(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) **1-0047785**

(51)[2020.01] **A61P 35/00**; C07K 16/28

(13) **B**

(21) 1-2021-01221
(22) 12/08/2019
(86) PCT/US2019/046156 12/08/2019
(87) WO 2020/036867 20/02/2020
(30) 62/718,106 13/08/2018 US
(45) 25/06/2025 447
(43) 25/08/2021 401A
(73) Inhibrx Biosciences, Inc. (US)
11025 N. Torrey Pines Road, Suite 140, La Jolla, California 92037, United States of America
(72) TIMMER, John C. (US); CRAGO, William (US); JONES, Kyle (US); SULZMAIER, Florian (DE); BECKLUND, Bryan (US); ECKELMAN, Brendan P. (US); WILLIS, Katelyn (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) POLYPEPTIT LIÊN KẾT VỚI OX40, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYPEPTIT NÀY

(21) 1-2021-01221

(57) Sáng chế đề xuất polypeptit chứa VHH liên kết với OX40. Theo một số phương án, polypeptit chứa VHH liên kết và kích thích OX40 được đề xuất. Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm và phương pháp sản xuất polypeptit này.

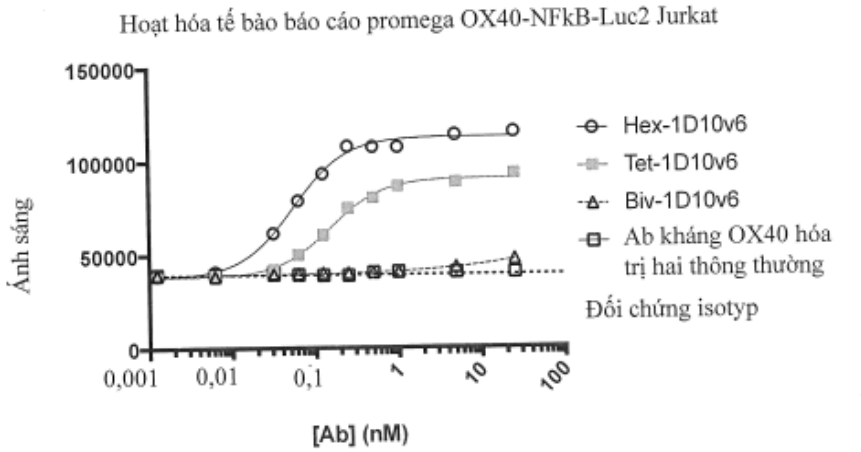


FIG. 5

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polypeptit liên kết với OX40, và phương pháp sử dụng polypeptit liên kết với OX40 để điều biến hoạt tính sinh học của OX40. Phương pháp này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, phương pháp điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án, polypeptit liên kết với OX40 là polypeptit liên kết với OX40 đa hóa trị.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Siêu họ thụ thể yếu tố hoại tử khối u (TNFRSF) bao gồm một vài thụ thể bề mặt tế bào liên quan về mặt cấu trúc. Hoạt hóa bằng phối tử đa phân tử là đặc tính chung của nhiều thụ thể này, và sự hoạt hóa này có công dụng trị liệu ở các bệnh khác nhau nếu được hoạt hóa chính xác. Chủ vận hữu hiệu của họ thụ thể này có thể cần sự tạo chùm thứ tự cao hơn là đạt được sử dụng kháng thể hóa trị hai truyền thống.

OX40 (TNFRSF4, CD134) là thành viên của siêu họ thụ thể TNF, và được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T từ 24 đến 72 giờ sau khi hoạt hóa tế bào T. Tế bào thể hiện kháng nguyên tiếp cận gần với tế bào T hoạt hóa thể hiện phối tử OX40 (OX40L) trên bề mặt của chúng, liên kết và tạo chùm OX40 trên tế bào T gửi tín hiệu kích thích đồng thời mà tăng sự giãn nở tế bào T và tăng cường biệt hóa tế bào T tác động. Hoạt hóa OX40 do đó để duy trì đáp ứng miễn dịch, ví dụ, bằng cách tăng cường sống sót và chức năng của tế bào T.

Do đó, có nhu cầu trị liệu với chất chủ vận có hiệu lực hơn của OX40.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Được đề xuất trong bản mô tả là polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết OX40, trong đó miền VHH chứa CDR1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, CDR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, và CDR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12. Theo một số phương án, miền VHH được làm giống như của người. Theo một số phương án, miền VHH chứa khung 2 (FR2) chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22. Theo một số phương án, miền VHH chứa FR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 và FR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23. Theo một số phương án, miền VHH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, polypeptit chứa hai miền VHH. Theo một số phương án, polypeptit chứa ba miền VHH. Theo một số phương án, polypeptit chứa bốn miền VHH. Theo một số phương án, polypeptit chứa ít nhất một miền liên kết mà liên kết kháng nguyên thứ hai khác với OX40. Theo một số phương án, kháng nguyên thứ hai được chọn từ PD-1, PD-L1, và 41BB. Theo một số phương án, ít nhất một miền liên kết mà liên kết kháng nguyên thứ hai là chất đối kháng hoặc chất chủ vận. Theo một số phương án, ít nhất một miền liên kết mà liên kết kháng nguyên thứ hai là miền VHH.

Theo một số phương án, mỗi miền VHH liên kết OX40. Theo một số phương án, mỗi miền VHH chứa CDR1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, CDR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, và CDR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12. Theo một số phương án, mỗi miền VHH chứa khung 2 (FR2) chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22. Theo một số phương án, mỗi miền VHH chứa FR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 và FR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23. Theo một số phương án, mỗi miền VHH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, polypeptit chứa miền Fc. Theo một số phương án, miền Fc chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 25 và 26. Theo một số phương án, polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14. Theo một số phương án, polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15. Theo một số phương án, được đề xuất trong bản mô tả là polypeptit mà liên kết OX40 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15. Theo một số phương án, được đề xuất trong bản mô tả là polypeptit mà liên kết OX40 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án khác nhau, polypeptit được đề xuất trong bản mô tả tạo thành đime trong điều kiện sinh lý. Theo một số phương án, polypeptit chứa miền Fc.

Theo một số phương án, polypeptit được đề xuất trong bản mô tả tăng sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Theo một số phương án, polypeptit tăng sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T khi có mặt tế bào Treg. Theo một số phương án, polypeptit tăng sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần. Theo một số phương án, polypeptit tăng sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vivo* ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần.

Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện CD25 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện CD25

trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần. Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện CD25 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vivo* ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần.

Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện CD71 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện CD71 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần. Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện CD71 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vivo* ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần.

Theo một số phương án, polypeptit tăng tín hiệu NFκB ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Theo một số phương án, polypeptit tăng tín hiệu NFκB ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* ít nhất 1,5 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, hoặc ít nhất 5 lần. Theo một số phương án, polypeptit tăng tín hiệu NFκB ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vivo* ít nhất 1,5 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, hoặc ít nhất 5 lần.

Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện IFNγ ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện IFNγ ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* ít nhất 1,5 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, hoặc ít nhất 5 lần. Theo một số phương án, polypeptit tăng biểu hiện IFNγ ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vivo* ít nhất 1,5 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, hoặc ít nhất 5 lần.

Theo các phương án khác nhau, polypeptit tăng biểu hiện của CD25, CD71, và/hoặc IFNγ, và/hoặc tăng tín hiệu NFκB khi có mặt tế bào Treg. Theo các phương án khác nhau, sự tăng được xác định dưới dạng trung bình của các kết quả từ tế bào T của ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau.

Theo các phương án khác nhau, polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả là chủ vận của hoạt tính sinh học OX40. Theo một số phương án, OX40 là OX40 của người. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 của người với ái lực (K_D) nhỏ hơn 10 nM, nhỏ hơn 5 nM, nhỏ hơn 2 nM, hoặc nhỏ hơn 1 nM. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 của khỉ cynomolgus với ái lực (K_D) nhỏ hơn 10 nM, nhỏ hơn 5 nM, nhỏ hơn 2 nM, hoặc nhỏ hơn 1 nM.

Theo một số phương án, dược phẩm được đề xuất, chứa polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết với OX40 được đề xuất trong bản mô tả và chất mang dược dụng.

Theo một số phương án, axit nucleic phân lập được đề xuất mà mã hóa polypeptit chứa ít nhất một miền VHH liên kết với OX40 được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, vectơ được đề xuất mà chứa axit nucleic. Theo một số phương án, tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vectơ được đề xuất. Theo một số phương án, tế bào chủ được đề xuất mà biểu hiện polypeptit chứa ít nhất một miền VHH liên kết với OX40 được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, tế bào chủ tiết polypeptit liên kết với OX40. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào sơ cấp của người. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào T. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào T- thụ thể kháng nguyên thể khảm (CAR).

Theo một số phương án, phương pháp sản xuất polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết OX40 được đề xuất, bao gồm ủ tế bào chủ trong điều kiện thích hợp để biểu hiện polypeptit. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm phân lập polypeptit.

Theo một số phương án, phương pháp làm tăng sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T được đề xuất, bao gồm tiếp xúc tế bào T với polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết với OX40. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng biểu hiện CD25 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T được đề xuất, bao gồm tiếp xúc tế bào T với polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết với OX40. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng biểu hiện CD71 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T được đề xuất, bao gồm tiếp xúc tế bào T với polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết với OX40. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng biểu hiện IFNγ ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T được đề xuất, bao gồm tiếp xúc tế bào T với polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết với OX40. Theo một số phương án, phương pháp làm tăng tín hiệu NFκB ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T được đề xuất, bao gồm tiếp xúc tế bào T với polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết OX40. Theo các phương án khác nhau, tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T là *in vitro*. Theo các phương án khác nhau, tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T là *in vivo*. Theo các phương án khác nhau, tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T

có mặt tế bào Treg. Theo các phương án khác nhau, sự tăng ít nhất 1,5 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, hoặc ít nhất 5 lần.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư được đề xuất, bao gồm dùng cho đối tượng mắc bệnh ung thư lượng có tác dụng làm thuốc của polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư được đề xuất, bao gồm dùng cho đối tượng mắc bệnh ung thư lượng có tác dụng làm thuốc của tế bào chủ mà biểu hiện polypeptit chứa ít nhất một miền VHH mà liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, tế bào chủ tiết polypeptit liên kết với OX40. Theo một số phương án, tế bào chủ biểu hiện polypeptit liên kết với OX40 trên bề mặt. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ ung thư tế bào cơ sở, bệnh ung thư ống mật; bệnh ung thư bàng quang; bệnh ung thư xương; bệnh ung thư não và hệ thần kinh trung ương; bệnh ung thư vú; bệnh ung thư của màng bụng; bệnh ung thư cổ; bệnh ung thư biểu mô nhau thai; bệnh ung thư ruột và trực tràng; bệnh ung thư mô liên kết; bệnh ung thư của hệ tiêu hóa; bệnh ung thư màng trong tử cung; bệnh ung thư thực quản; bệnh ung thư mắt; bệnh ung thư đầu và cổ; bệnh ung thư dạ dày; bệnh ung thư dạ dày ruột; u nguyên bào đệm; ung thư biểu mô gan; u gan; ung thư nội biểu mô; thận hoặc ung thư thận; ung thư thanh quản; bệnh ung thư gan; bệnh ung thư phổi; ung thư phổi tế bào nhỏ; ung thư phổi không phải tế bào nhỏ; ung thư biểu mô tuyến của phổi; ung thư biểu mô vảy của phổi; u ác tính; u tủy; u nguyên bào thần kinh; ung thư khoang miệng; bệnh ung thư buồng trứng; bệnh ung thư tuyến tụy; ung thư tuyến tiền liệt; u nguyên bào võng mạc; u cơ vân; ung thư trực tràng; ung thư hệ hô hấp; ung thư biểu mô tuyến nước bọt; sarcom; ung thư da; ung thư tế bào vảy; ung thư dạ dày; ung thư tinh hoàn; ung thư tuyến giáp; ung thư tử cung hoặc màng trong tử cung; ung thư hệ tiết niệu; ung thư âm hộ; u lympho; u lympho Hodgkin; u lympho không Hodgkin; u lympho tế bào B; u lympho không Hodgkin cấp thấp/nang (NHL); NHL tế bào lympho nhỏ (SL); NHL cấp trung gian/nang; NHL khuếch tán cấp trung gian; NHL nguyên bào miễn dịch cấp cao; NHL nguyên bào lympho cấp cao; NHL tế bào nhỏ không phân cắt cấp cao; bệnh cồng kềnh NHL; u lympho tế bào lớp vỏ; u lympho liên quan đến AIDS; chứng đại globulin huyết thanh Waldenstrom; bệnh bạch cầu u lympho mãn tính (CLL); bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL); bệnh bạch cầu tế bào lông; và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho mãn tính.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư còn bao gồm việc dùng chất trị liệu bổ sung. Theo một số phương án, chất trị liệu bổ sung là chất chống ung thư. Theo một số phương án, chất chống ung thư được chọn từ chất hóa trị liệu, tác nhân sinh học chống ung thư, xạ trị, liệu pháp CAR-T và virut tiêu hủy ung thư. Theo một số phương án, chất trị liệu bổ sung là tác nhân sinh học chống ung thư. Theo một số phương án, tác nhân sinh học chống ung thư là chất ức chế PD-1 và/hoặc PD-L1. Theo một số phương án, tác nhân sinh học chống ung thư được chọn từ nivolumab, pidilizumab, pembrolizumab, durvalumab, atezolizumab, avelumab, AMP-224, BMS-936559, AMP-514, MDX-1105, TSR-042, STI-A1010, và STI-A1110. Theo một số phương án, tác nhân sinh học chống ung thư là chất ức chế VISTA, gpNMB, B7H3, B7H4, HHLA2, CD73, CTLA4, hoặc TIGIT. Theo một số phương án, tác nhân sinh học chống ung thư là kháng thể. Theo một số phương án, tác nhân sinh học chống ung thư là xytokin. Theo một số phương án, chất chống ung thư là liệu pháp CAR-T. Theo một số phương án, chất chống ung thư là một loại virut tiêu hủy ung thư. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư được đề xuất trong bản mô tả còn bao gồm sự cắt bỏ khối u và/hoặc xạ trị.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện liên kết không đặc hiệu của 1D10v1-Fc và 1D10v6-Fc với tế bào HEK293không được chuyển nhiễm.

FIG. 2A-FIG. 2B thể hiện liên kết của 1D10v1-Fc và 1D10v6-Fc với tế bào CHO mà biểu hiện OX40 của người (A) và OX40 của khỉ cynomolgus (B).

FIG. 3A-FIG. 3B thể hiện liên kết của 3x1D10v1-Fc hóa trị sáu và 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu (còn được gọi là Hex-1D10v1 và Hex-1D10v6, tương ứng) với tế bào HEK293 biểu hiện OX40 của người (A) và tế bào HEK293 không được chuyển nhiễm (B).

FIG. 4 thể hiện sự hoạt hóa biểu hiện luciferaza bằng 3x1D10v1-Fc hóa trị sáu và 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu ở tế bào Jurkat biểu hiện OX40 và chứa dòng xuôi gen luciferaza của thành phần đáp ứng OX40.

FIG. 5 thể hiện biểu hiện luciferaza ở tế bào Jurkat biểu hiện OX40 và chứa dòng xuôi gen luciferaza của thành phần đáp ứng OX40 tiếp xúc với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu, 2x1D10v6-Fc hóa trị bốn, và 1D10v6-Fc hóa trị hai.

FIG. 6 thể hiện sự tăng sinh phụ thuộc vào liều của tế bào $CD4^+$ T từ bốn thể cho khác nhau (L556, Leuko 20, Leuko 22, và Leuko 9) được đồng kích thích với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu và 1D10v6-Fc hóa trị hai.

FIG. 7 thể hiện sự tăng phụ thuộc vào liều của biểu hiện $CD25^+$ trên tế bào $CD4^+$ T từ bốn thể cho khác nhau (L556, Leuko 20, Leuko 22, và Leuko 9) được đồng kích thích với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu và 1D10v6-Fc hóa trị hai.

FIG. 8 thể hiện sự tăng phụ thuộc vào liều của biểu hiện $CD71^+$ trên tế bào $CD4^+$ T từ bốn thể cho khác nhau (L556, Leuko 20, Leuko 22, và Leuko 9) được đồng kích thích với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu và 1D10v6-Fc hóa trị hai.

FIG. 9 thể hiện sự tăng phụ thuộc vào liều của IFNγ được tiết từ tế bào $CD4^+$ T từ bốn thể cho khác nhau (L556, Leuko 20, Leuko 22, và Leuko 9) được đồng kích thích với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu và hóa trị hai 1D10v6-Fc.

FIG. 10 thể hiện sự tăng ở tế bào $CD4^+$ T và tế bào $CD8^+$ T sau khi đồng kích thích tế bào T của người với kháng thể kháng CD3 và 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu ("không kháng thể" cho biết sự kích thích kháng thể kháng CD3 không có 3x1D10v1-Fc hóa trị sáu).

FIG. 11 thể hiện sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và $CD8^+$ T tăng (hai panen ở trên), phần trăm tăng của tế bào $CD25^+$ $CD4^+$ và $CD25^+$ $CD8^+$ T (hai panen ở giữa), và phần trăm tăng của tế bào $CD71^+$ $CD4^+$ và $CD71^+$ $CD8^+$ T (hai panen ở dưới), sau khi đồng kích thích tế bào T từ 10 thể cho khỏe mạnh với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu.

FIG. 12 thể hiện tăng phần trăm tế bào $IFN\gamma^+$ $CD4^+$ nội bào và $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ T nội bào sau khi đồng kích thích tế bào T từ 4 thể cho khỏe mạnh với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu.

FIG. 13 thể hiện rằng việc điều trị với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu đảo sự ức chế được điều tiết bởi Treg của sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ T gen đáp ứng và tăng phần trăm tế bào $CD4^+$ T biểu hiện gen đánh dấu hoạt hóa CD25 và CD71.

FIG. 14A-FIG. 14B thể hiện rằng sự kết hợp của pembrolizumab, PD-1 nhắm mục tiêu kháng thể, và 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu (Hex-1D10v6) nâng cao sản xuất IL-2 ở phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR). FIG. 14A thể hiện sự kết hợp của 10 nM pembrolizumab với các nồng độ khác nhau của 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu. FIG. 14B thể

hiện sự kết hợp của 1 nM 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu với các nồng độ khác nhau của pembrolizumab.

FIG. 15 thể hiện profin dược động học (PK) của 5 mg/kg, 20 mg/kg, hoặc 60 mg/kg 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu (Hex-1D10v6) được sử dụng cho khỉ cynomolgus. Sự tiếp xúc toàn thân đạt được và tăng tỷ lệ thuận với liều lượng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương án được đề xuất trong bản mô tả đề cập đến polypeptit liên kết với OX40 đa hóa trị mà điều biến hoạt tính của OX40 và sử dụng chúng trong các phương pháp điều trị bệnh ung thư khác nhau.

Định nghĩa và các phương án khác nhau

Các đề mục được sử dụng trong bản mô tả này chỉ dành cho mục đích tổ chức và không được hiểu là giới hạn đối tượng được mô tả.

Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong bản mô tả này, bao gồm đơn xin cấp bằng sáng chế, công bố, và số gia nhập Genbank trong bản mô tả này được viện dẫn nhờ tham chiếu, như thể riêng mỗi tài liệu tham khảo được thể hiện cụ thể và riêng rẽ để được viện dẫn nhờ tham chiếu toàn bộ nó.

Kỹ thuật và quy trình được mô tả hoặc viện dẫn trong bản mô tả này nói chung được hiểu rõ và thường được sử dụng phương pháp thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, như, ví dụ, phương pháp được sử dụng rộng rãi được mô tả ở Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al. eds*., (2003)); loạt METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor *eds*. (1995)), Harlow and Lane, *eds*. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, và ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, *ed*. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, *ed.*, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), *ed*., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds.,

1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, *eds.*); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, *eds.*, 1987); PCR: The Polymease Chain Reaction, (Mullis *et al.*, *eds.*, 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, *eds.*, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., *ed.*, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, *eds.*, Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, *eds.*, Harwood Academic Publishers, 1995); và Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, *eds.*, J.B. Lippincott Company, 1993); và phiên bản cập nhật của chúng.

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong sáng chế sẽ có nghĩa mà được hiểu chung bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ngoài ra, trừ khi theo cách khác cần bởi ngữ cảnh hoặc được thể hiện rõ, thuật ngữ số ít sẽ bao gồm số nhiều và thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm số ít. Đối với bất kỳ xung đột về định nghĩa giữa các nguồn hoặc tài liệu tham khảo khác nhau, định nghĩa được đề xuất trong bản mô tả sẽ kiểm soát.

Nói chung, đánh số của gốc trong chuỗi nặng globulin miễn dịch là chuỗi nặng của chỉ số EU như trong Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). "Chỉ số EU như trong Kabat" chỉ việc đánh số gốc của kháng thể IgG1 EU của người.

Được hiểu là các phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này bao gồm "gồm" và/hoặc "về cơ bản gồm" các phương án. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các dạng số ít bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi được thể hiện theo cách khác. Sử dụng thuật ngữ "hoặc" trong bản mô tả này không có nghĩa là ngụ ý rằng các lựa chọn thay thế loại trừ lẫn nhau.

Theo sáng chế, sử dụng "hoặc" có nghĩa là "và/hoặc" trừ khi được nêu hoặc được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Trong ngữ cảnh điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc vào nhiều điểm, sử dụng "hoặc" dùng để chỉ nhiều hơn một điểm yêu cầu bảo hộ độc lập hoặc phụ thuộc trước đó.

Cụm từ "mẫu tham khảo", "tế bào tham khảo", hoặc "mô tham khảo", là mẫu với ít nhất một đặc tính đã biết mà có thể được sử dụng làm so sánh với mẫu với ít nhất một đặc tính không xác định. Theo một số phương án, mẫu tham khảo có thể được sử dụng làm chỉ báo dương hoặc âm. Mẫu tham khảo có thể được sử dụng để thiết lập mức độ protein và/hoặc mARN mà có mặt ở, ví dụ, mô khỏe mạnh, trái ngược với mức protein và/hoặc mARN có mặt ở mẫu với đặc tính không xác định. Theo một số phương án, mẫu tham khảo đến từ cùng đối tượng, nhưng từ phần khác nhau của đối tượng được thử nghiệm. Theo một số phương án, mẫu tham khảo là từ vùng mô xung quanh hoặc liền kề với bệnh ung thư. Theo một số phương án, mẫu tham khảo không từ đối tượng được thử nghiệm, nhưng là mẫu từ đối tượng đã biết là có, hoặc không có, rối loạn đang quan tâm (ví dụ, bệnh ung thư cụ thể hoặc rối loạn có liên quan đến OX40). Theo một số phương án, mẫu tham khảo là từ cùng đối tượng, nhưng từ thời điểm trước khi đối tượng phát triển bệnh ung thư. Theo một số phương án, mẫu tham khảo là từ mẫu ung thư lành tính, từ cùng hoặc khác đối tượng. Khi mẫu tham khảo âm được sử dụng để so sánh, mức độ biểu hiện hoặc lượng phân tử đang quan tâm ở mẫu tham khảo âm sẽ chỉ ra mức mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ đánh giá được, được dùng sáng chế, rằng không có và/hoặc mức phân tử thấp. Khi mẫu tham khảo dương được sử dụng để so sánh, mức biểu hiện hoặc lượng phân tử đang quan tâm ở mẫu tham khảo dương sẽ chỉ ra mức mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ đánh giá được, được dùng sáng chế, rằng có mức phân tử.

Thuật ngữ "lợi ích", "lợi ích lâm sàng", "khả năng đáp ứng", và "khả năng đáp ứng trị liệu" như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh hưởng lợi từ hoặc đáp ứng lại với lần dùng chất trị liệu, có thể được đo bằng cách đánh giá các điểm cuối khác nhau, ví dụ, ức chế, ở mức độ nào đó, sự tiến triển của bệnh, bao gồm làm chậm và hoàn thành việc bắt giữ; giảm số đợt bệnh và/hoặc triệu chứng; giảm kích thước tổn thương; ức chế (nghĩa là giảm, làm chậm hoặc ngừng hoàn toàn) sự xâm nhập của tế bào bệnh vào các cơ quan và/hoặc mô ngoại vi lân cận; ức chế (có nghĩa là, giảm, làm chậm lại hoặc ngừng hoàn toàn) sự lây lan của bệnh; cứu trợ, ở một mức độ nào đó, một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn; tăng độ dài không thể hiện bệnh sau khi điều trị, ví dụ, sống sót không tiến triển; tổng thể sống sót tăng; tỷ lệ đáp ứng cao hơn; và/hoặc giảm tỷ lệ tử vong ở thời điểm dùng sau khi điều trị. Đối tượng hoặc bệnh ung thư mà

"không đáp ứng" hoặc "không phản hồi" là đối tượng không đáp ứng các tiêu chuẩn được lưu ý ở trên để được "đáp ứng".

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic", "axit nucleic" và "polynucleotit" có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và chỉ polyme của nucleotit. Các polyme của nucleotit này có thể chứa nucleotit tự nhiên và/hoặc không tự nhiên, và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ADN, ARN, và APN. "Trình tự axit nucleic" chỉ trình tự nucleotit mạch thẳng được chứa trong phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit.

Thuật ngữ "polypeptit" và "protein" được dùng hoán đổi cho nhau để chỉ polyme của gốc axit amin, và không bị giới hạn ở chiều dài tối thiểu. Polyme của gốc axit amin có thể chứa gốc axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên, và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, peptit, oligopeptit, đime, trime và multime của gốc axit amin. Cả protein chiều dài đầy đủ và các đoạn của chúng được bao bọc bởi định nghĩa này. Thuật ngữ cũng bao gồm sửa đổi sau biểu hiện của polypeptit, ví dụ, glycosyl hóa, sialyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, và tương tự. Hơn nữa, cho các mục đích sáng chế, "polypeptit" dùng để chỉ protein bao gồm sửa đổi, như xóa, bổ sung và thay thế (nói chung bảo toàn trong tự nhiên), với trình tự tự nhiên, miễn là protein duy trì hoạt tính mong muốn. Các sửa đổi này có thể là cố ý, như thông qua đột biến hướng vào vị trí, hoặc có thể là ngẫu nhiên, như thông qua đột biến của vật chủ tạo ra protein hoặc lỗi do khuếch đại PCR.

"OX40" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ OX40 tự nhiên, trưởng thành bất kỳ mà thu được từ việc xử lý tiền chất OX40 ở tế bào. Thuật ngữ bao gồm OX40 từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (*ví dụ*, người và khỉ cynomolgus hoặc rhesus) và loài gặm nhấm (*ví dụ*, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi được thể hiện theo cách khác. Thuật ngữ cũng bao gồm biến thể có trong tự nhiên của OX40, như biến thể nối hoặc biến thể alen. Trình tự axit amin OX40 của người làm ví dụ không giới hạn được thể hiện, *ví dụ*, ở số nhập GenBank CAE11757.1. *Xem* SEQ ID NO. 1. Trình tự axit amin OX40 của khỉ cynomolgus làm ví dụ không giới hạn được thể hiện, *ví dụ*, ở số nhập NCBI XP_005545179. *Xem* SEQ ID NO. 2.

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" với kháng nguyên hoặc epitop là thuật ngữ được hiểu rõ trong lĩnh vực, và phương pháp xác định liên kết đặc hiệu này cũng đã biết rõ trong lĩnh vực. Phân tử được cho là thể hiện "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết ưu tiên"

nếu nó phản ứng hoặc liên kết thường xuyên hơn, nhanh hơn, kéo dài hơn và/hoặc có ái lực lớn hơn với tế bào hoặc chất cụ thể so với các tế bào hoặc chất thay thế. Kháng thể đơn miền (sdAb) hoặc polypeptit chứa VHH "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết chuẩn" với đích nếu nó liên kết với ái lực lớn hơn, khao khát, sẵn sàng hơn, và/hoặc với thời lượng lớn hơn nó liên kết với các chất khác. Ví dụ, sdAb hoặc polypeptit chứa VHH liên kết đặc hiệu hoặc chuẩn với epitop OX40 là sdAb hoặc polypeptit chứa VHH liên kết epitop này với ái lực lớn hơn, khao khát, sẵn sàng hơn, và/hoặc với thời lượng lớn hơn nó liên kết với các epitop OX40 hoặc epitop không phải OX40 khác. Cũng được hiểu bằng cách đọc định nghĩa này là; ví dụ, sdAb hoặc polypeptit chứa VHH liên kết đặc hiệu hoặc chuẩn với đích thứ nhất có thể hoặc không thể liên kết đặc hiệu hoặc chuẩn với đích thứ hai. Như vậy, "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết chuẩn" không nhất thiết cần (mặc dù nó có thể bao gồm) liên kết độc quyền. Nói chung, nhưng không nhất thiết, tham chiếu đến liên kết có nghĩa là liên kết ưu tiên. "Tính đặc hiệu" chỉ khả năng của liên kết protein để liên kết có chọn lọc với kháng nguyên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều biến" đối với hoạt tính của OX40 chỉ sự thay đổi về hoạt tính của OX40. Theo một số phương án, "điều biến" chỉ sự tăng về hoạt tính OX40 được so sánh với OX40 khi không có chất điều biến.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop" chỉ vị trí trên phân tử đích (ví dụ, kháng nguyên, như protein, axit nucleic, carbohydrat hoặc lipit) mà phân tử liên kết với kháng nguyên (ví dụ, sdAb hoặc polypeptit chứa VHH) liên kết. Epitop thường bao gồm nhóm bề mặt hoạt động hóa học của phân tử như axit amin, polypeptit hoặc chuỗi bên đường và có đặc tính cấu trúc ba chiều cụ thể cũng như đặc tính nạp cụ thể. Epitop có thể được tạo ra từ cả gốc liền kề và/hoặc liền kề nhau không liền mạch (ví dụ, axit amin, nucleotit, đường, gốc lipit) của phân tử đích. Epitop được tạo ra từ gốc liền kề (ví dụ, axit amin, nucleotit, đường, gốc lipit) thường được giữ lại khi tiếp xúc với dung môi biến tính trong khi epitop được tạo ra bằng cách gấp thứ ba thường bị mất khi điều trị với dung môi biến tính. Epitop có thể bao gồm nhưng không bị giới hạn ở ít nhất 3, ít nhất 5 hoặc 8-10 gốc (ví dụ, axit amin hoặc nucleotit). Theo một số phương án, chiều dài epitop ít hơn 20 gốc (ví dụ, axit amin hoặc nucleotit), ít hơn 15 gốc hoặc ít hơn 12 gốc. Hai kháng thể có thể liên kết với cùng epitop trong kháng nguyên nếu chúng có liên kết cạnh tranh cho kháng nguyên. Theo một số phương án, epitop có thể được nhận biết bằng

khoảng cách tối thiểu nhất định đến gốc CDR trên phân tử liên kết với kháng nguyên. Theo một số phương án, epitop có thể được nhận biết bằng khoảng cách ở trên, và còn bị giới hạn ở gốc liên quan đến liên kết (ví dụ, liên kết hydro) giữa gốc của phân tử liên kết với kháng nguyên và gốc kháng nguyên. Epitop có thể được nhận biết bằng các quét khác nhau cũng vậy, ví dụ quét alanin hoặc arginin có thể chỉ ra một hoặc nhiều gốc mà phân tử liên kết với kháng nguyên có thể tương tác với. Trừ khi là rõ ràng, tập hợp gốc dưới dạng epitop không loại trừ các gốc khác với là một phần của epitop cho phân tử cụ thể liên kết với kháng nguyên. Thay vào đó, sự có mặt của tập hợp này chỉ ra một loạt tối thiểu (hoặc tập hợp các loài) của các epitop. Vì vậy, theo một số phương án, tập hợp gốc được nhận biết dưới dạng epitop chỉ định epitop tối thiểu liên quan đến kháng nguyên, chứ không phải là danh mục gốc độc quyền cho epitop trên kháng nguyên.

"Epitop không thẳng" hoặc "epitop tuân thủ" chứa polypeptit không liền mạch, axit amin và/hoặc đường trong protein kháng nguyên mà phân tử liên kết với kháng nguyên đặc hiệu với epitop liên kết. Theo một số phương án, ít nhất một gốc sẽ không liên tục với các gốc lưu ý khác của epitop; tuy nhiên, một hoặc nhiều gốc cũng có thể tiếp giáp với các gốc khác.

"Epitop mạch thẳng" chứa polypeptit tiếp giáp, axit amin và/hoặc đường trong protein kháng nguyên mà phân tử liên kết với kháng nguyên đặc hiệu với epitop liên kết. Cần lưu ý rằng, theo một số phương án, không phải mọi gốc trong epitop mạch thẳng đều cần được liên kết trực tiếp (hoặc tham gia vào liên kết) bởi phân tử liên kết kháng nguyên. Theo một số phương án, epitop mạch thẳng có thể là từ việc chủng ngừa với peptit mà gồm hữu hiệu trình tự của epitop mạch thẳng, hoặc từ các phần cấu trúc của protein được phân lập tương đối từ phần còn lại của protein (sao cho phân tử liên kết với kháng nguyên có thể tương tác, ít nhất chủ yếu), chỉ với phần trình tự đó.

Thuật ngữ "kháng thể" và "phân tử liên kết với kháng nguyên" được dùng hoán đổi cho nhau theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các polypeptit khác nhau chứa miền liên kết với kháng nguyên giống kháng thể, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở kháng thể thông thường (thường chứa ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ), kháng thể đơn miền (sdAb, chỉ chứa một chuỗi, thường tương tự với chuỗi nặng), polypeptit chứa VHH (polypeptit chứa ít nhất một chuỗi nặng chỉ miền biến đổi kháng thể, hoặc VHH), và mảnh của bất kỳ nêu trên, miễn là chúng có hoạt tính liên kết với kháng nguyên mong

muốn. Theo một số phương án, kháng thể chứa miền đime hóa. Các miền đime hóa bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, miền hằng định chuỗi nặng (chứa CH1, bản lề, CH2, và CH3, trong đó CH1 thường cặp với miền hằng định chuỗi nhẹ, CL, trong khi bản lề làm trung gian đime hóa) và miền Fc (chứa bản lề, CH2, và CH3, trong đó bản lề làm trung gian đime hóa).

Thuật ngữ kháng thể cũng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kháng thể thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, và kháng thể của các loài khác nhau như lạc đà (bao gồm lạc đà không bướu), cá mập, chuột, người, khỉ cynomolgus, *v.v.*

Thuật ngữ "kháng thể miền đơn" và "sdAb" được dùng hoán đổi cho nhau trong bản mô tả này để chỉ kháng thể có miền monome, đơn, như cặp miền biến đổi chuỗi nặng (hoặc VHH), không có chuỗi nhẹ.

Thuật ngữ "VHH" hoặc "miền VHH" hoặc "miền liên kết với kháng nguyên VHH" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ phần liên kết với kháng nguyên của kháng thể miền đơn, như kháng thể lạc đà hoặc kháng thể cá mập. Theo một số phương án, VHH chứa ba CDR và bốn vùng khung, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4 được chỉ định. Theo một số phương án, VHH có thể bị cắt ngắn ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C sao cho nó chỉ chứa một phần FR1 và/hoặc FR4, hoặc thiếu một hoặc cả hai vùng khung, miễn là VHH gần như duy trì liên kết kháng nguyên và tính đặc hiệu.

Thuật ngữ "polypeptit chứa VHH" chỉ polypeptit mà chứa ít nhất một miền VHH. Theo một số phương án, polypeptit VHH chứa hai, ba, hoặc bốn hoặc nhiều miền VHH, trong đó mỗi miền VHH có thể giống hoặc khác nhau. Theo một số phương án, polypeptit chứa VHH chứa miền Fc. Theo một số phương án, polypeptit VHH có thể tạo thành đime. Cấu trúc không giới hạn của polypeptit chứa VHH bao gồm VHH_1-Fc, VHH_1-VHH_2-Fc, và VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc, trong đó VHH_1, VHH_2, và VHH_3 có thể giống hoặc khác nhau. Theo một số phương án của cấu trúc này, một VHH có thể được kết nối với VHH khác bởi đoạn liên kết, hoặc một VHH có thể được kết nối với Fc bởi đoạn liên kết. Theo một số phương án, đoạn liên kết chứa 1-20 axit amin, tốt hơn là 1-20 axit amin chủ yếu bao gồm glyxin và, tùy chọn, serin. Theo một số phương án, khi polypeptit chứa VHH chứa Fc, nó tạo thành đime. Do đó, cấu trúc VHH_1-VHH_2-Fc, nếu nó tạo thành đime,

được coi là hóa trị bốn (tức là, đime có bốn miền VHH). Tương tự, cấu trúc VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc, nếu nó tạo thành đime, được coi là hóa trị sáu (tức là, đime có sáu miền VHH).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" chỉ kháng thể (bao gồm sdAb hoặc polypeptit chứa VHH) của quần thể gần như đồng nhất của kháng thể, đó là, kháng thể riêng chứa quần thể giống hệt nhau ngoại trừ đột biến có thể có trong tự nhiên có thể có mặt với lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng đặc hiệu rất cao, được hướng chống lại vị trí kháng nguyên đơn. Ngoài ra, trái ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng, thường bao gồm các kháng thể khác nhau được hướng ngược các yếu tố quyết định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng được hướng ngược yếu tố quyết định đơn trên kháng nguyên. Vì vậy, mẫu kháng thể đơn dòng có thể liên kết với cùng epitop trên kháng nguyên. Công cụ sửa đổi "đơn dòng" cho biết nhân vật của kháng thể như được lấy từ quần thể gần như đồng nhất của kháng thể, và không được hiểu là yêu cầu sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng có thể được tạo thành bằng phương pháp lai được mô tả đầu tiên bởi Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495, hoặc có thể được tạo thành bằng phương pháp ADN tái tổ hợp như được mô tả ở Pat. Mỹ số 4,816,567. Kháng thể đơn dòng cũng có thể được phân lập từ thư viện thể thực khuẩn được tạo ra sử dụng kỹ thuật được mô tả ở McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348:552-554, ví dụ.

Thuật ngữ "CDR" là khu vực xác định tính bổ sung như được định nghĩa bởi ít nhất một cách nhận biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Theo một số phương án, CDR có thể được định nghĩa theo bất kỳ trong số sơ đồ đánh số Chothia, sơ đồ đánh số Kabat, sự kết hợp của Kabat và Chothia, định nghĩa AbM, và/hoặc định nghĩa tiếp xúc. VHH chứa ba CDR, CDR1, CDR2, và CDR3 chỉ định.

Thuật ngữ "vùng hằng định chuỗi nặng" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ vùng chứa ít nhất ba miền hằng định chuỗi nặng, C_H1, bản lề, C_H2, và C_H3. Dĩ nhiên là, sự làm mất và thay thế không thay thế chức năng trong miền được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ "vùng hằng định chuỗi nặng," trừ khi chỉ định theo cách khác. Vùng hằng định chuỗi nặng làm ví dụ không giới hạn bao gồm γ, δ, và α. Vùng hằng định chuỗi nặng làm ví dụ không giới hạn cũng bao gồm ε và μ. Mỗi vùng hằng định nặng tương ứng với isotyp kháng thể. Ví dụ, kháng thể chứa vùng hằng định γ là kháng thể IgG, kháng thể chứa vùng hằng định δ là kháng thể IgD, và kháng thể chứa vùng hằng định α là kháng thể IgA. Ngoài ra, kháng thể chứa vùng hằng định μ là kháng thể IgM,

và kháng thể chứa vùng hằng định ε là kháng thể IgE. Isotyp nhất định có thể còn được chia thành các lớp con. Ví dụ, kháng thể IgG bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kháng thể IgG1 (chứa vùng hằng định γ_1), IgG2 (chứa vùng hằng định γ_2), IgG3 (chứa vùng hằng định γ_3), và IgG4 (chứa vùng hằng định γ_4); kháng thể IgA bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kháng thể IgA1 (chứa vùng hằng định α_1) và IgA2 (chứa vùng hằng định α_2); và kháng thể IgM bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, IgM1 và IgM2.

"Vùng Fc" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ một phần của vùng hằng định chuỗi nặng chứa CH2 và CH3. Theo một số phương án, vùng Fc chứa bản lề, CH2, và CH3. Theo các phương án khác nhau, khi vùng Fc chứa bản lề, bản lề làm trung gian đime hóa giữa hai polypeptit chứa Fc. Vùng Fc có thể là isotyp vùng hằng định chuỗi nặng kháng thể bất kỳ thảo luận trong bản mô tả này. Theo một số phương án, vùng Fc là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

"Khung nhận của người" như được sử dụng trong bản mô tả này là khung chứa trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) có nguồn gốc từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung đoàn kết của người, như đã thảo luận trong bản mô tả này. Khung nhận của người có nguồn gốc từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung đoàn kết của người có thể chứa cùng trình tự axit amin của nó, hoặc nó có thể chứa thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số thay đổi axit amin ít hơn 10, hoặc ít hơn 9, hoặc ít hơn 8, hoặc ít hơn 7, hoặc ít hơn 6, hoặc ít hơn 5, hoặc ít hơn 4 hoặc ít hơn 3, trên tất cả các khung của người ở miền liên kết kháng nguyên đơn, như VHH.

"Ái lực" chỉ độ bền của tổng số tương tác không cộng hóa trị giữa vị trí liên kết đơn của phân tử (ví dụ, kháng thể hoặc polypeptit chứa VHH) và cộng sự liên kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Ái lực hoặc ái lực rõ ràng của phân tử X đối với đối tác của nó, Y nói chung có thể được đại diện bởi hằng số phân ly (K_D) hoặc $K_{D\text{-rõ ràng}}$, tương ứng. Ái lực có thể được đo bằng phương pháp chung đã biết trong lĩnh vực (như, ví dụ, ELISA K_D, KinExA, phân tích tế bào theo dòng chảy, và/hoặc thiết bị cộng hưởng plasmon bề mặt), bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Phương pháp này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, phương pháp liên quan đến BIAcore®, Octet®, hoặc phân tích tế bào theo dòng chảy.

Thuật ngữ "K_D", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ hằng số phân ly cân bằng của tương tác phân tử liên kết với kháng nguyên/kháng nguyên. Khi thuật ngữ "K_D" được sử dụng trong bản mô tả này, nó bao gồm K_D và $K_{D\text{-rõ ràng}}$.

Theo một số phương án, K_D của phân tử liên kết với kháng nguyên được đo bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy sử dụng dòng tế bào biểu hiện kháng nguyên và phù hợp với huỳnh quang trung bình được đo ở mỗi nồng độ kháng thể với phương trình liên kết một vị trí không thẳng (bàn di chuột phần mềm Prism). Theo một số phương án, K_D là $K_{D\text{-rõ ràng}}$.

Thuật ngữ "hoạt tính sinh học" chỉ bất kỳ một hoặc nhiều tính tác nhân sinh học của phân tử (xem có mặt tự nhiên như tìm thấy in vivo, hoặc được đề xuất hoặc được kích hoạt bởi phương pháp tái tổ hợp). Tính tác nhân sinh học bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, liên kết phối tử, gây ra hoặc làm tăng sự tăng sinh của tế bào (như sự tăng sinh tế bào T), và gây ra hoặc làm tăng biểu hiện của xytokin=.

Thuật ngữ "hoạt tính OX40" hoặc "hoạt tính sinh học" của OX40, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm hiệu quả sinh học bất kỳ hoặc ít nhất một trong các chức năng thích hợp về mặt sinh học của protein OX40. Theo một số phương án, hoạt tính OX40 bao gồm khả năng của OX40 tương tác hoặc liên kết với phối tử OX40 (OX40L). Các hoạt động OX40 làm ví dụ không giới hạn bao gồm làm tăng tín hiệu NFκB, làm tăng sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T, làm tăng biểu hiện IFNγ ở tế bào T, làm tăng biểu hiện CD25 và/hoặc CD71 trên tế bào T, và giảm hoạt tính ức chế của tế bào Treg với sự hoạt hóa và tăng sinh tế bào T tác động.

Kháng thể "chủ vận" hoặc "hoạt hóa" (như sdAb hoặc polypeptit chứa VHH) là kháng thể mà tăng và/hoặc kích hoạt hoạt tính sinh học của kháng nguyên đích. Theo một số phương án, kháng thể chủ vận liên kết với kháng nguyên và tăng hoạt tính sinh học của nó ít nhất khoảng 20%, 40%, 60%, 80%, 85% hoặc hơn.

"Chất đối kháng", kháng thể "chặn" hoặc "vô hiệu hóa" là chất giảm và/hoặc làm bất hoạt hoạt tính sinh học của kháng nguyên đích. Theo một số phương án, kháng thể trung hòa liên kết với kháng nguyên và làm giảm hoạt tính sinh học của nó ít nhất khoảng 20%, 40%, 60%, 80%, 85% 90%, 95%, 99% hoặc hơn.

Polypeptit chứa VHH "trưởng thành ái lực" chỉ polypeptit chứa VHH với một hoặc nhiều thay thế ở một hoặc nhiều CDR được so sánh với polypeptit cha mẹ chứa VHH không có thay thế này, thay thế này dẫn đến sự cải thiện trong ái lực của polypeptit chứa VHH cho kháng nguyên.

"VHH được làm giống như của người" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ VHH trong đó một hoặc nhiều vùng khung gần như được thay thế bằng vùng khung của người. Trong một số trường hợp, gốc vùng khung (FR) nhất định của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng gốc không phải của người tương ứng. Ngoài ra, VHH được làm giống như của người có thể chứa gốc được tìm thấy không có trong VHH gốc cũng như trong trình tự khung của người, nhưng được bao gồm để tinh luyện thêm và tối ưu hóa công suất VHH hoặc polypeptit chứa VHH. Theo một số phương án, polypeptit chứa VHH được làm giống như của người chứa vùng Fc của người. Như sẽ hiểu được, trình tự được làm giống như của người có thể được nhận biết bằng trình tự sơ cấp của nó và không nhất thiết là quy trình tạo ra kháng thể.

"Vùng Fc chức năng" sở hữu "chức năng tác động" của vùng Fc trình tự tự nhiên. "Các chức năng tác động" làm ví dụ bao gồm liên kết thụ thể Fc; liên kết Clq và độc tế bào phụ thuộc bổ sung (CDC); liên kết thụ thể Fc; độc tế bào được điều tiết bởi tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC); thực bào; giảm quy định của thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B); và hoạt hóa tế bào B, v.v. Các chức năng tác động này nói chung cần vùng Fc được kết hợp với miền liên kết (ví dụ, miền biến đổi kháng thể) và có thể được đánh giá sử dụng các khảo nghiệm khác nhau.

"Vùng Fc trình tự tự nhiên" chứa trình tự axit amin giống hệt trình tự axit amin của vùng Fc tìm thấy ở tự nhiên. Vùng Fc trình tự tự nhiên của người bao gồm vùng Fc IgG1 trình tự tự nhiên của người (allotyp không phải A và A); vùng Fc IgG2 trình tự tự nhiên của người; vùng Fc IgG3 trình tự tự nhiên của người; và vùng Fc IgG4 trình tự tự nhiên của người cũng như biến thể có trong tự nhiên của nó.

"Vùng Fc biến thể" chứa trình tự axit amin khác với trình tự của vùng Fc trình tự tự nhiên nhờ ít nhất một sửa đổi axit amin. Theo một số phương án, "vùng Fc biến thể" chứa trình tự axit amin khác với trình tự của vùng Fc trình tự tự nhiên nhờ ít nhất một sửa đổi axit amin, vẫn giữ lại ít nhất một chức năng tác động của vùng Fc trình tự tự nhiên. Theo một số phương án, vùng Fc biến thể có ít nhất một thay thế axit amin được

so sánh với vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc với vùng Fc của polypeptit gốc, ví dụ, nằm trong khoảng từ một đến mười thay thế axit amin, và tốt hơn là, nằm trong khoảng từ một đến năm thay thế axit amin ở vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc ở vùng Fc của gốc polypeptit. Theo một số phương án, vùng Fc biến thể trong bản mô tả này sẽ sở hữu độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% với vùng Fc trình tự tự nhiên và/hoặc với vùng Fc của gốc polypeptit, độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 90%, độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 96%, ít nhất khoảng 97%, ít nhất khoảng 98%, hoặc ít nhất khoảng 99%.

"Thụ thể Fc" hoặc "FcR" mô tả thụ thể liên kết với vùng Fc của kháng thể. Theo một số phương án, FcγR là FcR tự nhiên của người. Theo một số phương án, FcR liên kết với kháng thể IgG (thụ thể gamma) và bao gồm thụ thể của lớp con FcγRI, FcγRII, và FcγRIII, bao gồm biến thể alen và cách khác là dạng nối của các thụ thể đó. Các thụ thể FcγRII bao gồm FcγRIIA ("thụ thể hoạt hóa") và FcγRIIB ("thụ thể ức chế"), có trình tự axit amin tương tự về cơ bản khác ở miền tế bào chất của nó. Thụ thể hoạt hóa FcγRIIA chứa mô típ hoạt hóa dựa vào tyrosin thụ thể miễn dịch (ITAM) ở miền tế bào chất của nó Thụ thể ức chế FcγRIIB chứa mô típ ức chế dựa vào tyrosin thụ thể miễn dịch (ITIM) ở miền tế bào chất của nó. (*Xem*, ví dụ, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). FcR được xem xét, ví dụ, ở Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Các FcR khác, bao gồm FcR được nhận biết trong tương lai, được bao gồm bằng thuật ngữ "FcR" trong bản mô tả này. Ví dụ, thuật ngữ "thụ thể Fc" hoặc "FcR" cũng bao gồm thụ thể sơ sinh, FcRn, chịu trách nhiệm cho việc truyền IgG của mẹ đối với thai nhi (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) và điều chỉnh cân bằng nội môi của các globulin miễn dịch. Phương pháp đo liên kết với FcRn đã biết (xem, ví dụ, Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

Thuật ngữ "gần như tương tự" hoặc "gần như giống," như được sử dụng trong bản mô tả này, là mức độ đủ cao của tính tương tự giữa hai hoặc nhiều giá trị số sao cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ xem xét sự khác nhau giữa hai hoặc nhiều giá trị là ít hoặc không có ý nghĩa sinh học và/hoặc thống kê trong ngữ cảnh của đặc tính sinh

học được đo theo giá trị này. Theo một số phương án hai hoặc nhiều giá trị gần như tương tự khác biệt không nhiều hơn khoảng bất kỳ trong số 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, hoặc 50%.

"Biến thể" polypeptit có nghĩa là polypeptit hoạt tính sinh học có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất khoảng 80% với polypeptit trình tự tự nhiên sau khi sắp xếp trình tự và đưa ra khoảng trống, nếu cần, để đạt được phần trăm độ đồng nhất trình tự tối đa, và không xem xét thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Các biến thể này bao gồm, ví dụ, polypeptit trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được bổ sung, hoặc bị xóa, tại đầu tận cùng N hoặc C của polypeptit. Theo một số phương án, biến thể sẽ có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất khoảng 80%. Theo một số phương án, biến thể sẽ có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất khoảng 90%. Theo một số phương án, biến thể sẽ có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất khoảng 95% với polypeptit trình tự tự nhiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "phần trăm (%) độ đồng nhất trình tự axit amin" và "tương đồng" về peptit, polypeptit hoặc trình tự kháng thể được định nghĩa là phần trăm của gốc axit amin ở trình tự ứng cử mà giống hệt với gốc axit amin ở trình tự peptit hoặc polypeptit đặc hiệu, sau khi sắp xếp trình tự và đưa vào khoảng trống, nếu cần thiết, để đạt được phần trăm độ tương đồng trình tự tối đa, và không xem xét dạng thay thế không bảo toàn bất kỳ là một phần của độ tương đồng trình tự. Sự sắp xếp thành hàng cho mục đích xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được theo các cách khác nhau nằm trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính có sẵn công khai như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc MEGALIGNTM (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định các thông số thích hợp để đo sự sắp xếp thành hàng, bao gồm bất kỳ thuật toán nào cần thiết để đạt được sự sắp xếp thành hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của trình tự được so sánh.

Thay thế axit amin có thể bao gồm nhưng không bị giới hạn ở sự thay thế của một axit amin ở polypeptit với axit amin khác. Các dạng thay thế làm ví dụ được thể hiện ở bảng 1. Các dạng thay thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc cho hoạt tính mong muốn, ví dụ, giữ lại/cải thiện liên kết kháng nguyên, giảm khả năng sinh miễn dịch, hoặc cải thiện ADCC hoặc CDC.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Các dạng thay thế làm ví dụ
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

Axit amin có thể được nhóm theo tính chất chuỗi bên chung:

(1) kỵ nước: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) axit: Asp, Glu;

(4) bazơ: His, Lys, Arg;

(5) gốc ảnh hưởng sự định hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các dạng thay thế kiểu không bảo toàn sẽ dẫn đến sự trao đổi thành viên của một nhóm trong số các nhóm này cho một nhóm khác.

Thuật ngữ "vectơ" được sử dụng để mô tả polynucleotit mà có thể được thiết kế để chứa polynucleotit hoặc các polynucleotit được tách dòng có thể được nhân giống trong tế bào chủ. Vectơ có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số các thành phần sau đây: gốc sao chép, một hoặc nhiều trình tự điều hòa (như, ví dụ, đoạn khởi đầu và/hoặc chất tăng cường) điều chỉnh biểu hiện của polypeptit quan tâm, và/hoặc một hoặc nhiều gen đánh dấu có thể lựa chọn (như, ví dụ, gen kháng kháng sinh và gen có thể được sử dụng trong các thử nghiệm so màu, ví dụ, β-galactosidaza). Thuật ngữ "vectơ biểu hiện" chỉ vectơ mà được sử dụng để biểu hiện polypeptit quan tâm ở tế bào chủ.

"Tế bào chủ" chỉ tế bào mà có thể hoặc là bên nhận vectơ hoặc polynucleotit được phân lập. Tế bào chủ có thể là tế bào sinh vật nhân sơ hoặc tế bào sinh vật nhân chuẩn. Tế bào sinh vật nhân chuẩn làm ví dụ bao gồm tế bào động vật có vú, như tế bào động vật linh trưởng hoặc động vật không phải linh trưởng; tế bào nấm, như nấm men; tế bào cây; và tế bào côn trùng. Tế bào động vật có vú làm ví dụ không giới hạn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tế bào NSO, tế bào PER.C6® (Crucell), và tế bào 293 và CHO, và dẫn xuất của chúng, như tế bào 293-6E, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-S, và CHO-DS. Tế bào chủ bao gồm con cháu của một tế bào chủ, và thế hệ con cháu có thể không nhất thiết phải hoàn toàn giống hệt (trong hình thái học hoặc bổ sung ADN bộ gen) với tế bào gốc ban đầu do đột biến tự nhiên, ngẫu nhiên hoặc cố ý. Tế bào chủ cũng bao gồm tế bào sơ cấp, như tế bào miễn dịch sơ cấp của người.

Thuật ngữ "được phân lập" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ phân tử mà đã được tách từ ít nhất một số thành phần mà thường được tìm thấy trong tự nhiên hoặc được tạo ra. Ví dụ, polypeptit được xem là "được phân lập" khi nó được tách từ ít nhất

một số thành phần của tế bào trong đó nó được tạo ra. Nơi polypeptit được tiết bởi tế bào sau khi biểu hiện, phân tách về mặt vật lý chất bề mặt chứa polypeptit từ tế bào tạo ra nó được coi là "phân lập" polypeptit. Tương tự, polynucleotit được xem là "được phân lập" khi nó không phải là một phần của polynucleotit lớn hơn (như, ví dụ, ADN bộ gen hoặc ADN ti thể, trong trường hợp là polynucleotit ADN), trong đó nó thường được tìm thấy trong tự nhiên, hoặc được tách từ ít nhất một số thành phần của tế bào mà nó được tạo ra, ví dụ, trong trường hợp này là polynucleotit ARN. Vì vậy, polynucleotit ADN mà được chứa trong vectơ bên trong tế bào chủ có thể được xem là "được phân lập".

Thuật ngữ "cá thể" và "đối tượng" được dùng hoán đổi cho nhau trong bản mô tả này chỉ động vật; ví dụ động vật có vú. Theo một số phương án, phương pháp điều trị động vật có vú, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, người, loài gặm nhấm, khỉ, mèo, chó, ngựa, bò, cá heo, cừu, dê, động vật có vú trong phòng thí nghiệm, động vật có vú trong trang trại, động vật có vú thể thao, và vật nuôi là động vật có vú, được đề xuất. Trong một số ví dụ, "cá thể" hoặc "đối tượng" chỉ cá thể hoặc đối tượng cần điều trị bệnh hoặc rối loạn. Theo một số phương án, đối tượng nhận điều trị có thể là bệnh nhân, chỉ ra thực tế rằng đối tượng được nhận biết là có rối loạn liên quan đến điều trị, hoặc có đủ rủi ro khi mắc phải rối loạn.

"Bệnh" hoặc "rối loạn" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tình trạng trong đó việc điều trị là cần thiết và/hoặc mong muốn.

Thuật ngữ "tế bào u", "tế bào ung thư", "bệnh ung thư", "khối u", và/hoặc "ung thư", trừ khi được thiết kế theo cách khác, được sử dụng trong bản mô tả này thay thế cho nhau và chỉ tế bào (hoặc các tế bào) thể hiện sự tăng trưởng không kiểm soát và/hoặc sống sót tế bào tăng bất thường và/hoặc ức chế quá trình chết tế bào theo chương trình can thiệp vào hoạt động bình thường của các cơ quan trong cơ thể và hệ thống. Được bao gồm trong định nghĩa này là ung thư lành tính và ác tính, polyp, tăng sản, cũng như khối u không hoạt động hoặc khối u di căn.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" và "khối u" bao gồm bệnh ung thư rắn và huyết học/bạch huyết và cũng bao gồm ác tính, tiền ác tính, và tăng trưởng lành tính, như chứng loạn sản. Ngoài ra, được bao gồm trong định nghĩa này là tế bào có sự tăng sinh bất thường không bị cản trở (ví dụ cơ chế trốn miễn dịch và thoát miễn dịch) bởi hệ miễn dịch (*ví dụ* tế bào bị nhiễm virut). Bệnh ung thư làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới

hạn ở: ung thư tế bào cơ sở, ung thư ống mật; ung thư bàng quang; ung thư xương; ung thư não và hệ thần kinh trung ương; ung thư vú; bệnh ung thư màng bụng; ung thư cổ; bệnh ung thư biểu mô nhau thai; ung thư ruột và trực tràng; ung thư mô liên kết; bệnh ung thư hệ tiêu hóa; ung thư màng trong tử cung; ung thư thực quản; ung thư mắt; bệnh ung thư đầu và cổ; bệnh ung thư dạ dày (bao gồm ung thư dạ dày ruột); u nguyên bào đệm; ung thư biểu mô gan; u gan; ung thư trong biểu mô; bệnh ung thư xoang thận hoặc bể thận; bệnh ung thư thanh quản; bệnh bạch cầu; bệnh ung thư gan; bệnh ung thư phổi (*ví dụ,* bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, ung thư biểu mô tuyến của phổi, và ung thư biểu mô vảy của phổi); u ác tính; u tủy; u nguyên bào thần kinh; bệnh ung thư khoang miệng (môi, lưỡi, miệng, và yết hầu); buồng trứng bệnh ung thư; bệnh ung thư tuyến tụy; bệnh ung thư tuyến tiền liệt; u nguyên bào võng mạc; u cơ vân; bệnh ung thư trực tràng; bệnh ung thư hệ hô hấp; ung thư biểu mô tuyến nước bọt; sarcom; bệnh ung thư da; bệnh ung thư tế bào vảy; bệnh ung thư bụng; bệnh ung thư tinh hoàn; bệnh ung thư tuyến giáp; ung thư tử cung hoặc màng trong tử cung; bệnh ung thư hệ tiết niệu; bệnh ung thư âm hộ; ung thư hạch bao gồm u lympho Hodgkin và không Hodgkin, cũng như u lympho tế bào B (bao gồm u lympho không Hodgkin cấp thấp/nang (NHL); NHL tế bào lympho nhỏ (SL); NHL cấp trung gian/nang; NHL khuếch tán cấp trung gian; NHL nguyên bào miễn dịch cao cấp; NHL nguyên bào lympho cấp cao; NHL tế bào nhỏ không phân cắt cao cấp; NHL bệnh cồng kềnh; u lympho tế bào lớp áo; ung thư hạch có liên quan đến AIDS; và chứng đại globulin huyết thanh Waldenstrom; bệnh bạch cầu mãn tính dòng lympho (CLL); bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL); bệnh bạch cầu tế bào lông; bệnh bạch cầu tủy bào mãn tính; cũng như các ung thư biểu mô và sarcom khác; và rối loạn tăng sinh bạch huyết sau cấy ghép (PTLD), cũng như sự tăng sinh mạch máu bất thường liên quan đến hội chứng u thần kinh-da ngoại bì, phù nề (như liên quan đến khối u não), và hội chứng Meig.

Thuật ngữ "tế bào không phải khối u" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tế bào hoặc mô bình thường. Tế bào không phải khối u làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: tế bào T, tế bào B, tế bào diệt tự nhiên (NK), tế bào T diệt tự nhiên (NKT), tế bào đuôi gai, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào biểu mô, nguyên bào sợi, tế bào gan, tế bào thận kẽ, tế bào hoạt dịch giống nguyên bào sợi, nguyên bào xương, và tế bào nằm ở vú, cơ xương, tuyến tụy, dạ dày, buồng trứng, ruột non, nhau thai, tử cung, tinh hoàn, thận, phổi, tim, não, gan, tuyến tiền liệt, ruột, cơ quan bạch huyết, xương, và tế bào

thân trung mô có nguồn gốc xương. Thuật ngữ "tế bào hoặc mô nằm ở ngoại vi" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tế bào không phải khối u không ở gần tế bào u và/hoặc trong môi trường vi mô khối u.

Thuật ngữ "tế bào hoặc mô trong môi trường vi mô khối u" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tế bào, phân tử, ma trận ngoại bào và/hoặc mạch máu bao quanh và/hoặc nuôi tế bào u. Tế bào hoặc mô làm ví dụ trong môi trường vi mô khối u bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: mạch máu khối u; lympho bào xâm nhập khối u; tế bào lưới nguyên bào sợi; tế bào tổ tiên nội mô (EPC); nguyên bào sợi liên kết bệnh ung thư; mao mạch; các tế bào mô đệm khác; thành phần của chất nền ngoại bào (ECM); tế bào đuôi gai; tế bào thể hiện kháng nguyên; tế bào T; tế bào T điều hòa (tế bào Treg); đại thực bào; bạch cầu trung tính; tế bào ức chế có nguồn gốc tủy (MDSC) và các tế bào miễn dịch khác nằm gần khối u. Phương pháp để xác định tế bào u, và/hoặc tế bào/mô nằm trong môi trường vi mô khối u đã biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả trong bản mô tả này, dưới đây.

Theo một số phương án, "sự tăng" hoặc "giảm" chỉ sự tăng hoặc giảm ý nghĩa thống kê, tương ứng. Như sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, "điều chỉnh" cũng có thể liên quan đến thực hiện thay đổi (có thể là tăng hoặc giảm) về ái lực, sự khao khát, độ đặc hiệu và/hoặc tính chọn lọc của đích hoặc kháng nguyên, cho một hoặc nhiều phối tử của nó, đối tác liên kết, đối tác để liên kết thành dạng đồng phân hoặc đa số, hoặc chất nền; tạo ra sự thay đổi (có thể là tăng hoặc giảm) trong độ nhạy của đích hoặc kháng nguyên cho một hoặc nhiều tình trạng trong môi trường hoặc môi trường xung quanh mà đích hoặc kháng nguyên có mặt (như độ pH, cường độ ion, sự có mặt của các đồng yếu tố, v.v.); và/hoặc sự tăng sinh tế bào hoặc sản xuất xytokin, được so sánh với cùng điều kiện nhưng không có chất kiểm tra. Điều này có thể được xác định theo cách thích hợp bất kỳ và/hoặc sử dụng khảo nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết mỗi lần hoặc được mô tả trong bản mô tả này, tùy thuộc vào đích tham gia.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đáp ứng miễn dịch" có nghĩa là bao gồm đáp ứng miễn dịch tế bào và/hoặc thuộc về thể chất đủ để ức chế hoặc ngăn chặn sự khởi phát hoặc cải thiện triệu chứng của bệnh (ví dụ, bệnh ung thư hoặc bệnh ung thư di căn). "Đáp ứng miễn dịch" có thể bao gồm các khía cạnh của cả hệ miễn dịch bẩm sinh và thích nghi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "việc điều trị" là cách tiếp cận để thu được kết quả lợi ích hoặc lâm sàng mong muốn. "Việc điều trị" như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm bất kỳ việc sử dụng hoặc áp dụng phương pháp điều trị bệnh ở động vật có vú, bao gồm cả con người. Đối với mục đích của sáng chế này, các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở bất kỳ một hoặc nhiều trong số: giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng, giảm mức độ bệnh, ngăn ngừa hoặc trì hoãn sự lây lan (ví dụ, di căn, chẳng hạn di căn đến phổi hoặc đến hạch bạch huyết) của bệnh, ngăn ngừa hoặc trì hoãn sự tái phát của bệnh, trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, cải thiện tình trạng bệnh, ức chế bệnh hoặc sự tiến triển của bệnh, ức chế hoặc làm chậm bệnh hoặc sự tiến triển của nó, bắt giữ sự phát triển và thuyên giảm của nó (cho dù một phần hay toàn bộ). Cũng bao gồm trong "điều trị" là việc giảm hậu quả bệnh lý của bệnh tăng sinh. Phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này đề cập đến bất kỳ một hoặc nhiều khía cạnh của điều trị. Phù hợp với các điều trên, thuật ngữ điều trị không yêu cầu loại bỏ một trăm phần trăm tất cả các khía cạnh của rối loạn.

"Cải thiện" có nghĩa là giảm bớt hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng so với việc không sử dụng chất điều trị. "Cải thiện" cũng bao gồm việc rút ngắn hoặc giảm thời gian của triệu chứng.

Thuật ngữ "chất chống ung thư" trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa rộng nhất để chỉ chất được sử dụng trong điều trị một hoặc nhiều bệnh ung thư. Các lớp làm ví dụ của chất này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất hóa trị liệu, thuốc sinh học chống ung thư (như xytokin, dung hợp miền ngoại bào thụ thể-Fc và kháng thể), xạ trị, liệu pháp CAR-T, oligonucleotit điều trị (như oligonucleotit đối nghĩa và siARN) và virut tiêu ung thư.

Thuật ngữ "mẫu sinh học" có nghĩa là lượng chất từ sinh vật sống hoặc sinh vật sống trước đây. Các chất này bao gồm, nhưng không giới hạn ở máu, (ví dụ, máu toàn phần), huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, nước ối, chất lỏng hoạt dịch, tế bào nội mô, bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, các tế bào khác, cơ quan, mô, tủy xương, nút bạch huyết và lá lách.

Thuật ngữ "đối chứng" hoặc "tham khảo" chỉ chế phẩm được biết là không chứa chất phân tích ("đối chứng âm") hoặc chứa chất phân tích ("đối chứng dương"). Đối chứng dương có thể bao gồm nồng độ đã biết của chất phân tích.

Thuật ngữ "sự ức chế" hoặc "ức chế" dùng để chỉ giảm hoặc chấm dứt bất kỳ đặc điểm kiểu hình nào hoặc giảm hoặc chấm dứt tỷ lệ, mức độ hoặc khả năng xảy ra của đặc điểm đó. "Giảm" hoặc "ức chế" là giảm, giảm hoặc ngừng hoạt động, chức năng và/hoặc số lượng so với tham chiếu. Theo một số phương án, "giảm" hoặc "ức chế" có nghĩa là khả năng gây ra mức giảm tổng thể là 10% hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, "giảm" hoặc "ức chế" có nghĩa là khả năng gây ra mức giảm tổng thể là 50% hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, "giảm" hoặc "ức chế" có nghĩa là khả năng gây ra mức giảm tổng thể là 75%, 85%, 90%, 95% hoặc cao hơn. Theo một số phương án, lượng được lưu ý ở trên bị giới hạn hoặc giảm trong một khoảng thời gian, so với mức đối chứng trong cùng khoảng thời gian.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "trì hoãn sự phát triển của bệnh" có nghĩa là trì hoãn, cản trở, làm chậm, làm trễ, ổn định, ngăn chặn và/hoặc trì hoãn sự phát triển của bệnh (như ung thư). Thời gian trì hoãn này có thể kéo dài khác nhau, tùy thuộc vào tiền sử bệnh và/hoặc cá nhân đang được điều trị. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thấy rõ, sự chậm trễ đủ hoặc đáng kể có thể bao gồm cả việc ngăn ngừa, theo đó cá nhân đó không phát triển bệnh. Ví dụ, bệnh ung thư giai đoạn cuối, như sự phát triển của di căn, có thể bị trì hoãn.

"Ngăn ngừa," như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm cung cấp các biện pháp dự phòng liên quan đến sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh ở đối tượng có thể dễ mắc bệnh nhưng chưa được chẩn đoán mắc bệnh. Trừ khi được quy định khác, các thuật ngữ "giảm", "ức chế" hoặc "ngăn chặn" không biểu thị hoặc yêu cầu ngăn chặn hoàn toàn mọi lúc, mà chỉ trong khoảng thời gian được đo.

"Lượng có tác dụng trị liệu" của chất/phân tử, chất chủ vận hoặc chất đối kháng có thể thay đổi tùy theo các yếu tố như tình trạng bệnh, tuổi, giới tính và cân nặng của cá nhân và khả năng của chất/phân tử, chất chủ vận hoặc chất đối kháng để tạo ra phản ứng mong muốn ở cá nhân. Lượng hiệu quả điều trị cũng là lượng trong đó bất kỳ tác dụng độc hại hoặc bất lợi nào của chất/phân tử, chất chủ vận hoặc chất đối kháng sẽ bị vượt trội hơn so với tác dụng có lợi về mặt điều trị. Lượng có hiệu quả điều trị có thể được phân phối trong một hoặc nhiều lần sử dụng. Lượng hiệu quả điều trị đề cập đến lượng có hiệu quả, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị và/hoặc dự phòng mong muốn.

Thuật ngữ "chế phẩm dược" và "dược phẩm" đề cập đến chế phẩm ở dạng sao cho cho phép hoạt động sinh học của (các) thành phần hoạt tính có hiệu quả và không chứa các thành phần bổ sung gây độc hại không thể chấp nhận được đối với đối tượng sẽ sử dụng chế phẩm. Các chế phẩm này có thể vô trùng.

"Chất mang dược dụng" chỉ chất độn rắn, bán rắn hoặc lỏng không độc, chất pha loãng, vật liệu bao gói, chất phụ trợ công thức, hoặc chất mang thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật để sử dụng với chất điều trị cùng bao gồm "dược phẩm" để sử dụng cho đối tượng. Chất mang dược dụng không độc đối với người nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng và tương thích với các thành phần khác của chế phẩm. Chất mang dược dụng thích hợp cho chế phẩm được sử dụng.

Sử dụng "kết hợp với" một hoặc nhiều chất trị liệu khác bao gồm sử dụng đồng thời (đồng thời) và tuần tự theo bất kỳ thứ tự nào.

Thuật ngữ "đồng thời" được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ việc sử dụng hai hoặc nhiều chất điều trị, trong đó ít nhất một phần sử dụng trùng lặp về thời gian, hoặc khi việc sử dụng một chất điều trị rơi vào một khoảng thời gian ngắn so với việc sử dụng chất điều trị khác, hoặc trong đó liệu pháp ảnh hưởng của cả hai chất chồng chéo lên nhau trong ít nhất một khoảng thời gian.

Thuật ngữ "tuần tự" được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ việc sử dụng hai hoặc nhiều chất điều trị không trùng lặp về thời gian, hoặc trong đó tác dụng điều trị của chất không trùng lặp.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kết hợp với" chỉ sử dụng một phương thức điều trị bên cạnh phương thức điều trị khác. Như vậy, "kết hợp với" đề cập đến việc sử dụng một phương thức điều trị trước, trong hoặc sau khi sử dụng phương thức điều trị khác cho cá thể.

Thuật ngữ "tờ đóng gói đi kèm" được sử dụng để chỉ hướng dẫn theo thông lệ bao gồm trong các gói thương mại của các sản phẩm điều trị, chứa thông tin về chỉ định, cách sử dụng, liều lượng, cách dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm điều trị đó.

"Vật phẩm sản xuất" là bất kỳ sản xuất nào (ví dụ, gói hoặc vật chứa) hoặc bộ kit chứa ít nhất một thuốc thử, ví dụ, thuốc điều trị bệnh hoặc rối loạn (ví dụ, ung thư), hoặc

đầu dò để phát hiện cụ thể dấu ấn sinh học được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sản xuất hoặc bộ kit được quảng bá, phân phối hoặc bán như đơn vị để thực hiện các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "nhãn" và "nhãn có thể phát hiện" có nghĩa là gốc được đính kèm, ví dụ, với kháng thể hoặc kháng nguyên để tạo ra phản ứng (ví dụ, liên kết) giữa các thành viên của cặp liên kết cụ thể, có thể phát hiện được. Thành phần được gắn nhãn của cặp liên kết cụ thể được gọi là "được gắn nhãn có thể phát hiện". Do đó, thuật ngữ "protein liên kết được gắn nhãn" dùng để chỉ protein có nhãn được kết hợp để cung cấp cho việc xác định protein liên kết. Theo một số phương án, nhãn là điểm đánh dấu có thể phát hiện được có thể tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được bằng phương tiện trực quan hoặc dụng cụ, ví dụ, kết hợp axit amin có nhãn phóng xạ hoặc gắn với polypeptit chứa các gốc biotinyl có thể được phát hiện bằng avidin được đánh dấu (ví dụ, streptavidin có chứa chất đánh dấu huỳnh quang hoặc hoạt tính của enzym có thể được phát hiện bằng phương pháp quang học hoặc so màu). Các ví dụ về nhãn cho polypeptit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, như sau: đồng vị phóng xạ hoặc hạt nhân phóng xạ (ví dụ, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, hoặc ^{153}Sm); chất tạo màu, nhãn huỳnh quang (ví dụ, FITC, rhodamin, chất phốt pho lanthanid), nhãn enzym (ví dụ, peroxidaza củ cải ngựa, luciferaza, phosphataza kiềm); chất đánh dấu hóa phát quang; nhóm biotinyl; các epitop polypeptit xác định trước được nhận biết bởi gen báo cáo thứ cấp (ví dụ, trình tự cặp dây kéo leuxin, vị trí liên kết với kháng thể thứ cấp, miền liên kết kim loại, thẻ epitop); và chất từ tính, như gadolini chelat. Các ví dụ đại diện của nhãn thường được sử dụng cho thử nghiệm miễn dịch bao gồm gốc tạo ra ánh sáng, ví dụ, hợp chất acridini và gốc tạo ra huỳnh quang, ví dụ, floresxein. Về vấn đề này, bản thân gốc có thể không được gắn nhãn dễ phát hiện nhưng có thể phát hiện được khi phản ứng với nhóm khác.

Polypeptit liên kết với OX40 làm ví dụ

Polypeptit liên kết với OX40 chủ vận được đề xuất trong bản mô tả này. Theo các phương án khác nhau, polypeptit liên kết OX40 chủ vận bao gồm ít nhất một miền VHH liên kết với OX40. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 chủ vận được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám miền VHH liên kết OX40. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 chủ vận được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm một, hai, ba hoặc bốn miền VHH liên kết OX40. Các

polypeptit liên kết với OX40 như vậy có thể bao gồm một hoặc nhiều vùng VHH bổ sung liên kết một hoặc nhiều protein mục tiêu khác với OX40.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 chủ vận bao gồm ít nhất một miền VHH liên kết với OX40 và miền Fc. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 chủ vận được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm một, hai, ba hoặc bốn miền VHH liên kết OX40 và miền Fc. Theo một số phương án, miền Fc làm trung gian cho quá trình đime hóa polypeptit liên kết OX40 ở các điều kiện sinh lý sao cho đime được tạo thành làm tăng gấp đôi số vị trí liên kết OX40. Ví dụ, polypeptit liên kết OX40 bao gồm ba miền VHH liên kết OX40 và vùng Fc có hóa trị ba như monome, nhưng ở các điều kiện sinh lý, vùng Fc có thể làm trung gian cho quá trình đime hóa, do đó polypeptit liên kết OX40 tồn tại dưới dạng đime hóa trị sáu trong các điều kiện này. Polypeptit liên kết OX-40 sáu hóa trị làm ví dụ không giới hạn bao gồm 3x1D10v1-Fc và 3x1D10v6-Fc, cũng được gọi là Hex-1D10v1 và Hex-1D10v6, tương ứng. Không có ý định bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết cụ thể nào, được cho rằng đồng kích thích thông qua OX40 được cải thiện bằng cách phân nhóm OX40, có nghĩa là polypeptit liên kết OX40 đa hóa trị (như hóa trị bốn hoặc hóa trị sáu) hiệu quả hơn polypeptit liên kết với OX40 hóa trị một hoặc hóa trị hai.

Theo các phương án khác nhau, miền VHH liên kết với OX40 bao gồm CDR1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, CDR2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11 và CDR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12. Theo một số phương án, miền VHH được làm giống như của người.

Theo một số phương án, miền VHH liên kết với OX40 có thể được làm giống như của người. Kháng thể được làm giống như của người (như polypeptit chứa VHH) hữu ích như phân tử điều trị vì kháng thể được làm giống như của người làm giảm hoặc loại bỏ đáp ứng miễn dịch của người với kháng thể không phải của người, có thể dẫn đến đáp ứng miễn dịch với kháng thể điều trị và giảm hiệu quả của phương pháp điều trị. Nói chung, kháng thể được làm giống như của người chứa một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó CDR, (hoặc các phần của nó) có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người và FR (hoặc các phần của nó) có nguồn gốc từ trình tự kháng thể của người. Tùy ý, kháng thể được làm giống như của người cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được làm giống như

của người được thế bằng gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà gốc CDR có nguồn gốc từ đó), ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu của kháng thể hoặc ái lực.

Kháng thể được làm giống như của người và phương pháp tạo ra chúng được xem xét, ví dụ, trong Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633, và còn được mô tả, ví dụ, trong Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-329; Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; US Patent Nos. 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Kashmiri *et al.*, (2005) *Methods* 36:25-34; Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (mô tả "sự tái tạo bề mặt"); Dall'Acqua *et al.*, (2005) *Methods* 36:43-60 (mô tả "xáo trộn FR"); và Osbourn *et al.*, (2005) *Methods* 36:61-68 và Klimka *et al.*, (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (mô tả cách tiếp cận "lựa chọn có hướng dẫn" để xáo trộn FR).

Vùng khung của người có thể được sử dụng để nhân hóa bao gồm nhưng không giới hạn ở: vùng khung được chọn bằng phương pháp "phù hợp nhất" (ví dụ, xem Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151 :2296); vùng khung có nguồn gốc từ trình tự nhất trí của kháng thể người thuộc phân nhóm cụ thể của vùng biến đổi chuỗi nặng (ví dụ, xem Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; và Presta *et al.* (1993) *J. Immunol*, 151:2623); vùng khung trưởng thành của người (bị đột biến soma) hoặc vùng khung mầm của người (ví dụ, xem Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); và vùng khung có nguồn gốc từ thư viện FR sàng lọc (ví dụ, xem Baca *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 và Rosok *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* 271 :22611-22618). Thông thường, vùng FR của VHH được thay thế bằng vùng FR của người để tạo VHH được làm giống như của người. Theo một số phương án, một số gốc FR nhất định của FR người được thay thế để cải thiện một hoặc nhiều đặc tính của VHH được làm giống như của người. Các miền VHH với gốc được thay thế này vẫn được gọi là "được làm giống như của người."

Theo một số phương án, miền VHH liên kết với OX40 bao gồm CDR1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, CDR2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11 và CDR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; và khung 2 (FR2) bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22. Theo một số phương án, miền VHH còn bao gồm FR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 bao gồm ít nhất một miền VHH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 bao gồm một, hai, ba hoặc bốn miền VHH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 bao gồm ba miền VHH liên kết OX40 và một miền Fc. Theo một số phương án này, mỗi miền VHH bao gồm CDR1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, CDR2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11 và CDR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12. Theo một số phương án, mỗi miền VHH bao gồm CDR1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, CDR2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11 và CDR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; và khung 2 (FR2) bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22. Theo một số phương án, mỗi miền VHH còn bao gồm FR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23. Theo một số phương án, mỗi miền VHH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9.

Theo các phương án khác nhau, miền Fc được bao gồm trong polypeptit liên kết OX40 là miền Fc của người, hoặc có nguồn gốc từ miền Fc của người.

Theo một số phương án, miền Fc có trong polypeptit liên kết OX40 có nguồn gốc từ miền Fc của người và bao gồm vùng xóa ba axit amin ở bản lề dưới tương ứng với IgG1 E233, L234 và L235, trong bản mô tả này được gọi là "Fc xELL". Polypeptit xELL của Fc không tham gia vào FcγR và do đó được gọi là "tác động im lặng" hoặc "không có hiệu ứng", tuy nhiên theo một số phương án, miền xELL Fc liên kết với FcRn và do đó có thời gian bán thải kéo dài và chuyển tế bào liên quan đến tái chế qua trung gian FcRn.

Theo một số phương án, miền Fc bao gồm trong polypeptit liên kết OX40 có nguồn gốc từ miền Fc của người và bao gồm đột biến M252Y và M428V, trong bản mô tả này được gọi là "Fc-YV". Theo một số phương án, đột biến này tăng cường liên kết với FcRn ở pH axit của nội tiết tố (gần 6,5), trong khi làm mất liên kết có thể phát hiện được ở pH trung tính (khoảng 7,2), cho phép tăng cường tái chế qua trung gian FcRn và kéo dài thời gian bán hủy.

Theo một số phương án, miền Fc được bao gồm trong polypeptit liên kết OX40 có nguồn gốc từ miền Fc của người và bao gồm đột biến được thiết kế cho quá trình dị

phân hóa, trong bản mô tả này được gọi là "núm" và "lỗ". Theo một số phương án, miền Fc "núm" bao gồm đột biến T366W. Theo một số phương án, miền Fc "lỗ" bao gồm các đột biến T366S, L368A và Y407V. Theo một số phương án, miền Fc được sử dụng để dị hợp tử hóa bao gồm đột biến bổ sung, như đột biến S354C trên thành viên đầu tiên của cặp Fc dị hợp tử tạo thành disulfua không đối xứng với đột biến tương ứng Y349C trên thành viên thứ hai của cặp Fc dị hợp tử. Theo một số phương án, một thành viên của cặp Fc dị hợp tử bao gồm sửa đổi H435R hoặc H435K để ngăn chặn liên kết protein A trong khi vẫn duy trì liên kết FcRn. Theo một số phương án, một thành viên của cặp Fc dị hợp tử bao gồm sửa đổi H435R hoặc H435K, trong khi thành viên thứ hai của cặp Fc dị hợp tử không được sửa đổi ở H435. Theo các phương án khác nhau, miền Fc giữ bao gồm sửa đổi H435R hoặc H435K (được gọi là "lỗ-R" trong một số trường hợp khi sửa đổi là H435R), trong khi miền Fc núm thì không. Trong một số trường hợp, đột biến lỗ-R cải thiện độ tinh khiết của đime khác loại trên các miền Fc lỗ homodime có thể có mặt.

Miền Fc làm ví dụ không giới hạn có thể được sử dụng trong polypeptit liên kết OX40 bao gồm miền Fc bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và 26.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 bao gồm ba miền VHH và miền Fc bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14 và miền Fc được hợp nhất với đầu tận cùng C của trình tự axit amin đó. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 bao gồm ba miền VHH và miền Fc bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15.

Hoạt tính làm ví dụ của polypeptit liên kết với OX40

Theo các phương án khác nhau, polypeptit liên kết với OX40 được đề xuất trong bản mô tả là chất chủ vận của hoạt động OX40. Theo một số phương án, hoạt tính chủ vận có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được cung cấp trong các ví dụ trong bản mô tả này, như sử dụng tế bào báo cáo Jurkat/OX40 hoặc tế bào tương tự.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết với OX40 được đề xuất trong bản mô tả tăng sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc in vivo. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm tăng sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ *in vitro*. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 làm tăng khả năng tăng sinh tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ lên ít nhất 1,5 lần

hoặc ít nhất 2 lần. Sự gia tăng tăng sinh của tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ có thể được xác định bằng bất kỳ phương pháp nào trong lĩnh vực này, như các phương pháp được cung cấp trong các ví dụ trong bản mô tả này. Thử nghiệm làm ví dụ không giới hạn như sau. Tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ có thể được phân lập từ một hoặc nhiều người cho khỏe mạnh và nhuộm bằng CellTrace Violet (CTV). Các tế bào T sau đó được đồng kích thích với kháng thể chống CD3 và polypeptit liên kết OX40, và sau đó được phân tích bằng FACS. Mất CTV nhuộm chứng tỏ tăng sinh. Theo một số phương án, mức tăng sinh tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ được xác định là giá trị trung bình từ một tập hợp các thử nghiệm hoặc từ các tế bào T tổng hợp, như bằng cách đo sự gia tăng tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ được phân lập từ các người cho khỏe mạnh khác nhau. Theo một số phương án, mức tăng sinh tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ được xác định là giá trị trung bình từ các thí nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào T từ ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau, hoặc từ nhóm tế bào T từ ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm tăng sự tăng sinh thậm chí của tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ ngay cả khi có mặt tế bào Treg.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết với OX40 được đề xuất trong bản mô tả tăng biểu hiện CD25 trên $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Biểu hiện CD25 chỉ ra sự kích hoạt tế bào T. Theo một số phương án, một polypeptit liên kết OX40 cung cấp tài liệu này làm tăng biểu hiện CD25 trên $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ tế bào T *in vitro*. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 làm tăng sự biểu hiện CD25 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ lên ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần. Sự gia tăng biểu hiện CD25 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ có thể được xác định bằng bất kỳ phương pháp nào trong lĩnh vực này, như các phương pháp được cung cấp trong các Ví dụ trong bản mô tả này. Thử nghiệm làm ví dụ không giới hạn như sau. Tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ có thể được phân lập từ một hoặc nhiều người cho khỏe mạnh và được đồng kích thích bằng kháng thể kháng CD3 và polypeptit liên kết với OX40, sau đó được FACS phân tích biểu hiện CD25. Theo một số phương án, sự gia tăng biểu hiện CD25 trên sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ được xác định là giá trị trung bình từ một nhóm thử nghiệm hoặc từ tế bào T tổng hợp, như bằng cách đo biểu hiện CD25 trên $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ Tế bào T được phân lập từ các người cho khỏe mạnh khác nhau. Theo một số phương án, sự tăng biểu hiện CD25 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc

$CD8^+$ được xác định là giá trị trung bình từ các thí nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào T từ ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau hoặc từ một nhóm tế bào T từ ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm tăng sự biểu hiện CD25 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ ngay cả khi có mặt tế bào Treg.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này tăng biểu hiện CD71 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Biểu hiện CD71 cho biết tế bào T hoạt hóa. Theo một số phương án, một polypeptit liên kết OX40 cung cấp tài liệu này tăng biểu hiện CD71 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ *in vitro*. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 làm tăng biểu hiện CD71 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ lên ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần. Sự tăng biểu hiện CD71 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ có thể được xác định bằng bất kỳ phương pháp nào trong lĩnh vực này, như các phương pháp được cung cấp trong phần ví dụ trong bản mô tả này. Thử nghiệm làm ví dụ không giới hạn như sau. Tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ có thể được phân lập từ một hoặc nhiều người cho khỏe mạnh và được đồng kích thích với kháng thể chống CD3 và polypeptit liên kết với OX40, sau đó được FACS phân tích biểu hiện CD71. Theo một số phương án, sự tăng biểu hiện CD71 trên sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ được xác định là giá trị trung bình từ một nhóm thử nghiệm hoặc từ tế bào T tổng hợp, như bằng cách đo biểu hiện CD71 trên $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ Tế bào T được phân lập từ người cho khỏe mạnh khác nhau. Theo một số phương án, sự tăng biểu hiện CD71 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ được xác định là giá trị trung bình từ các thí nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào T từ ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau hoặc từ một nhóm tế bào T. từ ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm tăng sự biểu hiện CD71 trên tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ ngay cả khi có mặt tế bào Treg.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm tăng biểu hiện IFNγ trong tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Biểu hiện IFNγ cho biết kích hoạt tế bào T. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm tăng biểu hiện IFNγ ở $CD4^+$ và/hoặc tế bào

T CD8$^+$ *in vitro*. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 làm tăng sự biểu hiện IFNγ trên tế bào T CD4$^+$ và/hoặc CD8$^+$ lên ít nhất 1,5 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần hoặc ít nhất 5 lần. Sự tăng biểu hiện IFNγ ở tế bào T CD4$^+$ và/hoặc CD8$^+$ có thể được xác định bằng bất kỳ phương pháp nào trong lĩnh vực này, như phương pháp được cung cấp trong phần ví dụ trong bản mô tả này. Thử nghiệm làm ví dụ không giới hạn như sau. Tế bào T CD4$^+$ và/hoặc CD8$^+$ có thể được phân lập từ một hoặc nhiều người cho khỏe mạnh và được đồng kích thích với kháng thể chống CD3 và polypeptit liên kết với OX40. Để xác định biểu hiện IFNγ nội bào, tế bào được tạo viên và đánh dấu bề mặt bằng kháng thể kháng CD4 và kháng CD8 có thể phát hiện được. Sau đó, tế bào được cố định và thẩm thấu, và sau đó được nhuộm bằng kháng thể kháng IFNγ có thể phát hiện được. Sau đó, tế bào IFNγ $^+$ CD4$^+$ hoặc IFNγ$^+$ CD8$^+$ được FACS phát hiện. Theo một số phương án, sự tăng biểu hiện IFNγ trên sự tăng sinh tế bào T CD4$^+$ và/hoặc CD8$^+$ được xác định là giá trị trung bình từ một nhóm thử nghiệm hoặc từ tế bào T tổng hợp, như bằng cách đo biểu hiện IFNγ ở tế bào T CD4$^+$ và/hoặc CD8$^+$ được phân lập từ các người cho khỏe mạnh khác nhau. Theo một số phương án, sự tăng biểu hiện IFNγ ở CD4$^+$ và/hoặc tế bào T CD8$^+$ được xác định là giá trị trung bình từ các thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào T từ ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau, hoặc từ nhóm T tế bào từ ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm tăng biểu hiện IFNγ ở CD4$^+$ và/hoặc tế bào T CD8$^+$ ngay cả khi có mặt tế bào Treg.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm giảm hoặc làm suy yếu hoạt động ức chế của tế bào T điều hòa (Treg). Theo một số phương án, polypeptit liên kết với OX40 làm giảm hoạt tính ức chế Treg trên tế bào T CD4$^+$ và/hoặc CD8$^+$ ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30% hoặc ít nhất 50%. Sự giảm hoạt động ức chế Treg trên tế bào T CD4$^+$ và/hoặc CD8$^+$ thông thường có thể được xác định bằng bất kỳ phương pháp nào trong lĩnh vực này, như các phương pháp được cung cấp trong các ví dụ trong bản mô tả này. Thử nghiệm làm ví dụ không giới hạn như sau. Tregs và tế bào T CD4$^+$ được đánh dấu phân biệt với thuốc nhuộm tế bào tăng sinh huỳnh quang sau khi phân lập từ PBMC của người cho khỏe mạnh. CD4$^+$ T tế bào được kích thích với anti-CD3 kháng thể, trong khi Treg tế bào được ủ khi có mặt của polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này. Hai quần thể tế bào T được đồng nuôi cấy lại trong 3 ngày và sự tăng sinh và hoạt hóa của tế bào T CD4$^+$ được theo dõi bằng phương

pháp đo tế bào dòng chảy. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này làm tăng sự hoạt hóa và tăng sinh của tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ khi có mặt tế bào Treg, so với sự hoạt hóa tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ và tăng sinh với sự có mặt của tế bào Treg nhưng không có polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 là đa hóa trị, bao gồm nhiều hơn một miền liên kết OX40. Theo các phương án khác nhau, polypeptit liên kết OX40 bao gồm hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám miền liên kết OX40. Theo một số phương án như vậy, ít nhất một hoặc tất cả các miền liên kết OX40 đều giống nhau. Theo một số phương án như vậy, tất cả các miền liên kết OX40 bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của 1D10v6 (SEQ ID NO: 10, 11 và 12, tương ứng). Theo một số phương án, ít nhất một hoặc tất cả các miền liên kết OX40 bao gồm 1D10v6 VHH (SEQ ID NO: 9). Theo một số phương án, ít nhất một miền liên kết OX40 bao gồm các CDR hoặc VHH của 1D10v6 và ít nhất một miền liên kết OX40 không bao gồm các CDR hoặc VHH của 1D10v6. Theo một số phương án, polypeptit liên kết với OX40 là đa đặc hiệu, bao gồm ít nhất một miền liên kết OX40 và ít nhất một miền mà liên kết với kháng nguyên khác. Theo một số phương án, kháng nguyên thứ hai được chọn từ PD1, PDL1, CTLA4, TIGIT, LAG3, VISTA, gpNMB, B7H3, B7H4, HHLA2, CD73, CD39, 41BB, GITR, CD28, ICOS, HVEM, 5T4, Alpha-4 Integrin, Integrin alpha-V, Integrin alpha4beta1, Integrin alpha4beta7, AGR2, kháng Lewis-Y, thụ thể Apelin J, APRIL, B7-H3, B7-H4, B7-H6, BAFF, BTLA, bổ thể C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), cacbonic anhydraza 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, Collagen, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, thụ thể endothelin B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, protein F của RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, fibronectin ngoài miền B (EDB), FLT-3, alpha thụ thể Folat (FR α), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM- CSFR, thụ thể GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA,

GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, Hyaluronidase, IFNalpha, IFNbeta, IFNgamma, IgE, thụ thể IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rbeta1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, thụ thể Insulin, phối tử răng cưa, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, Mesothelin, MRP4, MUC1, Mucin-16 (MUC16, CA-125), Na/K ATPase, NGF, NEctin 4, Nicastrin, thụ thể Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRalpha, PDGFRbeta, PD-1, PD-L1, PD-L2, Phosphatidyl-serin, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Sphingosin 1 Phosphat, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA 1, TEM-8, TGFbeta, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFalpha, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Transferrin, thụ thể Transferrin, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2 và WISP- 3. Theo một số phương án, ít nhất một vùng liên kết liên kết với kháng nguyên thứ hai là chất đối kháng hoặc chất chủ vận. Theo một số phương án, ít nhất một miền liên kết liên kết với kháng nguyên thứ hai là miền VHH.

Được đề xuất trong bản mô tả này là các tế bào được thao tác di truyền biểu hiện polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được tiết ra từ tế bào. Theo một số phương án, các polypeptit liên kết OX40 bao gồm peptit tín hiệu, ví dụ, peptit tín hiệu kháng thể hoặc trình tự tín hiệu khác gây ra polypeptit được tiết ra bởi tế bào. Peptit tín hiệu, hoặc một phần của peptit tín hiệu, có thể bị phân cắt khỏi polypeptit khi nó được tiết ra. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 có thể được mã hóa bởi axit nucleic trong tế bào, sau đó được tế bào biểu hiện và tiết ra. Axit nucleic thường chứa các trình tự điều hòa thích hợp (như, ví dụ, đoạn thúc đẩy và/hoặc đoạn tăng cường) để biểu hiện trong các điều kiện mong muốn. Axit nucleic có thể được kết hợp vào bộ gen của tế bào, hoặc có thể có mặt dưới dạng axit nucleic ngoài bộ gen. Theo một số phương án, các tế bào là tế bào miễn dịch, như, ví dụ, tế bào miễn dịch chính.

Theo một số phương án, các polypeptit liên kết OX40 là thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR). CAR là thụ thể tổng hợp thường chứa gốc nhắm đích hoặc liên kết

ngoại bào, như miền liên kết kháng nguyên, miền xuyên màng, và một hoặc nhiều miền tín hiệu trong phân tử dung hợp được biểu hiện trên bề mặt của tế bào, như tế bào T. Do đó, CAR kết hợp tính đặc hiệu của kháng nguyên và đặc tính kích hoạt tế bào T trong một phân tử. CAR thế hệ đầu tiên thường bao gồm các khu vực tế bào chất của CD3zeta hoặc Fc l thụ chuỗi γ dưới dạng miền tín hiệu của chúng. CAR thế hệ đầu tiên được thử nghiệm trong các nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I ở bệnh nhân ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư hạch và u nguyên bào thần kinh, nơi chúng gây ra các phản ứng khiêm tốn (được đánh giá trong Sadelain et al., Curr Opin Immunol, 21 (2): 215-223, 2009). CAR thế hệ thứ hai, chứa các miền tín hiệu của phân tử đồng kích thích, như CD28 và CD3zeta, cung cấp tín hiệu kép cho các tín hiệu kích hoạt và đồng kích thích kết hợp trực tiếp. CAR thế hệ thứ ba phức tạp hơn với ba miền tín hiệu hoặc nhiều hơn (được xem xét trong Sadelain et al., Cancer Discovery (3), 388-398, 2013 và Dotti et al, Immuno. Rev, 257 (1), 1-36, 2014).

Theo một số phương án, gốc liên kết ngoại bào của CAR chứa một hoặc nhiều miền liên kết, như miền VHH, mà liên kết với OX40. Theo một số phương án, gốc liên kết ngoại bào là đa hóa trị, bao gồm nhiều hơn một miền liên kết mà liên kết OX40. Theo các phương án khác nhau, gốc liên kết ngoại bào bao gồm hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám miền liên kết OX40. Theo một số phương án này, ít nhất một hoặc tất cả các miền liên kết OX40 là giống nhau. Theo một số phương án này, tất cả các miền liên kết OX40 bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 của 1D10v6 (lần lượt là SEQ ID NO: 10, 11, và 12). Theo một số phương án, ít nhất một hoặc tất cả các miền liên kết OX40 bao gồm 1D10v6 VHH (SEQ ID NO: 9). Theo một số phương án, ít nhất một miền liên kết với OX40 bao gồm các CDR hoặc VHH của 1D10v6 và ít nhất một miền liên kết OX40 không bao gồm các CDR hoặc VHH của 1D10v6. Theo một số phương án, gốc liên kết ngoại bào là đa đặc hiệu, bao gồm ít nhất một miền liên kết OX40 và ít nhất một miền mà liên kết với kháng nguyên khác. Theo một số phương án, kháng nguyên thứ hai được chọn từ PD1, PDL1, CTLA4, TIGIT, LAG3, VISTA, gpNMB, B7H3, B7H4, HHLA2, CD73, CD39, 41BB, GITR, CD28, ICOS, HVEM, 5T4, Alpha-4 Integrin, Integrin alpha-V, Integrin alpha4beta1, Integrin alpha4beta7, AGR2, kháng Lewis-Y, thụ thể Apelin J, APRIL, B7-H3, B7-H4, B7-H6, BAFF, BTLA, bổ thể C5, C-242, CA9, CA19-9, (Lewis a), Cacbonic anhydraza 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD27, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44,

CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD123, CD125, CD132, (IL-2RG), CD133, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, Collagen, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL3, DLL4, DPP-4, DSG1, EDA, EDB, EGFR, EGFRviii, thụ thể Endothelin B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, ERBB3, protein F của RSV, FAP, FGF-2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, Fibronectin vùng phụ B (EDB), FLT-3, thụ thể Folat alpha (FR α), GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4, GM-CSF, GM-CSFR, Các thụ thể GP IIb/IIIa, Gp130, GPIIB/IIIA, GPNMB, GRP78, HER2/neu, HER3, HER4, HGF, hGH, HVEM, Hyaluronidase, IFNalpha, IFNbeta, IFNgamma, IgE, thụ thể IgE (FceRI), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12, IL12p40, IL-12R, IL-12Rbeta1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL2R, IL4, IL4R, IL6, IL6R, thụ thể Insulin, phối tử răng cưa, Jagged 1, Jagged 2, KISS1-R, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, Ly6G6D, LyPD1, MCSP, Mesothelin, MRP4, MUC1, Mucin-16 (MUC16, CA-125), Na/K ATPase, NGF, NEctin 4, Nicastrin, Notch Receptors, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM -R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFRalpha, PDGFRbeta, PD-1, PD-L1, PD-L2, Phosphatidyl-serin, P1GF, PSCA, PSMA, PSGR, RAAG12, RAGE, SLC44A4, Sphingosine 1 Phosphat, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TEM-8, TGFbeta, TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNFalpha, TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Transferrin, thụ thể Transferrin, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2, và WISP-3. Theo một số phương án, một hoặc nhiều miền liên kết kháng nguyên của gốc liên kết ngoại bào là scFv hoặc VHH. Theo một số phương án, gốc liên kết ngoại bào liên kết hoặc có khả năng liên kết với kháng nguyên đích có đủ ái lực sao cho CAR hữu ích trong liệu pháp, ví dụ, nó hữu ích để nhắm mục tiêu tế bào hoặc mô biểu hiện kháng nguyên đích.

Miền xuyên màng của CAR là miền thường đi qua hoặc có khả năng đi qua hoặc kéo dài qua màng sinh chất và được kết nối, trực tiếp hoặc gián tiếp (ví dụ qua chất đệm, như chuỗi bản lề globulin miễn dịch) với kháng nguyên ngoại bào - miền liên kết và phần

nội chất chứa miền tín hiệu nội bào. Theo một số phương án, miền xuyên màng của CAR là vùng xuyên màng của protein xuyên màng (ví dụ protein xuyên màng loại I), trình tự kỵ nước nhân tạo hoặc sự kết hợp của chúng. Theo một số phương án, miền xuyên màng bao gồm miền xuyên màng CD3zeta hoặc miền xuyên màng CD28. Các miền xuyên màng khác sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng liên quan đến các phương án của CAR được đề xuất trong bản mô tả này.

Vùng tín hiệu nội bào của CAR được đề xuất trong bản mô tả này chứa một hoặc nhiều miền tín hiệu nội bào truyền tín hiệu đến tế bào T khi có sự tham gia của miền liên kết kháng nguyên của CAR, như khi liên kết kháng nguyên. Theo một số phương án, vùng nội bào chứa miền tín hiệu nội bào có hoặc chứa miền tín hiệu ITAM. Các miền tín hiệu nội bào ví dụ bao gồm, ví dụ, miền tín hiệu có nguồn gốc từ chuỗi ζ của phức hợp thụ thể tế bào T hoặc bất kỳ chuỗi tương đồng nào của nó (ví dụ, chuỗi η, chuỗi FcsRIy và β, chuỗi MB 1 (Iga), chuỗi B29 (Ig), v.v.), chuỗi CD3zeta của người, polypeptit CD3 (Δ, δ và ε), tyrosin kinaza họ syk (Syk, ZAP 70, v.v.), tyrosin kinaza họ src (Lck, Fyn, Lyn, v.v.) và các các phân tử tham gia vào quá trình tải nạp tế bào T, như CD2, CD5, OX40 và CD28. Theo các phương án cụ thể, vùng tín hiệu nội bào chứa vùng tín hiệu nội bào có nguồn gốc từ chuỗi CD3 zeta của người.

Theo một số phương án, miền nội bào bao gồm miền tín hiệu CD3-zeta. Theo một số phương án, miền tín hiệu CD3-zeta bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27 hoặc trình tự axit amin thể hiện ít nhất 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc nhiều hơn nhận dạng trình tự thành SEQ ID NO: 27 và duy trì hoạt động của tín hiệu tế bào T.

Theo một số phương án, vùng tín hiệu nội bào của CAR có thể còn chứa miền tín hiệu nội bào có nguồn gốc từ phân tử đồng kích thích. Trong ví dụ này, miền tín hiệu nàycó thể tăng cường hoạt động của tế bào CAR-T, như thông qua việc tăng cường sự tăng sinh, sự tồn tại và/hoặc sự phát triển của tế bào nhớ, sau khi tương tác cụ thể với kháng nguyên, ví dụ, so với CAR chỉ chứa ITAM miền báo hiệu, ví dụ CD3 zeta. Theo một số phương án, miền đồng kích thích là miền tín hiệu chức năng thu được từ protein được chọn từ: CD28, CD137 (4-IBB), CD134 (OX40), DapIO, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD1 la/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 hoặc kết

hợp của chúng. Theo các phương án cụ thể, miền tín hiệu đồng kích thích có nguồn gốc hoặc thu được từ protein người. Theo một số khía cạnh, miền tín hiệu đồng kích thích có nguồn gốc hoặc thu được từ CD28 của người hoặc CD137 của người (4-IBB).

Theo một số phương án, miền tín hiệu đồng kích thích có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB và bao gồm trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ SEQ ID NO: 28-31 hoặc trình tự axit amin thể hiện ít nhất 85 %, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc nhiều hơn nhận dạng trình tự cho SEQ ID NO: 28-31 và duy trì hoạt động của tín hiệu đồng kích thích tế bào T.

Theo một số phương án, CAR còn bao gồm vùng bản lề hoặc vùng đệm mà kết nối miền liên kết kháng nguyên ngoại bào và miền xuyên màng. Vùng bản lề hoặc vùng đệm này có thể được sử dụng để đạt được độ dài khác nhau và tính linh hoạt của CAR thu được. Ví dụ về vùng bản lề hoặc vùng đệm có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mảnh Fc của kháng thể hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của chúng, vùng bản lề của kháng thể, hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của chúng, vùng C_H2 của kháng thể, vùng C_H3 của kháng thể, trình tự đệm nhân tạo, ví dụ trình tự peptit, hoặc sự kết hợp của chúng. Các khu vực bản lề hoặc miếng đệm khác sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng. Theo một phương án, vùng bản lề là vùng bản lề lgG4 hoặc vùng bản lề CD8A.

Theo một số phương án, vùng đệm và vùng xuyên màng là vùng bản lề và vùng xuyên màng có nguồn gốc từ CD8, như có trình tự được làm ví dụ được nêu trong SEQ ID NO: 32-34 hoặc trình tự axit amin thể hiện độ tương đồng trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với SEQ ID NO: 32-34.

Cũng được đề xuất trong bản mô tả này là axit nucleic phân tách bao gồm polynucleotit mã hóa CAR bao gồm polypeptit liên kết với OX40 được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic đầu tiên mã hóa hệ số CAR được tách ra từ axit nucleic thứ hai mã hóa các polypeptit liên kết OX40 bởi yếu tố biscistronic, như IRES hoặc trình tự bỏ qua ribosom (ví dụ T2A hoặc P2A). Theo một số khía cạnh, cấu trúc là vectơ biểu hiện để biểu hiện polypeptit liên kết OX40 và/hoặc CAR trong tế bào. Vectơ biểu hiện có thể là vectơ virut. Công nghệ vectơ virut đã biết trong lĩnh vực và được mô tả, ví dụ, trong Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual,

Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2013). Một số hệ thống dựa trên virut được phát triển để chuyển gen vào tế bào động vật có vú. Ví dụ, retrovirut như vectơ adenovirut được sử dụng. Theo một phương án, vectơ lentivirut được sử dụng.

Theo khía cạnh khác, cũng được đề xuất là tế bào hoặc quần thể tế bào phân lập bao gồm một hoặc nhiều cấu trúc axit nucleic như được mô tả ở trên. Cũng được đề xuất là tế bào hoặc quần thể tế bào phân lập được biến đổi gen để biểu hiện polypeptit liên kết OX40 và/hoặc CAR được đề xuất trong bản mô tả này. Do đó, được đề xuất trong bản mô tả này là các tế bào được biến đổi gen bao gồm, bất kỳ có thể biểu hiện ổn định, CAR được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một phương án, tế bào được chọn từ tế bào T, tế bào diệt tự nhiên (NK), tế bào lympho T gây độc (CTL), tế bào T quy định, tế bào gốc tạo máu, và/hoặc tế bào gốc phôi/cảm ứng đa năng. Trong một số trường hợp, tế bào là tế bào T, như tế bào T CD4 + và/hoặc CD8 +. Theo một số phương án, các tế bào là tự thân đối với đối tượng. Ví dụ, theo một số phương án, các tế bào T có thể được phân lập từ bệnh nhân (còn gọi là tế bào T chính) để xử lý di truyền, ví dụ như chuyển nhiễm hoặc truyền chất, với cấu trúc axit nucleic CAR.

Trong phương pháp làm ví dụ, tế bào T chính có thể được tinh chế *ex vivo* (tế bào CD4+ hoặc tế bào CD8+ hoặc cả hai) và được kích thích bằng chất chủ vận TCR/CD28, như hạt phủ kháng CD3/chống CD28. Sau quá trình hoạt hóa kéo dài 2 hoặc 3 ngày, vectơ biểu hiện tái tổ hợp mã hóa CAR có thể được đưa ổn định vào tế bào T chính thông qua các giao thức chuyển gen lentivirut hoặc retrovirut tiêu chuẩn hoặc các chiến lược điện di plasmit. Các tế bào có thể được theo dõi để tiết ra polypeptit liên kết OX40 và/hoặc biểu hiện CAR bằng cách, ví dụ, đo lưu lượng tế bào bằng cách sử dụng thẻ kháng epitop hoặc kháng thể phản ứng chéo với phân tử gốc tự nhiên. Tế bào T biểu hiện CAR có thể được làm giàu thông qua việc phân loại bằng kháng thể gắn thẻ kháng epitop hoặc được làm giàu để biểu hiện cao hoặc thấp tùy thuộc vào ứng dụng.

Các polypeptit liên kết OX40 và/hoặc tế bào T được thiết kế kỹ thuật CAR có thể được thử nghiệm cho chức năng thích hợp bằng nhiều cách khác nhau. Trong một số trường hợp, độc tính tế bào *in vitro*, tăng sinh, thử nghiệm báo cáo OX40 hoặc thử nghiệm xytokin (ví dụ, biểu hiện IFN-gamma, IL-2, TNFα) có thể được sử dụng để đánh giá chức năng của tế bào T được thiết kế. Các điểm cuối tiêu chuẩn ví dụ là phần trăm ly giải của dòng khối u, sự tăng sinh của tế bào T được thiết kế kỹ thuật hoặc biểu hiện protein IFN-

gamma trong dịch nuôi cấy. Trong một số trường hợp, có thể đánh giá khả năng kích thích hoạt hóa tế bào T khi kích thích CAR, ví dụ thông qua kháng nguyên, như bằng cách theo dõi biểu hiện của các dấu hiệu hoạt hóa như CD69, CD44 hoặc CD62L, sự tăng sinh và/hoặc sản xuất xytokin.

Cũng được đề xuất trong bản mô tả này là các phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng ở đối tượng, như ung thư, bao gồm việc sử dụng cho đối tượng các tế bào được thiết kế được đề xuất trong bản mô tả này. Nói chung, đối tượng đang cần điều trị bệnh hoặc tình trạng. Lượng hoạt tính dược dụng của tế bào và/hoặc dược phẩm theo sáng chế. Theo một số phương án, tế bào biểu hiện và tiết ra polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng trong điều trị. Theo một số phương án, CAR thiết kế tế bào T biểu hiện polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị.

Biểu hiện và sản xuất polypeptit

Các phân tử axit nucleic bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit liên kết OX40 được đề xuất. Do đó, theo các phương án khác nhau, phân tử axit nucleic được đề xuất mã hóa miền VHH liên kết với OX40 bao gồm CDR1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, CDR2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11, và CDR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được đề xuất mã hóa miền VHH liên kết với OX40 bao gồm CDR1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, CDR2 bao gồm amin trình tự axit của SEQ ID NO: 11 và CDR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; và khung 2 (FR2) bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic mã hóa thêm FR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được cung cấp mã hóa polypeptit liên kết OX40 bao gồm ít nhất một, như một, hai, ba hoặc bốn miền VHH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9. Theo các phương án khác nhau, phân tử axit nucleic mã hóa thêm Miền Fc, như miền Fc của SEQ ID NO: 25 hoặc 26. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được đề xuất mã hóa polypeptit liên kết OX40 bao gồm ba miền VHH và miền Fc bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14 và miền Fc được hợp nhất với đầu tận cùng C của trình tự axit amin đó. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được đề xuất mã hóa polypeptit liên kết OX40 bao gồm hoặc bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15. Theo bất kỳ phương án nào

trong số các phương án nêu trên, phân tử axit nucleic cũng có thể mã hóa trình tự dẫn đầu chỉ đạo tiết ra polypeptit liên kết OX40, trình tự dẫn đầu thường được phân cắt sao cho nó không có trong polypeptit được tiết ra. Trình tự dẫn đầu có thể là trình tự dẫn đầu chuỗi nặng tự nhiên (hoặc VHH), hoặc có thể là trình tự dẫn đầu khác loài.

Các phân tử axit nucleic có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp thông thường trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic là vectơ biểu hiện thích hợp để biểu hiện trong tế bào chủ đã chọn.

Vectơ chứa axit nucleic mã hóa polypeptit liên kết OX40 được mô tả trong bản mô tả này được đề xuất. Vectơ này bao gồm, nhưng không giới hạn, vectơ ADN, vectơ thể thực khuẩn, vectơ virut, vectơ retrovirut, *vv.* Theo một số phương án, vectơ được chọn được tối ưu hóa để biểu hiện polypeptit trong loại tế bào mong muốn, như tế bào dẫn xuất CHO hoặc CHO hoặc trong tế bào NSO. Ví dụ về vectơ này được mô tả, ví dụ, trong Running Deer *et al., Biotechnol. Prog.* 20: 880-889 (năm 2004).

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 có thể được biểu hiện trong tế bào nhân sơ, như tế bào vi khuẩn; hoặc trong tế bào nhân thực, như tế bào nấm (như nấm men), tế bào thực vật, tế bào côn trùng và tế bào động vật có vú. Ví dụ, biểu hiện này có thể được thực hiện theo các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Tế bào nhân thực làm ví dụ có thể được sử dụng để biểu hiện polypeptit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào COS, bao gồm tế bào COS 7; tế bào 293, trong đó có tế bào 293-6E; tế bào CHO, bao gồm CHO-S, DG44. Tế bào Lec13 CHO và tế bào FUT8 CHO; tế bào PER.C6® (Crucell); và tế bào NSO. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 có thể được biểu hiện trong nấm men. *Xem, ví dụ.*, công bố đơn Mỹ số US 2006/0270045 A1. Theo một số phương án, tế bào chủ sinh vật nhân thực cụ thể được chọn dựa trên khả năng tạo ra biến đổi sau dịch mã mong muốn đối với polypeptit. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào CHO tạo ra polypeptit có mức độ sialyl hóa cao hơn polypeptit tương tự được tạo ra trong 293 tế bào.

Việc đưa một hoặc nhiều axit nucleic (như vectơ) vào tế bào chủ mong muốn có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào, bao gồm nhưng không giới hạn ở, chuyển gen canxi photphat, chuyển gen qua trung gian DEAE-dextran, chuyển gen qua trung gian lipit cation, điện di, truyền, nhiễm trùng, *vv.* Các phương pháp làm ví dụ không giới hạn được mô tả, ví dụ, trong Sambrook *et al.,* Molecular Cloning, A Laboratory

Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Axit nucleic có thể được chuyển gen tạm thời hoặc ổn định vào tế bào chủ mong muốn, theo bất kỳ phương pháp phù hợp nào.

Tế bào chủ chứa bất kỳ axit nucleic hoặc vectơ nào được mô tả trong bản mô tả này cũng được đề xuất. Theo một số phương án, tế bào chủ biểu hiện polypeptit liên kết OX40 được mô tả trong bản mô tả này được đề xuất. Các polypeptit liên kết OX40 biểu hiện trong tế bào chủ có thể được tinh chế bằng bất kỳ phương pháp thích hợp nào. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc sử dụng ma trận ái lực hoặc sắc ký tương tác kỵ nước. Các phối tử ái lực thích hợp bao gồm ROR1 ECD và chất liên kết vùng Fc. Ví dụ, protein A, protein G, protein A/G hoặc cột ái lực kháng thể có thể được sử dụng để liên kết vùng Fc và để tinh chế polypeptit liên kết OX40 bao gồm vùng Fc. Sắc ký tương tác kỵ nước, ví dụ, cột butyl hoặc phenyl, cũng có thể thích hợp để tinh chế một số polypeptit như kháng thể. Sắc ký trao đổi ion (ví dụ sắc ký trao đổi anion và/hoặc sắc ký trao đổi cation) cũng có thể thích hợp để tinh chế một số polypeptit như kháng thể. Sắc ký chế độ hỗn hợp (ví dụ pha đảo ngược/trao đổi anion, pha đảo ngược/trao đổi cation, tương tác ưa nước/trao đổi anion, tương tác ưa nước/trao đổi cation, *v.v.)* cũng có thể thích hợp để tinh chế một số polypeptit như kháng thể. Nhiều phương pháp tinh chế polypeptit đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được tạo ra trong hệ thống không có tế bào. Các hệ thống không có tế bào làm ví dụ không giới hạn được mô tả, ví dụ, trong Sitaraman *et al., Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo *et al., Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được điều chế bằng phương pháp được mô tả ở trên được đề xuất. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được điều chế trong tế bào chủ. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được điều chế trong hệ thống không có tế bào. Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được tinh chế. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy tế bào chứa polypeptit liên kết OX40 được đề xuất.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa kháng thể được điều chế bằng phương pháp được mô tả ở trên được đề xuất. Theo một số phương án, chế phẩm bao

gồm polypeptit liên kết OX40 được điều chế trong tế bào chủ. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm polypeptit liên kết OX40 được điều chế trong hệ thống không có tế bào. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm polypeptit liên kết OX40 tinh khiết.

Ví dụ về phương pháp điều trị bệnh bằng cách sử dụng polypeptit liên kết OX40

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ở cá thể bao gồm sử dụng polypeptit liên kết OX40 được đề xuất. Bệnh này bao gồm bất kỳ bệnh nào có lợi từ việc tăng sinh và kích hoạt các tế bào T $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư ở cá thể được đề xuất. Phương pháp này bao gồm việc cho cá thể dùng lượng hiệu quả của polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này. Phương pháp điều trị này có thể ở người hoặc động vật. Theo một số phương án, phương pháp điều trị cho người được đề xuất. Bệnh ung thư làm ví dụ không giới hạn có thể được điều trị bằng polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm ung thư biểu mô tế bào đáy, ung thư đường mật; ung thư bàng quang; ung thư xương; ung thư não và hệ thần kinh trung ương; ung thư vú; ung thư phúc mạc; ung thư cổ tử cung; ung thư biểu mô màng đệm; ung thư ruột kết và trực tràng; ung thư mô liên kết; ung thư hệ tiêu hóa; ung thư nội mạc tử cung; ung thư thực quản; ung thư mắt; ung thư đầu và cổ; ung thư dạ dày; ung thư đường tiêu hóa; u thần kinh đệm; ung thư biểu mô gan; u gan; khối u biểu mô trong biểu mô; ung thư thận hoặc thận; ung thư thanh quản; ung thư gan; ung thư phổi; ung thư phổi tế bào nhỏ; ung thư phổi không phải tế bào nhỏ; ung thư biểu mô tuyến của phổi; ung thư biểu mô vảy của phổi; u hắc tố; u tủy; u nguyên bào thần kinh; ung thư khoang miệng; ung thư buồng trứng; ung thư tuyến tụy; ung thư tuyến tiền liệt; u nguyên bào võng mạc; ung thư cơ vân; ung thư trực tràng; ung thư hệ hô hấp; ung thư biểu mô tuyến nước bọt; khối u mô liên kết; ung thư da; ung thư tế bào vảy; ung thư dạ dày; ung thư tinh hoàn; ung thư tuyến giáp; ung thư tử cung hoặc nội mạc tử cung; ung thư hệ tiết niệu; và ung thư âm hộ; u lympho; u lympho Hodgkin; u lympho không Hodgkin; u lympho tế bào B; u lympho không Hodgkin (NHL) cấp độ thấp/nang; NHL lympho bào nhỏ (SL); NHL cấp độ trung gian/nang; NHL khuếch tán cấp độ trung gian; NHL miễn dịch cấp độ cao; NHL nguyên bào lympho cấp độ cao; NHL tế bào nhỏ không phân cắt cấp độ cao; NHL bệnh cồng kềnh; u lympho tế bào áo khoác; u lympho liên quan đến AIDS; chứng đại globulin huyết thanh Waldenstrom; bệnh bạch cầu lympho

bào mãn tính (CLL); bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL); bệnh bạch cầu tế bào lông; và bệnh bạch cầu myeloit mãn tính.

Polypeptit liên kết OX40 có thể được sử dụng khi cần thiết cho đối tượng. Việc xác định tần suất sử dụng thuốc có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như bác sĩ chăm sóc dựa trên cân nhắc về tình trạng đang được điều trị, tuổi của đối tượng được điều trị, mức độ nghiêm trọng của tình trạng đang được điều trị, tình trạng sức khỏe chung đối tượng đang được điều trị và tương tự. Theo một số phương án, liều hiệu quả của polypeptit liên kết OX40 được sử dụng cho đối tượng một hoặc nhiều lần. Theo một số phương án, liều hiệu quả của polypeptit liên kết OX40 được dùng cho đối tượng hàng ngày, hai tuần một lần, hàng tuần, hai tuần một lần, một tháng một lần, v.v. Liều hiệu quả của polypeptit liên kết OX40 được dùng cho đối tượng ít nhất một lần. Theo một số phương án, liều hiệu quả của polypeptit liên kết OX40 có thể được dùng nhiều lần, bao gồm nhiều lần trong thời gian ít nhất một tháng, ít nhất sáu tháng hoặc ít nhất một năm.

Theo một số phương án, dược phẩm được dùng với lượng có hiệu quả để điều trị (bao gồm cả phòng ngừa) ung thư và/hoặc tăng sinh tế bào T. Lượng hiệu quả điều trị thường phụ thuộc vào cân nặng của đối tượng được điều trị, tình trạng sức khỏe hoặc thể chất của đối tượng, mức độ lan rộng của tình trạng cần điều trị hoặc độ tuổi của đối tượng được điều trị. Nhìn chung, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 0,05 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 100 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 10 µg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 100 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 50 µg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 5 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 100 µg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 10 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 100 µg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 20 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 0,5 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 20 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ

khoảng 0,5 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 10 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 0,05 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 20 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 0,05 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 10 mg/kg trọng lượng cơ thể cho mỗi liều. Theo một số phương án, kháng thể có thể được dùng với lượng trong khoảng từ khoảng 5 mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, ví dụ như ít hơn 4, ít hơn 3, ít hơn 2 hoặc ít hơn 1 mg/kg kháng thể.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 có thể được sử dụng *in vivo* theo nhiều đường khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm tĩnh mạch, trong động mạch, tiêm, trong phúc mạc hoặc dưới da. Có thể lựa chọn chế phẩm và đường dùng thích hợp tùy theo ứng dụng dự kiến.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bằng cách sử dụng polypeptit liên kết OX40 được thực hiện bằng cách tăng sinh tế bào T và/hoặc kích hoạt. Theo một số phương án, tăng sinh tế bào T và/hoặc kích hoạt ức chế sự phát triển của ung thư.

Dược phẩm

Theo một số phương án, chế phẩm chứa polypeptit liên kết OX40 được đề xuất ở dạng điều chế với nhiều chất mang dược dụng khác nhau (xem, ví dụ, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed (2003); Ansel *et al.,* Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Các chất mang dược dụng khác nhau, bao gồm chất dẫn thuốc, chất bổ trợ và chất pha loãng, có sẵn. Hơn nữa, các chất phụ trợ dược dụng khác nhau, như chất đệm và điều chỉnh pH, chất điều chỉnh trương lực, chất ổn định, chất làm ướt và tương tự, cũng có sẵn. Chất mang làm ví dụ không giới hạn bao gồm nước muối, nước muối đệm, dextroza, nước, glyxerol, etanol, và kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm polypeptit liên kết OX40 ở nồng độ ít nhất 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL, 175 mg/mL, 200 mg/mL, 225 mg/mL, hoặc 250 mg/mL.

Liệu pháp kết hợp

Polypeptit liên kết với OX40 có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các phương thức điều trị khác, như các chất chống ung thư khác. Chúng có thể được cung cấp trước, về cơ bản cùng lúc hoặc sau các phương thức điều trị khác (tức là đồng thời hoặc tuần tự). Theo một số phương án, phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này còn có thể bao gồm sử dụng: xạ trị, hóa trị, tiêm vắcxin, liệu pháp điều trị khối u có đích, liệu pháp CAR-T, liệu pháp virut tiêu ung thư, liệu pháp miễn dịch ung thư, liệu pháp xytokin, cắt bỏ bằng phẫu thuật, sửa đổi chromatin, cắt bỏ, liệu pháp đông lạnh, chất đối nghĩa chống lại đích khối u, tác nhân siARN chống lại đích khối u, tác nhân microARN chống lại đích khối u hoặc chất chống ung thư/khối u, hoặc tác nhân sinh học, như kháng thể, xytokin hoặc dung hợp miền ngoại bào thụ thể-Fc.

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng đồng thời với chất điều trị thứ hai, ví dụ, liệu pháp PD-1. Ví dụ về liệu pháp PD-1/PD-L1 bao gồm bao gồm nivolumab (BMS); pidilizumab (CureTech, CT-011), pembrolizumab (Merck); durvalumab (Medimmune/AstraZeneca); atezolizumab (Genentech/Roche); avelumab (Pfizer); AMP-224 (Amplimmune); BMS-936559; AMP-514 (Amplimmune); MDX-1105 (Merck); TSR-042 (Tesaro/AnaptysBio, ANB-011); STI-A1010 (Sorrento Therapeutics); STI-A1110 (Sorrento Therapeutics); và các chất khác nhắm vào gen chết theo chương trình-1 (PD-1) hoặc phối tử chết theo chương trình 1 (PD-L1).

Theo một số phương án, polypeptit liên kết OX40 được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng đồng thời với liệu pháp CAR-T (tế bào T thụ thể kháng nguyên khảm), liệu pháp virut tiêu ung thư, liệu pháp xytokin và/hoặc chất nhắm vào các phân tử điểm kiểm tra khác, như VISTA, gpNMB, B7H3, B7H4, HHLA2, CD73, CTLA4, TIGIT, v.v.

Phương pháp chẩn đoán và điều trị làm ví dụ không giới hạn

Theo một số phương án, phương pháp mô tả trong tài liệu này rất hữu ích cho việc đánh giá đối tượng và/hoặc mẫu từ đối tượng (ví dụ bệnh nhân ung thư). Theo một số phương án, đánh giá là một hoặc nhiều chẩn đoán, tiên lượng và/hoặc phản ứng với điều trị.

Theo một số phương án, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc đánh giá sự có mặt, không có hoặc mức độ của protein. Theo một số phương án, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc đánh giá sự có mặt, không có hoặc mức độ biểu hiện của axit nucleic. Chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho các phép đo này. Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc tiếp xúc với mẫu của khối u hoặc tế bào được nuôi cấy từ khối u với chất điều trị như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, việc đánh giá có thể điều trị trực tiếp (bao gồm điều trị bằng kháng thể được mô tả trong bản mô tả này). Theo một số phương án, đánh giá có thể chỉ đạo việc sử dụng hoặc ngừng liệu pháp bổ trợ sau khi cắt bỏ. Liệu pháp bổ trợ, còn được gọi là chăm sóc bổ trợ, là phương pháp điều trị được thực hiện ngoài phương pháp điều trị chính, chính hoặc ban đầu. Theo ví dụ không giới hạn, liệu pháp bổ trợ có thể là phương pháp điều trị bổ sung thường được thực hiện sau phẫu thuật, trong đó tất cả các bệnh có thể phát hiện được đã được loại bỏ, nhưng vẫn còn nguy cơ tái phát do bệnh tiềm ẩn. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng làm liệu pháp bổ trợ trong điều trị ung thư. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng làm liệu pháp bổ trợ duy nhất trong điều trị ung thư. Theo một số phương án, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này được ngừng sử dụng làm liệu pháp bổ trợ trong điều trị ung thư. Ví dụ, nếu bệnh nhân không có khả năng đáp ứng với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này hoặc sẽ có phản ứng tối thiểu, thì có thể không áp dụng phương pháp điều trị vì lợi ích của chất lượng cuộc sống và để tránh độc tính không cần thiết từ liệu pháp hóa trị không hiệu quả. Trong các trường hợp này, có thể sử dụng chăm sóc giảm nhẹ.

Theo một số phương án, phân tử được sử dụng như liệu pháp tân bổ trợ trước khi cắt bỏ. Theo một số phương án, liệu pháp tân bổ trợ đề cập đến liệu pháp làm co và/hoặc hạ cấp khối u trước bất kỳ cuộc phẫu thuật nào. Theo một số phương án, liệu pháp tân bổ trợ có nghĩa là hóa trị được dùng cho bệnh nhân ung thư trước khi phẫu thuật. Theo một số phương án, liệu pháp tân bổ trợ có nghĩa là kháng thể được dùng cho bệnh nhân ung thư trước khi phẫu thuật. Loại ung thư mà hóa trị tân bổ trợ thường được xem xét bao gồm, ví dụ, vú, đại trực tràng, buồng trứng, cổ tử cung, bàng quang và phổi. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng như liệu pháp tân bổ trợ trong điều trị ung thư. Theo một số phương án, việc sử dụng là trước khi cắt bỏ.

Theo một số phương án, môi trường vi mô khối u được xem xét trong phương pháp được mô tả trong bản mô tả này là một hoặc nhiều trong số: mạch máu khối u; tế bào lympho xâm nhập khối u; tế bào lưới nguyên bào sợi; tế bào tiền thân nội mô (EPC); nguyên bào sợi liên quan đến ung thư; tế bào quanh mạch; các tế bào mô đệm khác; thành phần của ma trận ngoại bào (ECM); tế bào dạng sợi; tế bào trình diện kháng nguyên; tế bào T; tế bào T điều hòa; đại thực bào; bạch cầu trung tính; và các tế bào miễn dịch khác nằm gần khối u.

Bộ kit

Cũng được đề xuất là vật phẩm sản xuất và bộ kit bao gồm bất kỳ polypeptit liên kết OX40 nào như được mô tả trong bản mô tả này, và bao bì phù hợp. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm bộ kit có (i) polypeptit liên kết OX40, và (ii) hướng dẫn sử dụng bộ kit để dùng polypeptit liên kết OX40 cho cá thể.

Bao bì thích hợp cho chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm, ví dụ, lọ (*ví dụ,* lọ kín), bình, ống thuốc, chai, lọ, bao bì mềm (*ví dụ,* túi Mylar hoặc túi nhựa kín), v.v. Các vật phẩm sản xuất này có thể còn được khử trùng và/hoặc bịt kín. Cũng được đề xuất là dạng liều đơn vị bao gồm chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Các dạng liều đơn vị này có thể được bảo quản trong bao bì thích hợp theo liều đơn hoặc nhiều liều đơn vị và cũng có thể còn được khử trùng và bịt kín. Hướng dẫn được cung cấp trong bộ kit theo sáng chế thường là hướng dẫn bằng văn bản trên nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng (ví dụ, tờ giấy có trong bộ kit), nhưng hướng dẫn có thể đọc bằng máy (ví dụ, hướng dẫn được lưu trên đĩa lưu trữ từ tính hoặc quang học) cũng được chấp nhận. Hướng dẫn liên quan đến việc sử dụng kháng thể thường bao gồm thông tin về liều, lịch trình dùng thuốc và đường dùng cho mục đích điều trị hoặc mục đích sử dụng trong công nghiệp. Bộ kit có thể còn bao gồm mô tả về việc lựa chọn phương pháp điều trị hoặc chế độ điều trị phù hợp cho từng cá thể.

Vật chứa có thể là liều đơn vị, gói số lượng lớn (*ví dụ,* gói đa liều) hoặc liều dưới đơn vị. Ví dụ, bộ kit cũng có thể được đề xuất chứa đủ liều phân tử được bộc lộ trong bản mô tả này để cung cấp phương pháp điều trị hiệu quả cho cá thể trong một thời gian dài, như khoảng một tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần, 3 tháng, 4 tháng, 5 tháng, 6 tháng, 7 tháng, 8 tháng, 9 tháng hoặc lâu hơn. Bộ kit cũng có thể bao gồm nhiều đơn vị liều phân tử và hướng dẫn sử dụng và được đóng gói với số lượng đủ để bảo quản và sử

dụng trong hiệu thuốc, ví dụ, nhà thuốc bệnh viện và hiệu thuốc hỗn hợp. Theo một số phương án, bộ kit này bao gồm chế phẩm khô (*ví dụ,* đông khô) có thể được hoàn nguyên, pha trộn lại hoặc được bù nước để tạo thành hỗn dịch nước ổn định của kháng thể nói chung.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ được thảo luận dưới đây có mục đích chỉ là ví dụ minh họa cho sáng chế và không được coi là giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào. Ví dụ không có mục đích thể hiện rằng thí nghiệm dưới đây là tất cả hoặc chỉ là thí nghiệm được thực hiện. Nỗ lực được thực hiện để đảm bảo độ chính xác liên quan đến con số được sử dụng (ví dụ, số lượng, nhiệt độ, v.v.) nhưng một số lỗi và độ lệch thử nghiệm cần được tính đến. Trừ khi có chỉ dẫn khác, phần là phần theo khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ tính bằng độ C và áp suất ở hoặc gần khí quyển.

Ví dụ 1: 1D10v6-Fc giảm liên kết không cụ thể so với 1D10v1-Fc

Kháng thể miền đơn (sdAb) bao gồm miền VHH liên kết OX40 được phát triển trước đó. Xem công bố đơn PCT số WO 2017/123673 A2. SdAb 1D10 được chọn để làm giống như của người, dẫn đến 1D10v1. Xem id. và SEQ ID NO: 3.

1D10v1 được tối ưu hóa để giảm liên kết không cụ thể. Việc tối ưu hóa đó dẫn đến nhóm thế của một axit amin trong CDR3 của vùng VHH của sdAb và hai axit amin trong vùng khung 2 (FR2), tạo ra 1D10v6 (SEQ ID NO: 9). CDR3 của 1D10v6 (SEQ ID NO: 12) có thay thế G thành A so với CDR3 của 1D10v1 (SEQ ID NO: 6) và FR2 của 1D10v6 có thay thế GL thành ER (SEQ ID NO: 22). Đáng ngạc nhiên là các thay thế đó làm giảm liên kết không đặc hiệu của sdAb, trong khi ái lực với OX40 của người và khỉ cynomolgus vẫn được giữ lại, như được mô tả dưới đây.

Liên kết không đặc hiệu của sdAb hoá trị hai được xác định bằng phương pháp đo lưu lượng tế bào sau khi chịu ứng suất nhiệt độ cao. 1D10v1-Fc và 1D10v6-Fc tinh khiết được trao đổi đệm thành 20 mM Tris pH 8,0, NaCl 150 mM, trehaloza 2%, TWEEN-20 0,2% và chịu ứng suất bằng cách ủ ở 50°C trong 7 ngày. Sau đó, kháng thể được lọc bằng bộ lọc ống tiêm Acrodisc 0,2 µm và định lượng bằng phép đo A280. Tế bào HEK293 không biểu hiện OX40 có thể đo được trên bề mặt tế bào và do đó được sử dụng làm dòng tế bào đối chứng cho sự liên kết không đặc hiệu. 30000 tế bào trên mỗi giếng được

ủ với loạt pha loãng 1D10v1-Fc hoặc 1D10v6-Fc chịu ứng suất nhiệt độ. Sau khi ủ với kháng thể chính, kháng thể Fc Alexa Fluor 647 kháng người thứ cấp được sử dụng ở độ pha loãng 1/2000, sau đó kháng thể liên kết được đo bằng phương pháp đo lưu lượng tế bào trong Intellicyte iQue Plus và huỳnh quang được biểu diễn dưới dạng cường độ huỳnh quang trung bình. Như thể hiện trên FIG. 1, 1D10v1-Fc biểu hiện liên kết không đặc hiệu với tế bào HEK293 chưa chuyển gen bắt đầu ở khoảng 33 nM sdAb, liên kết này tăng đáng kể khi nồng độ sdAb tăng. Ngược lại, 1D10v6-Fc biểu hiện không liên kết có thể phát hiện được với tế bào HEK293 chưa chuyển gen lên đến 1000 nM sdAb.

Liên kết của sdAbs với OX40 của người và khỉ cynomolgus được xác định như sau. Tế bào CHO được chuyển nạp ổn định biểu hiện OX40 của người hoặc khỉ cynomolgus có chiều dài đầy đủ là OX40 được mạ ở 50000 tế bào/giếng. Kháng thể được chuẩn độ pha loãng theo tỉ lệ 1:3 bắt đầu ở 400 nM, và được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp Fc 488 kháng người. Phân tích tế bào dòng chảy được thực hiện trên máy phân tích Intellicyte iQue và huỳnh quang được vẽ dưới dạng cường độ huỳnh quang trung bình. Như được thể hiện trên FIG. 2, 1D10v6-Fc thể hiện sự liên kết có thể so sánh được với OX40 ở người (FIG. 2A) và OX40 của khỉ cynomolgus (FIG. 2B) là 1D10v1-Fc. Ái lực (K_D) của 1D10v6-Fc đối với OX40 của người và khỉ cynomolgus lần lượt là 0,81 nM và 0,66 nM. Ái lực (K_D) của 1D10v1-Fc đối với OX40 của người và khỉ cynomolgus lần lượt là 0,86 nM và 0,79 nM.

Ví dụ 2: 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu có liên kết không đặc hiệu giảm so với 3x1D10v1-Fc hóa trị sáu

sdab kháng OX40 hóa trị sáu được tạo ra bằng cách nối ba miền VHH thành Fc, polypeptit này tạo thành đime hóa trị sáu. Liên kết không đặc hiệu của 3x1D10v1-Fc hóa trị sáu (SEQ ID NO: 8; còn được gọi là Hex-1D10v1) và 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu (SEQ ID NO: 14; còn được gọi là Hex-1D10v6) được xác định như sau. 3x1D10v1-Fc và 3x1D10v6-Fc được ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng trong dung dịch đệm gồm His 20 mM, NaCl 150 mM, TWEEN-20 0,02%, pH 9, với tế bào tự do HEK293 chưa chuyển gen hoặc với tế bào tự do HEK293 chuyển gen tạm thời biểu hiện OX40 chiều dài đầy đủ. Kháng thể thứ cấp huỳnh quang đặc hiệu kháng Fc được sử dụng để phát hiện 3x1D10v1-Fc và 3x1D10v6-Fc liên kết, và được đo bằng phương pháp đo lưu lượng tế

bào sử dụng máy phân tích Intellicyte iQue. Cường độ huỳnh quang trung bình được biểu thị cho từng nồng độ kháng thể.

Như thể hiện trên FIG. 3, 3x1D10v1-Fc và 3x1D10v6-Fc thể hiện liên kết đặc hiệu tương đương trong các điều kiện này, với K_D biểu kiến lần lượt là 0,82 nM và 0,90 nM (FIG. 3A). Tuy nhiên, 3x1D10v1-Fc biểu hiện liên kết không đặc hiệu với tế bào HEK293 chưa chuyển gen, trong khi 3x1D10v6-Fc thì không (FIG. 3B).

Ví dụ 3: 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu duy trì hoạt tính chủ vận OX40

Như mô tả ở trên, 3x1D10v6-Fc làm giảm liên kết không đặc hiệu với tế bào HEK293, trong khi vẫn giữ được ái lực liên kết OX40. Hoạt tính chủ vận của 3x1D10v6-Fc được xác nhận như sau.

Tế bào báo cáo Jurkat/OX40 rã đông và sử dụng (Promega) đoạn 5 được lấy ra khỏi nitơ lỏng và rã đông trong bồn nước 37°C. Tế bào biểu hiện OX40 ổn định và chứa báo cáo luciferaza xuôi của yếu tố đáp ứng NFκB. Tế bào được trộn nhẹ nhàng và chuyển vào 9 mL môi trường nuôi cấy được làm ấm trước (RPMI + 10% FBS). Tế bào được ly tâm ở 400 x g trong 5 phút và được tạo huyền phù lại trong 5 mL môi trường thử nghiệm (RPMI + 10% FBS). Mật độ và khả năng sống của tế bào được xác định bằng Trypan Blue và máy đếm tế bào tự động TC20. Trong 60 giếng bên trong của đĩa thử nghiệm, tế bào được đặt vào đĩa ở $6x10^4$ tế bào/giếng trong 50 µL/giếng môi trường thử nghiệm. 100 µL/giếng môi trường thử nghiệm được thêm vào các giếng bên ngoài. Thêm 2,5 mL môi trường thử nghiệm vào mỗi góc của đĩa thử nghiệm.

3x1D10v1-Fc và 3x1D10v6-Fc được pha loãng trong môi trường thử nghiệm sao cho nồng độ cao nhất gấp 2 lần nồng độ cuối cùng mong muốn. Pha loãng nối tiếp 9 điểm được thực hiện (5 lần, 5 lần, 2 lần, 2 lần, 2 lần, 2 lần, 5 lần, 5 lần), với nồng độ cao nhất là 50 nM và thấp nhất là 0,005 nM. Do đó, nồng độ thử nghiệm cuối cùng sẽ là cao nhất 25nM và thấp nhất là 0,0025 nM. Pha loãng kháng thể được thực hiện trong đĩa pha loãng 96 giếng. 50 µL/giếng pha loãng 2 lần kháng thể được thêm vào đĩa thử nghiệm. Thể tích thử nghiệm cuối cùng trên mỗi giếng là 100 µL. Đĩa thử nghiệm được đậy bằng nắp đĩa và đặt trong tủ ấm CO_2 ở 37°C trong 6 giờ.

Sau 6 giờ ủ, đĩa thử nghiệm được lấy ra khỏi máy ủ và đặt ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. 100 µL thuốc thử Bio-Glo Luciferaza tái tạo (Promega) được thêm vào mỗi

giếng chứa tế bào trong đĩa thử nghiệm. Đĩa thử nghiệm được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. 100 µL/giếng đĩa thử nghiệm được chuyển sang đĩa trắng 96 giếng để đo đơn vị phát quang tương đối (RLU). Đĩa được đọc trên máy đọc đĩa SpectraMax L của Molecular Devices và SoftMax Pro v5.4 theo cài đặt được xác định trong bảng thuốc thử (PMT-MaxRange, Target Wave-470 nm).

Kết quả của thí nghiệm đó được thể hiện trên Fig. 4. Liên kết tối đa (Bmax) và nồng độ enzym ở đáp ứng 50% (K_D) thể hiện rằng 3x1D10v6-Fc có hoạt tính tương đương trong thử nghiệm báo cáo OX40 luciferaza là 3x1D10v1-Fc.

Ví dụ 4: 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu có hoạt tính chủ vận OX40 vượt trội

Để chứng minh rằng 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu là chất chủ vận OX40 vượt trội so với phiên bản hóa trị hai và hóa trị bốn (SEQ ID NO: 13 và 16, tương ứng), thử nghiệm báo cáo luciferaza OX40 về cơ bản như được mô tả trong ví dụ 3 được sử dụng.

Kết quả của thí nghiệm đó được thể hiện trên FIG. 5. 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu vượt trội hơn 2x1D10v6-Fc hóa trị bốn trong thử nghiệm này, cho thấy 3x1D10v6-Fc là chất chủ vận vượt trội. 1D10v6-Fc hóa trị hai thể hiện hoạt tính tối thiểu trong thử nghiệm này.

Ví dụ 5: 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu tăng sinh tế bào T

Phân lập PBMC: PBMC được phân lập từ bạch cầu của người cho bình thường hoặc mẫu máu toàn phần bằng cách sử dụng ly tâm mật độ gradient, như sau. Mẫu máu được pha loãng bằng PBS/2% FBS (1:2) và 30 ml máu pha loãng được xếp lớp lên môi trường mật độ gradient Lymphoprep (Stemcell Technologies) 15 ml. Sau khi ly tâm ở 800xg trong 30 phút, lớp PBMC ở pha trung gian của huyết tương và lymphoprep được loại bỏ và tế bào hồng cầu còn lại được ly giải bằng đệm ly giải hồng cầu (BioLegend) trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào được rửa trong PBS và sau đó đông lạnh tươi trong Cryostor CS10 (Stemcell Technologies) ở mức $100x10^6$ tế bào trên ml.

Làm giàu tế bào T: Quần thể tế bào không phải T được gắn nhãn bằng kháng thể đánh dấu dòng tế bào kháng biotin chống lại CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ (BioLegend) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Quần thể tế bào không phải T sau đó được làm cạn kiệt bằng cách ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng với hạt streptavidin từ tính (500 µl hỗn dịch hạt cộng với 500 µl huyền phù tế bào trên $100x10^6$,

ủ 2x8 phút trên nam châm). Dịch tế bào không liên kết chứa tế bào T. Ngoài ra, tế bào T được làm giàu từ mẫu PBMC bằng bộ kit làm giàu tế bào T của người EasySep (Stemcell Technologies) theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Để tạo ra tế bào T $CD4^+$ được làm giàu, tế bào T được làm giàu được ủ với kháng thể kháng CD8 biotin và làm cạn kiệt bằng hạt streptavidin từ tính về cơ bản như mô tả ở trên.

Phủ hạt tosyl hoạt hóa M-450: Hạt kích thích cho thử nghiệm hoạt hóa tế bào T được phủ 200 µg kháng thể kháng CD3 của người ở chuột (bản sao OKT3; eBioscience) trên 4 x 10^8 hạt theo quy trình phủ được nhà sản xuất khuyến nghị. Tóm lại, hạt được rửa một lần trong dung dịch đệm 1 (đệm natri phosphat 0,1 M, pH 7,4–8,0) và sau đó ủ trong máy quay ống trong 18 giờ ở nhiệt độ phòng trong dung dịch đệm 1 chứa 200 µg kháng thể kháng CD3 của người. Sau đó, hạt được rửa 4 lần bằng dung dịch đệm 2 (PBS, BSA 0,1%, EDTA 2 mM pH 7,4). Nhóm tosyl tự do được bất hoạt bằng cách ủ hạt trong 4 giờ ở 37°C trong dung dịch đệm 3 (Tris 0,2 M, BSA 0,1%, pH 8,5). Sau đó, hạt được rửa một lần trong dung dịch đệm 2 và được tạo huyền phù lại ở nồng độ 400x10^6 hạt/ml.

Thử nghiệm đồng kích thích: Tế bào T $CD4^+$ được làm giàu (từ bốn người cho khác nhau) được gắn nhãn bằng CellTrace Violet (CTV; Invitrogen) ở độ pha loãng 1:1000. Sau đó, tế bào được đặt vào đĩa ba bản sao ở 200000 tế bào trên mỗi giếng trong đĩa tròn 96 giếng và kết hợp với 100000 hạt phủ kháng thể kháng CD3 của người. Giống cấy được ủ với chuẩn độ 3x1D10v6-Fc hoặc 1D10v6-Fc giá trị hai bắt đầu ở nồng độ cuối cùng là 50 nM và chuẩn độ trên toàn bộ đĩa 1:5. Thể tích nuôi cấy cuối cùng là 200 µl trên mỗi giếng và tế bào được ủ ở 37°C/5% CO_2 trong 4 ngày.

Nhuộm FACS: Vào ngày 4 của nuôi cấy tế bào T, tế bào được rửa một lần trong 150 ml đệm FACS và viên tế bào được tạo huyền phù lại trong 50 µl dung dịch nhuộm dấu hiệu bề mặt (chứa kháng thể đối với CD4, CD25 và CD71 và propidi iodua). Tế bào được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng trước khi rửa lần cuối và phân tích trên máy đo lưu lượng tế bào SONY Analyzer. Phần mềm FlowJo được sử dụng để phân tích quần thể tế bào T. Cường độ huỳnh quang trung bình thô cho các đoạn đánh dấu hoạt hóa khác nhau sau đó được xuất và phân tích bằng Excel và GraphPad PRISM. Giá trị được biểu đồ hóa và đường cong chuẩn độ được điều chỉnh để đánh giá mối quan hệ liều lượng-đáp ứng bằng cách sử dụng đường cong phù hợp phi tuyến tính [Chất chủ vận] so với đáp

ứng – Độ dốc thay đổi (bốn thông số). Sự phù hợp này cũng được sử dụng để xác định nồng độ hiệu quả (EC50) cho mỗi thể cho.

Chiến lược tác động FACS: Để đánh giá mức độ tăng sinh tế bào T và mức độ biểu hiện đoạn đánh dấu hoạt hóa trên phân nhóm tế bào T, chiến lược tác động sau đây được sử dụng: mảnh vụn tế bào bị loại trừ bằng cách loại trừ kích thước FSC/SSC và tế bào chết bị loại trừ dựa trên tín hiệu propidi iodua dương tính của chúng. Tế bào đơn lẻ được chọn bằng cách sử dụng cặp đôi FSC-A/FSC-H và loại trừ tập hợp. Quần thể tế bào còn lại được xác nhận là $CD4^+$. Việc mất nhuộm CellTrace Violet (CTV^+) so với đối chứng chỉ có tế bào T là dấu hiệu của sự tăng sinh tế bào. Mức MFI tăng của gen đánh dấu hoạt hóa CD25 và CD71 là dấu hiệu của sự hoạt hóa tế bào T.

IFNγ ELISA và phân tích dữ liệu: Vào ngày thứ 4, mẫu dịch nổi nuôi cấy tế bào được lấy và lưu trữ ở -80°C. Mức IFNγ trong dịch nổi nuôi cấy tế bào được đo bằng cách sử dụng bộ kit ELISA IFNγ theo giao thức của nhà sản xuất. Tóm lại, đĩa ELISA được phủ kháng thể bắt giữ kháng IFNγ qua đêm ở 4°C. Ngày hôm sau, đĩa được phong bế trong 1 giờ trong đệm thử nghiệm trước khi ủ dịch nuôi cấy tế bào trong 2 giờ. Mẫu được pha loãng 1:25 trong đệm thử nghiệm. Liên kết kháng nguyên được phát hiện bằng cách ủ đĩa trong 1 giờ với kháng thể phát hiện biotin hóa và ủ tiếp theo với thuốc thử streptavidin liên hợp với peroxidaza cải ngựa. Hoạt tính HRP được đo sau khi thêm dung dịch cơ chất và ủ trong 15 phút. Sau khi thêm dung dịch dừng, đĩa được phân tích trên đầu đọc vi mạch Emax precision ở bước sóng 450 nm.

Giá trị thô từ đầu đọc vi mạch Emax precision được phân tích bằng phần mềm phân tích Softmax Pro của đầu đọc vi mạch. Mức IFNγ mẫu tính bằng pg/ml được tính toán bằng cách sử dụng giá trị hấp thụ của đường cong chuẩn và hồi quy logistic bốn tham số. Giá trị đã phân tích được xuất vào Excel (Microsoft, Phiên bản 15.27) để phân tích dữ liệu thêm. Giá trị được biểu diễn bằng đồ thị PRISM (GraphPad Software Inc., Phiên bản 7.0c) và đường cong chuẩn độ được điều chỉnh để đánh giá mối quan hệ đáp ứng liều bằng cách sử dụng đường cong điều chỉnh phi tuyến tính [Chất chủ vận] so với đáp ứng – Độ dốc thay đổi (bốn tham số).

Như thể hiện trên FIG.6, việc điều trị bằng 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu, nhưng không phải bằng 1D10v6-Fc hóa trị hai, dẫn đến tăng sinh tế bào T $CD4^+$ từ cả bốn thể cho. Việc điều trị bằng 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu cũng dẫn đến mức cao hơn của gen đánh dấu

hoạt hóa CD25 và CD71 ở cả bốn thể cho (FIG. 7 và FIG. 8). Mức IFNγ tiết ra cũng cao hơn khi điều trị bằng 3x1D10v6-Fc (FIG. 9). Cường độ đồng kích thích thay đổi tùy theo thể cho, nhưng nhìn chung phụ thuộc vào liều lượng. Giá trị EC50 đã tính toán được tóm tắt trong bảng 2 bên dưới.

Bảng 2: Giá trị EC50 cho 3x1D10v6-Fc:

EC50 [nM]	L556	Leuko 22	Leuko 20	Leuko 9
IFNγ	0,077	0,032	0,019	0,094
Sự tăng sinh CD4	0,024	0,016	0,008	0,004
$CD4^+$ CD25 MFI	0,026	0,026	0,008	0,04
$CD4^+$ CD71 MFI	0,032	0,022	0,007	0,069

Tóm lại, 3x1D10v6-Fc cải thiện sự kích thích tế bào T do kháng thể kháng CD3 trung gian *in vitro*. Không có ý định bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết cụ thể nào, có vẻ như sự đồng kích thích hiệu quả trong thử nghiệm này đòi hỏi phải tập hợp OX40, ví dụ, với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu.

Ví dụ 6: 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu tăng cường kích thích tế bào T và sản xuất IFNγ

Tế bào T được làm giàu từ 10 người cho khỏe mạnh được kích thích bằng kháng thể kháng CD3 dưới mức tối ưu khi có hoặc không có 3x1D10v6-Fc.

PBMC được phân lập từ 10 người cho khỏe mạnh và quần thể tế bào T được làm giàu về cơ bản như được mô tả trong ví dụ 5.

Kích thích tế bào T: Tế bào T được làm giàu từ 10 người cho khỏe mạnh được rã đông và rửa hai lần bằng môi trường chống kết tụ CTL. Tế bào T được gắn nhãn bằng thuốc nhuộm tăng sinh CellTrace Violet (CTV) (ThermoFisher) trong 10 phút ở 37°C. Sau khi rửa, tế bào T được tạo huyền phù thành $1,5x10^6$ tế bào/ml trong RPMI bổ sung 10% FBS và 1X kháng sinh/kháng nấm và 150000 tế bào T được thêm vào mỗi giếng trong 100 µl trong đĩa 96 giếng đáy phẳng. M-450 Tosylactivated Dynabeads (ThermoFisher) được phủ qua đêm bằng 200 µg kháng thể kháng CD3 (bản sao OKT3, eBioscience) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hạt phủ kháng thể kháng CD3 được thêm vào 50 µl mỗi giếng vào tế bào T được gắn nhãn theo tỷ lệ 1:2 để cung cấp kích thích tế bào T chính. 3x1D10v6-Fc được thêm vào 50 µl ở nồng độ cuối cùng là 10 nM. Đĩa được

ủ ở 37°C/5% CO_2 trong 3 ngày và được phân tích bằng phương pháp đo lưu lượng tế bào.

Phân tích dòng chảy tế bào: Sau 3 ngày, tế bào T được quay ly tâm và gắn nhãn trong đệm FACS (PBS/FBS 2%/natri azit 0,05%) với chất đánh dấu khả năng sống propidi iodua (PI) cùng với kháng thể được gắn nhãn huỳnh quang sau: CD4-PE, CD8-APC, CD25-FITC và CD71-PE/Cy7 (Biolegend) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào T được rửa và tạo huyền phù lại trong 70 µl đệm FACS và được phân tích bằng máy phân tích quang phổ Sony SA3800. Phần mềm Flowjo được sử dụng để phân loại quần thể CD4 và CD8 sống (PI-) và phần trăm tế bào trải qua quá trình tăng sinh được xác định bằng cách tác động vào tế bào T trải qua tối thiểu một lần phân chia theo phương pháp pha loãng CTV. Phần trăm tế bào T CD4 và CD8 biểu hiện gen đánh dấu hoạt hóa CD25 và CD71 được xác định bằng cách so sánh với quần thể tế bào T không được kích thích. Dữ liệu được xuất sang Microsoft Excel và biểu đồ bằng Prism.

Nhuộm xytokin nội bào: Tế bào được quay và gắn nhãn bề mặt bằng kháng thể kháng CD4 gắn với PE và kháng thể kháng CD8 gắn với APC cùng với thuốc nhuộm khả thi Zombie Red (BioLegend) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng trong đệm FACS (FBS 2%/Natri Azit 0,1% trong PBS). Sau khi rửa, tế bào được cố định trong 30 phút bằng đệm BD Fix/Perm. Tế bào được rửa bằng đệm BD Perm/Wash 1X và gắn nhãn bằng kháng thể kháng IFNγ PE/Cy7 trong đệm Perm/Wash trong 45 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, tế bào được tạo huyền phù lại trong đệm FACS và đọc trên máy phân tích quang phổ Sony SA3800. Phân tích dữ liệu của quần thể tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$ được thực hiện bằng phần mềm Flowjo và biểu đồ bằng Prism.

Trong tế bào T từ tất cả 10 thể cho được thử nghiệm, phương pháp điều trị 3x1D10v6-Fc dẫn đến sự gia tăng đáng kể về phần trăm tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$ trải qua quá trình tăng sinh để đáp ứng với sự kích thích của kháng thể kháng CD3 (FIG. 10, FIG. 11). Hơn nữa, phần trăm tế bào T CD4 và CD8 biểu hiện đoạn đánh dấu hoạt hóa CD25 và CD71 tăng lên với phương pháp điều trị 3x1D10v6-Fc (FIG. 11). Trong thí nghiệm riêng biệt, nhóm nhỏ hơn gồm 4 thể cho thể hiện sự gia tăng nồng độ IFNγ nội bào ở cả hai nhóm tế bào T sau khi điều trị bằng 3x1D10v6-Fc (FIG. 12). Do đó, 3x1D10v6-Fc cung cấp tín hiệu đồng kích thích mạnh mẽ cho tế bào T, dẫn đến tăng cường hoạt hóa, tăng sinh và chức năng hiệu ứng.

Ví dụ 7: 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu đảo ngược sự ức chế qua trung gian Treg của sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$

Làm giàu tế bào T: Treg và tế bào T $CD4^+$ thông thường được làm giàu từ PBMC của thể cho tươi, khỏe mạnh bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T điều hòa EasySep Human $CD4^+CD127^{thấp}CD25^+$ (Stemcell) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thử nghiệm ức chế tế bào T: Để phân biệt hai quần thể tế bào, tế bào Treg được làm giàu và tế bào T đáp ứng $CD4^+$ được gắn nhãn bằng thuốc nhuộm tăng sinh CellTrace Violet (CTV) và CFSE tương ứng trong 10 phút ở 37°C. Sau khi rửa, tế bào Treg và tế bào T $CD4^+$ được tạo huyền phù lại thành $1,5x10^6$ tế bào/ml trong RPMI bổ sung 10% FBS và 1X kháng sinh/thuốc chống nấm. Tế bào Treg được gieo trong thể tích 50 µl tạo ra 75000 tế bào Treg/giếng trong đĩa tròn đáy 96 giếng. Tế bào Treg được ủ qua đêm ở 37°C khi có 10 nM 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu kháng OX40, 10 nM kháng thể kháng OX40 hóa trị hai thông thường (HC/LC) hoặc khi không có kháng thể. Song song đó, tế bào T đáp ứng $CD4^+$ được gắn nhãn được hoạt hóa qua đêm ở 37°C với hạt dynabead phủ kháng CD3 theo tỷ lệ hạt trên tế bào T là 1:2. Ngày hôm sau, đĩa Treg được rửa 2X bằng môi trường để loại bỏ kháng thể. Tế bào T đáp ứng $CD4^+$ được kích thích được thêm vào 100 µl môi trường, cung cấp 150000 tế bào T $CD4^+$/giếng vào đĩa chứa Treg theo tỷ lệ 1 Treg cho mỗi 2 tế bào T đáp ứng $CD4^+$. 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu hoặc kháng thể kháng OX40 hóa trị hai thông thường được thêm trở lại 100 µl môi trường với nồng độ cuối cùng là 10 nM theo bản sao vào tập hợp con của tế bào. Ngoài ra, nhóm các tế bào T đáp ứng $CD4^+$ được đưa vào mà không được ủ chung với Treg. Đĩa được ủ ở 37°C/5% CO_2 trong 3 ngày và được phân tích bằng phương pháp đo lưu lượng tế bào.

Phân tích dòng chảy tế bào: Sau 3 ngày, tế bào T được quay và gắn nhãn trong đệm FACS (PBS/FBS 2%/natri azit 0,05%) với chất đánh dấu khả năng sống propidi iodua (PI) cùng với kháng thể được gắn nhãn huỳnh quang sau: CD4-PE, CD25-APC và CD71-PE/Cy7 (Biolegend) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào T được rửa và tạo huyền phù lại trong 70 µl đệm FACS và được phân tích bằng máy phân tích quang phổ Sony SA3800. Phần mềm Flowjo được sử dụng để tác động vào quần thể $CD4^+$ hoặc Treg CTV^+ đáp ứng $CFSE^+$ sống (PI^-) và phần trăm tế bào trải qua quá trình tăng sinh được xác định bằng cách tác động vào tế bào T đáp ứng trải qua tối thiểu một lần phân chia theo cách pha loãng CFSE. Phần trăm tế bào T $CD4^+$ đáp ứng biểu hiện gen đánh

dấu hoạt hóa CD25 và CD71 được xác định bằng cách so sánh với quần thể tế bào T không được kích thích. Dữ liệu được xuất sang Microsoft Excel và biểu đồ bằng Prism.

Kích thích bằng hạt phủ kháng CD3 trong tổng số 4 ngày dẫn đến sự tăng sinh của 66% tế bào T $CD4^+$ đáp ứng (FIG. 13). Việc bổ sung Treg làm giàu vào giống cấy dẫn đến sự giảm đáng kể sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ đáp ứng (34% tăng sinh). Xử lý bằng 10 nM 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu dẫn đến sự phục hồi gần như hoàn toàn sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ đáp ứng (62% tăng sinh). Hơn nữa, biểu hiện của đoạn đánh dấu hoạt hóa tế bào T CD25 và CD71 được phục hồi ở mức tương tự như tế bào T $CD4^+$ đáp ứng không có nhóm thử nghiệm Treg. Ngược lại, xử lý bằng kháng thể kháng OX40 hóa trị hai thông thường không phục hồi được sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ hoặc làm tăng biểu hiện của CD25 hoặc CD71 so với nhóm không có kháng thể.

Ví dụ 8: 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu khi kết hợp với hoạt hóa tế bào T tiềm năng Pembrolizumab

Sau khi gắn kết TCR, phân tử đồng kích thích như OX40 được điều hòa tăng lên cùng với phân tử điều hòa âm tính, chống lại hoạt hóa tế bào T bằng cách làm giảm tín hiệu TCR. Về mặt lâm sàng, việc phong tỏa con đường này, trục PD-1/PD-L1, được thể hiện là phục hồi thành công chức năng của tế bào T đặc hiệu khối u không phản ứng, bằng cách làm giảm tín hiệu ức chế này. OX40 đạt được kết quả tương tự, tăng cường phản ứng của tế bào T, thông qua cơ chế khác: cung cấp tín hiệu đồng kích thích ngoại sinh có tác dụng hiệp đồng với tín hiệu TCR. Các cơ chế không chồng chéo nhưng bổ sung này cho thấy rằng việc kết hợp chất chủ vận OX40 với phong tỏa điểm kiểm soát sẽ mang lại lợi ích lâm sàng lớn hơn.

Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp dị sinh (MLR) là thử nghiệm *in vitro* được sử dụng để chứng minh sự điều biến chức năng của tế bào T; nó sử dụng hỗn hợp tế bào đuôi gai chưa trưởng thành có nguồn gốc *in vitro* (iDC) và tế bào T không khớp HLA để hoạt hóa tế bào T phụ thuộc TCR. 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu được thể hiện là có hoạt tính khiêm tốn trong thử nghiệm này. (Dữ liệu không được thể hiện.) Hoạt tính của 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu được thử nghiệm kết hợp với kháng thể kháng PD-1 pembrolizumab để xác định xem sự kết hợp này có biểu hiện hoạt hóa tế bào T tăng lên hay không.

Phân lập tế bào T CD4+: PBMC được phân lập từ leukopak máu người cho bằng phương pháp ly tâm theo mật độ, về cơ bản như sau. Mẫu máu được pha loãng với PBS/FBS 2% (1:2) và 30 mL mẫu pha loãng được xếp lớp lên môi trường mật độ theo mật độ Lymphoprep™ 15 mL. Sau khi ly tâm ở tốc độ 800xg trong 30 phút, lớp PBMC ở pha trung gian của huyết tương và Lymphoprep™ được thu thập và tế bào hồng cầu còn lại được ly giải bằng dung dịch ly giải tế bào hồng cầu trong 7 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, PBMC được làm giàu cho tế bào đơn nhân như mô tả bên dưới hoặc đông lạnh ở mật độ $100x10^6$ tế bào/ml trong môi trường bảo quản lạnh CryoStor® và được lưu trữ trong nitơ lỏng. Tế bào T CD4+ được làm giàu từ PBMC thể cho tươi, khỏe mạnh bằng bộ kit phân lập tế bào T CD4+ của người EasySepTM (Stemcell Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. PBMC được tạo huyền phù lại ở mật độ $50x10^6$ tế bào/mL trong PBS chứa FBS 2% và EDTA 1mM. Tế bào T CD4+ được làm giàu âm tính bằng hỗn hợp phân lập tế bào T CD4+ sau đó ủ với Dextran RapidSpheres™ trong nam châm EasySep™. Sau hai vòng làm giàu trên nam châm, tế bào T CD4+ được đếm và rửa bằng PBS/BSA 0,1% (đệm CTV). Tế bào được gắn nhãn bằng thuốc nhuộm CellTrace™ Violet (1:1000) ở mật độ $10x10^6$ tế bào/mL trong đệm CTV trong 10 phút ở 37°C. Tế bào được gắn nhãn được rửa một lần bằng PBS/FBS 2% và tạo huyền phù lại ở mật độ $3,5x10^6$ tế bào/mL trong môi trường thử nghiệm (RPMI + 10% FBS cộng với penixilin, streptomyxin và amphoterixin).

Làm giàu bạch cầu đơn nhân và tạo tế bào đuôi gai chưa trưởng thành (iDC): Tế bào đơn nhân được làm giàu từ PBMC được phân lập từ thể cho leukopak bằng cách sử dụng bộ kit làm giàu âm tính mà không làm suy giảm CD16 theo quy trình của nhà sản xuất (bộ kit làm giàu bạch cầu đơn nhân EasySep™ không làm suy giảm CD16; Stemcell Technologies). Tóm lại, quần thể không phải bạch cầu đơn nhân được đánh dấu bằng phức hợp kháng thể tetrame nhận biết đoạn đánh dấu kháng dòng và bị cạn kiệt bằng cách sử dụng hạt từ tính. Phần nổi của tế bào không liên kết chứa bạch cầu đơn nhân. Bạch cầu đơn nhân được nuôi cấy ở $1x10^6$ tế bào/mL trong RPMI được bổ sung FBS 10% cộng với penixilin, streptomyxin và amphoterixin, 500 U/mL GM-CSF, và 250 U/mL IL-4. Một nửa giá thể được bổ sung sau mỗi 2 ngày cho đến khi thu hoạch tế bào đuôi gai (iDC) chưa trưởng thành vào ngày thứ 7 bằng cách thu thập tế bào được tạo huyền phù và bám dính lỏng lẻo. Tế bào được rửa trong PBS và sau đó đông lạnh tươi trong CryoStor ® ở $3x10^6$ tế bào mỗi mL. Cảm ứng kiểu hình iDC theo phác đồ này được

xác nhận bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy sử dụng loại trừ kích thước FSC/SSC và phát hiện nhuộm CD14- CD11c+ HLA-DR+ ở ít nhất 60% quần thể.

Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR): Tế bào đuôi gai chưa trưởng thành có nguồn gốc từ tế bào đơn nhân (iDC) được tạo huyền phù lại ở mức $0,8x10^6$ tế bào/mL trong môi trường thử nghiệm. $1,75x10^5$ tế bào T CD4+ từ thể cho khác được tạo huyền phù trong 50µL và trộn với $4x10^4$ iDC trong 50 µL trong đĩa đáy chữ U 96 giếng.

3x1D10v6-Fc hóa trị sáu được bổ sung tại nồng độ thử nghiệm ban đầu là 10 nM và chuẩn độ trên đĩa 1:4 ba lần khi có hoặc không có nồng độ thử nghiệm không đổi là 10 nM pembrolizumab. Trong thí nghiệm riêng biệt, pembrolizumab được bổ sung tại nồng độ thử nghiệm ban đầu là 50 nM và được chuẩn độ trên đĩa 1:4 ba lần khi có hoặc không có nồng độ thử nghiệm không đổi là 1 nM 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu. Nồng độ cố định của 3x1D10v6Fc hóa trị sáu (1 nM) được lựa chọn dựa trên nồng độ kháng thể bão hòa thể hiện hoạt tính tối đa trong thử nghiệm đồng kích thích tế bào T và đối với pembrolizumab (10 nM), nồng độ kháng thể bão hòa cho hoạt tính báo cáo tối đa trong thử nghiệm phong bế PD1/PD-L1. Tất cả các đĩa thử nghiệm được ủ ở 37°C trong 7 ngày.

ELISA IL-2 của người: Các phần dịch nổi bề mặt trong thử nghiệm được thu thập vào ngày thứ 3 để xác định nồng độ IL-2 của người bằng ELISA sử dụng bộ kit ELISA MAX™ Deluxe của người (Biolegend) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đĩa ELISA MaxiSorp được phủ qua đêm bằng kháng thể bắt IL-2 của người, rửa sau đó phong bế bằng đệm pha loãng trong một giờ. Đường cong chuẩn được chuẩn bị theo bản sao từ nồng độ ban đầu là 1000 pg/mL IL-2 và mẫu dịch nổi bề mặt trong thử nghiệm được pha loãng theo tỷ lệ 1:5 hoặc 1:10 trong đệm pha loãng. Mẫu và chuẩn được ủ trên đĩa ELISA trong hai giờ, sau đó rửa sạch và ủ với kháng thể phát hiện trong một giờ. Đĩa thử nghiệm được rửa và ủ với streptavidin liên hợp với peroxidaza cải ngựa (HRP) trong 30 phút. Sau bước rửa cuối cùng, IL-2 của người đã bắt được phát hiện trên đĩa ELISA với dung dịch chất nền được cung cấp. Phản ứng phát hiện được dừng lại sau 10-30 phút với thể tích tương đương HCl 1M. Giá trị hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc đĩa EMax® (Thiết bị phân tử) và nồng độ IL-2 của người trong dịch nổi bề mặt thử nghiệm MLR được tính toán từ đường cong chuẩn.

Như được thể hiện trên FIG. 14A-14B, hỗn hợp của pembrolizumab và 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu tăng cường sản xuất IL-2 từ tế bào T $CD4^+$ trong phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR). Các kết quả này chứng minh lợi ích của việc kết hợp phong bế trục PD-1/PD-L1 với chất chủ vận OX40.

Ví dụ 9: Đánh giá đặc tính dược động học của 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu

Đặc tính dược động học (PK) và profin động học của chất độc của chất điều trị rất quan trọng để hiểu mối quan hệ liều lượng/phơi nhiễm, tốc độ thanh thải và profin an toàn. Phơi nhiễm giảm và hoặc profin thanh thải tăng tốc có thể tiết lộ trách nhiệm trong chính chất do tương tác không đặc hiệu, độ ổn định kém hoặc khả năng sinh miễn dịch; hoặc trong đích như được chứng minh bằng độc tính hoặc thay đổi trong quá trình phân bố thuốc. Thông thường, đặc tính PK của kháng thể điều trị được đánh giá ở loài gặm nhấm và/hoặc ở loài linh trưởng không phải người. PK kém trong các mô hình này có thể chỉ ra liên kết không đặc hiệu và thanh thải nhanh của kháng thể.

3x1D10v6Fc hóa trị sáu được tiêm tĩnh mạch cho khỉ cynomolgus (5 con đực và 5 con cái mỗi nhóm) với liều 5mg/kg, 20 mg/kg và 60 mg/kg. Phương pháp ELISA định lượng được sử dụng để xác định nồng độ huyết thanh của 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu, về cơ bản như sau. Giếng vi mạch được phủ sơ bộ bằng dạng tái tổ hợp của miền ngoại bào của OX40 ở người được dung hợp với miền Fc ở chuột (OX40-mFc). Sau khi phong bế và rửa, chuẩn độ 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu (để có đường cong chuẩn), mẫu đối chứng chứa nồng độ 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu được xác định trước và mẫu thử nghiệm được thêm vào các giếng và ủ để cho 3x1D10v6Fc hóa trị sáu có trong mẫu liên kết với OX40-mFc cố định. Đĩa được rửa sạch và kháng thể thứ cấp kháng IgG của người liên hợp với peroxidaza cải ngựa (HRP) đặc hiệu với mảnh Fcγ được thêm vào để phát hiện 3x1D10v6Fc hóa trị sáu liên kết với đĩa. Dung dịch chứa chất nền HRP tetrametylbenzidin (TMB) được thêm vào giếng, tạo ra tín hiệu đo màu tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể kháng IgG của người liên hợp với HRP liên kết với 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm dung dịch axit và độ hấp thụ ở 450 nm được xác định. Đối với mẫu đối chứng và thử nghiệm, việc chuyển đổi giá trị độ hấp thụ quang phổ (được định lượng theo mật độ quang [OD450]) thành nồng độ được thực hiện bằng cách so sánh với đường cong hiệu chuẩn được phân tích đồng thời được hồi quy

theo mô hình 4-PL/logistic. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của 3x1D10v6Fc hóa trị sáu trong huyết thanh theo phương pháp này là 100 ng/mL.

Trong phạm vi liều, phơi nhiễm toàn thân (Cmax và AUC $_{0\text{-}168h}$) đạt được và tăng liều theo tỷ lệ, không có sự khác biệt về giới tính. Trong phạm vi liều từ 5 đến 60 mg/kg, sử dụng phân tích không ngăn, $T_{1/2}$ trung bình giữa các nhóm là 55-89,7 giờ, tốc độ thanh thải (CL) là 0,683-0,832 mL/h/kg, và thể tích phân bố ở trạng thái ổn định (Vdss) là 55,9-86,2 mL/kg. Profin PK của 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu được thể hiện trên FIG. 15.

Các kết quả này chứng minh rằng 3x1D10v6-Fc hóa trị sáu có profin PK tốt, thích hợp cho ứng dụng điều trị, và cho thấy liên kết không đặc hiệu quan sát được với 1D10v1 được giảm thiểu.

Sáng chế có thể được thể hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không xa rời tinh thần hoặc đặc điểm cơ bản của chúng. Do đó, phương án nêu trên được xem xét theo mọi khía cạnh mang tính minh họa chứ không phải là giới hạn của sáng chế. Do đó, phạm vi sáng chế được chỉ ra bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải bởi mô tả ở trên, và tất cả các thay đổi đi kèm với ý nghĩa và phạm vi tương đương của các điểm yêu cầu bảo hộ do đó đều được chấp nhận trong bản mô tả này.

Bảng của một số trình tự nhất định

SEQ ID NO	Mô tả	Trình tự
1	OX40 của người	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI
2	OX40 của khỉ cynomolgus	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTTAKLH CVGDTYPSND RCCQECRPGN GMVSRCNRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSAKP CKACTWCNLR SGSERKQPCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPPTQPQETQ GPPARPTTVQ PTEAWPRTSQ RPSTRPVEVP RGPAVAAILG LGLALGLLGP LAMLLALLLL RRDQRLPPDA PKAPGGGSFR TPIQEEQADA HSALAKI
3	1D10v1	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAFMYWVRQA PGKGLEWVSS ISNRGLKTAY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCSRDV DGDFRGQGTL VTVKP
4	1D10v1	GFTFSDAF

	CDR1	
5	1D10v1 CDR2	ISNRGLKT
6	1D10v1 CDR3	SRDVDGDF
17	1D10v1 FR1	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAAS
18	1D10v1 FR2	MYWVRQA PGKGLEWVSS
19	1D10v1 FR3	AY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYC
20	1D10v1 FR4	RGQGTL VTVKP
7	1D10v1-Fc (hóa trị hai)	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAFMYWVRQA PGKGLEWVSS ISNRGLKTAY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCSRDV DGDFRGQGTL VTVKPGGGGD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
8	3x1D10v1-Fc (hóa trị sáu; còn được gọi là Hex-1D10v1)	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAFMYWVRQA PGKGLEWVSS ISNRGLKTAY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCSRDV DGDFRGQGTL VTVKPGGSGG SEVQLLESGG GEVQPGGSLR LSCAASGFTF SDAFMYWVRQ APGKGLEWVS SISNRGLKTA YAESVKGRFT ISRDNAKNTL YLQMSSLRAE DTAVYYCSRD VDGDFRGQGT LVTVKPGGSG GSEVQLLESG GGEVQPGGSL RLSCAASGFT FSDAFMYWVR QAPGKGLEWV SSISNRGLKT AYAESVKGRF TISRDNAKNT LYLQMSSLRA EDTAVYYCSR DVDGDFRGQG TLVTVKPGGG GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
9	1D10v6	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAFMYWVRQA PGKEREWVSS ISNRGLKTAY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCSRDV DADFRGQGTL VTVKP
10	1D10v6 CDR1	GFTFSDAF
11	1D10v6 CDR2	ISNRGLKT
12	1D10v6 CDR3	SRDVDADF
21	1D10v6	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAAS

	FR1	
22	1D10v6 FR2	MYWVRQA PGKEREWVSS
23	1D10v6 FR3	AY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYC
24	1D10v6 FR4	RGQGTL VTVKP
13	1D10v6-Fc (hóa trị hai)	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAFMYWVRQA PGKEREWVSS ISNRGLKTAY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCSRDV DADFRGQGTL VTVKPGGGGD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
14	3x1D10v6	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAFMYWVRQA PGKEREWVSS ISNRGLKTAY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCSRDV DADFRGQGTL VTVKPGGSGG SEVQLLESGG GEVQPGGSLR LSCAASGFTF SDAFMYWVRQ APGKEREWVS SISNRGLKTA YAESVKGRFT ISRDNAKNTL YLQMSSLRAE DTAVYYCSRD VDADFRGQGT LVTVKPGGSS GSEVQLLESG GGEVQPGGSL RLSCAASGFT FSDAFMYWVR QAPGKEREWV SSISNRGLKT AYAESVKGRF TISRDNAKNT LYLQMSSLRA EDTAVYYCSR DVDADFRGQG TLVTVKP
15	3x1D10v6-Fc (hóa trị sáu; còn được gọi là Hex-1D10v6)	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAFMYWVRQA PGKEREWVSS ISNRGLKTAY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCSRDV DADFRGQGTL VTVKPGGSGG SEVQLLESGG GEVQPGGSLR LSCAASGFTF SDAFMYWVRQ APGKEREWVS SISNRGLKTA YAESVKGRFT ISRDNAKNTL YLQMSSLRAE DTAVYYCSRD VDADFRGQGT LVTVKPGGSS GSEVQLLESG GGEVQPGGSL RLSCAASGFT FSDAFMYWVR QAPGKEREWV SSISNRGLKT AYAESVKGRF TISRDNAKNT LYLQMSSLRA EDTAVYYCSR DVDADFRGQG TLVTVKPGGG GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
16	2x1D10v6-Fc (hóa trị bốn)	EVQLLESGGG EVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAFMYWVRQA PGKEREWVSS ISNRGLKTAY AESVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCSRDV DADFRGQGTL VTVKPGGSSG SEVQLLESGG GEVQPGGSLR LSCAASGFTF SDAFMYWVRQ APGKEREWVS SISNRGLKTA YAESVKGRFT ISRDNAKNTL YLQMSSLRAE DTAVYYCSRD VDADFRGQGT LVTVKPGGGG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
25	Miền Fc 1 (IgG1 của người)	DKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
26	Miền Fc 2 (IgG1 của	DKTHTCPPCP APGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY

	người xELL)	PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
27	Miền tín hiệu CD3-zeta	RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDT YDALHMQALP PR
28	miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB	KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC EL
29	miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB	SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS
30	miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB	RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAYR S
31	miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB	FWVRSKRSRL LHSDYMNMTP RRPGPTRKHY QPYAPPRDFA AYRS
32	bản lề hoặc miền xuyên màng có nguồn gốc từ CD8	KPTTTPAPRP PTPAPTIASQ PLSLRPEASR PAAGGAVHTR GLDFASDIYI WAPLAGTCGV LLLSLVITLY C
33	bản lề hoặc miền xuyên màng có nguồn gốc từ CD8	AKPTTTPAPR PPTPAPTIAS QPLSLRPEAC RPAAGGAVHT RGLDFACDIY IWAPLAGTCG
34	bản lề hoặc miền xuyên màng có nguồn gốc từ CD8	VLLLSLVIT

Yêu cầu bảo hộ

1. Polypeptit chứa ít nhất một miền VHH liên kết với OX40, trong đó miền VHH này chứa CDR1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, CDR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, và CDR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12, và trong đó miền VHH chứa FR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22.

2. Polypeptit theo điểm 1, chứa hai, ba, bốn miền VHH.

3. Polypeptit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mỗi miền VHH liên kết với OX40.

4. Polypeptit theo điểm 3, trong đó mỗi miền VHH chứa CDR1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, CDR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, và CDR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12, và trong đó mỗi miền VHH chứa FR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22.

5. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó ít nhất một miền VHH liên kết với OX40 chứa FR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23.

6. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó ít nhất một miền VHH liên kết với OX40 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9.

7. Polypeptit theo điểm 6, trong đó mỗi miền VHH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9.

8. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó polypeptit chứa miền Fc.

9. Polypeptit theo điểm 8, tạo thành đime trong điều kiện sinh lý.

10. Polypeptit theo điểm 8 hoặc 9, trong đó miền Fc chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 25 và 26.

11. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14.

12. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15.

13. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó polypeptit này:

a) tăng sự tăng sinh của tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*;

b) tăng biểu hiện CD25 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*;

c) tăng biểu hiện CD71 trên tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*;

d) tăng tín hiệu NFκB ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*; và/hoặc

e) tăng biểu hiện IFNγ ở tế bào $CD4^+$ và/hoặc $CD8^+$ T *in vitro* và/hoặc *in vivo*.

14. Polypeptit theo điểm 13, trong đó sự tăng xảy ra khi có mặt tế bào Treg.

15. Polypeptit theo điểm 13 hoặc 14, trong đó sự tăng là ở *in vitro* và ít nhất 1,5 lần hoặc ít nhất 2 lần.

16. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 15, trong đó sự tăng được xác định là trung bình của các kết quả từ tế bào T của ít nhất năm hoặc ít nhất mười người cho khỏe mạnh khác nhau.

17. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, là chất chủ vận của hoạt tính sinh học OX40.

18. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó OX40 là OX40 của người.

19. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó polypeptit liên kết OX40 của người với ái lực (K_D) là nhỏ hơn 10 nM, nhỏ hơn 5 nM, nhỏ hơn 2 nM, hoặc nhỏ hơn 1 nM.

20. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, trong đó polypeptit liên kết OX40 của khỉ cynomolgus với ái lực (K_D) là nhỏ hơn 10 nM, nhỏ hơn 5 nM, nhỏ hơn 2 nM, hoặc nhỏ hơn 1 nM.

21. Polypeptit liên kết OX40 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15.

22. Polypeptit theo điểm 21, tạo thành đime trong điều kiện sinh lý.

23. Dược phẩm chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22 và chất mang dược dụng.

24. Axit nucleic phân lập mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22.

25. Vectơ chứa axit nucleic theo điểm 24.

26. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 24 hoặc vectơ theo điểm 25.

27. Tế bào chủ biểu hiện polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22.

28. Phương pháp sản xuất polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22 bao gồm ủ tế bào chủ theo điểm 26 hoặc 27 trong điều kiện thích hợp để biểu hiện polypeptit.

29. Phương pháp theo điểm 28, còn bao gồm phân lập polypeptit.

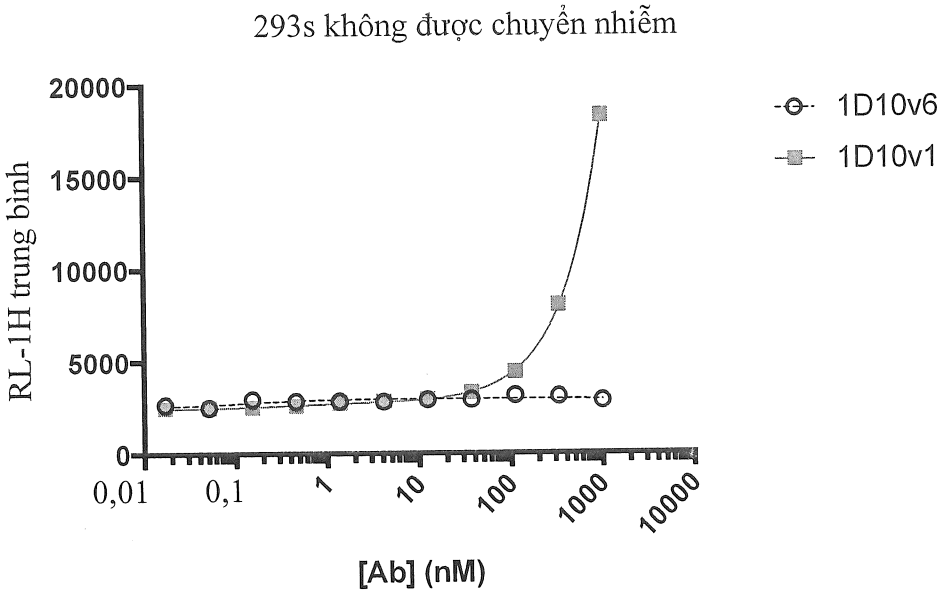

293s không được chuyển nhiễm
RL-1H trung bình
20000
15000
10000
5000
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
[Ab] (nM)
1D10v6
1D10v1

FIG. 1

	1D10v6	1D10v1
Bmax	100641	100931
Kd	0,8068	0,86

293s được chuyển nhiễm huOX40

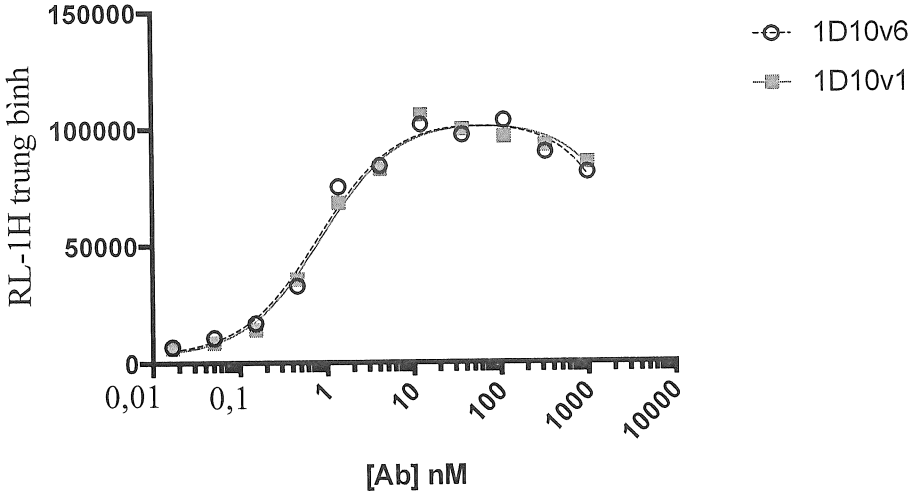


FIG. 2A

	1D10v6	1D10v1
Bmax	108132	107962
Kd	0,6638	0,7902

293s được chuyển nhiễm cyOX40

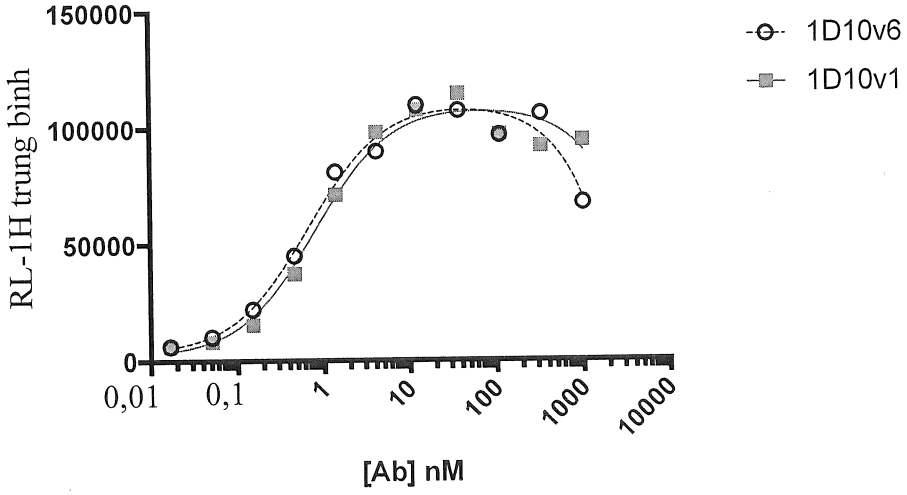


FIG. 2B

Phân tích tế bào theo dòng chảy có khả năng liên kết đặc hiệu: OX40+ 293

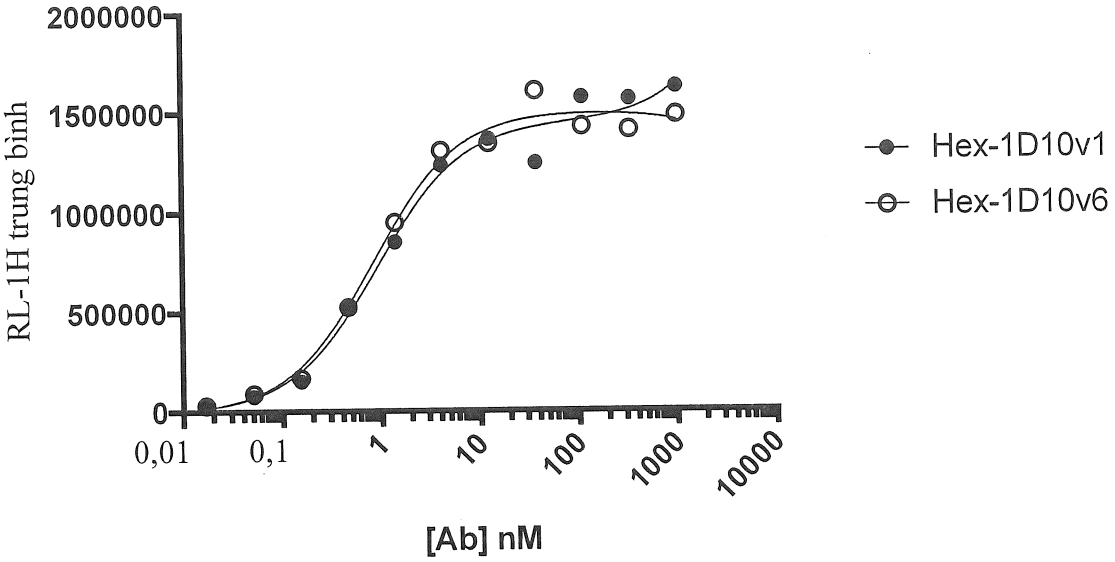


FIG. 3A

Phân tích tế bào theo dòng chảy có khả năng liên kết không đặc hiệu: 293

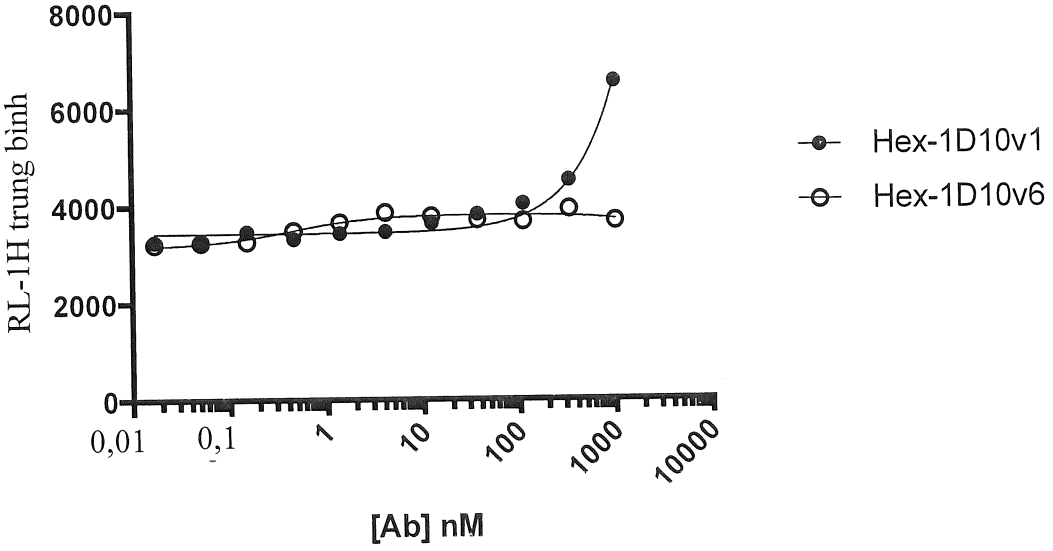
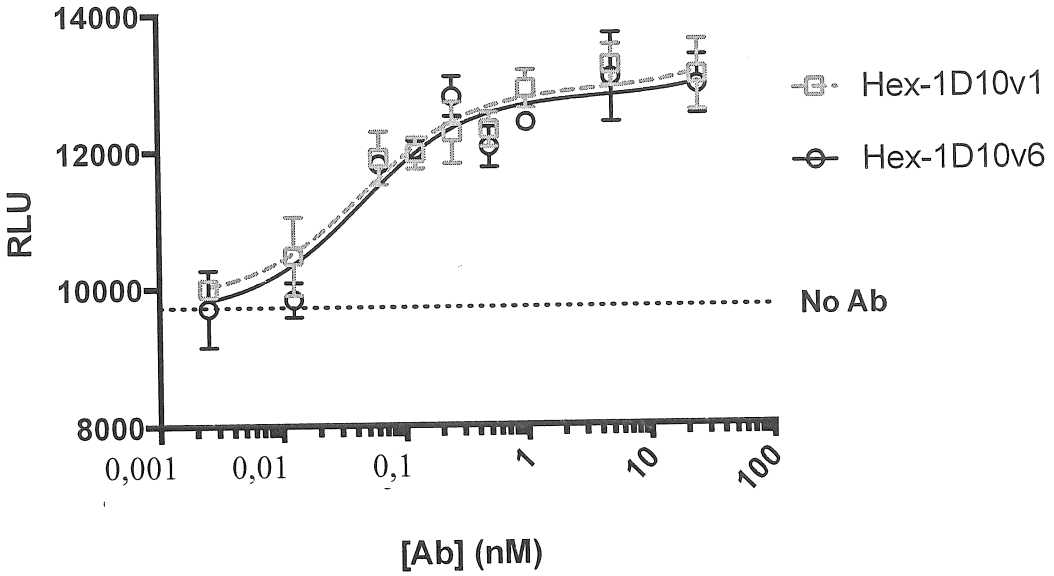


FIG. 3B

Gen báo cáo OX40



	Hex-1D10v6	Hex-1D10v1
Bmax	3144	3029
Kd	0,04396	0,04639

FIG. 4

Hoạt hóa tế bào báo cáo promega OX40-NFkB-Luc2 Jurkat

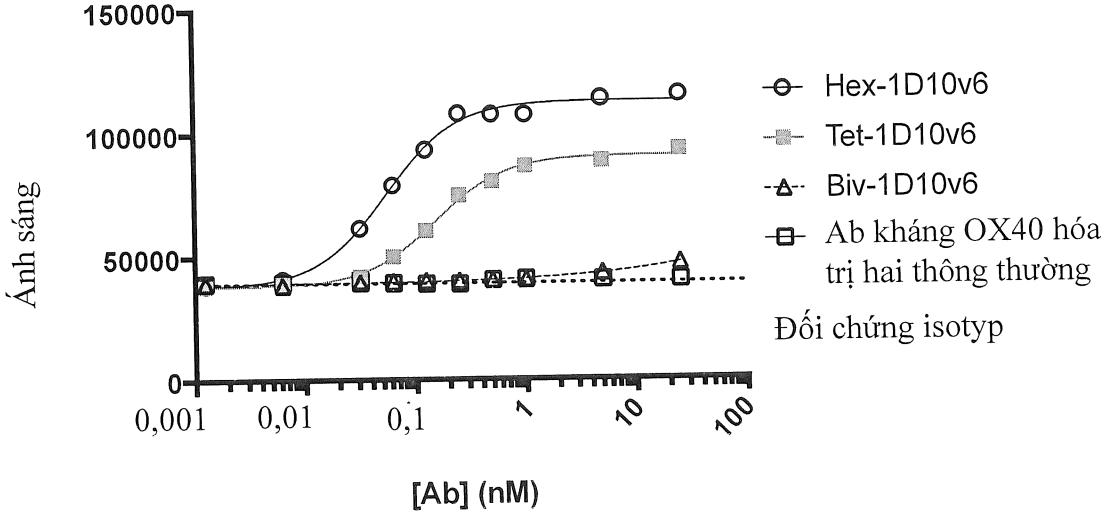


FIG. 5

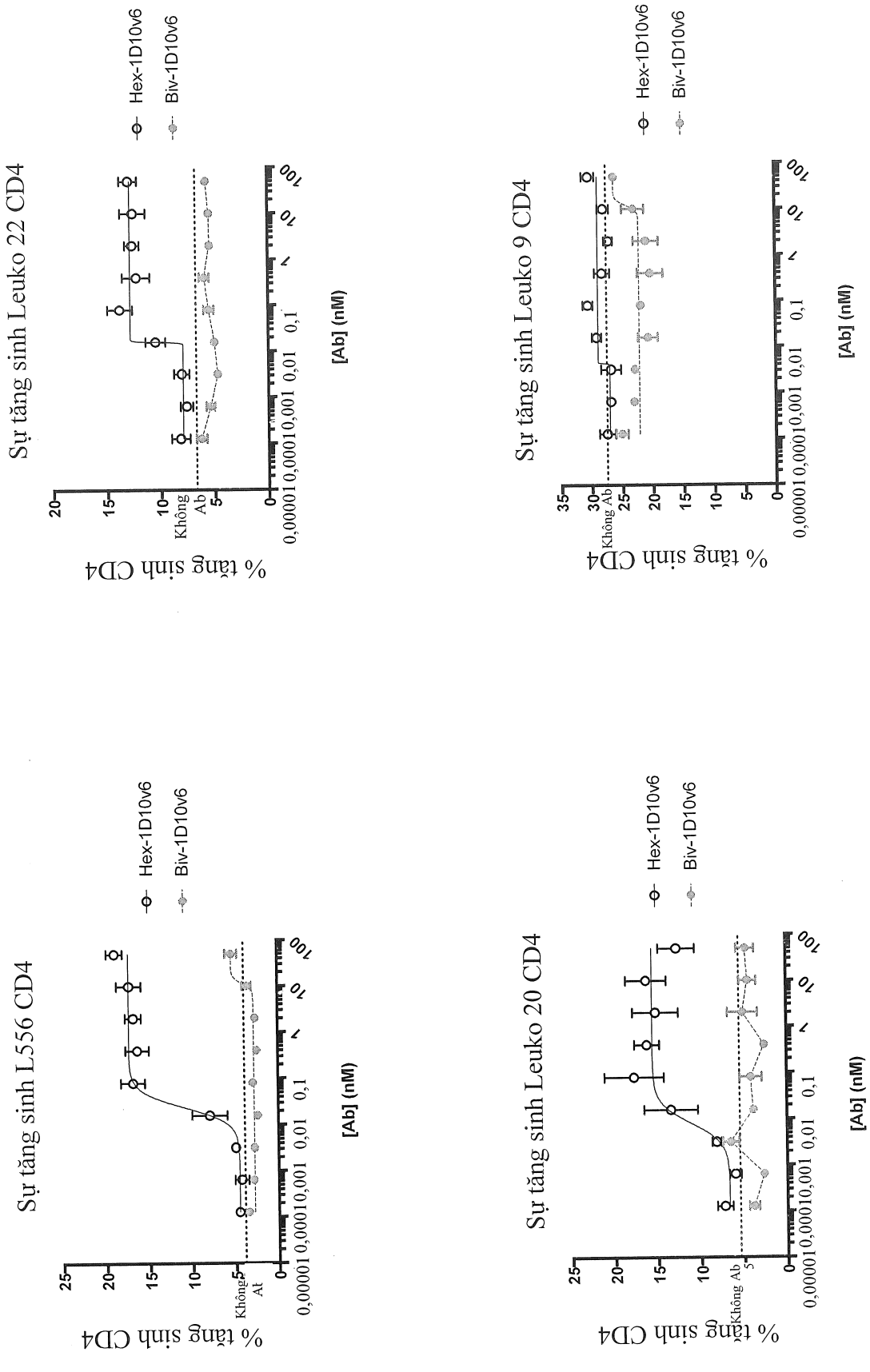

Sự tăng sinh Leuko 22 CD4
% tăng sinh CD4
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
Không Ab
[Ab] (nM)
Sự tăng sinh Leuko 9 CD4
% tăng sinh CD4
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
Không Ab
[Ab] (nM)
Sự tăng sinh L556 CD4
% tăng sinh CD4
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
Không Ab
[Ab] (nM)
Sự tăng sinh Leuko 20 CD4
% tăng sinh CD4
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
Không Ab
[Ab] (nM)

FIG. 6

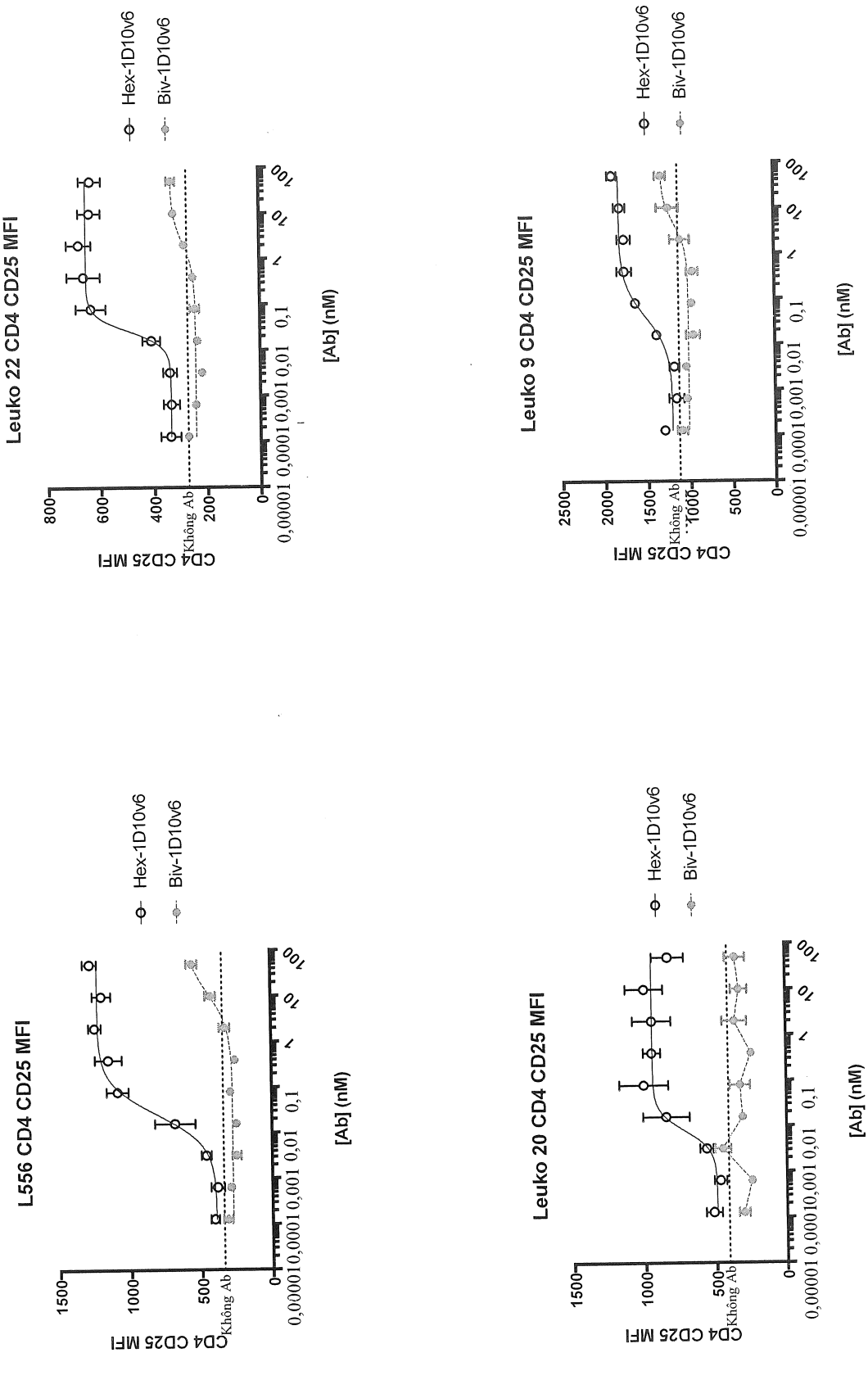
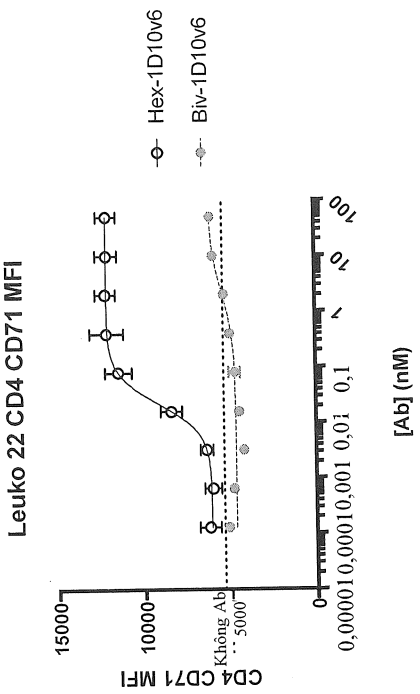
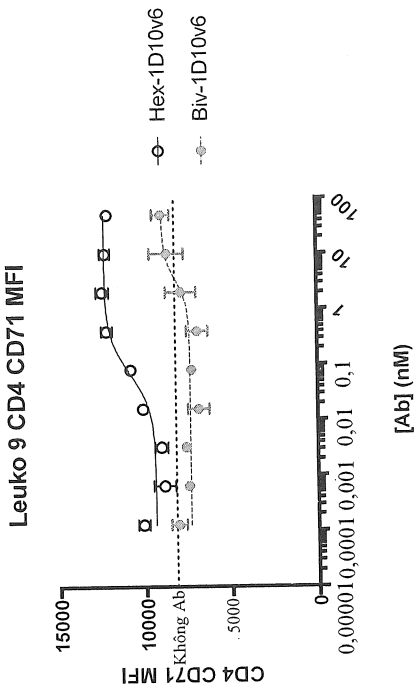
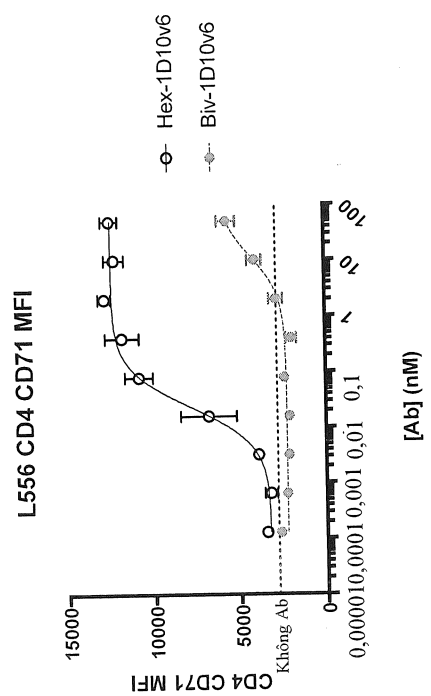

Leuko 22 CD4 CD25 MFI
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
CD4 CD25 MFI
800
600
400
200
0
Không Ab
0,00001 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)
Leuko 9 CD4 CD25 MFI
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
CD4 CD25 MFI
2500
2000
1500
1000
500
0
Không Ab
0,00001 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)
L556 CD4 CD25 MFI
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
CD4 CD25 MFI
1500
1000
500
0
Không Ab
0,00001 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)
Leuko 20 CD4 CD25 MFI
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
CD4 CD25 MFI
1500
1000
500
0
Không Ab
0,00001 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)

FIG. 7


Leuko 22 CD4 CD71 MFI
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
CD4 CD71 MFI
15000
10000
5000
0
Không Ab
0,000001 0,00010,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)


Leuko 9 CD4 CD71 MFI
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
CD4 CD71 MFI
15000
10000
5000
0
Không Ab
0,000010,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)


L556 CD4 CD71 MFI
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
CD4 CD71 MFI
15000
10000
5000
0
Không Ab
0,000010,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)

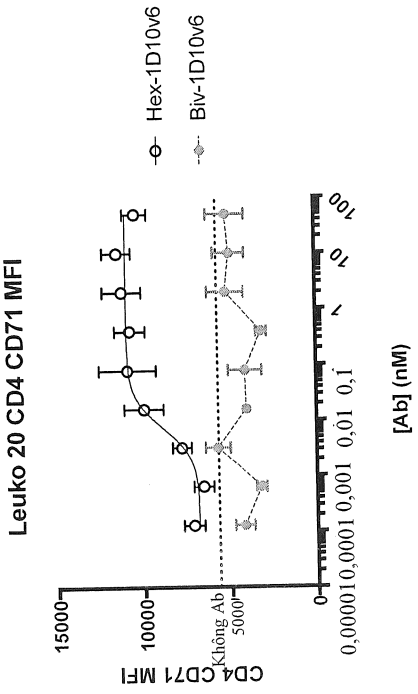

Leuko 20 CD4 CD71 MFI
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
CD4 CD71 MFI
15000
10000
5000
0
Không Ab
0,000010,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)

FIG. 8

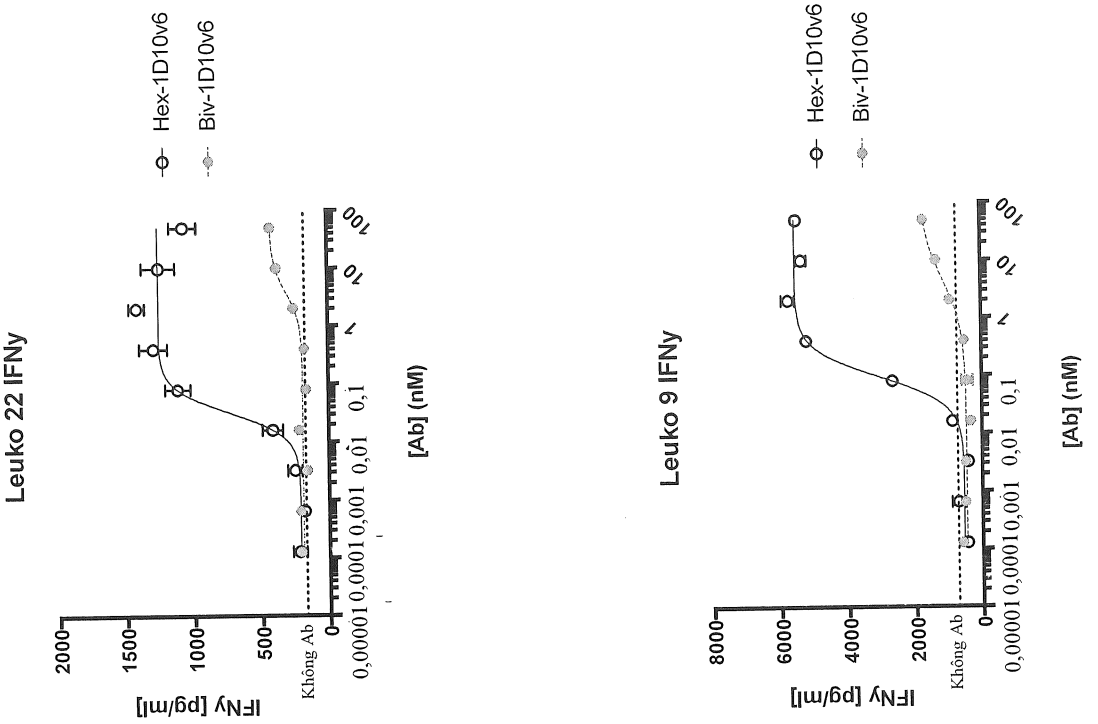

Leuko 22 IFNy
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
IFNy [pg/ml]
2000
1500
1000
500
0
Không Ab
0,00001 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)
Leuko 9 IFNy
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
IFNy [pg/ml]
8000
6000
4000
2000
0
Không Ab
0,00001 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)
L556 IFNy
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
IFNy [pg/ml]
4000
3000
2000
1000
0
Không Ab
0,00001 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)
Leuko 20 IFNy
Hex-1D10v6
Biv-1D10v6
IFNy [pg/ml]
2000
1500
1000
500
0
Không Ab
0,00001 0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
[Ab] (nM)

FIG. 9

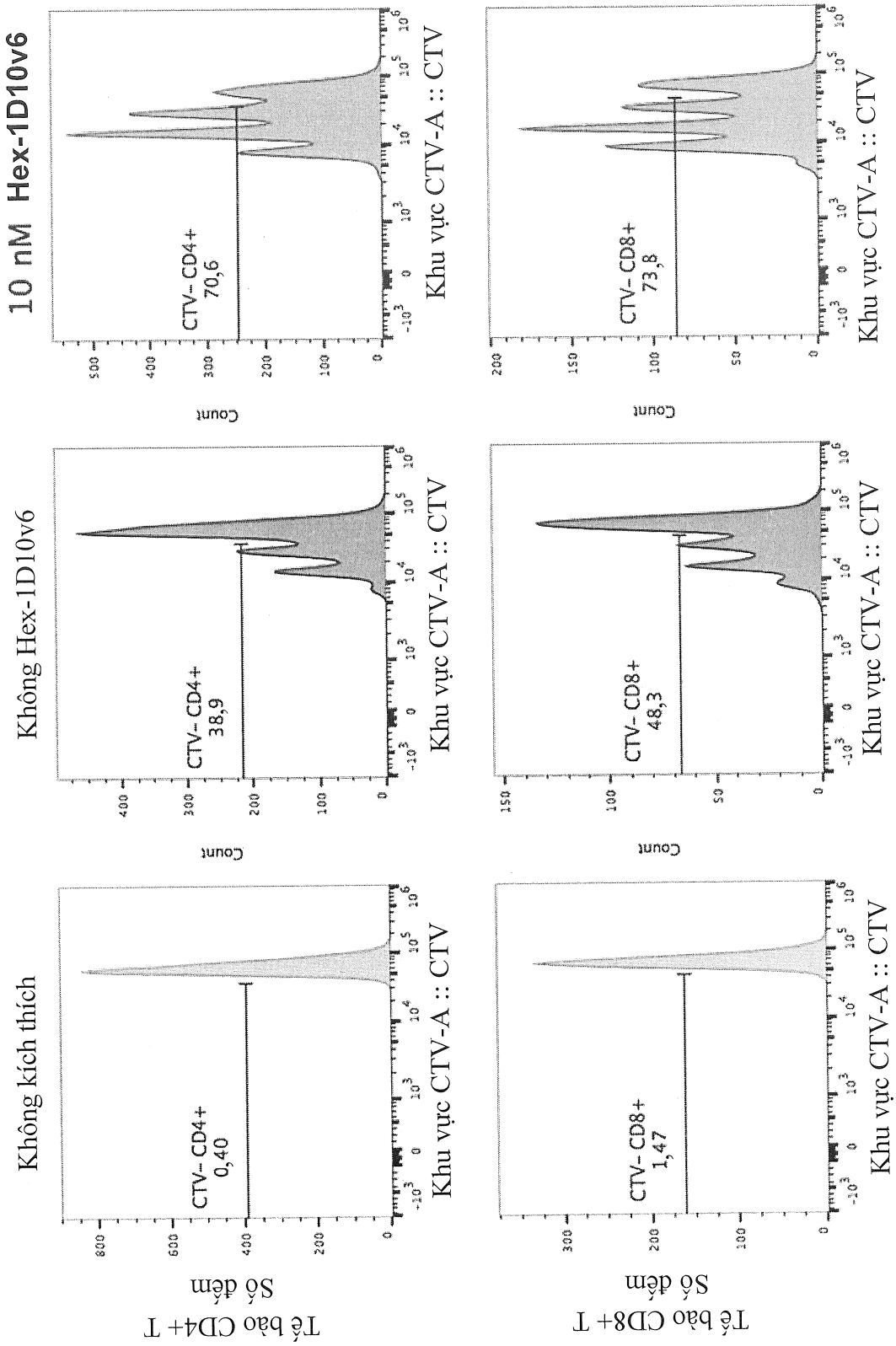

Không kích thích
Không Hex-1D10v6
10 nM Hex-1D10v6
Tế bào CD4+ T
Số đếm
Tế bào CD8+ T
Số đếm
CTV- CD4+
0,40
CTV- CD4+
38,9
CTV- CD4+
70,6
CTV- CD8+
1,47
CTV- CD8+
48,3
CTV- CD8+
73,8
Khu vực CTV-A :: CTV
Count

FIG. 10

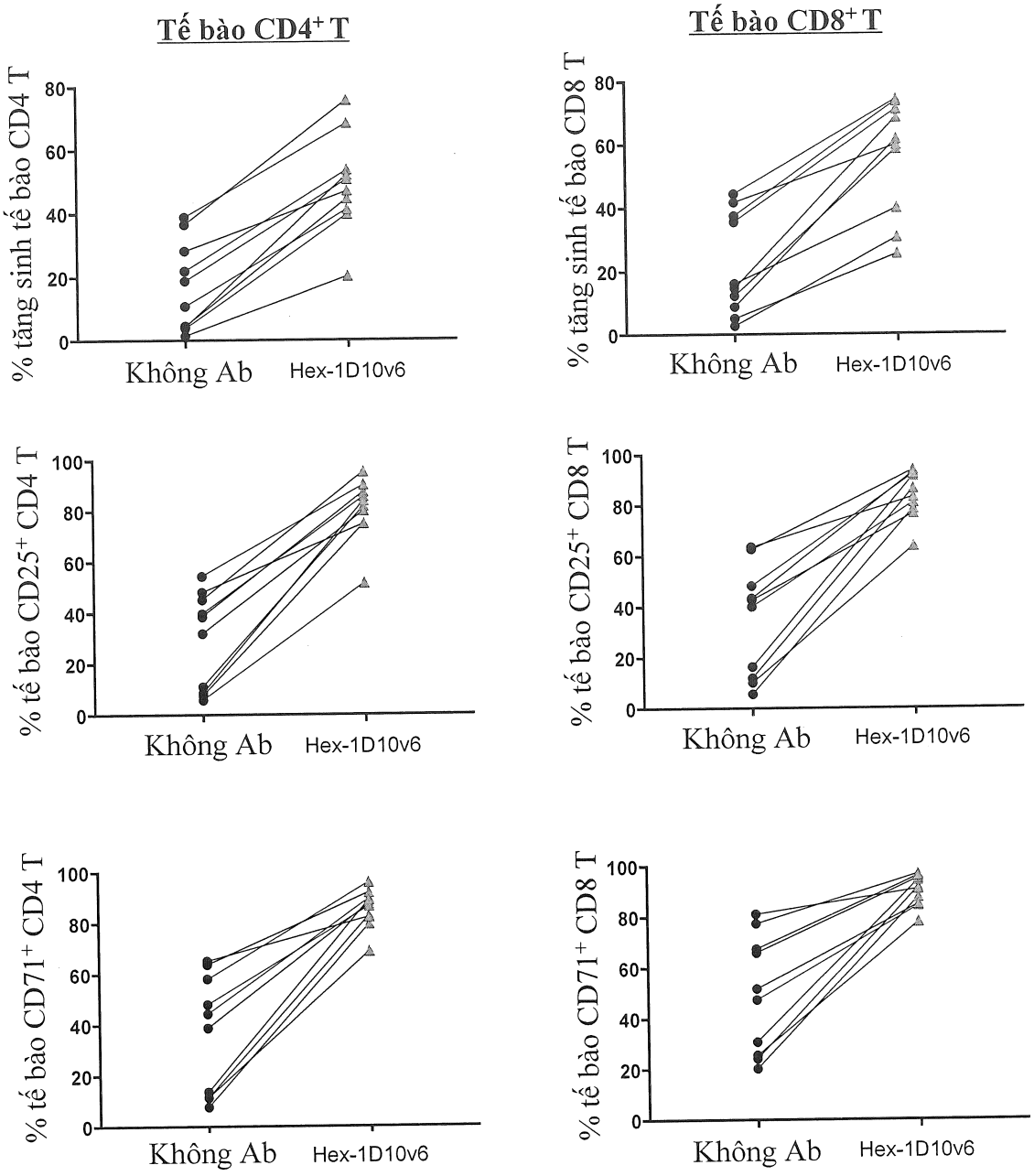

Tế bào CD4+ T
Tế bào CD8+ T
% tăng sinh tế bào CD4 T
% tăng sinh tế bào CD8 T
% tế bào CD25+ CD4 T
% tế bào CD25+ CD8 T
% tế bào CD71+ CD4 T
% tế bào CD71+ CD8 T
Không Ab
Hex-1D10v6
0
20
40
60
80
100

FIG. 11

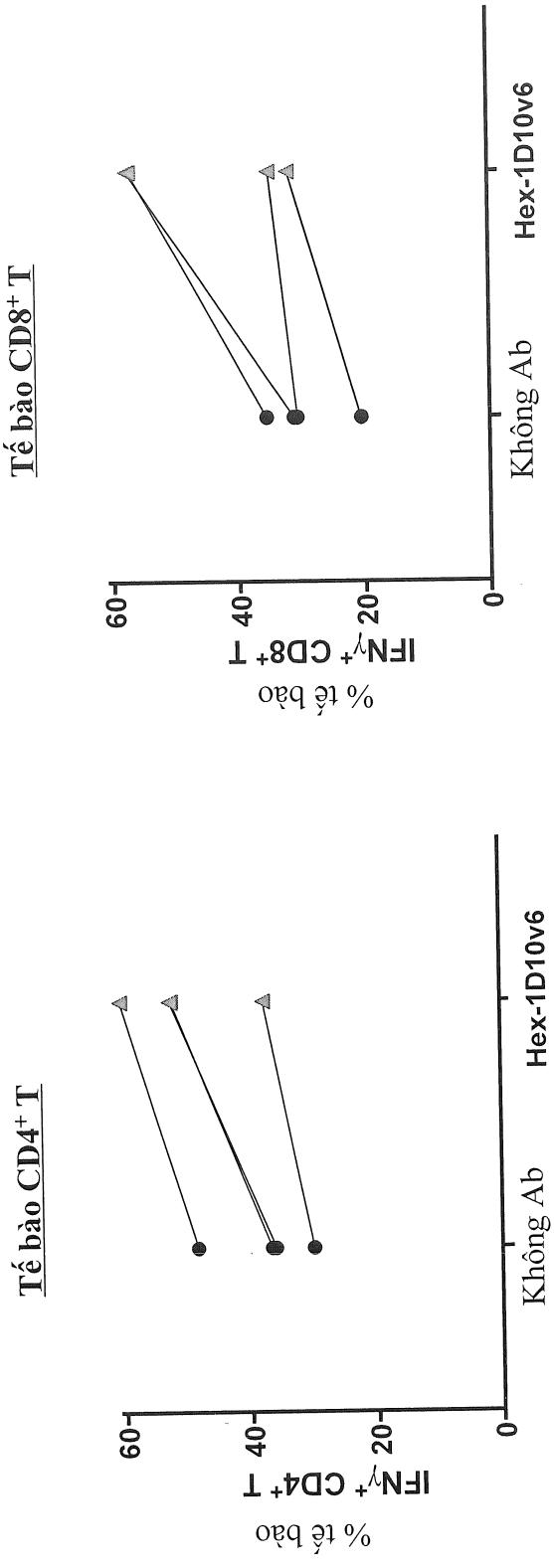

Tế bào CD8+ T
% tế bào
IFNγ+ CD8+ T
60
40
20
0
Không Ab
Hex-1D10v6
Tế bào CD4+ T
% tế bào
IFNγ+ CD4+ T
60
40
20
0
Không Ab
Hex-1D10v6

FIG. 12

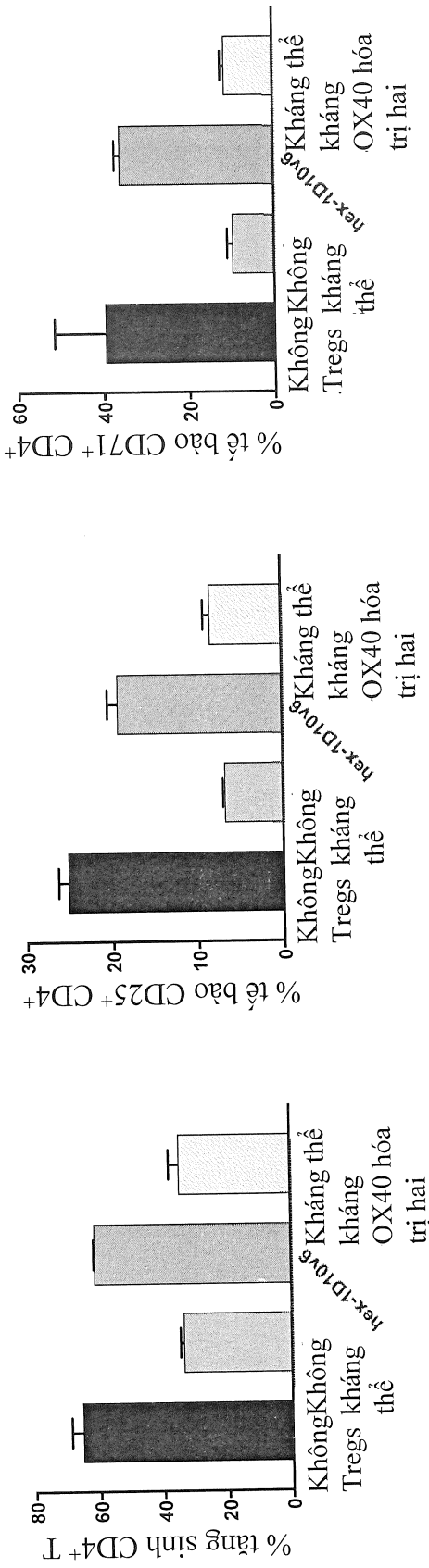

% tăng sinh CD4+ T
0
20
40
60
80
Không
Không Tregs
kháng thể
hex-1D10v6
Kháng thể kháng OX40 hóa trị hai
% tế bào CD25+ CD4+
0
10
20
30
Không
Không Tregs
kháng thể
hex-1D10v6
Kháng thể kháng OX40 hóa trị hai
% tế bào CD71+ CD4+
0
20
40
60
Không
Không Tregs
kháng thể
hex-1D10v6
Kháng thể kháng OX40 hóa trị hai

FIG. 13

Phản ứng lympho bào hỗn hợp: sản xuất IL-2
chuẩn độ Hex-1D10v6 -/+ 10nM Pembrolizumab

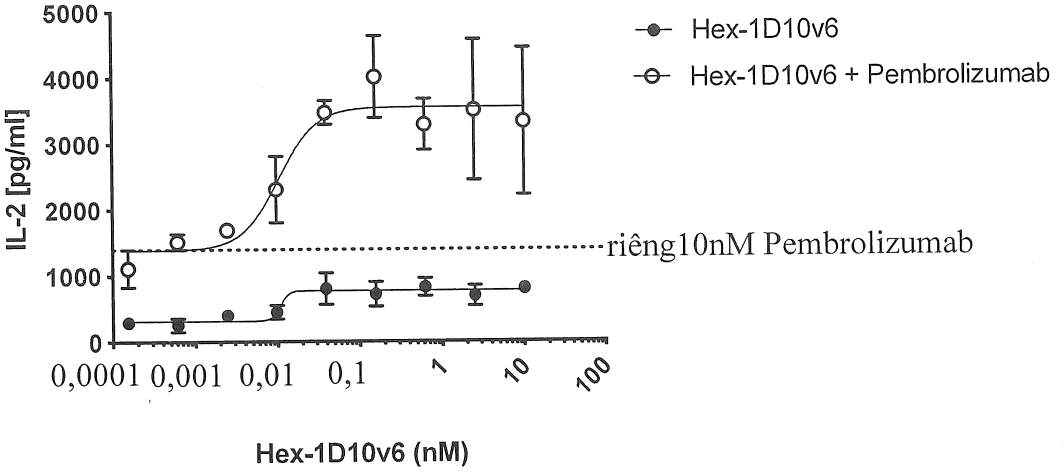


FIG. 14A

Phản ứng lympho bào hỗn hợp: sản xuất IL-2
chuẩn độ Pembrolizumab -/+ 1nM Hex-1D10v6

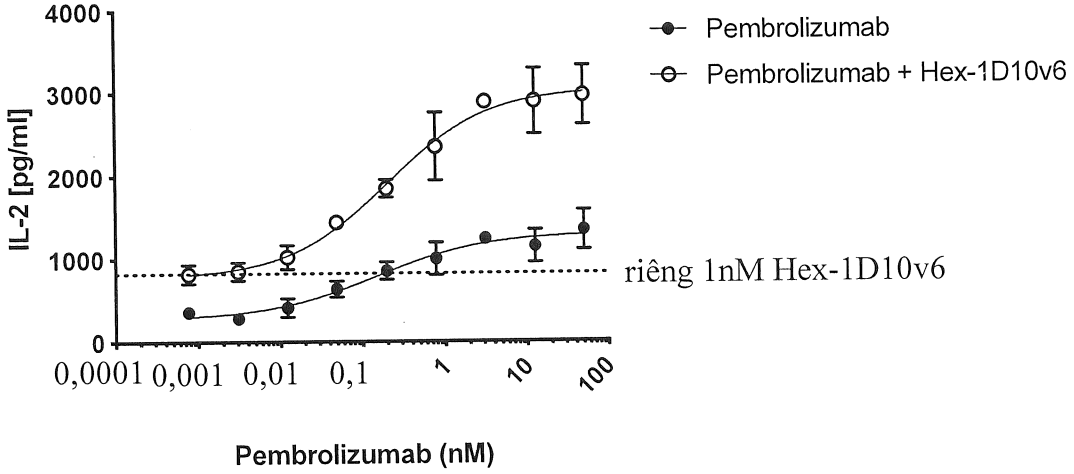


FIG. 14B

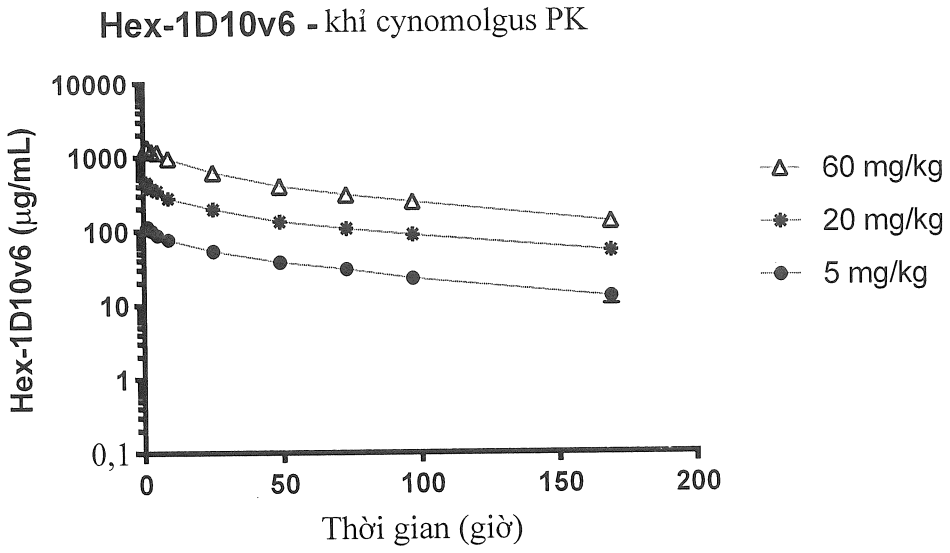

Hex-1D10v6 - khỉ cynomolgus PK
Hex-1D10v6 (µg/mL)
10000
1000
100
10
1
0,1
0
50
100
150
200
Thời gian (giờ)
60 mg/kg
20 mg/kg
5 mg/kg

FIG. 15

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> INHIBRX, INC.

<120> POLYPEPTIT LIÊN KẾT VỚI OX40, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYPEPTIT NÀY

<130> 01202-0014-00PCT

<150> US 62/718,106
<151> 2018-08-13

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

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

<400> 1

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 2
<211> 277
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 2

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Thr Ala Lys Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys Gln Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Asn Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ala Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Ala Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

Gln Pro Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

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

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Pro Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Thr Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Arg Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Arg Gly Pro Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Ala
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Met Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala Pro Lys Ala Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Ala Leu Ala Lys Ile
275

<210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 1D10v1

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Lys Pro
115

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v1 CDR1

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v1 CDR2

<400> 5

Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v1 CDR3

<400> 6

Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe
1 5

<210> 7
<211> 346
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v1-Fc (hóa trị hai)

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Lys Pro Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
115 120 125

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
145 150 155 160

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
165 170 175

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
180 185 190

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
195 200 205

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
210 215 220

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
225 230 235 240

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
245 250 255

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
260 265 270

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
275 280 285

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
290 295 300

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
305 310 315 320

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345

<210> 8
<211> 588
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 3x1D10v1-Fc (hóa trị sáu; còn được gọi là Hex-1D10v1)

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Lys Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly
165 170 175

Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg
195 200 205

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp
210 215 220

Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro Gly Gly Ser Gly
225 230 235 240

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro
245 250 255

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
260 265 270

Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
275 280 285

Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu
290 295 300

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
305 310 315 320

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
325 330 335

Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Gly Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Lys Pro Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
355 360 365

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
370 375 380

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
385 390 395 400

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
405 410 415

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
420 425 430

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
435 440 445

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
450 455 460

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
465 470 475 480

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
485 490 495

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
500 505 510

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
515 520 525

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
530 535 540

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
545 550 555 560

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
565 570 575

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580 585

<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v6

<400> 9

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Lys Pro
115

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v6 CDR1

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v6 CDR2

<400> 11

Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v6 CDR3

<400> 12

Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp Phe
1 5

<210> 13
<211> 346

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v6-Fc (hóa trị hai)

<400> 13

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Lys Pro Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
115 120 125

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
145 150 155 160

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
165 170 175

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
180 185 190

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
195 200 205

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
210 215 220

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
225 230 235 240

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
245 250 255

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
260 265 270

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
275 280 285

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
290 295 300

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
305 310 315 320

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345

<210> 14
<211> 357
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 3x1D10v6

<400> 14

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Lys Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly
165 170 175

Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg
195 200 205

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp
210 215 220

Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro Gly Gly Ser Ser
225 230 235 240

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro
245 250 255

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
260 265 270

Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
275 280 285

Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu
290 295 300

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
305 310 315 320

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
325 330 335

Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Lys Pro
355

<210> 15
<211> 588
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 3x1D10v6-Fc (hóa trị sáu; còn được gọi là Hex-1D10v6)

<400> 15

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Lys Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
115 120 125

```
Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
    130                 135                 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln
145                 150                 155                 160

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly
                165                 170                 175

Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
            180                 185                 190

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg
        195                 200                 205

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp
    210                 215                 220

Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro Gly Gly Ser Ser
225                 230                 235                 240

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro
                245                 250                 255

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
            260                 265                 270

Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
        275                 280                 285

Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu
    290                 295                 300

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
305                 310                 315                 320

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                325                 330                 335

Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu
            340                 345                 350

Val Thr Val Lys Pro Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
        355                 360                 365
```

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
370 375 380

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
385 390 395 400

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
405 410 415

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
420 425 430

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
435 440 445

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
450 455 460

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
465 470 475 480

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
485 490 495

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
500 505 510

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
515 520 525

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
530 535 540

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
545 550 555 560

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
565 570 575

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580 585

<210> 16
<211> 467
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 2x1D10v6-Fc (hóa trị bốn)

<400> 16

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

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

Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Lys Pro Gly Gly Ser Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Glu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Phe Met Tyr Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Asn Arg Gly
165 170 175

Leu Lys Thr Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg
195 200 205

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Val Asp Ala Asp
210 215 220

Phe Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v1 FR1

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v1 FR2

<400> 18

Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Ser

<210> 19
<211> 38
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v1 FR3

<400> 19

Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v1 FR4

<400> 20

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
1 5 10

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v6 FR1

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

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

<220>
<223> 1D10v6 FR2

<400> 22

Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Ser

<210> 23
<211> 38
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 1D10v6 FR3

<400> 23

Ala Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1D10v6 FR4

<400> 24

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Pro
1 5 10

<210> 25
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 26
<211> 224
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: miền tín hiệu CD3-zeta

<400> 27

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 28
<211> 42
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB

<400> 28

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 29
<211> 40
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB

<400> 29

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
20 25 30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 30
<211> 41
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB

<400> 30

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 31
<211> 44
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD28 hoặc 4-1BB

<400> 31

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
1 5 10 15

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
20 25 30

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 32
<211> 71
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: bản lề hoặc miền xuyên màng có nguồn gốc từ CD8

<400> 32

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

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

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Ser Asp Ile
35 40 45

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
50 55 60

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
65 70

<210> 33
<211> 60
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: bản lề hoặc miền xuyên màng có nguồn gốc từ CD8

<400> 33

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
1 5 10 15

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

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
50 55 60

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: bản lề hoặc miền xuyên màng có nguồn gốc từ CD8

<400> 34

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
1 5