleselumab, Blinatumomab, Blontuvetmab, Blosozumab, Bococizumab, Brentuximab vedotin, Briakinumab, Brodalumab, Brolucizumab, Brontictuzumab, Cabiralizumab Canakinumab, Cantuzumab mertansine, Cantuzumab ravtansine Caplacizumab, Capromab pendetide Carlumab Carotuximab, Catumaxomab, CBR96-doxorubicin immunoconjugate, Cedelizumab, Cergutuzumab amunaleukin, Certolizumab pegol, Cetuximab, Ch.14.18, Citatuzumab bogatox, Cixutumumab, Clazakizumab, Clenoliximab, Clivatuzumab tetraxetan, Codrituzumab, Coltuximab ravtansine, Conatumumab, Concizumab, Crenezumab, Crotedumab, CR6261, Dacetuzumab, Daclizumab, Dalotuzumab, Dapirolizumab pegol, Daratumumab, Dectrekumab, Demcizumab, Denintuzumab mafodotin, Denosumab, Derlotuximab biotin, Detumomab, Dinutuximab, Diridavumab, Dapirolizumab pegol, Daratumumab,

Dectrekumab, Demcizumab, Denintuzumab mafodotin, Denosumab, Derlotuximab biotin,
 Detumomab Dinutuximab, Diridavumab Domagrozumab, Dorlimomab aritox, Drozitumab,
 Duligotumab Dupilumab Durvalumab Dusigitumab, Echromeximab, Eculizumab,
 Edobacomab, Edrecolomab, Efalizumab, Efungumab, Eldelumab, Elgemitumab,
 Edrecolomab, Efalizumab, Efungumab, Eldelumab, Elgemitumab, Elotuzumab,
 Elsilimomab, Emactuzumab, Emibetuzumab, Emicizumab, Enavatuzumab, Enfortumab
 vedotin, Enlimomab pegol, Enoblituzumab, Enokizumab, Ensituximab, Epitumomab
 cituxetan, Epratuzumab, Erlizumab, Ertumaxomab, Etaracizumab, Etrolizumab,
 Evinacumab, Evolocumab, Exbivirumab, Fanolesomab, Faralimomab, Farletuzumab
 FBTA05, Felvizumab, Fezakinumab, Fibatuzumab, Ficlatuzumab, Figitumumab,
 Firivumab, Flanvotumab, Fletikumab, Fontolizumab, Foralumab, Foravirumab,
 Fresolimumab, Fulranumab, Futuximab, Galcanezumab, Galiximab, Ganitumab,
 Gantenerumab, Gavilimomab, Gemtuzumab, ozogamicin, Gevokizumab, Girentuximab,
 Glembatumumab, vedotin, Golimu, Gomiliximab, Guselkumab, Ibalizumab, Ibritumomab
 tiuxetan, Icrucumab, Idarucizumab, Igovomab, IMAB362, Imalumab, Imciromab,
 Imgatuzumab, Inclacumab, Indatuximab ravtansine, Indusatumab vedotin, Inebilizumab,
 Infliximab, Intetumumab, Inolimomab, Inotuzumab ozogamicin, Ipilimumab, Iratumumab,
 Isatuximab, Itolizumab, Ixekizumab, Keliximab, Labetuzumab, Lambrolizumab,
 Lampalizumab, Lanadelumab, Laprituximab emtansine, Lebrikizumab, Lendalizumab,
 Lenzilumab, Lerdelimumab, Lexatumumab, Libivirumab, Lifestuzumab vedotin,
 Ligelizumab, Lilotomab satetraxetan, Lintuzumab, Lirilumab, Lodelcizumab, Lokivetmab,
 Lorvotuzumab mertansine, Lucatumumab, Lulizumab pegol, Lumiliximab, Lumretuzumab,
 Mapatumumab, Margetuximab, Maslimomab, Mavrilimumab, Matuzumab, Mepolizumab,
 Metelimumab, Milatuzumab, Minretumomab, Mirvetuximab, soravtansine, Mitumomab,
 Mogamulizumab, Monalizumab, Morolimumab, Motavizumab, Moxetumomab pasudotox,
 Muromonab-CD3, Nacolomab tafenatox Namilumab, Naptumomab estafenatox,
 Naratuximab emtansine, Narnatumab, Natalizumab, Navicixizumab,, Navivumab,
 Nebacumab, Necitumumab, Nemolizumab, Nerelimomab, Nesvacumab, Nimotuzumab,
 Nimotuzumab, Nimotuzumab, Nivolumab, Nofetumomab merpentan, Obiltoxaximab,
 Obinutuzumab, Ocaratuzumab, Ocrelizumab, Odulimomab, Ofatumumab, Olaratumab,

Olokizumab, Ontuxizumab, Opicinumab, Oportuzumab monatox, Oregovomab, Orticumab, Otelixizumab, Otlertuzumab, Oxelumab, Ozanezumab, Ozoralizumab, Pagibaximab, Palivizumab, Pamrevlumab, Panitumumab, Pankomab, Panobacumab, Parsatuzumab, Pascolizumab, Pasotuxizumab, Pateclizumab, Patritumab, Pembrolizumab, Pemtumomab, Perakizumab, Perakizumab, Pertuzumab, Pexelizumab, Pinatuzumab vedotin, Pintumomab, Placulumab, Plozalizumab, Pogalizumab, Polatuzumab vedotin, Ponezumab, Prezalizumab, Priliximab, Pritoxaximab, Pritumumab, PRO 140, Quilizumab, Racotumomab, Radretumab, Rafivirumab, Ralpancizumab, Ramucirumab, Ranibizumab, Raxibacumab, Refanezumab, Regavirumab, Reslizumab, Rilotumumab, Rinucumab, Rituximab, Rivabazumab pegol, Robatumumab, Roledumab, Romosozumab, Rontalizumab, Rovalpituzumab tesirine, Rovelizumab, Ruplizumab, Sacituzumab govitecan, Samalizumab, Sapelizumab, Sarilumab, Satumomab pendetide, Secukinumab, Seribantumab, Setoxaximab, Sevirumab, Sibrotuzumab, SGN-CD19A, SGN-CD33A, Sifalimumab, Siltuximab, Simtuzumab, Siplizumab, Sirukumab, Sofituzumab vedotin, Solanezumab, Solitomab, Sonepcizumab, Sontuzumab, Stamulumab, Sulesomab, Suvizumab, Tabalumab, Tacatuzumab tetraxetan, Tadocizumab, Talizumab, Tamtuvatmab, Tanezumab, Taplitumomab paptax, Tarextumab, Tefibazumab, Telimomab aritox, Tenatumomab, Teneliximab, Teplizumab, Teprotumumab, Teprotumumab, Tesidolumab, Tetulomab, Tezepelumab, TGN1412, Ticilimumab (tremelimumab), Tildrakizumab, Tigatuzumab, Timolumab, Tisotumab vedotin, TNX-650, Tocilizumab (atlizumab), Toralizumab, Tosatoxumab, Tositumomab, Tovetumab, Tralokinumab, Trastuzumab, Trastuzumab emtansine, TRBS07, Tregalizumab, Tremelimumab, Trevogrumab, Tucotuzumab celmoleukin, Tuvirumab, Ublituximab, Ulocuplumab, Urelumab, Urtoxazumab, Ustekinumab, Vadastuximab talirine, Vandortuzumab, Vedotin, Vantictumab, Vanucizumab, Vapaliximab, Varlilumab, Vatelizumab, Vepalimumab, Vesencumab, Visilizumab, Vobarilizumab, Volociximab, Vorsetuzumab, mafodotin, Votumumab, Xentuzumab, Zalutumumab, Zanolimumab, Zatuximab, Ziralimumab và Zolimomab aritox.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn phản hồi tự miễn dịch trong đối tượng bị bệnh tự miễn. Trong một số phương án, phản hồi tự miễn dịch liên quan đến hoặc có nguồn gốc

từ tình trạng được lựa chọn từ nhóm bao gồm: viêm khớp dạng thấp, bệnh nhược cơ năng, lupus ban đỏ hệ thống, bệnh Graves, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, thiếu máu tan huyết, đái tháo đường, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, các bệnh tự miễn do thuốc gây ra, hoặc lupus do thuốc gây ra. Trong các phương án nhất định, phản hồi tự miễn dịch liên quan đến hoặc có nguồn gốc từ lupus ban đỏ hệ thống.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn phản hồi tự miễn dịch trong đối tượng đang bị bệnh phản hồi tự miễn dịch mà có nguồn gốc từ bệnh truyền nhiễm.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn phản hồi tự miễn dịch trong đối tượng đang bị bệnh phản hồi tự miễn dịch mà có nguồn gốc từ hội chứng Reiter, viêm đốt sống, bệnh Lyme, nhiễm HIV, giang mai, hoặc lao.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn xơ hóa trong đối tượng.

Một số ví dụ về xơ hóa bao gồm: xơ hóa phổi hoặc bệnh hóa xơ. Một số ví dụ về xơ hóa phổi bao gồm: xơ hóa phổi thứ cấp với hội chứng suy hô hấp người trưởng thành, xơ hóa phổi do thuốc, xơ hóa phổi tự phát, hoặc viêm phổi quá mẫn. Một số ví dụ về bệnh hóa xơ bao gồm: Viêm gan C; viêm gan B; xơ gan; xơ gan thứ cấp với sự nhiễm độc; xơ gan thứ cấp với thuốc; xơ gan thứ cấp với nhiễm vi rút; và xơ gan thứ cấp với bệnh tự miễn.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn bệnh đường tiêu hóa. Một số ví dụ về bệnh đường tiêu hóa bao gồm: rối loạn thực quản, bệnh viêm ruột (bao gồm bệnh Crohn và viêm ruột kết mạn loét), viêm dạ dày, viêm đại tràng collagen (bao gồm viêm đại tràng lympho bào và viêm đại tràng vi mô), bệnh tiêu chảy mỡ (cũng được gọi là bệnh ruột nhạy cảm với gluten, bệnh sprue dạ dày, hoặc không dung nạp gluten), và bệnh cứng bì.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn bệnh đường máu. Một số ví dụ về bệnh đường máu bao gồm: vữa xơ động mạch, bệnh động mạch thận, phù bạch huyết, các rối loạn thiếu

máu cục bộ, và thương tật do tái chảy máu. Cũng được bao gồm là các bệnh phức hợp miễn dịch/mạch máu collagen ví dụ như lupus ban đỏ hệ thống hoặc crioglobulin huyết.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn sự gia tăng của các tế bào khối u tế bào T trong đối tượng đang bị bệnh ung thư tế bào T, ví dụ, ung thư bạch cầu tế bào T hoặc u bạch huyết. Kháng thể kháng CD154 như vậy, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể được dùng cho đối tượng với lượng hiệu quả để ngăn chặn sự gia tăng của các tế bào khối u tế bào T trong đối tượng này.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể ngăn chặn sự nhiễm vi rút của các tế bào T của đối tượng bởi vi rút gây ung thư bạch cầu tế bào T ở người loại 1 (HTLV I). Kháng thể kháng CD154 hoặc được phẩm chứa kháng thể như vậy có thể được dùng cho đối tượng với một lượng hiệu quả để ngăn ngừa nhiễm vi rút.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có khả năng tạo ảnh các tế bào ung thư hoặc các tế bào khối u trong đối tượng mà biểu hiện protein CD154 mà với nó kháng thể theo sáng chế gắn đặc hiệu vào. Phương pháp tạo ảnh các tế bào ung thư hoặc các tế bào khối u trong đối tượng bao gồm các bước: dùng cho đối tượng một lượng hiệu quả kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc chế phẩm chứa nó, trong các điều kiện cho phép sự tạo thành của các phức hợp giữa kháng thể và protein trên bề mặt của các tế bào ung thư hoặc các tế bào khối u; và tạo ảnh phức hợp protein/ kháng thể bất kỳ được tạo ra, nhờ đó tạo ảnh các tế bào ung thư hoặc các tế bào khối u bất kỳ trong đối tượng.

Trong một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể, có thể phát hiện sự có mặt của các tế bào ung thư hoặc các tế bào khối u trong đối tượng mà biểu hiện protein CD154 mà với nó kháng thể theo sáng chế gắn đặc hiệu vào. Một phương pháp để phát hiện sự có mặt của các tế bào ung thư hoặc các tế bào khối u như vậy trong đối tượng bao gồm các bước: dùng cho đối tượng một lượng hiệu quả kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa nó, trong các điều kiện cho phép sự hình thành của phức hợp giữa kháng thể và protein; xóa bất kỳ tác được

người hóa ảnh không liên quan khỏi đối tượng, và phát hiện sự có mặt của phức hợp protein/ kháng thể được tạo ra, sự có mặt của phức hợp này chỉ báo sự có mặt của các tế bào ung thư hoặc các tế bào khối u trong đối tượng.

Dược phẩm

Sáng chế này đề xuất các dược phẩm chứa protein gắn CD154, ví dụ, kháng thể kháng CD154, như được mô tả trong sáng chế này.

Trong một phương án theo sáng chế, dược phẩm chứa ít nhất một kháng thể kháng CD154, theo sáng chế.

Các kháng thể kháng CD154 cải tiến hoặc dược phẩm chứa kháng thể, không gây ra chứng huyết khối, bao gồm các sự kiện huyết khối và do đó là hoàn toàn phù hợp cho liệu pháp ở người.

Các dược phẩm như vậy có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chất mang dược dụng được chấp nhận, chất phụ trợ, phương tiện phân phối, chất đệm và/hoặc chất ổn định bất kỳ. Các kỹ thuật ví dụ để tạo thành và dùng các kháng thể theo sáng chế có thể được tìm thấy trong, ví dụ, "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., ấn bản mới nhất.

Trong một phương án cụ thể hơn theo sáng chế, chất mang dược dụng được chấp nhận là dung dịch muối đệm phosphat, dung dịch nước muối sinh lý, nước, các dung dịch xitrat/sucroza/Tween và các nhũ tương, ví dụ, các nhũ tương dầu/nước.

Trong một phương án theo sáng chế, dược phẩm có thể được phân phối trong thiết bị bao con nhộng cực nhỏ để giảm bớt hoặc ngăn ngừa phản hồi miễn dịch vật chủ chống lại chế phẩm. Các chất gắn, ví dụ như các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể theo sáng chế, cũng có thể được phân phối trong bao con nhộng cực nhỏ trong màng, ví dụ như, ví dụ, liposom hoặc phương tiện phân phối được bảo vệ miễn dịch hoặc được bọc trong bao con nhộng khác.

Trong một phương án theo sáng chế, dược phẩm có thể là ở dạng chế phẩm để tiêm tĩnh mạch, ví dụ, dịch huyền phù chứa dầu hoặc chứa nước tĩnh mạch. Dịch huyền phù này có

thể điều chế theo các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực sử dụng các tác được người hóa huyền phù, làm ướt, phân tán thích hợp.

Trong một phương án theo sáng chế, dược phẩm có thể được hấp thụ theo đường miệng, ngoài da hoặc tiêm tĩnh mạch. Khi được dùng một cách hệ thống, dược phẩm nên vô trùng, hầu như không chứa chất gây sốt và dung dịch được chấp nhận ngoài đường tiêu hóa có liên quan đến pH, tính đẳng trương, và độ ổn định. Ví dụ, dược phẩm hầu như không chứa các vật chất gây sốt sao cho phù hợp với việc dùng làm liệu pháp chữa bệnh cho người. Các điều kiện này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Trong một phương án cụ thể hơn theo sáng chế, đối với việc dùng qua đường miệng, dược phẩm được điều chế thành viên con nhộng, viên nén, dung dịch hoặc dịch huyền phù chứa nước thích hợp. Các dạng rắn của chế phẩm để dùng qua đường miệng có thể chứa các chất mang hoặc các tá dược thích hợp, ví dụ như tinh bột ngô, gelatin, lactoza, acacia, sucroza, xenluloza siêu tinh thể, kaolin, mannitol, dicanxi phosphat, canxi carbonat, natri clorua, hoặc axit alginic. Các chất phân rã mà có thể được sử dụng bao gồm, mà không giới hạn ở, xenluloza siêu tinh thể, tinh bột ngô, tinh bột natri glycolat, và axit alginic. Các chất gắn viên nén mà có thể được sử dụng bao gồm acacia, metylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza, polyvinylpyrrolidon (Povidone™), hydroxypropyl metylxenluloza, sucroza, tinh bột, và etylxenluloza. Các chất bôi trơn mà có thể được sử dụng bao gồm magie stearat, axit stearic, dịch lỏng silicon, talc, sáp, dầu, và silic oxit keo.

Trong một phương án cụ thể hơn theo sáng chế, đối với việc dùng ngoài da, các dược phẩm có thể tạo ra dưới dạng thuốc mỡ thích hợp. Một số ví dụ về dạng chế phẩm dùng ngoài da bao gồm: các giọt, cồn, nước xức, kem, dung dịch, và thuốc mỡ chứa thành phần hoạt chất và các phương tiện và các chất hỗ trợ khác.

Trong một phương án theo sáng chế, dạng thuốc mỡ bán rắn dùng ngoài da điển hình chứa nồng độ thành phần hoạt chất từ khoảng 1 đến 20%, ví dụ, từ 5 đến 10%, trong chất mang, ví dụ như kem nền dược phẩm.

Trong một phương án theo sáng chế, các dược phẩm dùng để hít và truyền qua da cũng có thể được điều chế. Dược phẩm có thể được dùng qua đường mũi hoặc phổi, ví dụ, dưới dạng xịt bột hoặc chất lỏng (được làm lạnh khô).

Trong một phương án theo sáng chế, các dạng lỏng của dược phẩm để dùng qua đường miệng được điều chế trong nước hoặc các phương tiện nước khác có thể chứa các tác dược người hóa huyền phù khác nhau ví dụ như methylxenluloza, các alginat, tragacanth, pectin, kelgin, carrageenan, acacia, polyvinylpyrrolidon, và rượu polyvinyl. Các dạng lỏng của các dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm các dung dịch, các nhũ tương, các sirô và các cồn ngọt chứa, cùng với (các) hoạt chất hoạt hóa, các tác nhân làm ướt, các chất làm ngọt, và các chất tạo màu và vị. Các dạng bột và lỏng khác nhau của các dược phẩm có thể được điều chế bằng các phương pháp thông thường để hít vào phổi của động vật có vú cần được điều trị.

Trong một phương án theo sáng chế, các dạng lỏng của dược phẩm để tiêm có thể bao gồm các chất mang khác nhau ví dụ như các dầu thực vật, dimethylaxetamit, dimethylformamit, etyl lactat, etyl carbonat, isopropyl myristat, etanol, các polyol, nghĩa là, glycerol, propylen glycol, polyetylen glycol dung dịch, và tương tự. Trong một số phương án, chế phẩm bao gồm chất mang xitrat/sucroza/Tween. Để tiêm tĩnh mạch, các phiên bản có thể hòa tan trong nước của chế phẩm có thể dùng bằng phương pháp nhỏ giọt, ở đó dược phẩm chứa chất chống nấm và tá dược sinh lý được chấp nhận được tiêm. Các tá dược sinh lý được chấp nhận có thể bao gồm, ví dụ, 5% dextrose, 0,9% nước muối, dung dịch Ringer hoặc các tá dược thích hợp khác. Dạng không tan thích hợp của chế phẩm có thể được điều chế và được dùng như dịch huyền phù trên cơ sở nước hoặc trên cơ sở dầu dược liệu được chấp nhận, ví dụ như este có axit béo chuỗi dài, ví dụ, etyl oleat.

Trong một phương án theo sáng chế, dược phẩm chứa từ khoảng 0,1 đến 90% trọng lượng (ví dụ như từ 1 đến 20% hoặc từ 1 đến 10%) kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, trong chất mang dược phẩm được chấp nhận.

Trong một phương án theo sáng chế, nồng độ tối ưu của kháng thể kháng CD154 theo sáng chế trong mỗi dược phẩm thay đổi theo mỗi dạng và hiệu quả trị liệu mong muốn trong các bệnh lý cụ thể và các khuôn khổ điều trị tương quan. Dạng dược phẩm là đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực. Các phương pháp thông thường, đã được biết ở người có trình độ trung bình trong lĩnh vực, có thể được sử dụng để dùng dược phẩm cho đối tượng.

Theo đó, các dược phẩm theo sáng chế liên quan đến các dạng giải phóng kéo dài. Giải phóng kéo dài, hoặc giải phóng kiểm soát, hoặc giải phóng chậm, là để chỉ các dạng thuốc mà giải phóng thuốc hoạt hóa, ví dụ như polypeptit hoặc thuốc kháng thể, trong một khoảng thời gian sau khi dùng cho đối tượng. Giải phóng kéo dài các thuốc polypeptit, mà có thể xảy ra trong một khoảng thời gian mong muốn (ví dụ nhiều phút, nhiều giờ, nhiều ngày, nhiều tuần hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào dạng của thuốc) khác với các dạng tiêu chuẩn trong đó hầu như toàn bộ đơn vị liều dùng là sẵn sàng cho việc hấp thụ ngay lập tức hoặc phân phối ngay lập tức qua đường máu. Các dạng giải phóng kéo dài có thể, trong các phương án nhất định, có kết quả ở mức điều hòa thuốc từ một lần dùng mà được duy trì, ví dụ, trong 8 giờ hoặc lâu hơn, 12 giờ hoặc lâu hơn, 24 giờ hoặc lâu hơn, 36 giờ hoặc lâu hơn, 48 giờ hoặc lâu hơn, 60 giờ hoặc lâu hơn, 72 giờ hoặc lâu hơn, 84 giờ hoặc lâu hơn, 96 giờ hoặc lâu hơn, hoặc thậm chí, ví dụ, trong 1 tuần hoặc 2 tuần hoặc lâu hơn, ví dụ, 1 tháng hoặc lâu hơn. Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể chứa kháng thể kháng CD154 của sáng chế.

Trong một số phương án theo sáng chế, dược phẩm ngoài ra còn chứa hợp chất điều biến miễn dịch hoặc ngăn ngừa miễn dịch khác. Ví dụ, hợp chất điều biến miễn dịch hoặc ngăn ngừa miễn dịch như vậy có thể là một trong số sau đây: tác nhân làm gián đoạn việc truyền tín hiệu đồng kích thích tế bào T qua CD28; tác nhân làm gián đoạn việc truyền tín hiệu calcineurin, corticosteroid, tác nhân chống tăng sinh, và kháng thể mà gắn đặc hiệu vào protein được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào miễn dịch, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 và RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LT β và VLA-4.

Trong một số phương án của sáng chế, hợp chất điều biến miễn dịch hoặc ngăn ngừa miễn dịch là tacrolimus, sirolimus, mycophenolate mofetil hoặc dạng hoạt hóa của nó axit mycophenolic, mizoribin, deoxyspergualin, brequinarnatri, leflunomit, rapamycin hoặc azaspiran.

Trong các phương án khác của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế hoặc các dược phẩm chứa chúng có thể được chứa trong thùng chứa, gói hoặc gói riêng hoặc là một phần của kit với các nhãn và các hướng dẫn sử dụng.

Việc dùng và các đường vận chuyển

Các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng theo cách bất kỳ mà được chấp nhận y tế. Đối với các mục đích của sáng chế, "dùng" có nghĩa là phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ để dùng kháng thể, đoạn kháng thể, hoặc dược phẩm mà đã biết bởi chuyên gia trong lĩnh vực, và không bị giới hạn ở các ví dụ đề cập ở đây.

Trong một số phương án theo sáng chế, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng bằng cách tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm tử cung, tiêm bắp, tiêm tủy sống, tiêm tâm thất, tiêm nội mạc tử cung, tiêm động mạch, tiêm mạch máu, tiêm trong khớp, tiêm trong hoạt dịch, tiêm trong xương ức, tiêm trong vỏ, tiêm trong gan, tiêm trong cột sống, tiêm trong khối u, tiêm trong hộp sọ; dùng bằng các đường ruột, đường phổi, niêm mạc, trong tử cung, hoặc dưới lưỡi, hoặc ngoài ra, ví dụ, tại các vị trí viêm hoặc nơi phát triển khối u.

Trong một số phương án theo sáng chế, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng bằng đường miệng hoặc bằng đường mũi, hoặc bằng các đường hít, mắt, trực tràng, hoặc ngoài da.

Trong phương án cụ thể hơn, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng theo đường miệng dưới dạng các viên con nhộng, các viên nén, các dung dịch hoặc dịch huyền phù chứa nước.

Trong phương án cụ thể hơn, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng ngoài da bằng cách bôi kem, thuốc mỡ hoặc tương tự.

Trong các phương án khác của sáng chế, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được dùng cho đối tượng bằng cách hít nhờ việc sử dụng thuốc xông hơi, thuốc hít bột khô hoặc ống thở liều lượng định lượng.

Trong các phương án khác theo sáng chế, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng bằng cách sử dụng giải phóng kéo dài, bằng các cách như tiêm dự trữ các cấy ghép có thể tiêu được áp dụng trực tiếp trong khi phẫu thuật hoặc bằng cách cấy ghép một bơm truyền hoặc cấy ghép giải phóng kéo dài tương thích sinh học vào đối tượng.

Trong phương án cụ thể hơn, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng bằng các đường sử dụng dự trữ có thể tiêm, ví dụ như bằng cách dùng các chất và các phương pháp có thể tiêm hoặc có thể phân hủy sinh học dự trữ 1, 3, hoặc 6 tháng.

Trong phương án cụ thể hơn, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng bằng cách dán lên da của đối tượng miếng dán chứa kháng thể, dẫn xuất kháng thể hoặc dược phẩm, và để miếng dán tiếp xúc với da của đối tượng, thông thường trong từ 1 đến 5 giờ mỗi miếng.

Trong các phương án khác của sáng chế, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng với liều bất kỳ trên mỗi trọng lượng cơ thể và tần suất liều bất kỳ mà được chấp nhận trong y học. Liều được chấp nhận bao gồm khoảng giữa 0,01 và 200 mg/kg trọng lượng cơ thể đối tượng.

Các kháng thể kháng CD154 đối tượng được dùng cho đối tượng với lượng hiệu quả để tạo hiệu quả miễn dịch mong muốn, nghĩa là, việc ngăn ngừa miễn dịch tế bào T hoặc B, hoặc lượng hiệu quả để ngăn ngừa, xử lý, hoặc cải thiện các triệu chứng của bệnh trong đó việc ngăn ngừa miễn dịch tế bào B hoặc T được mong muốn trong điều trị. Như đã được đề cập các tình trạng này bao gồm cụ thể là các dấu hiệu tự miễn, viêm và dị ứng.

Tổng lượng dùng kháng thể có thể tùy chọn gồm từ ,01, ,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 mg hoặc nhiều hơn hoặc có thể chứa lượng can thiệp bất kỳ các giá trị mg ở trên. Trong phương án ưu tiên theo sáng chế, các kháng thể kháng CD154 được mô tả ở đây, hoặc các đoạn gán của nó, cũng như các kết hợp của các đoạn kháng thể đã nêu, có thể được dùng cho đối tượng nhận với tần suất một lần mỗi hai mươi sáu tuần hoặc ngắn hơn, ví dụ như một lần mỗi mười sáu tuần hoặc ngắn hơn, một lần mỗi tám tuần hoặc ngắn hơn, hoặc một lần mỗi bốn tuần, mỗi tháng, mỗi hai tuần hoặc ngắn hơn.

Trong phương pháp bất kỳ để sử dụng các kháng thể hoặc các dược phẩm theo sáng chế, các kháng thể hoặc các dược phẩm có thể được dùng cho đối tượng với liều đơn hoặc nhiều liều mỗi ngày, mỗi 2, 3, 4, 5 hoặc 6 ngày, hàng tuần, hàng tháng hoặc phần bất kỳ hoặc số nhiều của nó, và ngoài ra có thể được dùng lặp lại cho đối tượng ở các khoảng từ mỗi ngày đến cách tháng, như được xác định bởi chuyên gia.

Trong phương pháp bất kỳ để sử dụng các kháng thể hoặc các dược phẩm theo sáng chế, các kháng thể hoặc các dược phẩm chứa chúng, có thể được dùng cho đối tượng cần được điều trị ở các khoảng thời gian dài như được chỉ định, trong khoảng nhiều ngày hoặc nhiều tuần cho đến suốt cuộc đời của đối tượng. Trong các phương án khác, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng lặp lại cho đối tượng ở các khoảng thời gian từ mỗi ngày đến cách tháng.

Trong một phương án theo sáng chế, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng với nhiều liều mỗi ngày, để đạt được tổng liều hàng ngày mong muốn. Hiệu quả của phương pháp điều trị có thể được đánh giá bằng cách theo dõi các triệu chứng hoặc các dấu hiệu đã biết về bất thường ở đối tượng.

Đối với tất cả phương án theo sáng chế, liều lượng và tỷ lệ liều của các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế và các dược phẩm theo sáng chế có hiệu quả để tạo ra các hiệu quả mong muốn sẽ phụ thuộc vào các nhân tố khác nhau, ví dụ như bản chất của bệnh cần được xử lý, kích thước và tuổi của đối tượng, mục tiêu điều trị, dược phẩm cụ thể được sử dụng, dược động học của chất hoạt tính, và đánh giá của bác sĩ điều trị.

Cần hiểu rằng liều hiệu quả có thể phụ thuộc vào các đặc điểm của đối tượng nhận, ví dụ như, tuổi, giới tính, tình trạng mang thai, chỉ số khối lượng cơ thể, khối lượng nạc của cơ thể, tình trạng hoặc các tình trạng mà chế phẩm được sử dụng, các tình trạng sức khỏe khác của đối tượng nhận mà có thể ảnh hưởng đến sự tổng hợp hoặc dung nạp chế phẩm, các mức IL-6 trong đối tượng nhận, và hiện tượng kháng chế phẩm (ví dụ, xuất hiện ở bệnh nhân phát triển các kháng thể kháng lại chế phẩm). Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể xác định lượng hiệu quả và tần suất dùng qua các thử nghiệm hàng ngày, ví dụ như được hướng dẫn bởi phần bộc lộ ở đây và được hướng dẫn trong Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland, R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; và Golan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., [v.v.]: Lippincott Williams & Wilkins.

Theo đó, các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế, sẽ được dùng với lượng hiệu quả để đạt được mục đích dự định của chúng. Lượng hiệu quả điều trị có thể là để chỉ lượng kháng thể hiệu quả để ngăn ngừa, làm giảm nhẹ hoặc cải thiện các triệu chứng bệnh hoặc kéo dài thời gian sống sót của đối tượng được điều trị. Lượng hiệu quả điều trị có thể đạt được bằng cách thay đổi liều và lịch dùng của các kháng thể đối tượng.

Các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế, và các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng làm một liều đơn với các mục đích nhất định, ví dụ như ngăn ngừa phản hồi miễn dịch với kháng nguyên mà với nó đối tượng được tiếp xúc trong một thời gian ngắn, ví dụ như kháng nguyên ngoại sinh được dùng trong một ngày điều trị. Các ví dụ của việc trị liệu như vậy bao gồm đồng sử dụng đoạn kháng thể theo sáng chế cùng với tác nhân trị liệu, ví dụ dược phẩm kháng nguyên, dị ứng nguyên hoặc sản phẩm huyết, hoặc vectơ liệu pháp gen. Trong các chỉ định ở đó kháng nguyên có mặt lâu dài, ví dụ như trong kiểm soát phản ứng miễn dịch với mô được cấy ghép hoặc với các dược phẩm kháng nguyên được dùng lâu dài, các đoạn kháng thể hoặc các dược phẩm theo sáng chế được dùng trong các khoảng thời gian dài như được chỉ định y học, trong khoảng từ nhiều ngày hoặc nhiều tuần đến suốt cuộc đời của đối tượng.

Trong phương pháp bất kỳ được mô tả ở trên, các kháng thể hoặc các dược phẩm có thể được dùng cho đối tượng với tác nhân thứ hai. Trong các phương án nhất định, tác nhân là tác nhân trị liệu, ví dụ như, ví dụ, tác nhân điều biến miễn dịch hoặc tác nhân ngăn ngừa miễn dịch. Tác nhân điều biến miễn dịch hoặc tác nhân ngăn ngừa miễn dịch có thể là bất kỳ trong số:

- (a) tác nhân làm gián đoạn việc truyền tín hiệu đồng kích thích tế bào T thông qua CD28;
- (b) tác nhân làm gián đoạn việc truyền tín hiệu calcineurin,
- (c) corticosteroid,
- (d) tác nhân ngăn ngừa tăng sinh; và

(e) kháng thể gắn đặc hiệu với protein được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào miễn dịch, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 và RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LT α và VLA-4.

Hợp chất điều biến miễn dịch hoặc ngăn ngừa miễn dịch có thể là, ví dụ, tacrolimus, sirolimus, mycophenolat mofetil, mizoribin, deoxyspergualin, brequinar natri, leflunomit, rapamycin hoặc azaspiran. Kháng thể và tác nhân thứ hai có thể được dùng đồng thời hoặc tuần tự. Trong một số trường hợp, có thể có ưu điểm khi dùng một hoặc nhiều axit nucleic theo sáng chế cho đối tượng cần được điều trị. Các phương pháp điều trị và chẩn đoán theo sáng chế bao gồm bước dùng ít nhất một axit nucleic theo sáng chế theo các phương pháp đã được biết đến rộng rãi được bao gồm trong phạm vi sáng chế.

Trong một phương án theo sáng chế, (các) đối tượng mà có thể được điều trị bởi các phương pháp được đề cập ở trên là động vật. Tốt hơn là, động vật là động vật có vú. Các ví dụ về động vật có vú mà có thể được điều trị bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người, động vật linh trưởng không phải người, các loài gặm nhấm (bao gồm chuột, chuột nhắt, hamster và chuột lang) bò, ngựa, cừu, dê, lợn, chó và mèo. Tốt hơn là, động vật có vú trong bản mô tả này là người.

Sáng chế này sẽ được mô tả rõ hơn dựa vào các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, chuyên gia trong lĩnh vực cần hiểu rằng các phương pháp và các kết quả cụ thể được thảo luận chỉ đơn thuần nhằm minh họa sáng chế được mô tả ở đây.

Các ví dụ sau đây được đặt ra để cung cấp cho người có trình độ trung bình trong lĩnh vực phần bộc lộ và mô tả hoàn chỉnh về việc tạo ra và sử dụng đối tượng sáng chế, và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế. Các nỗ lực đã được thực hiện để đảm bảo sự chính xác về các số liệu được sử dụng (ví dụ lượng, nhiệt độ, nồng độ, v.v.) tuy nhiên một số lỗi thực nghiệm và sai số là có thể được chấp nhận. Trừ khi được nêu khác đi, các phần là các phần theo trọng lượng, trọng lượng phân tử là trọng lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là tính theo thang bách phân; và áp suất là ở hoặc gần áp suất khí quyển.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thiết kế các cải biến kháng thể với ái lực cao hơn với CD154 ở người (Các giá trị K_D thấp hơn)

Trong đơn sáng chế này các tác giả sáng chế mô tả kháng thể CD154 IgG1 kháng nhân được người hóa có các trình tự được chứa trong các hình 1A-C mà để sử dụng trong liệu pháp cho con người, cụ thể là các chỉ định điều trị trong đó sự ngăn ngừa miễn dịch tế bào T và B là được mong muốn trong điều trị. Kháng thể được đề cập ở trên này có nguồn gốc từ IDEC131 bằng cách sử dụng kết hợp các phương pháp đột biến và trưởng thành ái lực và bằng cách cải biến vùng IgG1 Fc của IDEC-131 nhằm loại trừ FcγRII và FcγRIII và C1q (gắn bổ sung).

Cụ thể là, các kết hợp khác nhau của các phân dư CDR trên các vùng có thể cải biến nặng và nhẹ của IDEC131 được tạo đột biến với mục đích thu được cải biến của IDEC-131 có ái lực gắn với CD154 của người được cải thiện. Các thí nghiệm này tạo ra một số lượng lớn các cải biến. Số lượng áp đảo của các biến thể không gắn với CD154 ở người này tốt hơn so với IDEC-131, thay vì chúng có các ái lực gắn tốt hoặc kém hơn CD154 ở người (các kết quả không được thể hiện).

Các thí nghiệm này tạo ra 11 biến thể được người hóa mà được xác định trong và chứa các trình tự chuỗi nặng và nhẹ được thể hiện trên các hình 2A đến 2C và 3. Ái lực gắn của mỗi biến thể này với CD154 ở người sau đó được sàng lọc bằng Biacore. Thử nghiệm Biacore được tiến hành như được thể hiện dưới đây.

THỬ NGHIỆM BIACORE:

Thiết bị: Biacore 3000

Đệm thử nghiệm- 10 nM đệm HEPES (pH 7,4), 150 nM NaCl, 3mM EDTA, 0,05% P20 (polyoxyetylenesorbitan)

Đệm tái tạo- 10 mM Glycin HCl (pH 1,75)

Đệm tiếp hợp- 10 nM đệm natri axetat (pH 5)

Tốc độ dòng chảy- Tốc độ dòng chảy để thu thập phối tử là 5 µl/phút. Tốc độ dòng chảy để phân tích động học là 30 µl/phút.

Quy trình:

Các thử nghiệm gắn được thực hiện trên Biacore 300 tại 25° C. Các kháng thể được cố định trực tiếp trên tế bào dòng 2 (1000 RU kết hợp #23) và tế bào dòng 4 (1000 RU EWT #131) và kháng nguyên CD154 được cho chảy qua bộ chip. Việc gắn kháng nguyên vào các kháng thể được thử nghiệm được theo dõi trong thời gian thực. Từ $k_{\text{bắt}}$, $k_{\text{tắt}}$ và K_D quan sát được được xác định cho mỗi biến thể.

Phân tích chấm điểm được thực hiện sử dụng các nồng độ phân tích cụ thể. Ở các nồng độ được thử nghiệm, việc gắn cần được quan sát ngay cả nếu ái lực gắn phối tử là tương đối yếu. Các động học đầy đủ có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết. Đối với các tương tác phân tử với tốc độ tắt nhanh, các trạng thái động học ổn định có thể được sử dụng để xác định giá trị K_D .

Phân tích Chi bình phương (χ^2) có thể được thực hiện để xác định độ chính xác của phân tích. χ^2 trong khoảng từ 1 đến 2 được coi là đáng kể và dưới 1 được coi là hết sức đáng kể. Việc sàng lọc này cho phép xác định số lượng các biến thể trình tự với các ái lực gắn được cải thiện đáng kể, nghĩa là, tốt hơn từ 4 đến 5 lần so với IDEC-131. Như được ghi chú ở trên, điều này xảy ra rất bất ngờ do IDEC-131 thể hiện ái lực gắn hoặc K_D bằng 151 pm. Kết quả này còn gây ngạc nhiên hơn do IDEC-131 được lựa chọn làm ứng cử viên lâm sàng chính trong số nhiều trình tự được người hóa ứng cử viên khác dựa trên ái lực gắn mạnh mẽ của nó với CD154.

Như được thể hiện dưới đây các kháng thể kháng CD154 được người hóa có nguồn gốc từ IDEC-131 được thu mà có các giá trị K_D nằm trong khoảng từ thấp như 26pm cho đến 57 pm. Các trình tự axit amin của các trình tự biến thể nặng và nhẹ của các biến thể này mà được xác định trong đơn sáng chế này là biến thể 21, biến thể 22, biến thể 23, biến thể 24, biến thể 25, biến thể 26, biến thể 27, biến thể 28, biến thể 29, biến thể 30 và biến thể 31 trong hình 2.

Bảng 4 tổng hợp các ái lực gắn khác nhau của các biến thể này như được xác định bởi Biacore.

Bảng 4.

Biến thể	$K_a(1/\text{Ms})$	$K_d(1/\text{s})$	K_D	Chi^2	Độ cải thiện trong
----------	--------------------	-------------------	-------	----------------	--------------------

#					K _D (được so sánh với IDEC131)
IDEC- 131	3,468E +06	5,25E - 04	1,51E - 10	0,097	1,0
21	4,42E +06	1,28E - 04	2,89E - 11	0,184	4,7
22	4,48E +06	1,17E - 04	2,62E - 11	0,222	5,2
23	3,35E +06	1,41E - 04	4,21E - 11	0,242	4,2
24	3,70E +06	1,35E - 04	3,64E - 11	0,265	4,9
25	4,11E +06	1,49E +04	3,62E - 11	0,243	3,9
26	2,03E +06	1,17 +04	5,76E - 11	0,201	2,5
27	3,58E +06	1,20E - 04	3,36E - 11	0,135	4,5
28	3,65E +06	1,15E - 04	3,15E - 11	0,108	4,8
29	3,86E +06	1,33E - 04	3,44E - 11	0,152	4,2
30	4,24E +06	1,40E - 04	3,29E - 11	0,171	4,4
31	3,61E	1,23E -	3,41E -	0,121	4,8

	+06	04	11		
--	-----	----	----	--	--

- (Trung bình n=6)

Ví dụ 2: Sử dụng các biến thể kháng nguyên với ái lực cao hơn cho CD154 ở người (Các giá trị K_D thấp hơn) cho việc dùng SC

Như được thể hiện trong bảng ở trên, biến thể được lựa chọn làm ứng cử viên chính số #21 có giá trị K_D bằng 29 pM là tốt hơn 4,7 lần so với IDEC131. Sự cải thiện về ái lực này là đáng kể do nó cho phép kháng thể này được dùng bằng cách tiêm dưới da. Các nghiên cứu trước với IDEC131 đã thể hiện hiệu quả lâm sàng ở người ở trên 10 mg/kg, hoặc nhằm mục đích phân tích giới hạn trên của 20 mg/kg. Dựa vào đó, và giả định rằng người có trọng lượng trung bình khoảng 80 kg, liều với lượng hiệu quả có thể được tính toán như sau đây:

$$10 \text{ mg/kg} \times 80 \text{ kg} = \text{liều } 800 \text{ mg.}$$

Tuy nhiên, dạng kháng thể được sử dụng thông thường không vượt quá 100 ng/ml. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06000895>)

Ngoài ra, thể tích liều được dung nạp điển hình để dùng s.q. nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5ml (các thể tích lớn hơn 3mL được coi là "lớn"). Do đó, liều hiệu quả đối với IDEC-131 là cần khoảng 8 mL. (xem tính toán bên dưới.) Thể tích liều này vượt quá các định mức y tế s.q..

$$(10 \text{ mg/kg} \times 80 \text{ kg}) / 100 \text{ mg/ml} = 8 \text{ mL.}$$

Ngược lại, do biến thể số #21 (INX021) có K_D thấp hơn 5 lần (nghĩa là, gần với ái lực lớn hơn với CD154), biến thể sẽ cần thuốc với lượng ít hơn 5 lần để đạt được cùng hiệu quả. Như được thể hiện dưới đây điều này có nghĩa là thể tích liều bằng khoảng 1,6 ml mà là phù hợp với mức trong các công ước y tế về việc tiêm s.q. cho bệnh nhân.

$$(2 \text{ mg/kg} \times 80 \text{ kg}) / 100 \text{ mg/ml} = 1,6 \text{ mL.}$$

Do đó, không giống IDEC131, INX021 là hoàn toàn phù hợp để dùng qua đường s.q..

Ví dụ 3: So sánh tiềm năng của các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế

Hình 4 mô tả sơ lược các kết quả thử nghiệm phát hiện việc ngăn chặn sự hoạt hóa tế bào B được dẫn động từ CD154 tế bào T. Các kết quả này được chứa trong hình minh họa tiềm năng được cải thiện, nghĩa là, việc ngăn chặn tốt hơn đối với sự hoạt hóa tế bào B được dẫn động từ CD154 tế bào T của INX-021 khi so sánh với IDEC-131.

Ví dụ 4: Khả năng của kháng thể cải tiến trong việc tạo dung nạp

Hình 5 thể hiện các kết quả của các thử nghiệm minh họa rằng các kháng thể CD154 IgG1 kháng chuột chứa cùng các đột biến Fc như được chứa trong INX021 (E269R và K322A)) có thể tạo dung nạp trong thử nghiệm ở da được mô tả ở trên. Do đó, các kháng thể kháng CD154 người chứa các miền hằng định IgG1 được tạo đột biến này nên tạo dung nạp và chặc các hiệu quả khác của CD154 trên các bệnh nhân là người.

Ví dụ 6: INX021 không tạo sự kết tụ tiểu cầu *in vitro*

Hình 6 thể hiện các kết quả của các thử nghiệm mà bộc lộ rằng kháng thể INX021 chứa các đột biến mà giảm bớt hoặc loại trừ việc gắn FcR không tạo sự kết tụ tiểu cầu *in vitro* trong thử nghiệm sử dụng các phức hợp miễn dịch của đối tượng kháng thể INX021 và collagen. Các thử nghiệm *in vitro* này bộc lộ rằng các phức hợp miễn dịch của các đột biến FcR trong khoảng thời gian 16 hoặc 20 phút không tạo nên sự hoạt hóa hoặc sự kết tụ của cả các tiểu cầu ở người lẫn ở chuột được phân lập. Ngược lại trong cùng thử nghiệm kháng thể 5c8 đối chứng gây ra sự kết tụ tiểu cầu.

Ví dụ 7: Các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế không tạo ra sự kết tụ tiểu cầu *in vivo*

Hình 7A-D thể hiện các kết quả của các thử nghiệm minh họa rằng INX021 không hoạt hóa các tiểu cầu, không tạo ra sự kết tụ tiểu cầu và không làm ảnh hưởng đến (giảm bớt) số lượng tiểu cầu *in vivo*. Thử nghiệm trong hình 7A thể hiện rằng INX021 không tạo ra căng thẳng huyết khối hoặc hoạt hóa các tiểu cầu khi so sánh với đối chứng dương. Thử nghiệm trong hình 7B thể hiện rằng INX021 không làm ảnh hưởng đến số lượng các tiểu cầu tuần hoàn so sánh với đối chứng dương. Thử nghiệm trong hình 7C thể hiện rằng INX021 không tạo ra sự hình thành các cục máu đông (tắc mạch) trong phổi so sánh với đối chứng dương. Hình 7D tóm tắt các lợi ích của INX021 *in vivo*, nghĩa là, nó không làm giảm

bớt số lượng tiểu cầu, không hoạt hóa tiểu cầu, không gây ra căng thẳng về tiểu cầu và nó không tạo nên sự hình thành các cục máu đông.

Ví dụ 8: Sử dụng các kháng thể kháng CD154 theo sáng chế trong các mô hình tự miễn

Các thử nghiệm được tóm tắt trong hình 8A-B thể hiện rằng các kháng thể kháng CD154 IgG1 chống được người hóa chứa các đột biến Fc trong INX021 mà giảm bớt hoặc loại trừ việc gắn FcR là hoạt động trong các mô hình tự miễn hoặc viêm khác nhau.

Thử nghiệm trong hình 8A thể hiện rằng các kháng thể CD154 IgG1 ở người chứa các đột biến Fc trong INX021 có tiềm năng ngăn chặn EAE trong thời gian khoảng 20 ngày. Thử nghiệm trong hình 8B thể hiện rằng các kháng thể kháng CD154 IgG1 được người hóa chứa các đột biến Fc trong INX021 có tiềm năng ngăn ngừa miễn dịch thể dịch chống lại myelin oligodendrocyt glycoprotein ("MOG") có thể so sánh với kháng thể bố mẹ.

Ví dụ 9: Thử nghiệm của các biến thể IDEC-131 bao gồm INX021 về khả năng ngăn ngừa sự kích hoạt tế bào B được kích thích bởi tế bào T của chúng

Thử nghiệm trên hình 9 so sánh các hiệu quả của các biến thể kháng thể khác nhau theo sáng chế, nghĩa là, biến thể từ số #21 (INX021) đến số #31 để ngăn ngừa sự kích hoạt tế bào B được kích thích bởi tế bào T dựa trên sự biểu hiện của CD86. Trong các thử nghiệm này các hiệu quả ngăn ngừa của các biến thể kháng thể theo sáng chế được so sánh trong phản ứng lympho hỗn hợp. Kết quả đọc được là sự biểu hiện CD86 bằng các tế bào B được kích hoạt. Như được thể hiện trên hình các kháng thể với các giá trị K_D tốt hơn không nhất thiết là tương quan với hiệu quả chức năng được cải thiện trong các phản ứng MLR. INX021 có các đặc tính ngăn ngừa miễn dịch vượt trội khi so sánh với các biến thể khác.

Ví dụ 10: Các phép đo nghiên cứu độc tính INX021 và phản hồi kháng thể phụ thuộc tế bào T (TDAR)

Nhằm đánh giá sự thích hợp của nó để sử dụng trong liệu pháp cho con người, kháng thể cải tiến INX021 được thử nghiệm trong nghiên cứu 8 tuần non-GLP tox ở khỉ Rhesus ở các trung tâm CRL và Harvard. Thiết kế nghiên cứu được thể hiện trên các bảng dưới đây. Mục đích của nghiên cứu là thử nghiệm tính an toàn và hiệu quả của INX021 ở linh trưởng không phải là con người (NHP).

Bảng 5 Tổng quan của thử nghiệm TDAR:

Tổng quan của thử nghiệm TDAR:

Liều bắt đầu	Ngày 1
Liều KLH thứ nhất	Ngày 29
Chảy máu	Các ngày 29, 36, 39 (Các ngày sau liều KLH 0, 7, 10)
Liều KLH thứ hai	Ngày 43
Chảy máu	Các ngày 43, 50, 53, 57 (Các ngày sau liều KLH 14, 21, 24, 28)
Đo IgG và IgM	

Bảng 6 Các nhóm TDAR NHP:

Vị trí	Điều trị	n	Các loài linh trưởng không phải là con người (NHP)
CRL	Tá dược lỏng	4	Rhesus
CRL	50 mg/kg	8	Rhesus
CRL	20 mg/kg	8	Rhesus
Harvard	Tá dược lỏng	3	Cynomolgus
Harvard	1 mg/kg	3	Cynomolgus
Harvard	5 mg/kg	3	Cynomolgus

Hình 10A-B so sánh các hiệu quả của INX021 và kháng thể 5c8 lai tạo với sự sản xuất các kháng thể IgG và IgM trong thử nghiệm KLH. Hình 10A so sánh các hiệu quả của chúng với IgG và hình 10B so sánh các hiệu quả của chúng với IgM.

Hình 11A-B so sánh các hiệu quả của phương tiện, INX021 và kháng thể 5c8 trên các điểm tâm phôi. Hình 11A thể hiện sự so sánh điểm tâm phôi và hình 11B chứa biểu đồ

so sánh số lượng và mức độ di động của các tâm phôi trong lá lách và các hạch bạch huyết (các LN) của các động vật được điều trị.

Hình 12 tóm tắt tần suất tổn thương quan sát được thành các kết quả được công bố với một kháng thể kháng CD154 khác (α CD154 Fab được pegylat hóa của Biogen/UCB).

Các kết quả này chỉ báo rằng INX021 là an toàn và hiệu quả trong liệu pháp ở người.

Ví dụ 11: INX021 ngăn ngừa các phản hồi kháng thể kháng thuốc (ADA) trong các NHP

Trong các thử nghiệm INX021 tox/TDAR được thảo luận trong ví dụ trước chúng tôi đã đo sự có mặt của các ADA trong tất cả các nhóm. Các phản hồi TDAR trong tất cả các động vật được ngăn ngừa thể hiện rằng các phản hồi kháng thể với các kháng nguyên tan được có thể được ngăn ngừa trong các động vật được xử lý INX021. Để kiểm tra điều này, chúng tôi đo các phản hồi ADA ở khỉ rhesus trong 8 tuần sau khi tiêm INX021, hoặc 5C8. Toàn bộ trừ một động vật với các liều thấp nhất (1 mg/kg) của nhóm INX021 thất bại trong việc phát triển bất kỳ ADA có thể phát hiện nào.

Phương pháp:

Việc phát hiện các kháng thể chống lại INX021 và ch5C8 ở Rhesus (ELISA)

Pha chế axit sulfuric 2N (dung dịch dùng)

Cho mỗi 1000 mL axit sulfuric 2N cần được pha chế trộn 500 mL axit sulfuric 4N với 500 mL nước cất. Trộn đều. Hạn sử dụng là một năm từ ngày pha chế hoặc hạn sử dụng của nhà sản xuất cho mỗi thành phần đơn, bất cứ ngày nào sớm hơn, sẽ được áp dụng. Dung dịch sẽ được cất giữ ở nhiệt độ phòng (từ 17°C đến 27°C).

Chuẩn bị các đĩa 96 giếng được phủ

Trong các protocol này vật chất thử nghiệm là để chỉ các mẫu chứa tinh chất khỉ Rhesus hoặc Cynomolgus, các mẫu chứa đối chứng dương, và/hoặc các mẫu trống.

Quy trình

1. Chuẩn bị 1,0 pg/mL dung dịch phủ với INX021 hoặc ch5C8 sử dụng đệm phủ (Đệm cacbonat bicarbonat 0,2) làm chất pha loãng.

2. Thêm 100 pL dung dịch phủ vào mỗi giếng của (các) đĩa polystyren sạch 96 giếng và che phủ.

3. Ủ (các) đĩa trong từ 12 đến 24 giờ ở từ 2°C đến 8°C.

4. Hút (loại bỏ) dung dịch phủ từ mỗi giếng của (các) đĩa, sau đó rửa mỗi giếng bằng 3 x 300 pL 1X PBS-T.

5. Thêm 200 pL Blocker Casein vào mỗi giếng của (các) đĩa và che phủ.

6. Ủ đĩa trong 1 giờ $\pm$ 5 phút.

7. Hút Blocker Casein từ mỗi giếng của (các) đĩa, sau đó rửa mỗi giếng bằng 3 x 300 pL 1X PBS-T.

8. Sử dụng (các) đĩa ngay sau khi rửa (hoàn tất việc đặt trong vòng 2 giờ kể từ lúc hoàn tất rửa). Gắn hạn sử dụng là ngày việc chuẩn bị đĩa được hoàn tất.

Quy trình thử nghiệm để phát hiện các kháng thể chống lại INX021 hoặc ch5C8

Trong các quy trình thử nghiệm này "vật chất thử nghiệm" là để chỉ các mẫu chứa tinh chất khỉ Rhesus hoặc Cynomolgus, các mẫu chứa đối chứng dương, và/hoặc các mẫu trống. Nhiệt độ phòng/không khí xung quanh là từ 17°C đến 27°C.

Quy trình

1. Thêm 100 pL mỗi vật liệu thử nghiệm vào (các) giếng thích hợp của (các) đĩa được phủ INX021 hoặc ch5C8 và che phủ bằng đồ bịt kín đĩa.

2. Sử dụng khuôn đĩa để ghi lại vị trí của vật liệu thử nghiệm.

3. Ủ vật liệu thử nghiệm với (các) đĩa được phủ INX021 hoặc ch5C8 ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ $\pm$ 5 phút.

(a) Quy trình phân tích

1. Hút vật liệu thử nghiệm từ mỗi giếng của (các) đĩa, sau đó rửa mỗi giếng của (các) đĩa bằng 3 x 300 pL 1X PBS-T.

2. Thêm 100 pL 0,125 pg/mL INX021-BIOTIN hoặc 1,0 pg/mL ch5C8-BIOTIN vào mỗi giếng của (các) đĩa và che phủ bằng đồ bịt kín đĩa.

3. Ủ (các) đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ $\pm$ 5 phút.
4. Hút (loại bỏ) INX021- BIOTIN hoặc ch5C8-BIOTIN từ mỗi giếng của (các) đĩa, sau đó rửa mỗi giếng của (các) đĩa bằng 3 x 300 pL 1X PBS-T.
5. Thêm 100 pL 0,1 pg/mL SA-HRP vào mỗi giếng của (các) đĩa và che phủ.
6. Ủ (các) đĩa ở nhiệt độ phòng trong 30 phút $\pm$ 5 phút.
7. Hút (loại bỏ) SA-HRP từ mỗi giếng của (các) đĩa, sau đó rửa mỗi giếng của (các) đĩa bằng 3 x 300 pL 1X PBS-T.
8. Thêm 100 pL TMB vào mỗi giếng của (các) đĩa.
9. Ủ (các) đĩa ở nhiệt độ phòng trong 20 phút $\pm$ 5 phút.
10. Thêm 100 pL axit sulfuric 2N vào mỗi giếng của (các) đĩa.
11. Đọc (các) đĩa ở 450 nm sử dụng dụng cụ quang phổ tấm nhỏ trong vòng 30 phút để phân tích.

Giảm dữ liệu tổng quát

Với tất cả vật liệu thử nghiệm giá trị trung bình A450, độ lệch chuẩn, và % sai số (nếu n=2) hoặc CV% (nếu n > 3) sẽ được tính toán để thử nghiệm các biến, trừ khi được nêu khác đi. Tất cả CV% tiêu chí chấp nhận sẽ áp dụng cho các giá trị % sai số nếu % sai số được tính toán thay vì CV%. Nếu ba hoặc nhiều hơn ba giếng của vật liệu thử nghiệm được phân tích, một giếng có thể được lược bỏ nếu CV% không đạt tiêu chí đã nêu.

% CV: r Độ lệch chuẩn > giá trị trung bình x 100

% sai số: r giá trị A – giá trị B v giá trị trung bình x 100

Phân tích mức dư bình thường tối đa (Maximum Normed Residual - MNR) sẽ được thực hiện để thử nghiệm các biến ở mức 5% trên TS trống để loại bỏ hai giá trị các mẫu thử nghiệm trống A450 (TS) ngoại lệ. A450 trung bình sẽ được tính toán từ tất cả các giá trị không được loại bỏ là ngoại lệ. Các giếng bổ sung có thể được bỏ qua do lỗi kỹ thuật.

Điểm cắt đĩa cụ thể (PSCP) sẽ được tính toán là điểm cắt tổng (CP) x A450 trung bình TS trống (không có ngoại lệ) = PSCP (overall Cut Point (CP) x Blank TS mean A450 (không có ngoại lệ) = PSCP).

Tiêu chuẩn chấp nhận chung

Nếu TS trống có nhiều hơn hai ngoại lệ thì đĩa thất bại và cần được phân tích lại. Ít nhất 5 giá trị A450 TS trống phải được giữ để phân tích MNR sau khi đánh dấu các ngoại lệ và các giếng mà đã được đánh dấu do lỗi kỹ thuật. Công thức sau đây sẽ được sử dụng để tính toán giá trị MNR: Giá trị TS trống MNR – TS trống trung bình (MNR Blank TS value - mean Blank TS)

Độ lệch chuẩn $\times \sqrt{n-1}$

Giá trị sẽ được xác định là ngoại lệ nếu giá trị MNR lớn hơn so với giá trị tiêu chuẩn. Các giá trị tiêu chuẩn được xác định là: $n=12=0,727$, $n=11=0,745$, $n=10=0,763$, $n=9=0,783$, $n=8=0,804$, $n=7=0,825$, $n=6=0,844$, và $n=5=0,858$. Tất cả ngoại lệ sẽ được đánh dấu.

Blocker Casein trống và A450 trung bình TS trống sau khi bỏ ngoại lệ cần nhỏ hơn LPC A450. Điểm cắt đĩa cụ thể (PSCP) sẽ được tính toán như sau: $PSCP = CF \times \text{trung bình toàn cầu TS (không có ngoại lệ)}$. Yếu tố hiệu chỉnh (CF) sẽ được thêm vào tập phân tích. LPC A450 trung bình phải lớn hơn PSCP. Nếu không, LPC cho mẫu đó thất bại.

CV% đệm thử nghiệm trống nên $< 30\%$. Nếu đệm thử nghiệm trống không đạt các tiêu chuẩn được đo ở trên, đĩa sẽ được thử nghiệm trong quá trình đánh giá khoa học để xác định xem dữ liệu có thể được sử dụng hay không.

$HPC > MPC > LPC$ cho A450 trung bình của mỗi nhóm PC. Ít nhất hai phần ba các mức PC cần đạt các tiêu chuẩn được chấp nhận, với ít nhất một PC ở mỗi mức PC nằm trong các tiêu chuẩn được chấp nhận.

% sai số các mẫu thử nghiệm giữa các giếng nhân bản nên $< 25\%$. Nếu mẫu thử nghiệm không đạt các tiêu chuẩn này, mẫu sẽ được phân tích lại.

Chuẩn bị các đối chứng dương, TS trống và đệm thử nghiệm trống

Các đối chứng dương sẽ được chuẩn bị bằng cách ghim kháng thể đối chứng dương đại diện trong tinh chất khí Rhesus 100% (RHS) hoặc tinh chất khí Cynomolgus. Các đối chứng dương trong 100% khuôn lõm sẽ được pha loãng 10 lần bằng Blocker Casein để tạo ra nồng độ hoạt động thích hợp và 10% khuôn lõm. Mỗi nhóm PC sẽ được chuẩn bị độc lập

với nhau và sẽ được phân tích trên mỗi đĩa. Vào ngày phân tích, các PC sẽ được phân tích trên mỗi đĩa.

Mỗi đĩa sẽ chứa hai nhóm PC LPC (50ng/mL), MPC (250 ng/mL và HPC (1000 ng/mL). TS trống cũng sẽ được chuẩn bị với nồng độ cuối cùng bằng 10% khuôn lõm được pha loãng bằng Blocker Casein. 12 giếng TS trống sẽ được chạy trong mỗi đĩa. Blocker Casein sẽ được chạy trong ít nhất hai giếng của mỗi đĩa. Tất cả vật liệu thử nghiệm sẽ được phân tích trong ít nhất hai giếng trừ khi được nêu khác đi.

Thử nghiệm sàng lọc

Để sàng lọc, các mẫu được pha loãng 1/10 trong Blocker Casein được phân tích mỗi quy trình được mô tả trong phần 7.0. Giá trị hấp thụ trung bình của các mẫu nghiên cứu, trong quá trình phân tích mẫu, sẽ được so sánh với PSCP và sẽ được báo cáo là có tiềm năng dương tính nếu giá trị hấp thụ trung bình là > PSCP hoặc âm tính nếu giá trị hấp thụ trung bình là < PSCP.

KẾT QUẢ

Các phản hồi TDAR trong tất cả các động vật được ngăn chặn thể hiện rằng kháng thể phản hồi lại các kháng nguyên tan được có thể được ngăn ngừa trong các động vật được xử lý INX021. Để thử nghiệm việc này, chúng tôi đo các phản hồi ADA ở khỉ rhesus trong vòng 8 tuần sau khi tiêm INX021, hoặc 5C8. Tất cả trừ một động vật với các liều thấp nhất (1 mg/kg) của nhóm INX021 thất bại trong việc phát triển ADA có thể phát hiện bất kỳ. Do đó, kháng thể cải tiến INX021 có thể được sử dụng để ngăn ngừa miễn dịch thể dịch, ví dụ, kháng lại các thuốc miễn dịch ví dụ như các chất có nguồn gốc sinh học, ví dụ, các kháng thể trị liệu, các protein dung nạp và tương tự.

Các tài liệu trích dẫn của sáng chế

Các tài liệu trích dẫn được liệt kê sau đây. Nội dung của chúng được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

1. Noelle, R. J., Mackey, M., Foy, T., Buhlmann, J. và Burns, C., CD40 and its ligand in autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 1997. 815: 384-391.

2. Mackey, M. F., Barth, R. J., Jr. và Noelle, R. J., The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol* 1998. 63: 418-428.
3. Noelle, R. J., CD40 and its ligand in cell-mediated immunity. *Agents Actions Suppl* 1998. 49: 17-22.
4. Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. và Noelle, R. J., CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* 2004. 22: 307-328.
5. Kenyon, N. S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J. L., Kirk, A. D., Harlan, D. M., Burkly, L. C. và Ricordi, C., Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. 96: 8132-8137.
6. Kirk, A. D., Burkly, L. C., Batty, D. S., Baumgartner, R. E., Berning, J. D., Buchanan, K., Fechner, J. H., Jr., Germond, R. L., Kampen, R. L., Patterson, N. B., Swanson, S. J., Tadaki, D. K., TenHoor, C. N., White, L., Knechtle, S. J. và Harlan, D. M., Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 1999. 5: 686-693.
7. Sidiropoulos, P. I. và Boumpas, D. T., Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2004. 13: 391-397.
8. Sidiropoulos, P. I. và Boumpas, D. T., Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2004. 13: 391-397.
9. Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. và Taylor, F. R., The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge. *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594.
10. sáng chế Mỹ số 6,444,018

11. Gordon, E. J., Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Rossini, A. A. và Greiner, D. L., Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody. *Diabetes* 1998. 47: 1199-1206.
12. Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. và Rossini, A. A., Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* 1997. 64: 329-335.
13. Jarvinen, L. Z., Blazar, B. R., Adeyi, O. A., Strom, T. B. và Noelle, R. J., CD154 on the surface of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance. *Transplantation* 2003. 76: 1375-1379.
14. Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. và Noelle, R. J., Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation. *Blood* 2003. 102: 1920-1926.
15. Frleta, D., Lin, J. T., Quezada, S. A., Wade, T. K., Barth, R. J., Noelle, R. J. và Wade, W. F., Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice. *J Immunother* 2003. 26: 72-84.
16. Quezada, S., Eckert, M., Schned, A., Noelle, R. J. và Burns, C., Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis. *Arth Rheum.* 2003. in press.
17. Elster, E. A., Xu, H., Tadaki, D. K., Montgomery, S., Burkly, L. C., Berning, J. D., Baumgartner, R. E., Cruzata, F., Marx, R., Harlan, D. M. và Kirk, A. D., Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates. *Transplantation* 2001. 72: 1473-1478.
18. Benda, B., Ljunggren, H. G., Peach, R., Sandberg, J. O. và Korsgren, O., Co-stimulatory molecules in islet xenotransplantation: CTLA4Ig treatment in CD40 ligand-deficient mice. *Cell transplantation* 2002. 11: 715-720.

19. Wekerle, T. và Sykes, M., Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annual review of medicine* 2001. 52: 353-370.
20. Camirand, G., Caron, N. J., Turgeon, N. A., Rossini, A. A. và Tremblay, J. P., Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation. *Transplantation* 2002. 73: 453-461.
21. Tung, T. H., Mackinnon, S. E. và Mohanakumar, T., Long-term limb allograft survival using anti-CD40L antibody in a murine model. *Transplantation* 2003. 75: 644-650.
22. Koyama, I., Kawai, T., Andrews, D., Boskovic, S., Nadazdin, O., Wee, S. L., Sogawa, H., Wu, D. L., Smith, R. N., Colvin, R. B., Sachs, D. H. và Cosimi, A. B., Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in nonhuman primates. *Transplantation* 2004. 77: 460-462.
23. Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R. B., Sachs, D. H. và Cosimi, A. B., Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* 2000. 6: 114.
24. Daley, S. R., Cobbold, S. P. và Waldmann, H., Fc-disabled anti-mouse CD40L antibodies retain efficacy in promoting transplantation tolerance. *Am J Transplant* 2008. 8: 2265-2271.
25. Sanchez-Fueyo, A., Domenig, C., Strom, T. B. và Zheng, X. X., The complement dependent cytotoxicity (CDC) immune effector mechanism contributes to anti-CD154 induced immunosuppression. *Transplantation* 2002. 74: 898-900.
26. Monk, N. J., Hargreaves, R. E., Marsh, J. E., Farrar, C. A., Sacks, S. H., Millrain, M., Simpson, E., Dyson, J. và Jurcevic, S., Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat Med* 2003. 9: 1275-1280.
27. Truscott, S. M., Abate, G., Price, J. D., Kemper, C., Atkinson, J. P. và Hoft, D. F., CD46 engagement on human CD4⁺ T cells produces T regulatory type 1-like regulation of antimycobacterial T cell responses. *Infection and immunity* 2010. 78: 5295-5306.

28. Cardone, J., Le Friec, G., Vantourout, P., Roberts, A., Fuchs, A., Jackson, I., Suddason, T., Lord, G., Atkinson, J. P., Cope, A., Hayday, A. và Kemper, C., Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nature immunology* 2010. 11: 862-871.
29. Fuchs, A., Atkinson, J. P., Fremeaux-Bacchi, V. và Kemper, C., CD46-induced human Treg enhance B-cell responses. *European journal of immunology* 2009. 39: 3097-3109.
30. Alford, S. K., Longmore, G. D., Stenson, W. F. và Kemper, C., CD46-induced immunomodulatory CD4⁺ T cells express the adhesion molecule and chemokine receptor pattern of intestinal T cells. *Journal of immunology* 2008. 181: 2544-2555.
31. Barchet, W., Price, J. D., Cella, M., Colonna, M., MacMillan, S. K., Cobb, J. P., Thompson, P. A., Murphy, K. M., Atkinson, J. P. và Kemper, C., Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell responses but allow for dendritic-cell maturation. *Blood* 2006. 107: 1497-1504.
32. Liszewski, M. K., Kemper, C., Price, J. D. và Atkinson, J. P., Emerging roles and new functions of CD46. *Springer seminars in immunopathology* 2005. 27: 345-358.
33. Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R. B., Sachs, D. H. và Cosimi, A. B., Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand [In Process Citation]. *Nat Med* 2000. 6: 114.
34. Langer, F., Ingersoll, S. B., Amirkhosravi, A., Meyer, T., Siddiqui, F. A., Ahmad, S., Walker, J. M., Amaya, M., Desai, H. và Francis, J. L., The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation. *Thrombosis and haemostasis* 2005. 93: 1137-1146.
35. Robles-Carrillo, L., Meyer, T., Hatfield, M., Desai, H., Davila, M., Langer, F., Amaya, M., Garber, E., Francis, J. L., Hsu, Y. M. và Amirkhosravi, A., Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *J Immunol* 2010. 185: 1577-1583.
36. Couzin, J., Drug discovery. Magnificent obsession. *Science* 2005. 307: 1712-1715.

37. Hessel, A. J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C. E., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Lanigan, C. M., Landucci, G., Forthal, D. N., Parren, P. W., Marx, P. A. và Burton, D. R., Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 2007. 449: 101-104.
38. Armour, K. L., Clark, M. R., Hadley, A. G. và Williamson, L. M., Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol* 1999. 29: 2613-2624.
39. Taylor, P. A., Lees, C. J., Wilson, J. M., Ehrhardt, M. J., Campbell, M. T., Noelle, R. J. và Blazar, B. R., Combined effects of calcineurin inhibitors or sirolimus with anti-CD40L mAb on alloengraftment under nonmyeloablative conditions. *Blood* 2002. 100: 3400-3407.
40. Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. và Aruffo, A., A novel ligand on activated T helper cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. 89: 6550-6554.
41. Quezada, S. A., Bennett, K., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Sakaguchi, S. và Noelle, R. J., Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J Immunol* 2005. 175: 771-779.
42. Rossini, A. A., Parker, D. C., Phillips, N. E., Durie, F. H., Noelle, R. J., Mordes, J. P. và Greiner, D. L., Induction of immunological tolerance to islet allografts. *Cell Transplant* 1996. 5: 49-52.
43. Markees, T., Phillips, N., Gordon, E., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. và Rossini, A. A., Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody. *Transplant Proc* 1998. 30: 2444-2446.
44. Markees, T. G., Appel, M. C., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. và Rossini, A. A., Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation. *Transplantation Proceedings* 1996. 28: 814-815.

45. van den Eertwegh, A. J., Van Meurs, M., Foy, T. M., Noelle, R. J., Boersma, W. J. và Claassen, E., In vivo gp39-CD40 interactions occur in the non-follicular compartments of the spleen and are essential for thymus dependent antibody responses and germinal center formation. *Adv Exp Med Biol* 1994. 355: 75-80.

46. van, den, Eertwegh, Aj, Van, M. M., Foy, T. M., Noelle, R. J., Boersma, W. J. và Claassen, E., In vivo gp39-CD40 interactions occur in the non-follicular compartments of the spleen and are essential for thymus dependent antibody responses and germinal center formation. *Advances in experimental medicine and biology* 1994. 355: 75-80.

47. Foy, T. M., Laman, J. D., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E. và Noelle, R. J., gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J. Exp. Med.* 1994. 180: 157-164.

48. Gerritse, K., Laman, J. D., Noelle, R. J., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Boersma, W. J. và Claassen, E., CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *National Academy of Sciences, Washington, D.c, Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996. 93: 2499-2504.

49. Nagelkerken, L., Haspels, I., van Rijs, W., Blauw, B., Ferrant, J. L., Hess, D. M., Garber, E. A., Taylor, F. R. và Burkly, L. C., FcR interactions do not play a major role in inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by anti-CD154 monoclonal antibodies. *J Immunol* 2004. 173: 993-999.

50. Becher, B., Durell, B. G. và Noelle, R. J., Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 2002. 110: 493-497.

51. Becher, B., Durell, B. G., Miga, A. V., Hickey, W. F. và Noelle, R. J., The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. *J Exp Med* 2001. 193: 967-974.

52. Howard, L. M., Miga, A. J., Vanderlugt, C. L., Dal Canto, M. C., Laman, J. D., Noelle, R. J. và Miller, S. D., Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1999. 103: 281-290.

Toàn bộ phần bộc lộ của mỗi tài liệu được trích dẫn (bao gồm các sáng chế, các đơn sáng chế, các bài báo, các phần tóm tắt, các sách hướng dẫn, các sách, hoặc các dạng bộc lộ khác) trong phần tình trạng kỹ thuật của sáng chế, mô tả chi tiết sáng chế, và các ví dụ được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Các thay đổi khác nhau có thể được thực hiện cho sáng chế theo phần mô tả chi tiết ở trên. Thông thường, trong các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây, các thuật ngữ được sử dụng không nhằm giới hạn sáng chế vào các phương án cụ thể được bộc lộ trong phần mô tả và các yêu cầu bảo hộ. Theo đó, sáng chế không bị giới hạn ở phần bộc lộ, mà thay vào đó phạm vi của sáng chế là được xác định toàn bộ theo các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

Sáng chế có thể được thực hiện bằng cách khác so với đã được mô tả cụ thể trong phần mô tả và các ví dụ nêu trên. Các cải biến và các biến thể khác nhau của sáng chế là có thể theo các hướng dẫn nêu trên và, do đó, là nằm trong phạm vi bảo hộ của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Các đơn sáng chế liên quan

Sáng chế yêu cầu hưởng quyền ưu tiên theo các đơn sáng chế Mỹ số 62/192,269 được nộp vào ngày 14 tháng 7 năm 2015; đơn sáng chế Mỹ số 62/197,966 được nộp vào ngày 28 tháng 7 năm 2015; và đơn sáng chế Mỹ số 62/277,201 được nộp vào 11 tháng 1 năm 2016. Nội dung của các đơn sáng chế này được kết hợp ở đây để tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD154 hoặc đoạn kháng thể chứa polypeptit miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2.
2. Kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CD154 hoặc đoạn kháng thể này chứa các miền hằng định IgG1, IG2, IgG3 hoặc IgG4 ở người.
3. Kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CD154 hoặc đoạn kháng thể này chứa các miền hằng định IgG1 ở người.
4. Kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CD154 hoặc đoạn kháng thể này chứa các miền hằng định IgG1 ở người mà chứa đột biến E269R và đột biến K322A (trong đó đánh số theo Kabat).
5. Kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CD154 hoặc đoạn kháng thể này chứa các miền hằng định IgG1 ở người có chuỗi nhẹ và nặng lần lượt bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4.
6. Chế phẩm chứa kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1 và chất mang được dụng.
7. Chế phẩm chứa kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 2 và chất mang được dụng.

8. Chế phẩm chứa kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 3 và chất mang được dụng.

9. Chế phẩm chứa kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 4 và chất mang được dụng.

10. Chế phẩm chứa kháng thể kháng CD154 ở người hoặc đoạn kháng thể theo điểm 5 và chất mang được dụng.

1/15

HÌNH 1AChuỗi nặng

Vùng biến đổi được in đậm

Các CDR được bôi vàng

Các phần dư được tạo đột biến trở thành ái lực được gạch chân

Các đột biến Fe (E đến R và K đến A) được in đỏ

10	20	30	40	50	60
EVQLQESGPG	LVKPSSETLSL	TCTVSGDSIT	NGFWIWIRKP	PGNKLEYMGY	ISYSGSTYYN
70	80	90	100	110	120
PSLKSRI ^S IS	RDTSKNQFSL	KLSSVTAADT	GVYYCAY ^R SY	GRT ^R PYYFD ^R YW	GQGTTLT ^R VSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGFSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKAEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFP ^R PKP	KDTLMISRT ^R P	EVTCVVVDVS	HRDPEVKF ^R NW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCAVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK			

2/15

HÌNH 1BChuỗi nhẹ

Vùng biến đổi được in đậm

Các CDR được bôi vàng

Các phần dư được tạo đột biến trờng thành ái lực được gạch chân

10	20	30	40	50	60
DIVMTQSPSF	LSASVGDRVT	ITCKASS <u>NLG</u>	<u>H</u> AVAWYQQKP	GKSPKLLIYS	ASNRYTGVPD
70	80	90	100	110	120
RFGSGSGSGTD	FTLTISSLQP	EDFADYFCQQ	<u>Y</u> DDYPYTEGG	GTKLEIKRTV	AAPSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSTLT
190	200	210			
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

HÌNH 1CCác trình tự INX021

Miền biến đổi chuỗi nặng (SEQ ID NO: 1)

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSITNGFWIWIRKPPGNKLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRISISR
DTSKNQFSLKLSSVTAADTGVYYCAYRSYGRTPYYFDYWQQGTTTLTVSS

Miền biến đổi chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 2)

DIVMTQSPSFSLASVGDRTITCKASSNLGHAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISLQPEDFADYFCQQYDDYPYTFGGGGTKLEIK

Miền hằng định chuỗi nặng (SEQ ID NO: 3)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Miền hằng định chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 4)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

INX021 miền biến đổi chuỗi nặng CDR1 (SEQ ID NO: 5)

GDSITNGFWI

INX021 miền biến đổi chuỗi nặng CDR2 (SEQ ID NO: 6)

YISYSGSTY

INX021 miền biến đổi chuỗi nặng CDR3 (SEQ ID NO: 7)

YRSYGRTPYYFDY

INX021 miền biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 (SEQ ID NO: 8)

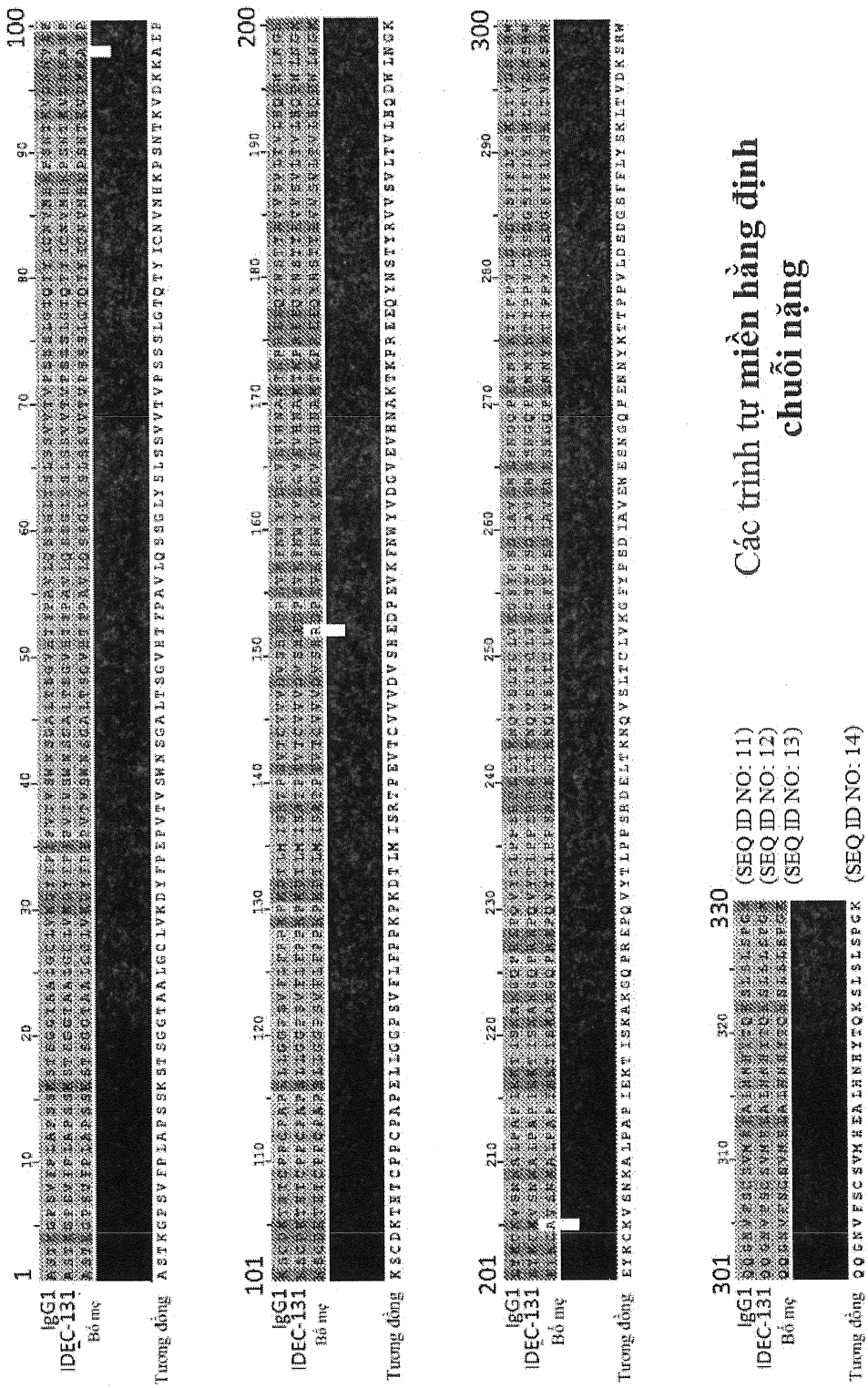
KASSNLGHAVA

INX021 miền biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 (SEQ ID NO: 9)

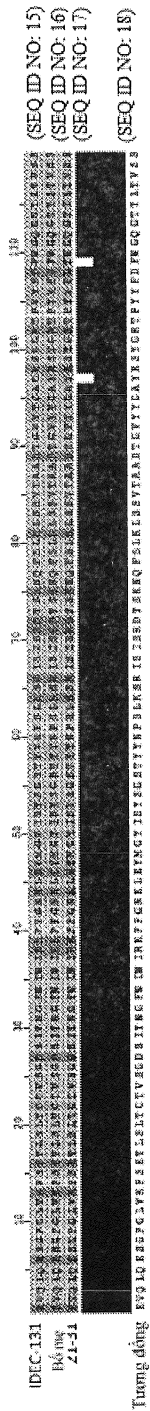
SASNRYT

INX021 miền biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 (SEQ ID NO: 10)

QQYDDYPYT

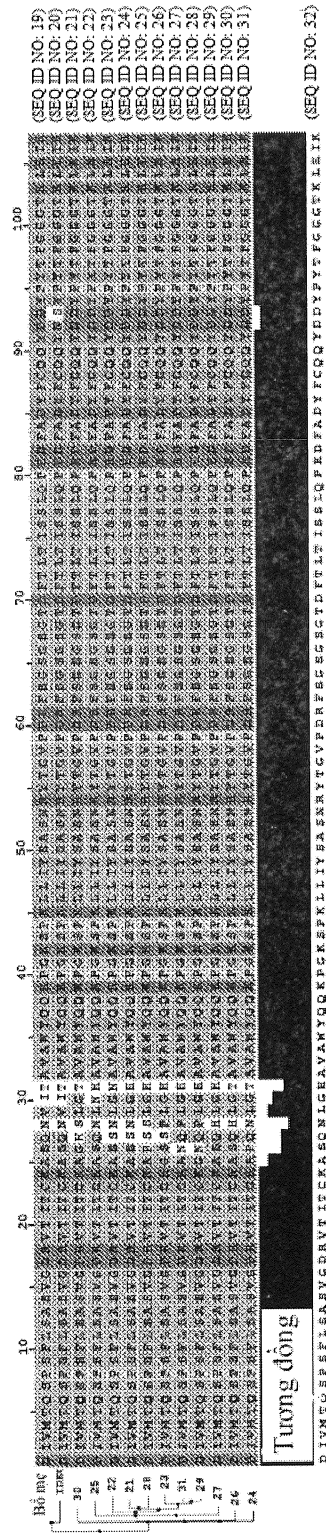


HÌNH 2A

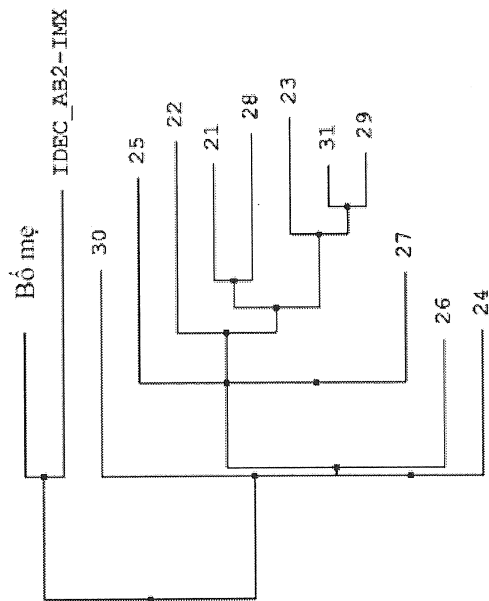


Các trình tự miền biến đổi
chuỗi nặng

HÌNH 2B



Các trình từ miền biến đổi chuỗi nhẹ

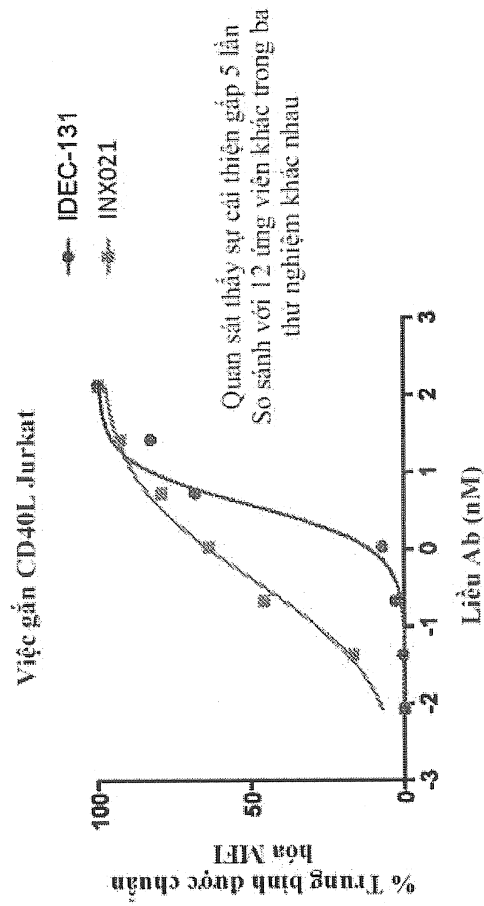


HÌNH 2C

Tiềm năng được cải thiện: sử dụng epitop IDEC

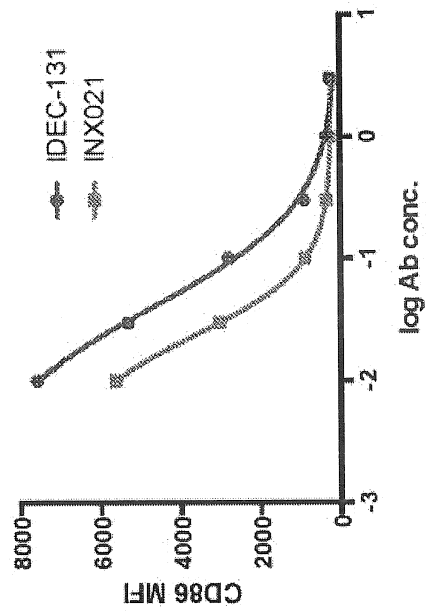
HÌNH 3

INX021 thể hiện khả năng gắn với CD40L trên các tế bào T tốt hơn

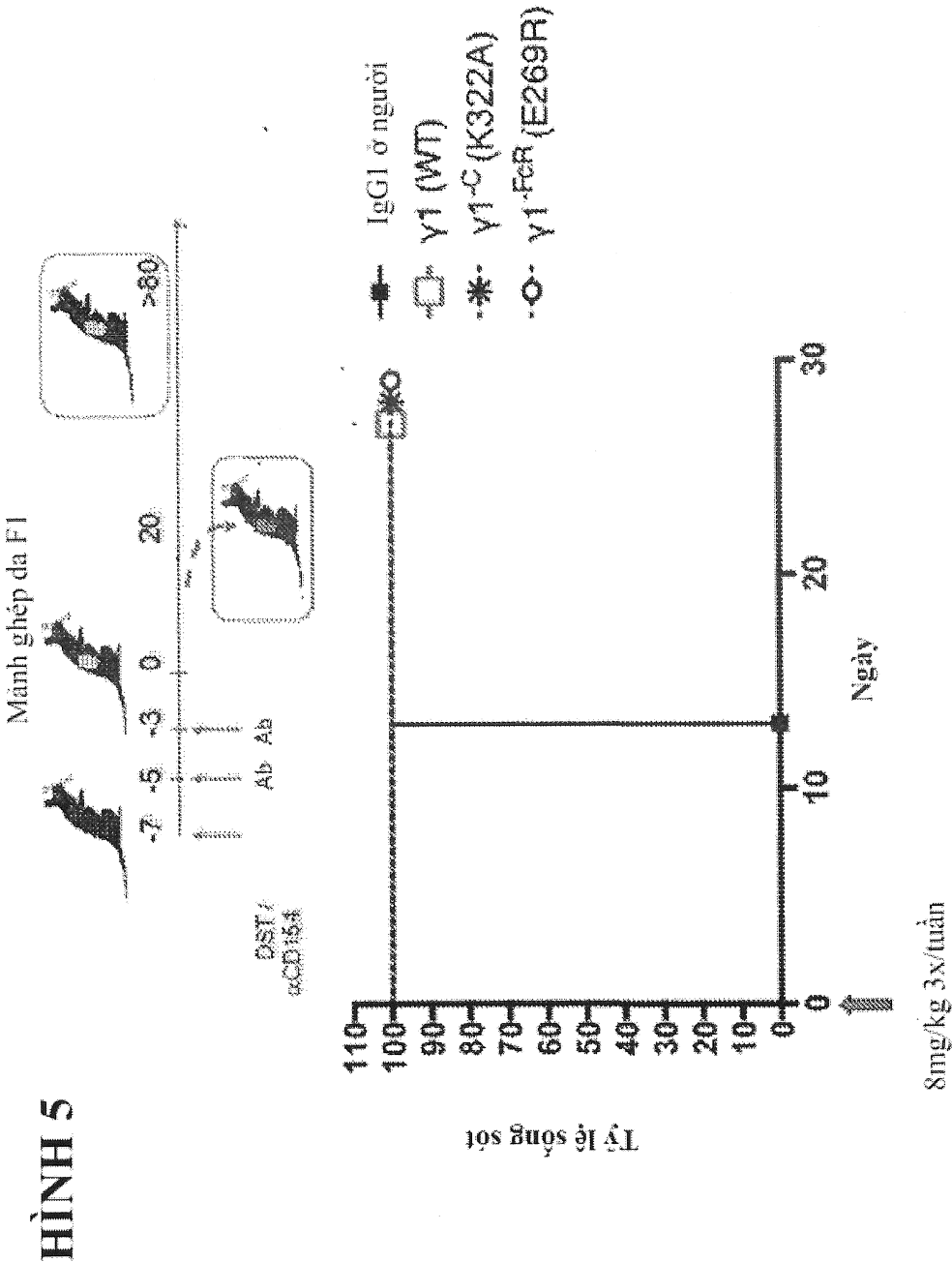


HÌNH 4

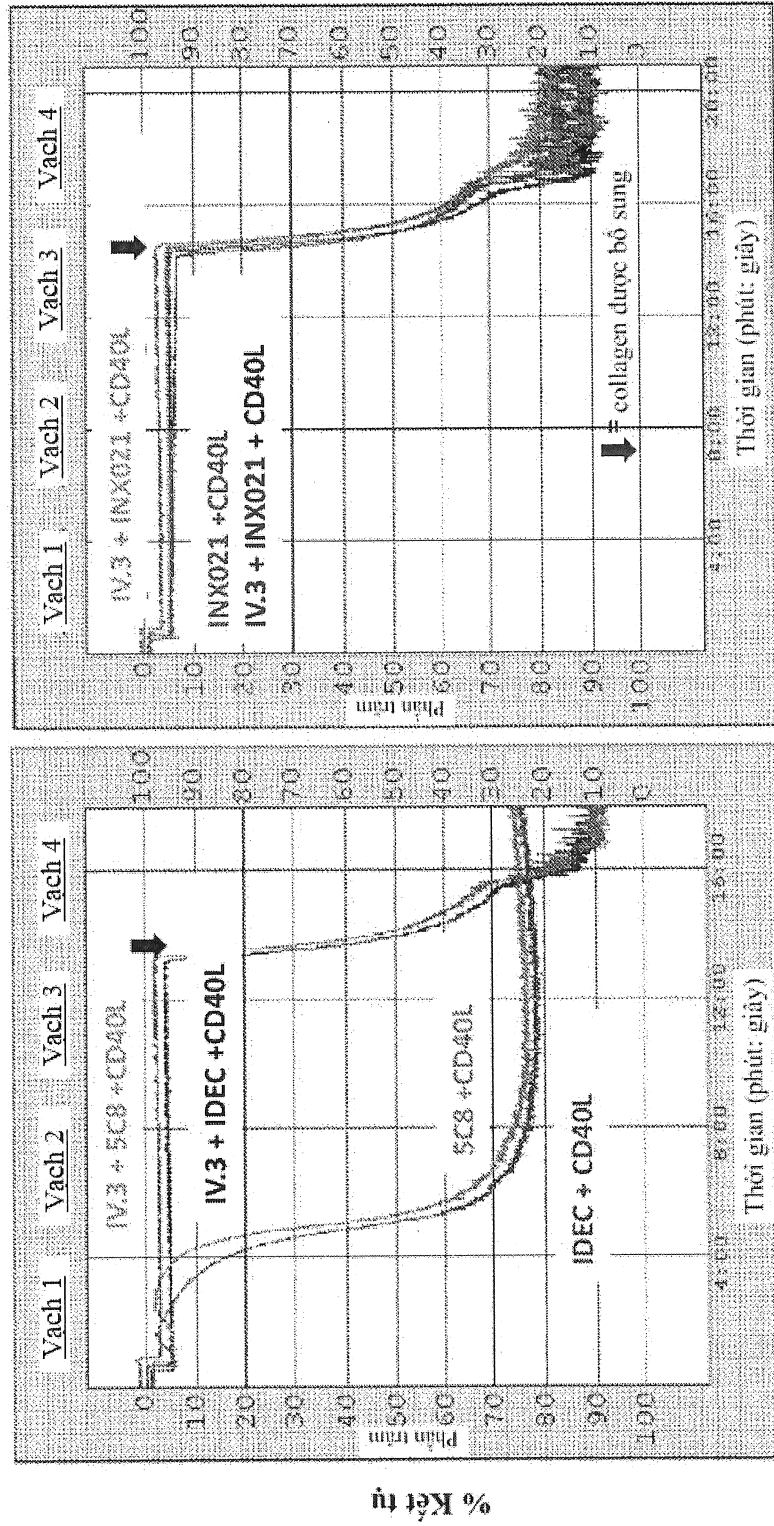
INX021 thể hiện nhiều tiềm năng hơn trong việc ngăn chặn sự hoạt hóa tế bào B được dẫn động CD40L tế bào T



Các đột biến FcR của hlgG kháng mCD40L tạo ra sự dung nạp



Các đột biến FcR của hlgG kháng CD40L không tạo ra sự kết tụ tiểu cầu

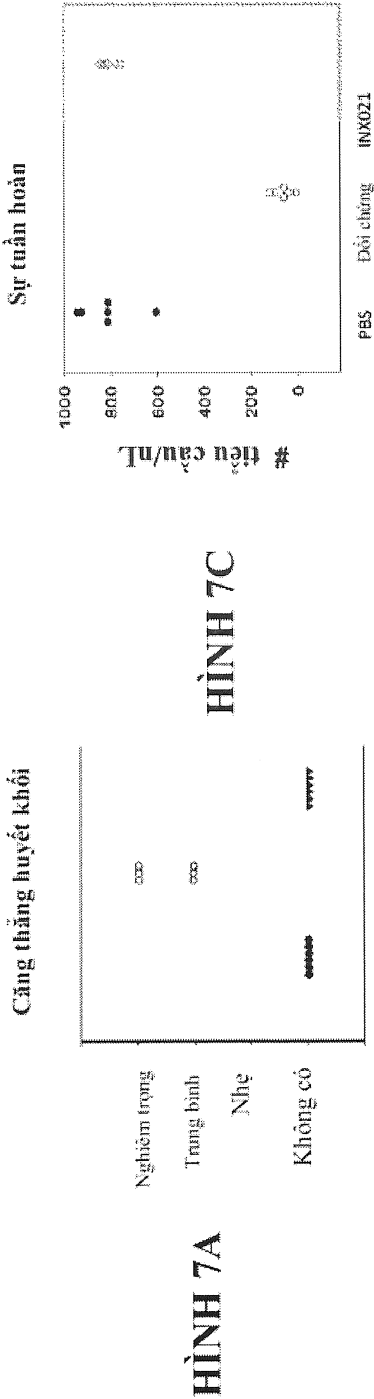


Các phức hợp miễn dịch của các đột biến FcR không tạo sự hoạt hóa tiểu cầu ở người và ở chuột được phân lập trong ống nghiệm.

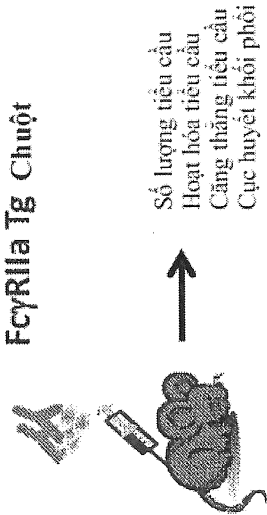
HÌNH 6

Thiếu hụt các hoạt động của tiểu cầu do các đột biến FcR của IgG1 kháng huCD40L trong cơ thể

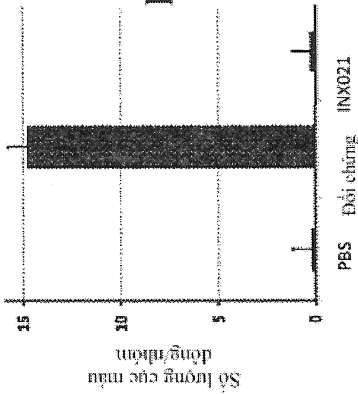
Các đột biến FcR không tạo nên căng thẳng huyết khối, số lượng tiểu cầu giảm sút, hoặc các cục máu đông trong phổi



Mô hình phức hợp miễn dịch gây ra sự giảm lượng tiểu cầu:



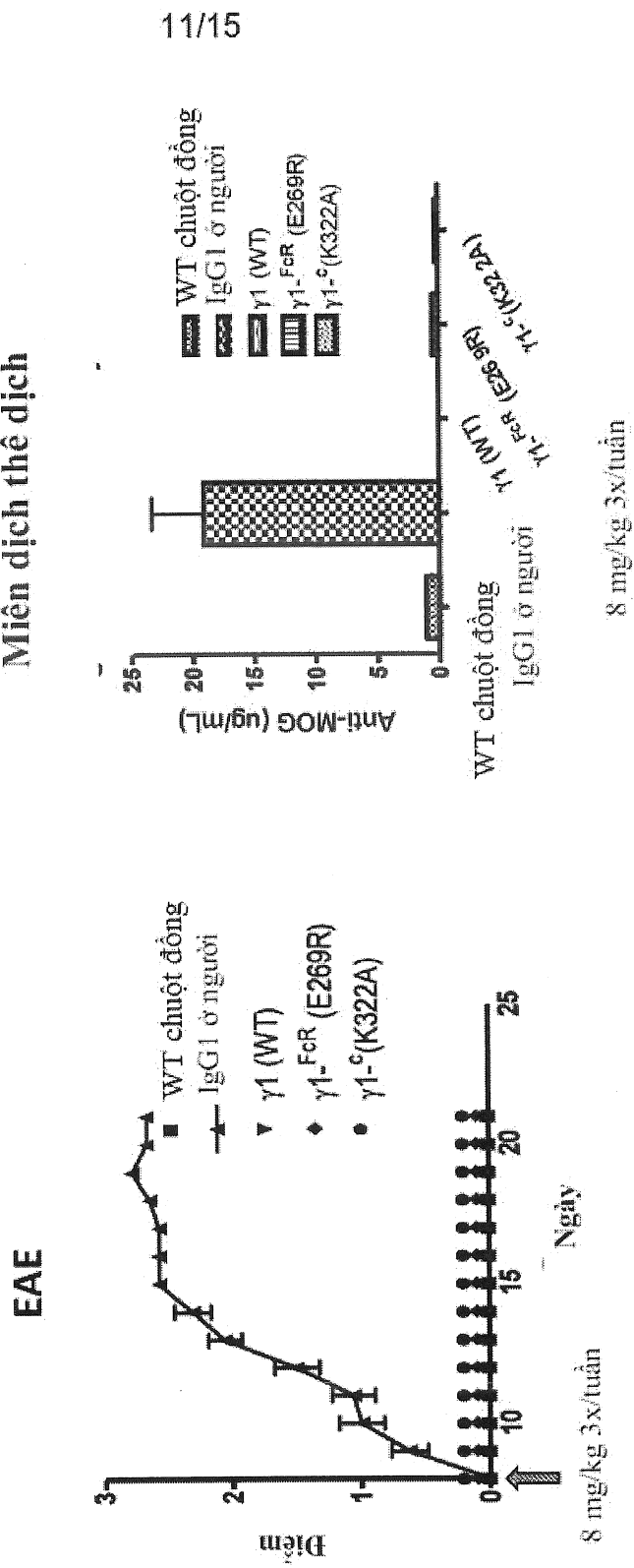
Vật nghẽn mạch



HÌNH 7D

Hoạt động của đột biến FcR/C1q kháng mCD40L abs

Các đột biến gắn FcR/C1q vẫn hoạt động trong các mô hình được quan tâm như EAE, dung nạp và phản hồi miễn dịch với MOG



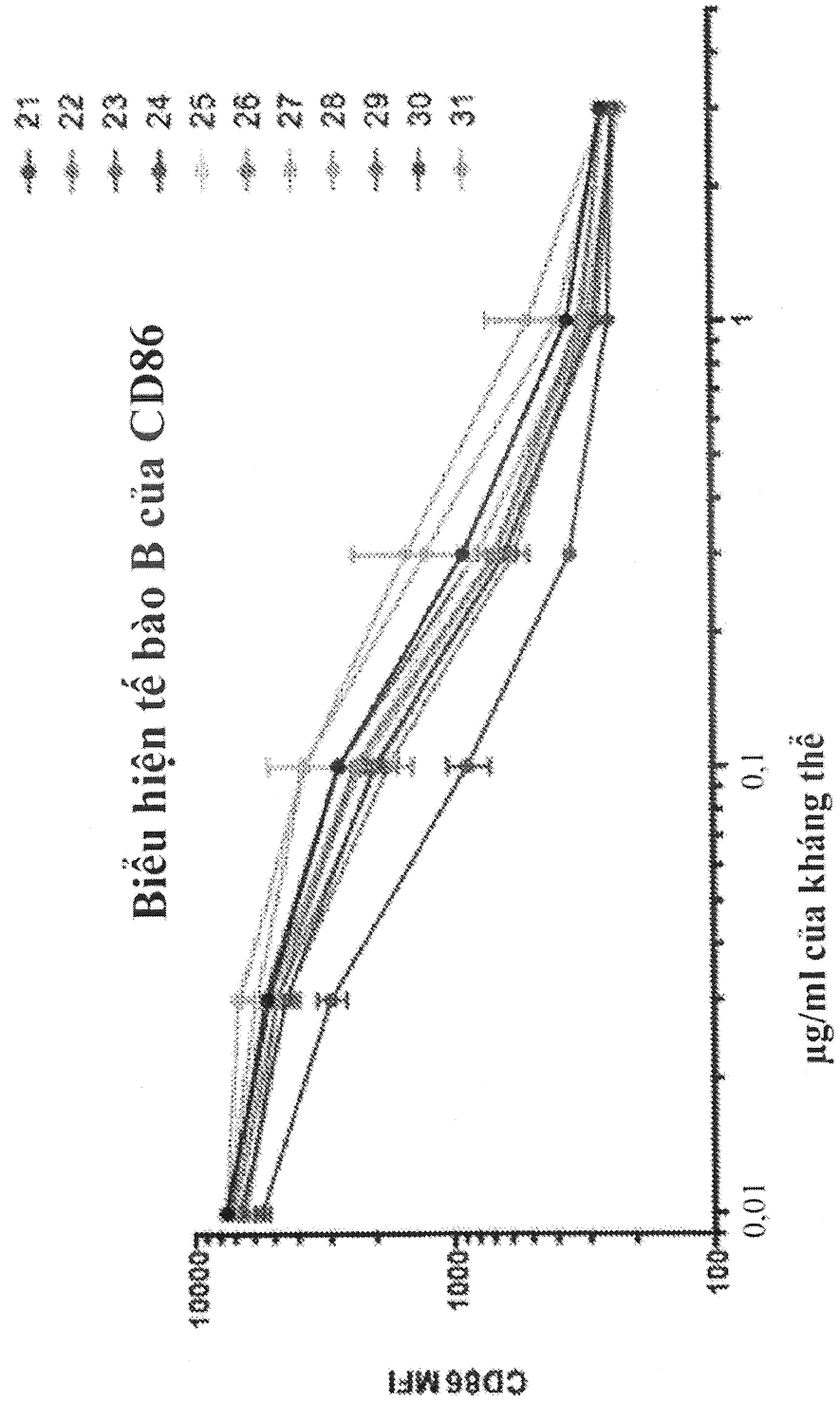
HÌNH 8A

HÌNH 8B

12/15

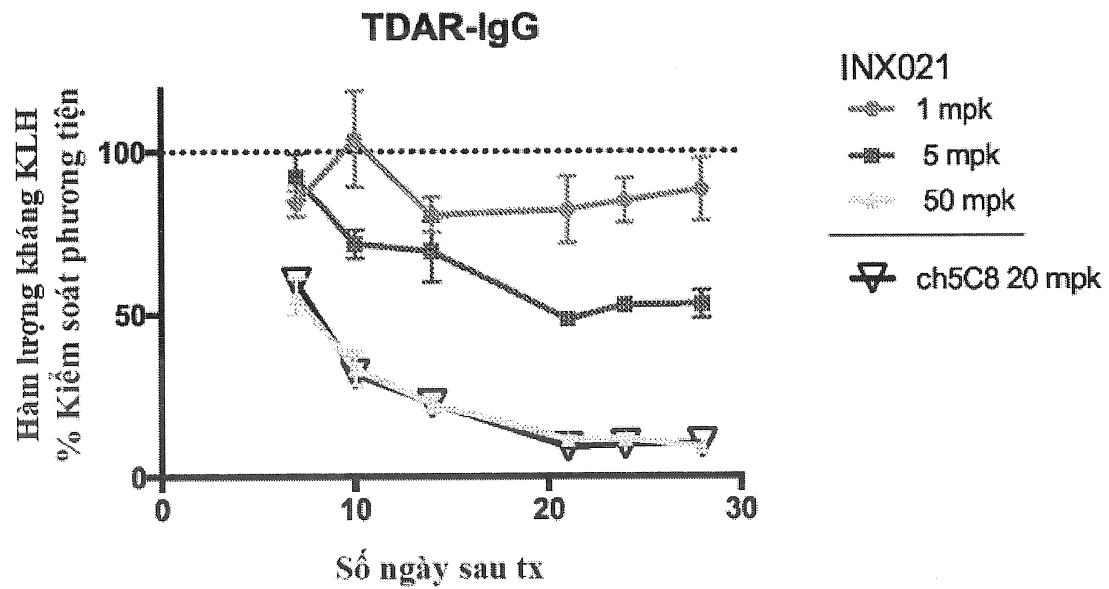
HÌNH 9

Biểu hiện tế bào B của CD86

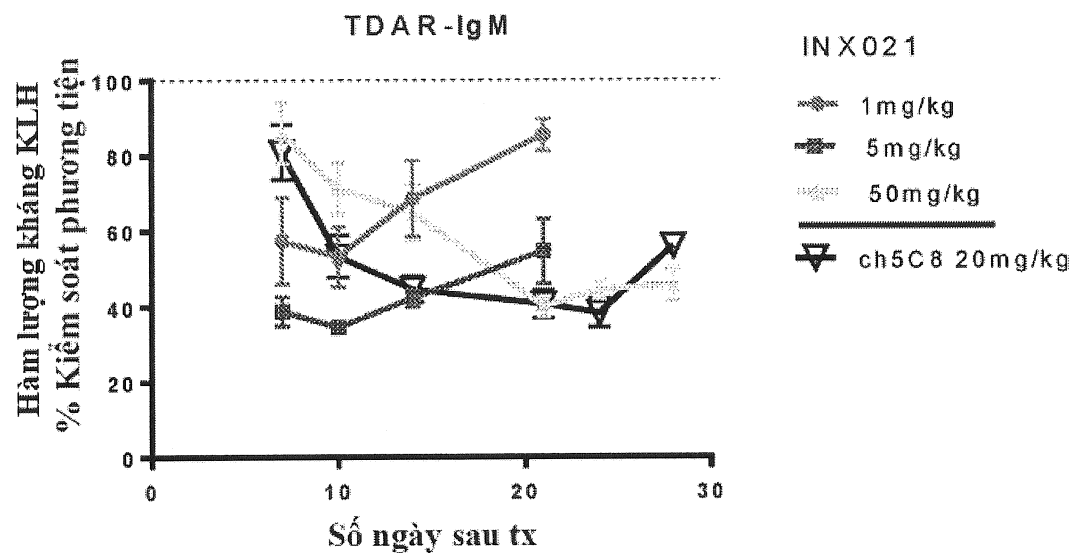


13/15

HÌNH 10A



HÌNH 10B

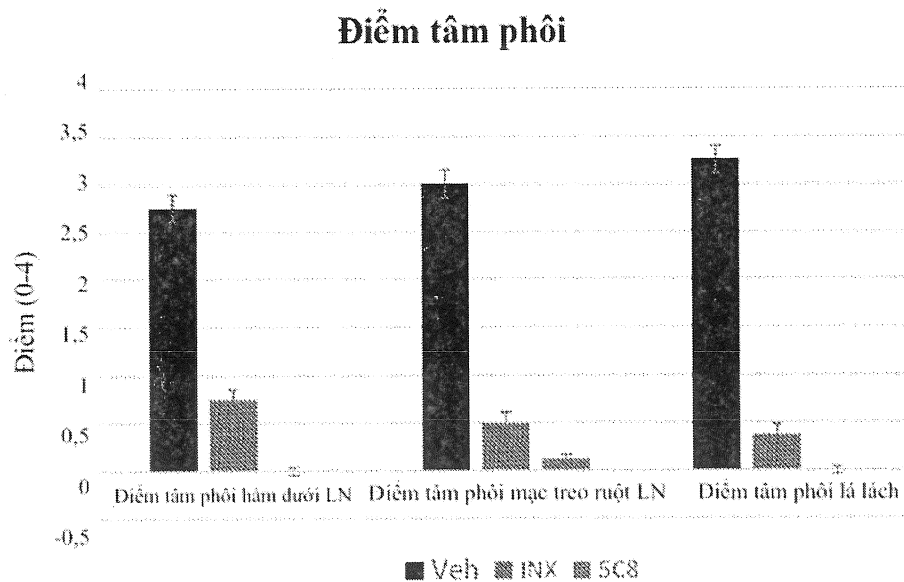


Các kết quả TDAR:

IgG TDAR (đỉnh) được so sánh với các kiểm soát dung dịch muối (các đường chấm).

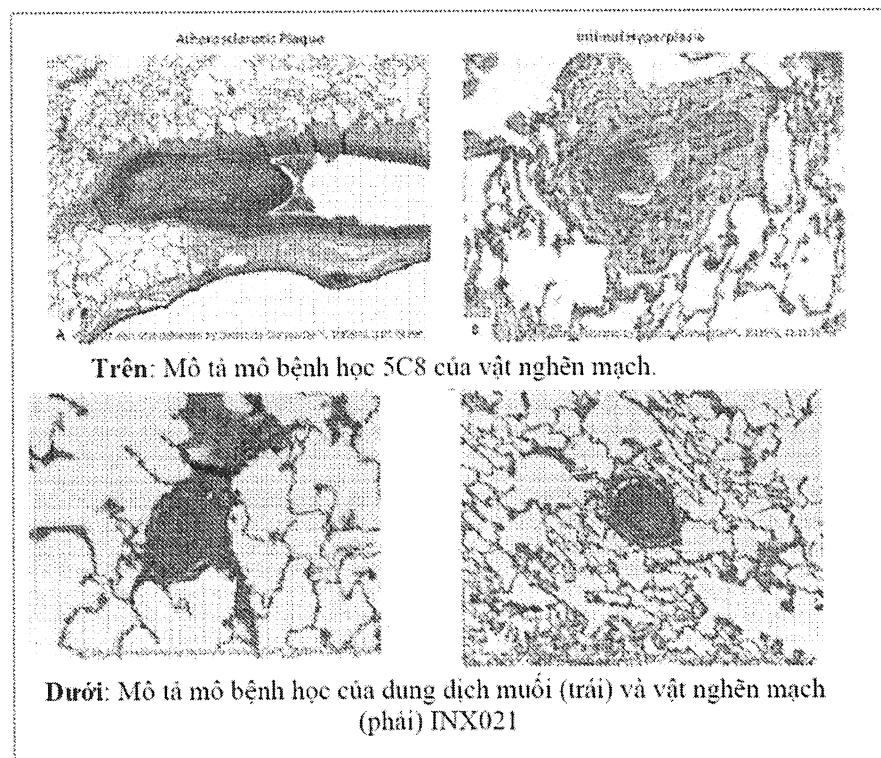
IgM TDAR (đáy) được so sánh với các kiểm soát dung dịch muối (các đường chấm).

HÌNH 11A



Các điểm cho điểm tâm phổi (ở trên): Số lượng và mức tế bào của các điểm tâm phổi trong lá lách và LN của các động vật được điều trị

HÌNH 11B



HÌNH 12

Tóm tắt về tần suất tổn thương khi so sánh với dữ liệu vật nghiền mạch UCB được công bố:

(CDP7657, kháng thể kháng CD40L thiếu vùng Fc, ngăn chặn các phản hồi miễn dịch phụ thuộc vào CD40L mà không có các biến chứng huyết khối: một nghiên cứu trong cơ thể Arthritis Res Ther. 2015; 17(1):234.)

Nhóm liều	Số động vật bị ảnh hưởng (%)	Tổng số phản phối được kiểm tra	Số phản phối bị ảnh hưởng (%)
Các đối chứng lịch sử			
Dung dịch nước muối	7 (50%)	406	2,5%
Biogen/UCB Pegylated Fab			
Dung dịch nước muối	1 (25%)	116	0,9%
Peg-Fab CDP765	3 (37,5%)	203	2,0%
Aglycosyl 5C8	3 (37,5%)	232	1,3%
hu5C8	5 (62,5%)	232	17,6%
ImmuNext INX021			
Phương tiện	2 (50%)	174	1,7%
INX021	3 (37,5%)	232	3,4%
ch5C8	6 (75%)	232	3,8%

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ROTHSTEIN, Jay
 <120> KHÁNG THỂ KHÁNG CD154 HOẶC ĐOẠN KHÁNG THỂ VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHỨNG
 <130> 43260.2613
 <140> TBA
 <141> 2016-07-13
 <150> 62/192269
 <151> 2015-07-14
 <150> 62/197966
 <151> 2015-07-28
 <150> 62/277201
 <151> 2016-01-11
 <160> 32
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> INX021 Miễn biến đổi chuỗi nặng
 <400> 1
 Glu 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 Thr Asn Gly
 20 25 30
 Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

34105

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> INX021 Miền biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly His Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> INX021 Miền hằng định chuỗi nặng

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> INX021 Miền hằng định chuỗi nhẹ

<400> 4

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

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

34105

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 5

Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly Phe Trp Ile
1 5 10

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 6

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
1 5

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 7

Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 8

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 8

Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly His Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 9

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 10

Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275

280

285

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

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

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

<210> 12

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> IDEC-131

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

34105

115					120					125					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325						330					

<210> 13
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tương đồng trình tự miễn hăng định chuỗi nặng

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nặng IDEC-131

<400> 15

Glu 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 Thr Asn Gly
 20 25 30

Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 16

Glu 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 Thr Asn Gly
20 25 30

Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 120
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu 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 Thr Asn Gly
 20 25 30

Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tương đồng trình tự miền biến đổi chuỗi nặng

<400> 18

Glu 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 Thr Asn Gly
 20 25 30

Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ile Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ IDEC_AB2-IMX

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ile Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 30

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

34105

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly His Ser Leu Gly Thr Ala	20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile	35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	100	105	

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 25
 <400> 22

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

34105

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 22

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asn Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 21

<400> 24

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Ser	Asn	Leu	Gly	His	Ala
			20					25					30		

Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Ser	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	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	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105		

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 28

<400> 25

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Pro	Ser	Ser	Leu	Gly	His	Ala
			20					25					30		

Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 23

<400> 26

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Ser Pro Leu Gly His Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 31

<400> 27

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asn Gln Pro Leu Gly His Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 29

<400> 28

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Asn Gln Pro Leu Gly His Ala

20

25

30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 27

<400> 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln His Leu Gly His Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 26

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln His Leu Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ 24

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Pro Gln Asn Leu Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tương đồng trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 32

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Leu Gly His Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105