



(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)



1-0025207

(51)⁷ A61K 39/395; C12N 15/13; C12N
15/12; A61K 39/00; C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2012-03242

(22) 30/03/2011

(86) PCT/US2011/030427 30/03/2011

(87) WO2011/123489 06/10/2011

(30) 61/319,574 31/03/2010 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/03/2013 300A

(73) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)

Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

(72) BARRETT, Rachel (US); BRODEUR, Scott (US); CANADA, Keith A. (US);
LITZENBURGER, Tobias (DE); SINGH, Sanjaya (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD40, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA KHÁNG THỂ VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng được làm tương thích với người để điều trị và chẩn đoán bệnh, polynucleotit phân lập mã hóa kháng thể này và chế phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được dùng trong chẩn đoán và trị liệu. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau được mô tả bởi các tế bào biểu hiện CD40. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm và kit chứa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD40 là một glycoprotein xuyên màng typ I 48kDa và một chi của liên họ thụ thể yếu tố hoại tử khối u (TNF). CD40 được biểu hiện trên các loại tế bào khác nhau bao gồm các tế bào B thông thường và tế bào B khối u, các tế bào cài vào nhau, ung thư biểu mô, các tế bào biểu mô (ví dụ các tế bào keratin), nguyên bào sợi (ví dụ tế bào dịch khớp) và bệnh tiểu cầu. Cũng có mặt trên các bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, một vài tế bào nội mô và các tế bào hình sao vùng nang. CD40 được biểu hiện sớm trong sự phát sinh cá thể tế bào B, xuất hiện trên các tiền thân của tế bào B sau đó đến sự xuất hiện của CD10 và CD19, nhưng trước khi biểu hiện CD21, CD23, CD24, và xuất hiện globulin miễn dịch bề mặt M (sIgM) (Uckun et al., 1990, Blood 15:2449). CD40 cũng được phát hiện trên amidan và các tế bào huyết tương có nguồn gốc tủy xương (Pellat-Decounynck et al., 1994, Blood 84:2597).

Phối tử của CD40 là CD40L (cũng được đề cập đến dưới dạng CD154, gp39, và TRAP), chi liên họ TNF. CD40L là một protein xuyên màng được biểu hiện chủ yếu trên các tế bào CD4⁺ T được hoạt hóa và tập hợp con của các tế bào CD8⁺ T (được báo cáo bởi: Van Kooten C. and Banchereau, 2000).

Sự tương tác của CD40 với CD40L gây ra cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và đáp ứng miễn dịch được trung gian tế bào. CD40 điều hòa cặp phối tử-thụ thể này để hoạt hóa các tế bào B và các tế bào trình diện kháng nguyên khác (APC) gồm các tế bào hình tua (các DC) (được báo cáo bởi: Toubi and Shoenfeld, 2004); Kiener, et al., 1995). Chức năng của CD40 đối với các tế bào B được nghiên cứu rộng rãi. Sự hoạt hóa CD40 đối với các tế bào B gây ra sự tăng sinh, sự biệt hóa thành các tế bào tiết ra kháng thể và isotyp

thay thế các tâm phôi của các cơ quan lympho thứ cấp. Các nghiên cứu *in vitro* chỉ ra các tác dụng đối của sự hoạt hóa CD40 đối với sự sản xuất xytokin (IL-6, IL-10, TNF- α , LT- α), sự biểu hiện các phân tử dính và các thụ thể đồng kích thích (ICAM, CD23, CD80 và CD86), và sự biểu hiện tăng của MHC lớp I, MHC lớp II, và chất vận chuyển TAP bởi các tế bào lympho B (Liu, et al., 1996). Trong hầu hết các quy trình này, CD40 đóng vai trò trong sự phối hợp với các xytokin hoặc các tương tác của thụ thể-phối tử khác.

Sự truyền tín hiệu CD40 đối với các bạch cầu đơn nhân và các DC làm tăng sự sống cũng như sự tiết ra các xytokin (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α và MIP-1 α). Sự gắn CD40 trên các APC này cũng dẫn đến sự điều hòa tăng của các phân tử đồng kích thích như (ICAM-1, LFA-3, CD80 và CD86). Sự hoạt hóa các thụ thể CD40 là một trong các tín hiệu quyết định cho phép sự thuần thực hoàn toàn DC thành các APC có hiệu quả điều khiển sự hoạt hóa của tế bào T (Banchereau and Steinman, 1998) (Van Kooten C. and Banchereau, 2000).

Các nghiên cứu mới đây trong các mô hình chuột chỉ ra rằng sự truyền tín hiệu CD40 trên các tế bào hình tua cũng đóng vai trò quan trọng đối với sự tạo ra các tế bào TH17 được xem là các chất trung gian có tính tự miễn dịch đối với các bệnh như chứng viêm khớp và đa xơ cứng (Iezzi, et al., 2009) (Perona-Wright, et al., 2009).

Tính khả dụng của chuột bất hoạt gen CD40 và CD40L cũng như các kháng thể kháng chuột chủ vận và đối kháng đưa ra khả năng nghiên cứu vai trò của các tương tác CD40-CD40L trong các mô hình bệnh khác nhau. Việc sử dụng sự phong bế sự kháng CD40L đã được chứng minh là có lợi trong các mô hình khác nhau về tính tự miễn gồm các bệnh tự phát giống bệnh viêm thận luput ở chuột SNF1 hoặc bệnh tiểu đường ở chuột NOD hoặc các dạng gây ra qua thực nghiệm của bệnh giống như chứng viêm khớp do collagen gây ra (CIA) hoặc bệnh viêm não và dây cột sống tự miễn qua thực nghiệm (EAE) (Toubi and Shoenfeld, 2004). CIA ở chuột bị ức chế bởi mAb kháng CD40L phong bế sự phát triển của chứng viêm khớp, kháng thể huyết thanh chuẩn độ với collagen, sự thâm nhiễm của các tế bào viêm vào mô dưới màng hoạt dịch cùng với sự ăn mòn sụn và xương (Durie, et al., 1993). Cả bệnh viêm thận luput và EAE, đều chứng minh được rằng sự kháng CD40L cũng có thể làm giảm bớt bệnh đang diễn ra, xác nhận vai trò của CD40-CD40L trong pha tác quan của bệnh (Kalled, et al., 1998); (Howard, et al., 1999).

Vai trò của sự tương tác CD40–CD40L đối với sự tiến triển của EAE cũng được nghiên cứu ở chuột thiếu CD40L được tiến hành trong thụ thể tế bào T chuyển gen đặc hiệu đối với protein gốc myelin. Những con chuột này không có khả năng phát triển EAE sau khi được cung cấp bởi kháng nguyên, và các tế bào T CD4⁺ còn lại không hoạt động và không sản xuất INF- α (Grewal, et al., 1996).

Hơn nữa, các kháng thể ức chế trực tiếp chống lại CD40 chỉ ra các hiệu quả có lợi trong các mô hình bệnh viêm như EAE. Lamann và các cộng sự chứng minh rằng mu5D12 kháng CD40 mAb người ở chuột đối kháng và dạng thể khảm của mAb này ngăn chặn hiệu quả sự biểu hiện lâm sàng EAE hủy myelin mạn tính ở khi đuôi sóc giao phối xa (Laman, et al., 2002); (Boon, et al., 2001). Nghiên cứu tiếp theo chỉ ra rằng việc điều trị bằng trị liệu với kháng thể kháng CD40 ở người thể khảm làm giảm chứng viêm có thể phát hiện bởi MRI và trì hoãn sự mở rộng các thương tổn não tồn tại từ trước trong mô hình EAE ở khi đuôi sóc (Hart, et al., 2005).

Các kháng thể kháng CD40 có hoạt tính chủ vận được thử nghiệm ở mô hình chuột về chứng viêm khớp có một vài kết quả mâu thuẫn. Như được dự đoán với chất kích thích miễn dịch, FGK45 kháng CD40 mAb ở chuột chủ vận cho thấy làm bệnh nặng thêm trong mô hình chuột DBA/1 của CIA (Tellander, et al., 2000). Tuy nhiên, trong mô hình CIA mạn tính khác FGK45, và kháng CD40 mAb ở chuột chủ vận khác, 3/23, cả hai lại biểu hiện các tác dụng trị liệu tích cực (Mauri, et al., 2000). Nó được quy định bởi nhóm này với các kháng thể chủ vận theo chế độ điều trị trị liệu này có tác dụng cơ lợi bằng cách gây ra sự chênh lệch đáp ứng miễn dịch theo hướng đáp ứng Th2 với mức giảm của IFN- γ và các mức tăng của IL-4 và IL-10 (Mauri, et al., 2000).

Sự ngăn chặn sự thải ghép bằng cách phong bế các tương tác CD40/CD154 cũng được chứng minh bằng tài liệu. Sử dụng ch5D12, chất đối kháng kháng CD40 thể khảm, trong các nghiên cứu dị ghép ở thận ở khi nâu chỉ ra rằng sự đối kháng của CD40 đủ cho sự biến đổi bệnh và kéo dài thời gian sống trung bình qua 100 ngày. Khi ch5D12 được liên kết với kháng thể kháng CD86 và chỉ đưa ra tại thời điểm bắt đầu các nghiên cứu dị ghép sau đó bởi sự điều trị kéo dài với cyclosporin, đạt được thời gian sống trung bình dài hơn 4 năm, cho thấy rằng sự kết hợp này có thể có khả năng gây ra tính kháng (Haanstra, et al., 2005).

Do đó, có nhiều các nghiên cứu cận lâm sàng đề xuất bằng chứng về vai trò quyết định của cặp CD40-CD40L đối với sự điều khiển đáp ứng miễn dịch phụ thuộc tế bào T hiệu quả. Sự phong bế sự truyền tín hiệu của CD40 do đó được nhận diện là một chiến lược trị liệu cần thiết và thích hợp để ức chế đáp ứng miễn dịch gây bệnh đối với các bệnh như RA, đa xơ cứng hoặc bệnh vẩy nến. Tuy nhiên, cho đến nay, không có các kháng thể CD40 được chấp nhận đối với sự can thiệp trị liệu của các rối loạn này do các phát hiện về các kháng thể kháng CD40 đối với sự phát triển chỉ ra các tác dụng phụ quan trọng. Do đó, còn lại một nhu cầu đáng kể đối với các chất trị liệu có thể được sử dụng để xảy ra trong hoạt động của CD40-CD40L và phong bế sự truyền tín hiệu CD40. Nhu cầu này có thể được giải quyết bởi các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người mới liên kết đặc hiệu CD40 và chỉ ra tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên, ái lực, và các đặc tính dược lực học và dược động học cho phép sử dụng chúng để can thiệp trị liệu đối với các rối loạn trên cơ sở CD40.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người trong đó kháng thể nêu trên liên kết đặc hiệu với CD40 ở người có hoạt tính đối kháng IC₅₀ nhỏ hơn 1nM và không có chủ vận lớn hơn 100µg/ml đối với sự tăng sinh tế bào B và trong đó kháng thể nêu trên khác biệt ở chỗ kháng thể có thời gian bán hủy *in vivo* trên động vật linh trưởng không phải người ít nhất là 10 ngày.

Kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người khác biệt ở chỗ kháng thể có thời gian bán hủy trên khỉ cynomolgus lớn hơn 8 ngày với liều dùng ít hơn 30mg/kg.

Theo các phương án dẫn chứng, kháng thể theo sáng chế bao gồm một trình tự chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4 và trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8.

Theo các phương án thực hiện khác, kháng thể là kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể được làm tương thích với người có trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID

NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, hoặc SEQ ID NO:73.

Theo các phương án thực hiện khác, kháng thể là kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể bao gồm trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75 hoặc SEQ ID NO:76.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể đơn dòng theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó trình tự CDR1 chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:9 đến SEQ ID NO:11, trình tự CDR2 chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:12 đến SEQ ID NO:15 và trình tự CDR3 chuỗi nặng từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:16 đến SEQ ID NO:17; và trong đó trình tự CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:18 đến SEQ ID NO:21, trình tự CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:22 đến SEQ ID NO:23 và trình tự CDR3 chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:24 đến SEQ ID NO:25.

Theo các phương án thực hiện cụ thể, kháng thể đơn dòng theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:10, trình tự chuỗi nặng CDR2 nêu trong SEQ ID NO:13 và trình tự chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO:16; và trong đó kháng thể nêu trên bao gồm trình tự chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO:19, trình tự chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO:22 và trình tự chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO:24.

Theo các phương án cụ thể khác, kháng thể đơn dòng theo sáng chế ở chỗ nó bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:9, trình tự chuỗi nặng CDR2 nêu trong SEQ ID NO:14 và trình tự chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO:16; và trong đó kháng thể nêu trên bao gồm trình tự chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO:20, trình

tự chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO:22 và trình tự chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO:24.

Theo phương án cụ thể khác, kháng thể đơn dòng theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:9, trình tự chuỗi nặng CDR2 nêu trong SEQ ID NO:14 và trình tự chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO:16; và trong đó kháng thể nêu trên bao gồm trình tự chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO:20, trình tự chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO:22 và trình tự chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO:24.

Theo phương án cụ thể khác, kháng thể đơn dòng theo sáng chế ở chỗ nó bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:11, trình tự chuỗi nặng CDR2 nêu trong SEQ ID NO:15 và trình tự chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO:17; và trong đó kháng thể nêu trên bao gồm trình tự chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO:21, trình tự chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO:23 và trình tự chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO:25.

Sáng chế cũng mô tả các trình tự riêng lẻ về các chuỗi nặng của các kháng thể được ưu tiên. Sáng chế, ví dụ, đề cập đến kháng thể kháng CD40 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4. Kháng thể kháng CD40 được mô tả thêm khi bao gồm trình tự vùng chuỗi nhẹ có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8.

Ngoài ra được dự tính là kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn kháng thể có có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27 và SEQ ID NO:26, tương ứng; SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:26, tương ứng; SEQ ID NO:29 và SEQ ID NO:26, tương ứng; SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:26, tương ứng; SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:31, tương ứng; SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:31, tương ứng; SEQ ID NO:34 và SEQ ID NO:31, tương ứng; SEQ ID NO:35 và SEQ ID NO:31, tương ứng; SEQ ID NO:37 và SEQ ID NO:36, tương ứng; SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:36, tương ứng; SEQ ID NO:39 và SEQ ID NO:36, tương ứng; SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:36, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27 và SEQ ID NO:26, tương ứng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể được làm tương thích với người có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:26, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29 và SEQ ID NO:26, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:26, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:31, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:31, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và SEQ ID NO:31, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35 và SEQ ID NO:31, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:37 và SEQ ID NO:36, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:36, tương ứng.

Theo một phương án thực hiện khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:39 và SEQ ID NO:36, tương ứng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể được làm tương thích với người có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:36, tương ứng,

Phương án khác đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên được phân lập liên kết đặc hiệu với CD40 ở người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người bao gồm vùng khung có trình tự axit amin ít nhất 90% đồng nhất với trình tự axit amin của trình tự axit amin chuỗi nặng vùng biến đổi ở người nêu trong SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 hoặc SEQ ID NO:30, và bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ ít nhất 90% đồng nhất với vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương ứng nêu trong SEQ ID NO:26.

Một phương án khác đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với CD40 ở người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người bao gồm vùng khung có trình tự axit amin có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất 90% so với trình tự axit amin của vùng khung trong trình tự axit amin chuỗi nặng vùng biến đổi ở người nêu trong SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 hoặc SEQ ID NO:35, và bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất 90% so với vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương ứng nêu trong SEQ ID NO:31.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên được phân lập được mô tả theo phương án nêu trên, trong đó trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:32; theo một phương án khác, trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:33; theo một phương án khác, trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:34; và theo một phương án khác, trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:35.

Cũng dự đoán được rằng kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên được phân lập liên kết đặc hiệu với CD40 ở người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người bao gồm vùng khung có trình tự axit amin có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90% so với trình tự axit amin của vùng khung trong trình tự axit amin chuỗi nặng vùng biến đổi ở người nêu trong SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:40, và bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90% so với chuỗi nhẹ tương ứng nêu trong SEQ ID NO:36.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên được phân lập được mô tả theo phương án nêu trên, trong đó trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:37; theo một phương án khác, trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:38; theo một phương án khác, trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:39; và theo một phương án khác, trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:40.

Kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ kháng thể này không kích thích sản sinh xytokine từ các tế bào B khi không có mặt CD40L.

Kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ kháng thể này liên kết với CD40 ở người với sự có mặt của 50% huyết thanh người với tốc độ liên kết giảm ít hơn hai lần.

Kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ kháng thể này tạo ra sự ức chế sự sản xuất IgM và IgG ở động vật có vú tại nồng độ bằng 1mg/kg.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng theo các phương pháp chẩn đoán, phòng ngừa, trị liệu khác nhau và các phương pháp khác. Ví dụ, sáng chế mô tả phương pháp phong bế chức năng của CD40 người ở động vật có vú bao gồm việc sử dụng cho động vật có vú nêu trên chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế với một lượng đủ để phong bế đáp ứng miễn dịch được trung gian bởi CD40 trong động vật có vú nêu trên.

Cũng dự tính được rằng ở đây phương pháp điều trị hoặc cải thiện mô ghép chống lại bệnh của vật chủ ở động vật có vú bao gồm việc sử dụng cho động vật có vú nêu trên chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế với một lượng đủ để làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của mô ghép chống lại bệnh của vật chủ trong động vật nêu trên.

Bằng cách ví dụ, bệnh tự miễn hoặc viêm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chứng viêm khớp dạng thấp, đa xơ cứng, viêm thận tiểu cầu luput tăng sinh, bệnh viêm ruột (IBD), bệnh vẩy nến, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh Crohn và luput ban đỏ hệ thống (SLE), viêm tuyến giáp Hashimoto, phù niêm nguyên phát, bệnh tăng năng tuyến giáp/bệnh Graves, bệnh thiếu máu ác tính, teo màng lót tự miễn, viêm tim tự miễn, bệnh Addison, mãn kinh sớm, đái tháo đường typ 1, hội chứng xuất huyết phế nang lan tỏa, chứng nhược cơ năng, thiếu máu huyết tán tự miễn, giảm bạch cầu tự phát, xơ đường dẫn mật bẩm sinh, viêm gan C mạn tính (HBs Ag âm tính), xơ gan vô căn, hội chứng Sjogren, viêm bì cơ, bệnh cứng da, bệnh mô liên kết tổng hợp, luput

dạng đĩa, và viêm mạch máu hệ thống. Theo các phương án dẫn chứng, động vật có vú bị chứng viêm khớp mạn tính tăng dần.

Các phương pháp theo sáng chế còn bao gồm việc sử dụng chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm gồm chất đối kháng TNF, thuốc chống thấp khớp thay đổi được bệnh, chất đối kháng CTLA4, thụ thể chống IL-6 mAb và mAb kháng CD20.

Theo các phương án cụ thể, bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn là bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn có liên quan đến các tế bào biểu hiện cả CD40 và CD20.

Theo các phương pháp cụ thể việc điều trị gồm có việc sử dụng chế phẩm kháng thể bởi đường dùng ngoài ruột.

Theo các phương pháp cụ thể việc điều trị gồm có việc sử dụng chế phẩm kháng thể trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Các phương pháp khác theo sáng chế bao gồm việc ức chế sự sản xuất kháng thể bởi các tế bào B ở bệnh nhân là người bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân người nêu trên một lượng hữu hiệu kháng thể kháng CD40 theo sáng chế.

Cụ thể hơn, người bệnh bị chứng viêm hoặc bệnh tự miễn có liên quan đến các tế bào biểu hiện CD40.

Theo các phương án dẫn chứng người bệnh tự miễn được chọn từ nhóm gồm có bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm được chọn từ nhóm gồm dạng viêm khớp mạn tính tăng dần, đa xơ cứng, viêm thận tiểu cầu luput tăng sinh, bệnh viêm ruột (IBD), bệnh vẩy nến, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh Crohn và luput ban đỏ hệ thống (SLE), viêm tuyến giáp Hashimoto, phù niêm nguyên phát, bệnh tăng năng tuyến giáp/bệnh Graves, bệnh thiếu máu ác tính, teo màng lót tự miễn, viêm tim tự miễn, bệnh Addison, mãn kinh sớm, đái tháo đường typ 1, hội chứng xuất huyết phé nang lan tỏa, chứng nhược cơ năng, thiếu máu huyết tán tự miễn, giảm bạch cầu tự phát, xơ đường dẫn mật bẩm sinh, viêm gan C mạn tính (HBs Ag âm tính), xơ gan vô căn, hội chứng Sjogren, viêm bì cơ, bệnh cứng da, bệnh mô liên kết tổng hợp, luput dạng đĩa, và viêm mạch máu hệ thống.

Phương pháp khác theo sáng chế đề cập đến việc ức chế sự phát triển của các tế bào biểu hiện kháng nguyên CD40 ở người, bao gồm việc sử dụng kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế cho các tế bào, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng

nguyên liên kết với kháng nguyên CD40 bề mặt tế bào ở người, trong đó liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên với kháng nguyên CD40 ức chế sự phát triển hoặc biệt hóa các tế bào.

Cũng được dự tính về phương pháp điều trị cho đối tượng bị rối loạn có liên quan đến CD40, bao gồm việc sử dụng cho đối tượng kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với CD40 ở người, trong đó liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên để CD40 ức chế sự phát triển hoặc biệt hóa các tế bào bị rối loạn có liên quan đến CD40. Các tế bào có thể nhưng không bị giới hạn với các tế bào nguyên bào lympho B, tế bào tuyến tụy, phổi, tế bào vú, tế bào buồng trứng, tế bào ruột kết, tế bào tuyến tiền liệt, tế bào da, tế bào đầu và cổ, tế bào bàng quang, tế bào xương hoặc tế bào thận.

Phương pháp điều trị để ức chế sự phát triển hoặc biệt hóa các tế bào có thể hữu ích để điều trị bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, u lympho Burkitt, đa u tủy, u lympho tế bào T, u lympho không phải Hodgkin, bệnh Hodgkin, macroglobulin huyết Waldenstrom hoặc xacôm Kaposi.

Cũng dự tính về phương pháp gây ra sự suy yếu của các tế bào B ngoại vi, bao gồm việc sử dụng cho các tế bào kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với kháng nguyên CD40 bề mặt tế bào ở người, trong đó liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên với kháng nguyên CD40 gây ra sự suy yếu của các tế bào.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên được sử dụng cho đối tượng bị rối loạn miễn dịch. Ví dụ, rối loạn miễn dịch là dạng viêm khớp mãn tính tăng dần hoặc luput ban đỏ hệ thống.

Cũng dự tính về phương pháp điều trị viêm khớp mãn tính tăng dần cho đối tượng bao gồm việc sử dụng cho đối tượng nêu trên một kháng thể theo sáng chế, trong đó kháng thể nêu trên là kháng thể đối kháng phong bế chức năng của CD40 ở đối tượng nêu trên.

Tốt hơn là, kháng thể được sử dụng với lượng hữu hiệu để ức chế sự biệt hóa tế bào B và isotyp kháng thể chuyển vào đối tượng nêu trên.

Theo các phương án khác, kháng thể được sử dụng với lượng hữu hiệu để ức chế sự sản xuất xytokin và chemokin và điều hòa tăng các phân tử dính trong các tế bào T và các đại thực bào trong đối tượng nêu trên. Tốt hơn là, kháng thể được sử dụng với lượng hữu hiệu để ức chế sự hoạt hóa các tế bào hình tua trong đối tượng nêu trên.

Theo các phương án khác, phương pháp khác biệt ở chỗ kháng thể được sử dụng với lượng hữu hiệu để ức chế sự sản xuất xytokin tiền viêm, chemokin, metalloproteinaza cơ chất, prostaglandin, và điều hòa giảm các phân tử dính trong các tế bào không miễn dịch ở đối tượng nêu trên.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể được sử dụng kết hợp với chế độ bao gồm việc sử dụng methotrexat và/hoặc sử dụng Enbrel/Humira.

Đối tượng tiếp nhận liệu pháp là đối tượng bị dạng viêm khớp mãn tính tăng dần và không đáp ứng chỉ với việc điều trị bằng methotrexat.

Theo các phương án cụ thể, phương pháp bao gồm việc điều trị cho đối tượng nêu trên theo chế độ bao gồm việc sử dụng methotrexat và/hoặc sử dụng Enbrel/Humira.

Phương pháp theo sáng chế có thể được mô tả thêm trong đó việc điều trị cho đối tượng nêu trên bằng kháng thể kháng CD40 đối kháng nêu trên có hiệu quả tốt hơn so với điều trị với một mình methotrexat, một mình Enbrel, tổ hợp của Enbrel+methotrexat.

Phương pháp theo sáng chế có thể được mô tả thêm trong đó việc điều trị cho đối tượng nêu trên bằng kháng thể kháng CD40 đối kháng nêu trên có hiệu quả tốt hơn so với điều trị với Enbrel +MTX trong các bệnh nhân, có đáp ứng không đủ với methotrexat.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể được sử dụng kết hợp với chế độ điều trị bao gồm chất kháng TNF.

Theo các phương án cụ thể, đối tượng được mô tả là đối tượng bị viêm khớp mãn tính tăng dần và không đáp ứng với việc điều trị với một mình chất kháng TNF. Theo các phương án trên, phương pháp có thể bao gồm việc điều trị cho bệnh nhân nêu trên theo chế độ bao gồm việc điều trị với chất kháng TNF kết hợp với kháng thể kháng CD40 đối kháng nêu trên.

Theo các phương án cụ thể, việc điều trị cho đối tượng nêu trên bằng kháng thể kháng CD40 đối kháng có hiệu quả tốt hơn so với việc điều trị với chất kháng TNF.

Theo các phương án khác, phương pháp khác biệt ở chỗ việc điều trị cho đối tượng nêu trên bằng kháng thể kháng CD40 đối kháng nêu trên có hiệu quả tốt hơn so với điều trị với Orencia hoặc Rituxan trong các bệnh nhân có đáp ứng không đủ chỉ với chất kháng TNF.

Sáng chế còn dự tính được phẩm chứa: (i) kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên như được mô tả trong bản mô tả; và (ii) tá được được dụng. Trong các chế phẩm này, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có thể thuận lợi được kết hợp với chất thứ hai, như ví dụ, chất gây độc tế bào, PEG-chất mang, enzym hoặc chất chỉ thị.

Cũng được dự tính trong bản mô tả là polynucleotit được phân lập ghi mã trình tự axit amin vùng chuỗi nhẹ có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, hoặc SEQ ID NO:73.

Cũng được dự tính trong bản mô tả là polynucleotit được phân lập ghi mã trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, hoặc SEQ ID NO:76.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để sản xuất thuốc phong bế chức năng của CD40 ở người ở động vật có vú trong đó thuốc phong bế đáp ứng miễn dịch được trung gian bởi CD40 ở động vật có vú nêu trên.

Theo một phương án của sáng chế đề cập đến việc sản xuất thuốc điều trị hoặc cải thiện mô ghép chống lại bệnh của vật chủ ở động vật có vú.

Theo các phương án dẫn chứng, thuốc được sản xuất để điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm được chọn từ nhóm gồm dạng viêm khớp mạn tính tăng dần, đa xơ cứng, viêm thận tiểu cầu luput tăng sinh, bệnh viêm ruột (IBD), bệnh vẩy nến, ban xuất huyết

giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh Crohn và luput ban đỏ hệ thống (SLE), viêm tuyến giáp Hashimoto, phù niêm nguyên phát, bệnh tăng năng tuyến giáp/bệnh Graves, bệnh thiếu máu ác tính, teo màng lót tự miễn, viêm tim tự miễn, bệnh Addison, mãn kinh sớm, đái tháo đường typ 1, hội chứng xuất huyết phế nang lan tỏa, chứng nhược cơ năng, thiếu máu huyết tán tự miễn, giảm bạch cầu tự phát, xơ đường dẫn mật bẩm sinh, viêm gan C mạn tính (HBs Ag âm tính), xơ gan vô căn, hội chứng Sjogren, viêm bì cơ, bệnh cứng da, bệnh mô liên kết tổng hợp, luput dạng đĩa và viêm mạch máu hệ thống.

Theo một vài phương án, thuốc còn bao gồm chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm gồm có chất đối kháng TNF, thuốc chống thấp khớp thay đổi được bệnh, chất đối kháng CTLA4, thụ thể chống IL-6 mAb và mAb kháng CD20.

Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng trong đường dùng ngoài ruột. Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Một phương án khác dự tính việc sử dụng các kháng thể được mô tả ở đây để sản xuất thuốc ức chế sự sản xuất kháng thể bởi các tế bào B ở bệnh nhân là người.

Một phương án khác dự tính việc sử dụng các kháng thể được mô tả ở đây để sản xuất thuốc ức chế sự phát triển và/hoặc biệt hóa các tế bào biểu hiện kháng nguyên CD40 ở người.

Một phương án khác dự tính việc sử dụng các kháng thể được mô tả ở đây để sản xuất thuốc điều trị cho đối tượng bị rối loạn có liên quan đến CD40 trong đó liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên trong thuốc nêu trên với CD40 ức chế sự phát triển hoặc biệt hóa các tế bào bị rối loạn có liên quan đến CD40.

Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng trong điều trị các tế bào bị rối loạn có liên quan đến CD40 được chọn từ các tế bào nguyên bào lympho B, tế bào tuyến tụy, phôi, tế bào vú, tế bào buồng trứng, tế bào ruột kết, tế bào tuyến tiền liệt, tế bào da, tế bào đầu và cổ, tế bào bàng quang, tế bào xương hoặc tế bào thận.

Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, u lympho Burkitt, đa u tủy, u lympho tế bào T, u lympho không phải Hodgkin, bệnh Hodgkin, macroglobulin huyết Waldenstrom hoặc xacôm Kaposi.

Một phương án khác dự tính việc sử dụng các kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc gây ra sự suy yếu các tế bào B ngoại vi trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết

kháng nguyên của thuốc liên kết đặc hiệu với kháng nguyên CD40 bề mặt tế bào ở người, trong đó liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên với kháng nguyên CD40 gây ra sự suy yếu của các tế bào.

Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng trong điều trị cho đối tượng bị rối loạn miễn dịch.

Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng trong điều trị dạng viêm khớp mãn tính tăng dần hoặc luput ban đỏ hệ thống.

Một phương án khác dự tính việc sử dụng các kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc điều trị bệnh viêm khớp mãn tính tăng dần.

Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng để ức chế sự biệt hóa của tế bào B và isotyp kháng thể chuyển vào đối tượng nêu trên.

Thuốc có thể được sản xuất sử dụng để ức chế sự sản xuất xytokin và chemokin và sự điều hòa tăng các phân tử dính trong các tế bào T và các đại thực bào trong đối tượng nêu trên.

Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng để ức chế sự hoạt hóa các tế bào hình tua trong đối tượng nêu trên.

Thuốc có thể được sản xuất để sử dụng để ức chế sự sản xuất xytokin tiền viêm, chemokin, matrix metalloproteinaza, prostaglandin, và sự điều hòa giảm các phân tử dính trong các tế bào không miễn dịch trong đối tượng nêu trên.

Theo các phương án nhất định, thuốc được sản xuất dưới dạng thuốc hỗn hợp được sử dụng kết hợp với chế độ bao gồm việc sử dụng methotrexat và/hoặc sử dụng Enbrel/Humira.

Theo các phương án khác, thuốc được sản xuất dưới dạng thuốc hỗn hợp và thuốc có bổ sung các kháng thể theo sáng chế còn bao gồm chất kháng TNF.

Khía cạnh được ưu tiên của sáng chế có thể được mô tả theo các phương án trong các mục sau đây:

Mục 1. Kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người trong đó kháng thể này liên kết đặc hiệu với CD40 ở người có hoạt tính đối kháng IC50 nhỏ hơn 1nM và không có tính đối kháng lên tới 100µg/ml trong sự tăng sinh tế bào B và trong đó tế bào

này còn khác biệt ở chỗ kháng thể có chu kỳ bán thải ở động vật linh trưởng không phải người ít nhất là 10 ngày.

Mục 2. Kháng thể đơn dòng làm tương thích với người theo mục 1, trong đó kháng thể này có chu kỳ bán thải ở khỉ cynomolgus lớn hơn 8 ngày ở liều dùng nhỏ hơn 30mg/kg.

Mục 3. Kháng thể theo mục 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4 và trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8.

Mục 4. Kháng thể theo mục 1, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể có trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, hoặc SEQ ID NO:73.

Mục 5. Kháng thể theo mục 1, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể mà bao gồm trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, hoặc SEQ ID NO:76.

Mục 6. Kháng thể đơn dòng theo mục 1, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó trình tự CDR1 chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:9 đến SEQ ID NO:11, trình tự CDR2 chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:12 đến SEQ ID NO:15 và trình tự CDR3 chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:16 đến SEQ ID

NO:17; và trong đó trình tự CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:18 đến SEQ ID NO:21, trình tự CDR2 chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:22 đến SEQ ID NO:23 và trình tự CDR3 chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:24 đến SEQ ID NO:25.

Mục 7. Kháng thể đơn dòng theo mục 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:10, trình tự CDR2 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:13 và trình tự CDR3 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:16 và trong đó kháng thể này bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:19, trình tự CDR2 chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:22 và trình tự CDR3 chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:24.

Mục 8. Kháng thể đơn dòng theo mục 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:9, trình tự CDR2 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:14 và trình tự CDR3 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:16 và trong đó kháng thể này bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:20, trình tự CDR2 chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:22 và trình tự CDR3 chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:24.

Mục 9. Kháng thể kháng CD40 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng trong số trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4.

Mục 10. Kháng thể kháng CD40 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong số trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8.

Mục 12. Kháng thể làm tương thích với người hoặc mục kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27 và SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:29 và SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:34 và SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:35 và SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:37 và SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:39 và SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:36.

Mục 13. Kháng thể phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với CD40 ở người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người bao gồm vùng khung có trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 90% so với trình tự axit amin của vùng khung chứa trình tự axit amin chuỗi nặng vùng biến đổi có SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 hoặc SEQ ID NO:30, và bao gồm

trình tự axit amin chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng ít nhất 90% so với vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương ứng nêu trong SEQ ID NO:26.

Mục 14. Kháng thể phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với CD40 ở người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng làm tương thích với người bao gồm vùng khung có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% so với trình tự axit amin của vùng khung chứa trình tự axit amin chuỗi nặng biến đổi ở người nêu trong SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 hoặc SEQ ID NO:35, và bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90% so với vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương ứng nêu trong SEQ ID NO:31.

Mục 15. Kháng thể phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với CD40 ở người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người bao gồm vùng khung có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% so với trình tự axit amin của vùng khung chứa trình tự axit amin chuỗi nặng vùng biến đổi ở người nêu trong SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:40, và bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90% so với chuỗi nhẹ tương ứng nêu trong SEQ ID NO:36.

Mục 16. Kháng thể theo mục 1, trong đó các kháng thể này không kích thích sự sản sinh xytokin từ tế bào B trong điều kiện không có CD40L.

Mục 17. Kháng thể theo mục 1, trong đó các kháng thể này liên kết với CD40 ở người trong điều kiện có mặt của huyết thanh người 50% với tốc độ liên kết nhỏ hơn hai lần.

Mục 18. Kháng thể theo mục 1, trong đó kháng thể này tạo ra sự ức chế sản xuất IgM và IgG ở động vật có vú tại nồng độ 1mg/kg.

Mục 19. Phương pháp phong bế chức năng của CD40 ở người ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú này dùng chế phẩm chứa kháng thể theo mục 1 ở lượng đủ để phong bế đáp ứng miễn dịch được trung gian bởi CD40 ở động vật có vú này.

Mục 20. Phương pháp điều trị hoặc cải thiện bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú này dùng

chế phẩm chứa kháng thể theo mục 1 với lượng đủ để làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ ở động vật có vú này.

Mục 21. Phương pháp theo mục 20, trong đó động vật có vú có bệnh tự miễn hoặc viêm được chọn từ nhóm gồm bệnh viêm khớp mạn tính tăng dần, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm cầu thận luput tăng sinh, bệnh viêm loét đại tràng (IBD), bệnh vẩy nến, bệnh ban xuất huyết tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh Crohn và luput ban đỏ hệ thống (SLE), viêm tuyến giáp Hashimoto, Myxedema xuất phát từ tuyến giáp trạng, hội chứng cường giáp/bệnh Grave, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh viêm dạ dày teo tự miễn, bệnh viêm tim, bệnh Addison, bệnh mãn kinh sớm, tiểu đường typ 1, xuất huyết phế nang lan tỏa, bệnh nhược cơ, thiếu máu tán huyết tự miễn, giảm bạch cầu tự phát, bệnh xơ ống mật nguyên phát, viêm gan mãn tính (HBs Ag âm tính), chứng xơ gan vô căn, hội chứng Sjogren, viêm bì cơ, bệnh mô liên kết tổng hợp, luput ban đỏ hình đĩa, và viêm mạch hệ thống.

Mục 22. Phương pháp theo mục 19, trong đó động vật có vú có bệnh viêm khớp mạn tính tăng dần.

Mục 23. Phương pháp theo mục 20, bao gồm thêm dùng chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm chất đối kháng TNF, thuốc chống thấp khớp thay đổi được bệnh, chất đối kháng CTLA4, mAb thụ thể kháng IL-6 và mAb kháng CD20 mAb.

Mục 24. Phương pháp theo mục 20, trong đó bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn là bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn mà liên quan đến các tế bào biểu hiện của CD40 và CD20.

Mục 25. Phương pháp theo điểm mục 19, trong đó kháng thể kháng CD40 được dùng qua đường ngoài ruột.

Mục 26. Phương pháp theo điểm mục 19, trong đó kháng thể kháng CD40 được dùng qua đường trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Mục 27. Phương pháp ức chế sự sản xuất kháng thể bởi tế bào B ở người bệnh bao gồm cho người bệnh dùng một lượng hữu hiệu kháng thể kháng CD40 theo mục 1.

Mục 28. Phương pháp theo điểm mục 27, trong đó người bệnh có bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn liên quan đến các tế bào biểu hiện CD40.

Mục 29. Phương pháp theo điểm mục 27, trong đó người bệnh mắc bệnh tự miễn được chọn từ nhóm gồm bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm được chọn từ nhóm gồm bệnh viêm khớp mạn tính tăng dần, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm cầu thận luput tăng sinh,

bệnh viêm loét đại tràng (IBD), bệnh vẩy nến, bệnh ban xuất huyết tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh Crohn và luput ban đỏ hệ thống (SLE), viêm tuyến giáp Hashimoto, Myxedema xuất phát từ tuyến giáp trạng, hội chứng cường giáp/bệnh Grave, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh viêm dạ dày teo tự miễn, bệnh viêm tim, bệnh Addison, bệnh mãn kinh sớm, tiểu đường tip 1, xuất huyết phế nang lan tỏa, bệnh nhược cơ, thiếu máu tán huyết tự miễn, giảm bạch cầu tự phát, bệnh xơ ống mật nguyên phát, viêm gan mãn tính (HBs Ag âm tính), chứng xơ gan vô căn, hội chứng Sjogren, viêm bì cơ, bệnh mô liên kết tổng hợp, luput ban đỏ hình đĩa, và viêm mạch hệ thống.

Mục 30. Phương pháp ức chế sự phát triển tế bào biểu hiện kháng nguyên CD40 ở người, bao gồm đưa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo mục 1 vào các tế bào, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên CD40 bề mặt tế bào ở người, trong đó sự liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên với kháng nguyên CD40 ức chế sự phát triển hoặc dị biệt của các tế bào.

Mục 31. Phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh rối loạn liên quan đến CD40, bao gồm đưa vào đối tượng kháng thể hoặc đoạn kháng nguyên theo mục 1, kháng thể hoặc đoạn kháng nguyên này liên kết với CD40 ở người, trong đó sự liên kết của kháng thể hoặc đoạn kháng nguyên với CD40 ức chế sự phát triển hoặc dị biệt của các tế bào của bệnh rối loạn liên quan đến CD40.

Mục 32. Phương pháp theo mục 31, trong đó các tế bào của bệnh rối loạn liên quan đến CD40 là tế bào lymphoblastoid, tuyến tụy, tế bào phổi, tế bào vú, tế bào buồng trứng, tế bào ruột kết, tế bào tuyến tiền liệt, tế bào da, tế bào đầu và cổ, tế bào bàng quang, tế bào xương hoặc tế bào thận.

Mục 33. Phương pháp theo mục 31, trong đó bệnh rối loạn liên quan đến CD40 là bệnh bạch cầu lymphocytic mãn tính, u limpho Burkitt, đa u tủy, u limpho tế bào T, u limpho Non-Hodgkin, bệnh Hodgkin, macroglobulin huyết Waldenstrom hoặc xacom Kaposi.

Mục 34. Phương pháp gây ra sự tiêu tế bào B ngoại biên, trong đó phương pháp này bao gồm đưa vào tế bào kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo mục 1, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên này liên kết đặc hiệu với kháng

nguyên CD40 bề mặt tế bào ở người, trong đó sự liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên với kháng nguyên CD40 gây ra sự tiêu tế bào.

Mục 35. Phương pháp theo mục 34, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên được dùng cho đối tượng mắc bệnh rối loạn tự miễn.

Mục 36. Phương pháp theo mục 34, trong đó bệnh rối loạn miễn dịch là bệnh viêm khớp mạn tính tiến triển hoặc luput ban đỏ hệ thống.

Mục 37. Phương pháp điều trị bệnh viêm khớp mạn tính tiến triển ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa vào đối tượng kháng thể theo mục 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đối kháng có tác dụng phong bế chức năng của CD40 ở đối tượng.

Mục 38. Phương pháp theo mục 37, trong đó kháng thể này được dùng với lượng hữu hiệu để ức chế sự dị biệt tế bào B và sự chuyển isotyp kháng thể ở đối tượng nêu trên.

Mục 39. Phương pháp theo mục 37, trong đó kháng thể này được dùng ở lượng hữu hiệu để ức chế sự sản xuất xytokin và chemokin và sự tăng số thụ thể của phân tử liên kết trong tế bào T và đại thực bào ở đối tượng này.

Mục 40. Phương pháp theo mục 37, trong đó kháng thể này được dùng ở lượng hữu hiệu để ức chế tế bào hình tua ở đối tượng.

Mục 41. Phương pháp theo mục 37, trong đó kháng thể này được đưa vào ở lượng hữu hiệu để ức chế sự sản xuất xytokin, chemokin tiền viêm, metalloproteinaza nền, prostaglandin, và giảm số thụ thể phân tử liên kết ở tế bào không miễn dịch ở đối tượng này.

Mục 42. Phương pháp theo mục 37, trong đó kháng thể này được đưa vào kết hợp với chế độ bao gồm dùng methotrexat và/hoặc dùng Enbrel/Humira.

Mục 43. Phương pháp theo mục 37, trong đó đối tượng mắc bệnh viêm khớp mạn tính tiến triển và đáp ứng với phương pháp điều trị chỉ bằng methotrexat.

Mục 44. Phương pháp theo mục 43, trong đó phương pháp bao gồm điều trị cho đối tượng bằng chế độ bao gồm dùng methotrexat và/hoặc dùng Enbrel/Humira.

Mục 45. Phương pháp theo mục 37, trong đó điều trị cho đối tượng bằng kháng thể kháng CD40 có hiệu quả vượt trội so với chỉ dùng methotrexat, Enbrel, kết hợp của Enbrel+methotrexat.

Mục 46. Phương pháp theo mục 43, trong đó điều trị cho đối tượng bằng kháng thể kháng CD40 đối kháng có hiệu quả vượt trội so với điều trị bằng Enbrel +MTX ở người bệnh có đáp ứng không đủ với methotrexat.

Mục 47. Phương pháp theo mục 37, trong đó kháng thể này được đưa vào kết hợp với chế độ bao gồm chất kháng TNF.

Mục 48. Phương pháp theo mục 37, trong đó đối tượng mắc bệnh viêm khớp mạn tính tiến triển và không đáp ứng với điều trị chỉ bằng chất kháng TNF.

Mục 49. Phương pháp theo mục 48 trong đó phương pháp này bao gồm bước điều trị cho đối tượng bằng chế độ bao gồm điều trị bằng chất chống TNF kết hợp với kháng thể chống CD40 đối kháng.

Mục 50. Phương pháp theo mục 37, trong đó điều trị cho đối tượng bằng kháng thể kháng CD40 đối kháng có hiệu quả vượt trội so với điều trị bằng chất kháng TNF.

Mục 51. Phương pháp theo mục 48, trong đó điều trị cho đối tượng bằng kháng thể kháng CD40 đối kháng có hiệu quả vượt trội so với điều trị bằng Orencia hoặc Rituxan ở người bệnh có đáp ứng không đủ nếu chỉ sử dụng riêng chất kháng TNF.

Mục 52. Dược phẩm bao gồm:(i) kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo mục 8; và (ii) tá dược được dụng.

Mục 53. Dược phẩm theo mục 52 trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được liên hợp với tác nhân thứ hai.

Mục 54. Dược phẩm theo mục 52 trong đó chất thứ hai là chất xytotoxic, chất mang PEG, enzym hoặc chất chỉ thị.

Mục 55. Polynucleotit đã phân lập mã hóa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng trong số trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID. NO:50, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID

NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 hoặc SEQ ID NO:73.

Mục 56. Polynucleotit phân lập mã hóa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong số trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, hoặc SEQ ID NO:76.

Mục 57. Sử dụng kháng thể theo mục 1 để sản xuất thuốc phong bế chức năng của CD40 ở người ở động vật có vú, trong đó thuốc để phong bế đáp ứng miễn dịch thông qua CD40 ở động vật có vú.

Mục 58. Sử dụng kháng thể theo mục 1 để sản xuất thuốc để điều trị hoặc cải thiện bệnh mảnh ghép chống ký chủ ở động vật có vú.

Mục 59. Sử dụng theo mục 58, trong đó thuốc được sản xuất để điều trị bệnh tự miễn hoặc viêm được chọn từ nhóm bao gồm viêm khớp mạn tính tăng dần, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm cầu thận luput tăng sinh, bệnh viêm loét đại tràng (IBD), bệnh vẩy nến, bệnh ban xuất huyết tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh Crohn và luput ban đỏ hệ thống (SLE), viêm tuyến giáp Hashimoto, Myxedema xuất phát từ tuyến giáp trạng, hội chứng cường giáp/bệnh Grave, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh viêm dạ dày teo tự miễn, bệnh viêm tim, bệnh Addison, bệnh mãn kinh sớm, tiểu đường tip 1, xuất huyết phế nang lan tỏa, bệnh nhược cơ, thiếu máu tán huyết tự miễn, giảm bạch cầu tự phát, bệnh xơ ống mật nguyên phát, viêm gan mạn tính (HBs Ag âm tính), chứng xơ gan vô căn, hội chứng Sjogren, viêm bì cơ, bệnh mô liên kết tổng hợp, luput ban đỏ hình đĩa, và viêm mạch hệ thống.

Mục 60. Sử dụng theo mục 58 trong đó thuốc này còn bao gồm chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm chất đối kháng TNF, thuốc chống thấp khớp thay đổi được bệnh, chất đối kháng CTLA4, mAb thụ thể kháng IL-6 và mAb kháng CD20.

Mục 61. Sử dụng theo mục 57 trong đó thuốc được sản xuất để sử dụng theo đường ngoài ruột.

Mục 62. Sử dụng theo mục 57 trong đó thuốc được sản xuất để sử dụng trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Mục 63. Sử dụng kháng thể theo mục 1 để sản xuất thuốc ức chế sự sản sinh kháng thể bởi tế bào B ở người bệnh.

Mục 64. Sử dụng kháng thể theo mục 1 để sản xuất thuốc ức chế sự phát triển và/hoặc dị biệt của tế bào biểu hiện kháng nguyên CD40 ở người.

Mục 65. Sử dụng kháng thể theo mục 1 để sản xuất thuốc điều trị cho đối tượng mắc bệnh rối loạn liên quan đến CD40, trong đó sự liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên trong thuốc này với CD40 ức chế sự phát triển hoặc dị biệt của tế bào của bệnh rối loạn liên quan đến CD40.

Mục 66. Sử dụng theo mục 65, trong đó thuốc được sử dụng để điều trị tế bào của bệnh rối loạn liên quan đến CD40 được chọn từ nhóm gồm tế bào lymphoblastoid B, tế bào tuyến tụy, tế bào phổi, tế bào vú, tế bào buồng trứng, tế bào ruột kết, tế bào tuyến tiền liệt, tế bào da, tế bào đầu và cổ, tế bào bàng quang, tế bào xương hoặc tế bào thận.

Mục 67. Sử dụng theo mục 65, trong đó thuốc được sử dụng để điều trị bệnh bạch cầu lymphocytic mãn tính, u limpho Burkitt, đa u tủy, u limpho tế bào T, u limpho Non-Hodgkin, bệnh Hodgkin, macroglobulin huyết Waldenstrom hoặc xacom Kaposi.

Mục 68. Sử dụng kháng thể theo mục 1 trong sản xuất thuốc để gây ra sự tiêu tế bào B ngoại biên trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên này của thuốc liên kết đặc hiệu với kháng nguyên CD40 bề mặt tế bào ở người, trong đó sự liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên với kháng nguyên CD40 gây ra sự tiêu biến tế bào.

Mục 69. Sử dụng theo mục 68, trong đó thuốc để điều trị cho đối tượng mắc bệnh rối loạn miễn dịch.

Mục 70. Sử dụng theo mục 68, trong đó thuốc để điều trị bệnh viêm khớp mạn tính tiến triển hoặc luput ban đỏ hệ thống.

Mục 71. Sử dụng kháng thể theo mục 1 để sản xuất thuốc để điều trị bệnh viêm khớp mạn tính tiến triển ở đối tượng.

Mục 72. Sử dụng theo mục 71, trong đó thuốc để ức chế sự dị biệt tế bào B và sự chuyển isotyp kháng thể ở đối tượng nêu trên.

Mục 73. Sử dụng theo mục 71, trong đó thuốc để ức chế sự sản xuất xytokin và chemokin và sự tăng số thụ thể của các phân tử liên kết trong tế bào T và đại thực bào ở đối tượng.

Mục 74. Sử dụng theo mục 71 trong đó thuốc để ức chế sự hoạt hóa tế bào hình tua ở đối tượng.

Mục 75. Sử dụng theo mục 71 trong đó thuốc để ức chế sự sản xuất xytokin tiền viêm, chemokin, metalloproteinaza nền, prostaglandin, và sự giảm số thụ thể của phân tử liên kết ở tế bào không miễn dịch ở đối tượng.

Mục 76. Sử dụng theo mục 71, trong đó thuốc là thuốc kết hợp được dùng kết hợp với chế độ bao gồm dùng methotrexat và/hoặc dùng Enbrel/Humira.

Mục 77. Sử dụng theo mục 71, trong đó thuốc bao gồm thêm chất kháng TNF.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: A. các đường cong liên kết và các giá trị EC50 tương ứng của các kháng thể được làm tương thích với người trên các tế bào HEK-293 được gây nhiễm CD40 được đo bằng phép đo đếm tế bào theo dòng chảy. B. So sánh liên kết của Kháng thể A, Kháng thể B và Kháng thể C với các tế bào HEK được gây nhiễm CD40 được đo bằng phép đo đếm tế bào theo dòng chảy. Dữ liệu điển hình cho mỗi thử nghiệm được chỉ ra

Fig.2: Các đường cong liên kết và các giá trị EC50 tương ứng của các kháng thể được làm tương thích với người trên các tế bào RAMOS được đo bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy. Dữ liệu điển hình cho mỗi thử nghiệm được chỉ ra

Fig.3: Thử nghiệm trên chuột và các kháng thể được làm tương thích với người về hoạt tính đối kháng trong thử nghiệm tăng sinh tế bào B nguyên phát ở người. (A) Đường cong chuẩn độ kháng thể điển hình và các giá trị IC50 kết quả được mô tả với mỗi kháng thể tiền thân của chuột. Dữ liệu điển hình cho một người cho được chỉ ra (B) Sự che phủ đường cong ức chế mô tả sự đối kháng của các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người khác nhau khi so sánh với 4D11.

Fig.4: Tóm tắt các kết quả thử nghiệm các kháng thể được làm tương thích với người đối với tác dụng đối kháng (IC50) và chủ vận (SI= chỉ số kích thích) trong thử nghiệm tăng sinh tế bào B nguyên phát ở người. Các kháng thể kháng CD40 khác nhau, 4D11, G28.5 và 5D12, được chỉ ra để so sánh.

Fig.5: Thử nghiệm với Kháng thể B, Kháng thể A và Kháng thể C để ức chế sự điều hòa tăng CD86 do CD40 gây ra trong các thử nghiệm máu toàn phần ở người. Kháng thể kháng CD40 4D11 được chỉ ra để so sánh. Đối chứng isotyp IgG1 chỉ ra rằng không có các hiệu quả trong thử nghiệm này. Dữ liệu điển hình cho mỗi người cho được chỉ ra.

Fig.6: Tóm tắt các kết quả của thử nghiệm của Kháng thể B để ức chế sự điều hòa tăng CD86 do CD40 gây ra đối với các tế bào B được tinh chế ở người và máu toàn phần ở người. Dữ liệu tại cả hai điểm (A) IC50 và (B) IC90 được mô tả. Đối chứng isotyp IgG1 chỉ ra rằng không có các hiệu quả trong thử nghiệm. Dữ liệu của nhiều người cho (n=4-5) được tóm tắt trong bảng.

Fig.7: Thử nghiệm của Kháng thể B, Kháng thể A và Kháng thể C để ức chế sự điều hòa tăng CD86 do CD40 gây ra trong các thử nghiệm máu toàn phần ở khỉ cynomolgus. Đối chứng isotyp IgG1 chỉ ra rằng không có hiệu quả trong thử nghiệm này. Dữ liệu điển hình cho một người cho được chỉ ra.

Fig.8: Đường cong thời gian nồng độ huyết tương với Kháng thể A (bảng bên trái) và Kháng thể B (bảng bên phải) ở khỉ cynomolgus sau khi sử dụng 1 và 10mg/kg mỗi kháng thể. Dữ liệu là bản tóm tắt về việc sử dụng cho 3 động vật thử nghiệm với mỗi kháng thể.

Fig.9: Sự thay đổi phần trăm các tế bào B dương tính CD86 từ khỉ cynomolgus trước khi sử dụng (Kháng thể B) và (Kháng thể A) và tại 3 thời điểm sau khi điều trị bởi mỗi kháng thể. Kháng thể B (Bảng trên cùng) và Kháng thể A được sử dụng cho 3 con vật mỗi con với 1mg/kg (các bảng bên trái) hoặc 10mg/kg (bảng bên phải).

Fig.10: (A) Các mức IgG ở người và (B) IgM ở người ở chuột NSG tại 2 tuần sau khi tiêm với $1,25 \times 10^6$ PBMC ở người. Chuột được điều trị bằng tá dược, đối chứng isotyp và các kháng thể Kháng thể A, Kháng thể B và Kháng thể C với liều dùng bằng 1mg/kg một ngày trước khi truyền PBMC ở người

Fig.11: Liên kết các kháng thể kháng CD40 ở người ở chuột khác nhau với các tiểu huyết cầu ở người.

Fig.12: Tóm tắt các kết quả của sự so sánh liên kết của Kháng thể B với 4D11 kháng CD40 mAb trên các tế bào B ở người và các tiểu huyết cầu trong máu toàn phần

Fig.13: Hoạt tính của ADCC với các sản phẩm thiết kế loại đại và IgG1 bị bất hoạt.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sự truyền tín hiệu được trung gian bởi CD40 hiện tại được nhận diện có liên quan đến các trạng thái khác nhau của các rối loạn đích. Mặc dù tính khả dụng của dữ liệu tiền lâm sàng khác nhau chỉ ra sự can thiệp trong các rối loạn này sẽ có lợi ích trị liệu, tồn tại một nhu cầu đối với các kháng thể kháng CD40 đối kháng có thể được sử dụng trong điều trị các bệnh tự miễn. Sáng chế theo các phương án được ưu tiên đề cập đến các kháng thể được làm tương thích với người để nhận diện CD40. Theo các phương án cụ thể, trình tự của các kháng thể được làm tương thích với người này đã được nhận biết trên cơ sở các trình tự của các kháng thể chuột dẫn đầu đã biết.

Các thuật ngữ "CD40" và "kháng nguyên bề mặt CD40" đề cập đến glycoprotein khoảng 48kD được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào bình thường và các tế bào B của khối u, đóng vai trò làm thụ thể cho các tín hiệu có liên quan đến sự tăng sinh và biệt hóa tế bào (Ledbetter et al., 1987, J. Immunol. 138:788-785). Phân tử cADN ghi mã CD40 đã được phân lập từ thư viện được chuẩn bị từ dòng tế bào u lympho Burkitt Raji (Stamenkovic et al., 1989, EMBO J. 8:1403).

Theo sáng chế, tế bào biểu hiện nội sinh CD40 là tế bào bất kỳ được mô tả bởi sự biểu hiện bề mặt của CD40, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào bình thường và các tế bào B của khối u, các tế bào cài vào nhau, các tế bào biểu mô đáy, các tế bào ung thư biểu mô, đại thực bào, các tế bào màng trong, tế bào hình sao vùng nang, các tế bào amidan, và các tế bào huyết tương có nguồn gốc từ tủy xương. Theo một vài phương án, phân tử CD40 là phân tử CD40 ở người.

Các kháng thể theo sáng chế liên kết đặc hiệu với CD40 tái tổ hợp ở người và CD40 bẩm sinh. Kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người trong đó kháng thể nêu trên liên kết đặc hiệu với CD40 ở người có hoạt tính đối kháng IC₅₀ nhỏ hơn 1nM và không có chủ vận lớn hơn 100µg/ml đối với sự tăng sinh tế bào B và trong đó kháng thể nêu trên hơn nữa khác biệt ở chỗ kháng thể có thời gian bán hủy *in vivo* của động vật linh trưởng không phải người ít nhất là 10 ngày.

Tốt hơn là kháng thể liên kết đặc hiệu với CD40 trong CD40-Fc tiếp hợp với EC₅₀ nhỏ hơn 1nM và CD40 trong các tế bào biểu hiện CD40 với EC₅₀ nhỏ hơn 2,5nM. Các đặc tính đối kháng của kháng thể được định rõ trong đó nó có các tế bào B hoặc hoạt tính

đổi kháng của tế bào hình tua IC50 nhỏ hơn 1nM. Hơn nữa kháng thể có các đặc tính được lực học tốt hơn có sự tăng về chu kỳ bán thải *in vivo* khi được so sánh với các kháng thể kháng CD40 khác (ví dụ, kháng thể kháng CD40 4D11).

Theo sáng chế, tế bào biểu hiện CD40 là tế bào bất kỳ được mô tả bởi sự biểu hiện bề mặt của CD40, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào bình thường và các tế bào B của khối u, các tế bào cài vào nhau, các tế bào biểu mô đáy, các tế bào ung thư biểu mô, đại thực bào, các tế bào màng trong, tế bào hình sao vùng nang, các tế bào amidan, và các tế bào huyết tương có nguồn gốc từ tủy xương. Theo một vài phương án, phân tử CD40 là phân tử CD40 ở người.

Các kháng thể theo sáng chế nhận diện đặc hiệu "epitop kháng nguyên CD40" và "epitop CD40". Theo sáng chế các thuật ngữ này đề cập đến phân tử (ví dụ, peptit) hoặc đoạn phân tử có khả năng phản ứng miễn dịch với kháng thể kháng CD40 và, ví dụ, gồm vùng quyết định kháng nguyên CD40 được nhận diện bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể có sự kết hợp của trình tự chuỗi nhẹ/chuỗi nặng của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:26 với chuỗi nặng bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:27, 28, 29 hoặc 30; hoặc chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:31 với chuỗi nặng bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:32, 33, 34 hoặc 35; hoặc chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:36 với chuỗi nặng bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:37, 38, 39 hoặc 40. Epitop kháng nguyên CD40 có thể gồm trong các protein, các đoạn protein, peptit hoặc các loại tương tự. Các epitop hầu hết là các protein, oligopeptit ngắn, các đoạn bất chức oligopeptit (tức là, các hợp chất hữu cơ bất chức các đặc tính liên kết kháng thể của kháng nguyên CD40), hoặc các hỗn hợp của chúng.

Cấu trúc phổ biến của các kháng thể đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, các phân tử này là các glycoprotein heterotetrameric, thường bằng khoảng 150000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ (L) giống hệt nhau và hai chuỗi nặng (H) giống hệt nhau. Mỗi chuỗi nhẹ được liên kết cộng hóa trị với chuỗi nặng bởi liên kết disulfua để tạo thành heterodime, và phân tử heterotetrameric được tạo thành thông qua mỗi liên kết disulfua cộng hóa trị giữa hai chuỗi nặng giống hệt nhau của các heterodime. Mặc dù các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết với nhau bởi một liên kết disulfua, số lượng các liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng thay đổi bởi isotyp globulin miễn dịch. Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cũng có các liên kết cầu disulfua trong chuỗi được đặt cách đều nhau. Mỗi chuỗi nặng tại vùng biến đổi đầu tận cùng amino (V_H), sau

đó bởi ba hoặc bốn vùng hằng định (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , và C_{H4}), cũng như vùng bản lề giữa C_{H1} và C_{H2} . Mỗi chuỗi nhẹ có hai vùng, một vùng biến đổi đầu tận cùng amino (V_L) và một vùng hằng định đầu tận cùng carboxy (C_L). Vùng V_L kết hợp không cộng hóa trị với vùng V_H , trong khi vùng C_L thường được liên kết cộng hóa trị với vùng C_{H1} thông qua liên kết disulfua. Các gốc axit amin cụ thể được cho rằng tạo thành bề mặt chung giữa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (Chothia et al., 1985, *J. Mol. Biol.* 186:651-663.)

Các vùng nhất định trong các vùng biến đổi khác biệt lớn giữa các kháng thể khác nhau tức là, "vùng siêu biến". Các vùng siêu biến này chứa các gốc có liên quan trực tiếp với liên kết và đặc hiệu với mỗi kháng thể cụ thể cho quyết định kháng nguyên đặc hiệu của nó. Khả năng biến đổi cao, cả trong các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, được tập trung trong ba đoạn đã được biết là các vùng quyết định bổ sung (các CDR) hoặc các vùng siêu biến (các HVL). Các CDR được xác định bằng cách so sánh trình tự như trong Kabat et al., 1991, In: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., trong khi các HVL được xác định về cấu trúc theo cấu trúc ba chiều của vùng biến đổi, như được mô tả bởi Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. Trong đó hai phương pháp này dẫn đến các nhận biết khác nhau không đáng kể các CDR, thì định nghĩa về cấu trúc được ưu tiên. Như được định rõ bởi Kabat, CDR-L1 được định vị tại các gốc 24-34, CDR-L2, tại các gốc 50-56, và CDR-L3, tại các gốc 89-97 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ; CDR-H1 được định vị tại các gốc 31-35, CDR-H2 tại các gốc 50-65, và CDR-H3 tại các gốc 95-102 trong vùng biến đổi chuỗi nặng. CDR1, CDR2, CDR3 trong các chuỗi nặng và nhẹ do đó định rõ các đặc tính chức năng và duy nhất đặc hiệu đối với kháng thể được đưa ra.

Ba CDR trong đó mỗi chuỗi trong số các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được phân tách bởi các vùng khung (FR), chứa các trình tự có xu hướng biến đổi ít hơn. Từ các đầu amin đến đầu carboxy của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, các FR và CDR được sắp xếp tương ứng: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Sự định hình tấm β ở mức độ lớn của các FR mang các CDR trong mỗi chuỗi vào gần nhau cũng như các CDR từ chuỗi khác. Hình dạng tạo thành góp phần vào vị trí liên kết kháng nguyên (tham khảo Kabat et al., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, các trang 647-669), mặc dù không phải tất cả là các gốc CDR đều cần phải liên quan đến liên kết kháng nguyên.

Các gốc FR và vùng hằng định Ig không liên quan trực tiếp với liên kết kháng nguyên, nhưng góp phần vào liên kết kháng nguyên và/hoặc chức năng của tác quan của kháng thể trung gian. Một vài gốc FR được cho rằng có tác dụng đáng kể đối với liên kết kháng nguyên theo ít nhất ba cách: bởi liên kết không cộng hóa trị trực tiếp với epitop, bằng cách phản ứng với một hoặc nhiều gốc CDR, và bằng cách ảnh hưởng đến bề mặt chung giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các vùng hằng định không có liên quan trực tiếp với liên kết kháng nguyên trung gian các chức năng tác quan Ig khác nhau, như sự tham gia của kháng thể trong sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) và sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP).

Các chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch ở động vật có xương sống được chỉ định với hai lớp riêng biệt rõ ràng, kappa (κ) và lambda (λ), trên cơ sở trình tự axit amin trong vùng hằng định. Bằng cách so sánh, các chuỗi nặng của globulin miễn dịch ở động vật có vú được chỉ định cho một trong năm lớp chính, theo trình tự của các vùng hằng định: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM. IgG và IgA và được chia thành các lớp phụ (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Các vùng hằng định chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác nhau của globulin miễn dịch được gọi là λ , δ , ϵ , γ và μ , tương ứng. Các cấu trúc dưới đơn vị và các cấu hình ba chiều của các lớp globulin miễn dịch bẩm sinh đã biết.

Thuật ngữ, "kháng thể", "kháng thể kháng CD40", "kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người", và "kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người khác nhau" được sử dụng trong bản mô tả theo nghĩa rộng nhất và cụ thể bao gồm các kháng thể đơn dòng (gồm các kháng thể đơn dòng toàn bộ chiều dài), các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép), và các đoạn kháng thể như các vùng biến đổi và các phần khác của kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn, ví dụ, liên kết CD40.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" (mAb) đề cập đến kháng thể trong tập hợp các kháng thể cơ bản đồng nhất; tức là, các kháng thể riêng lẻ trong đó tập hợp là giống nhau ngoại trừ các đột biến xuất hiện tự nhiên có mặt với lượng nhỏ hơn. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, trực tiếp đối với quyết định kháng nguyên đơn, một "epitop". Do đó, từ bỏ nghĩa "đơn dòng" có nghĩa là tập hợp cơ bản đồng nhất của các kháng thể đề cập đến epitop giống nhau và không được giải thích là sự sản xuất cần thiết kháng thể bởi phương pháp cụ thể bất kỳ. Nó được hiểu rằng các kháng thể đơn dòng có thể được

tạo thành bởi kỹ thuật hoặc hệ phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật; gồm ví dụ, phương pháp tế bào lai (Kohler et al., 1975, *Nature* 256:495), hoặc các phương pháp ADN tái tổ hợp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo, ví dụ, US 4816567), hoặc các phương pháp phân lập tái tổ hợp đơn dòng được sản xuất bằng cách sử dụng các thư viện kháng thể thực khuẩn, sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong Clackson et al., 1991, *Nature* 352: 624-628, và Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

Các kháng thể thể khảm gồm các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể từ một loài (ví dụ, động vật có vú không phải người như chuột) và các vùng hằng định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể loài khác (ví dụ, người) và có thể thu được bằng cách liên kết trình tự ADN ghi mã các vùng biến đổi của kháng thể từ loài đầu tiên (ví dụ, chuột) với các trình tự ADN cho các vùng hằng định của kháng thể từ loài thứ hai (ví dụ người) và biến đổi vật chủ bằng một vector biểu hiện chứa các trình tự được liên kết cho phép tạo ra kháng thể thể khảm. Mặc khác, kháng thể thể khảm cũng có thể là một kháng thể trong đó một hoặc nhiều vùng hoặc miền của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ giống hệt, tương đồng với, hoặc là một biến thể của trình tự tương ứng trong kháng thể đơn dòng từ một lớp hoặc isotyp globulin miễn dịch khác, hoặc từ trình tự liên ứng hoặc trình tự dòng gốc. Các kháng thể thể khảm có thể gồm các đoạn của các kháng thể này, đề xuất rằng đoạn kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn của kháng thể gốc của nó, ví dụ liên kết với epitop tương tự (tham khảo, ví dụ, US 4,816,567; và Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

Các thuật ngữ, "đoạn kháng thể", "đoạn kháng thể kháng CD40", "đoạn kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người", "đoạn kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người khác nhau" đề cập đến một phần của toàn bộ chiều dài của kháng thể kháng CD40, trong đó vùng biến đổi hoặc khả năng hoạt động được giữ lại, ví dụ, liên kết epitop CD40 đặc hiệu. Các ví dụ về các đoạn kháng thể gồm, nhưng không giới hạn với, đoạn Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv và scFv-Fc, kháng thể đặc hiệu kép tái tổ hợp, kháng thể tuyến tính, kháng thể chuỗi đơn, vi thể, kháng thể đặc hiệu kép tái tổ hợp được tạo thành từ các đoạn kháng thể, và các kháng đa đặc hiệu được tạo thành từ các đoạn kháng thể.

Các kháng thể đủ chiều dài có thể được xử lý bằng các enzym như papain hoặc pepsin để tạo ra các đoạn kháng thể hữu ích. Khả năng tiêu hóa papain được sử dụng để

tạo ra hai đoạn kháng thể liên kết kháng nguyên giống hệt nhau được gọi là các đoạn "Fab", mỗi đoạn có một vị trí liên kết kháng nguyên riêng lẻ, và đoạn "Fc" còn lại. Đoạn Fab cũng chứa vùng hằng định của chuỗi nhẹ và vùng CH_1 của chuỗi nặng. Việc xử lý pepsin thu được đoạn $F(ab')_2$ có hai vị trí liên kết kháng nguyên và vẫn có khả năng của kháng nguyên liên kết chéo.

Các đoạn Fab' khác với các đoạn Fab nhờ sự có mặt của các gốc bổ sung thêm vào gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề của kháng thể tại đầu C của vùng CH_1 . Các đoạn kháng thể $F(ab')_2$ là các cặp đoạn Fab' được liên kết bởi các gốc xystein trong vùng bản lề. Các liên kết hóa học khác của các đoạn kháng thể cũng đã được biết.

Đoạn "Fv" là đoạn chứa vị trí nhận diện kháng nguyên đầy đủ và vị trí liên kết gồm một dime của một vùng biến đổi chuỗi nhẹ và một vùng biến đổi chuỗi nặng kết hợp chặt chẽ, không cộng hóa trị. Trong dạng này, ba CDR của mỗi vùng biến đổi tương tác để định rõ vị trí liên kết kháng nguyên trên bề mặt của dime V_H - V_L . Nói chung, sáu CDR đem lại tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên với kháng thể.

Đoạn kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" là một biến thể Fv chuỗi đơn bao gồm các vùng V_H và V_L của kháng thể trong đó các vùng có trong chuỗi polypeptit đơn. Fv chuỗi đơn có khả năng nhận diện và liên kết kháng nguyên. Polypeptit scFv tùy ý có thể chứa mỗi liên kết polypeptit được định vị giữa các vùng V_H và V_L để dễ dàng tạo thành cấu trúc ba chiều mong muốn để kháng nguyên liên kết bởi scFv (tham khảo, ví dụ, Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315).

Các đoạn kháng thể được nhận diện khác gồm các đoạn bao gồm một cặp các đoạn Fd bộ đôi (V_H - CH_1 - V_H - CH_1) để tạo thành một cặp các vùng liên kết kháng nguyên. "Các kháng thể tuyến tính" này có thể đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu đơn như được mô tả trong, ví dụ, Zapata et al. 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062.

Kháng thể được nhân tính hoặc đoạn kháng thể được làm tương thích với người là một loại kháng thể thể khảm đặc hiệu gồm biến thể của trình tự axit amin globulin miễn dịch, hoặc đoạn của chúng, có khả năng liên kết với kháng nguyên định trước và, bao gồm một hoặc nhiều FR cơ bản chứa trình tự axit amin của globulin miễn dịch ở người và một hoặc nhiều CDR cơ bản chứa trình tự axit amin của globulin miễn dịch không phải ở người. Trình tự axit amin không phải ở người thường được đề cập đến

dưới dạng trình tự "nhập" thường được lấy ra từ vùng kháng thể "nhập", cụ thể là vùng biến đổi. Nói chung, kháng thể được làm tương thích với người gồm ít nhất các CDR hoặc HVL trong kháng thể không phải của người, được chèn giữa các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng ở người. Sáng chế mô tả các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người đặc hiệu chứa các CDR có nguồn gốc từ các kháng thể đơn dòng ở chuột được chỉ ra trong các Bảng 3 và 4 được chèn vào giữa các FR trong các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của trình tự dòng gốc ở người. Sáng chế sẽ được hiểu rằng các gốc FR đã biết ở chuột có thể quan trọng đối với chức năng của các kháng thể được làm tương thích với người và do đó một vài vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của trình tự dòng gốc ở người được biến đổi giống như các vùng của trình tự tương ứng ở chuột.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người cơ bản bao gồm tất cả ít nhất một, và thường là hai, vùng biến đổi (như chứa, ví dụ, trong các đoạn Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc và Fv) trong đó tất cả, hoặc cơ bản là tất cả, các CDR tương ứng với các đoạn của globulin miễn dịch không phải ở người, và cụ thể theo sáng chế, tất cả các CDR là các trình tự của chuột được mô tả chi tiết trong các Bảng từ 1 đến 4 dưới đây và tất cả, hoặc cơ bản là tất cả, trong số các FR là các đoạn của trình tự dòng gốc hoặc liên ứng globulin miễn dịch ở người. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người còn gồm ít nhất một phần của vùng Fc globulin miễn dịch, thường là của globulin miễn dịch ở người. Nói chung, kháng thể sẽ chứa cả chuỗi nhẹ cũng như ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng. Kháng thể cũng có thể gồm một hoặc nhiều các vùng C_{H1}, vùng khớp, C_{H2}, C_{H3}, và/hoặc C_{H4} của chuỗi nặng, nếu thích hợp.

Kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người có thể được chọn từ lớp globulin miễn dịch bất kỳ, gồm IgM, IgG, IgD, IgA và IgE, và isotyp bất kỳ, gồm IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ và IgA₂. Ví dụ, miền hằng định có thể là miền hằng định bổ sung trong đó mong muốn rằng kháng thể được làm tương thích với người thể hiện tác dụng gây độc tế bào, và isotyp thường là IgG₁. Trong đó tác dụng gây độc tế bào là không mong muốn, miền hằng định có thể là một isotyp khác, ví dụ, IgG₂. Kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người khác có thể bao gồm các trình tự khác với một lớp globulin miễn dịch hoặc isotyp, và chọn lọc các miền hằng định đặc biệt để tối ưu hóa các chức năng của miền tác động mong muốn nằm trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các

phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các kháng thể là các kháng thể IgG1 và cụ thể hơn, là các kháng thể IgG1 trong đó có sự bất hoạt các chức năng của miền tác động.

Các FR và CDR, hoặc HVL, của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người không cần thiết phải phù hợp một cách chính xác với các trình tự gốc. Ví dụ, một hoặc nhiều gốc trong trình tự CDR, hoặc HVL nhập, hoặc trình tự liên ứng hoặc trình tự FR dòng gốc có thể được biến đổi (ví dụ, được gây đột biến) bằng cách thay thế, chèn hoặc loại bỏ để gốc axit amin tạo thành không giống hệt với gốc tại vị trí tương ứng trong trình tự gốc nhưng tuy nhiên kháng thể vẫn giữ lại chức năng của liên kết với CD40. Sự thay đổi này thường sẽ không nhiều và sẽ là các thay đổi bảo thủ. Thông thường, ít nhất 75% các gốc của kháng thể được làm tương thích với người sẽ tương ứng với các gốc của các trình tự FR dòng gốc hoặc liên ứng gốc và trình tự CDR nhập, thông thường hơn ít nhất 90%, và thường xuyên nhất là lớn hơn 95%, hoặc lớn hơn 98% hoặc lớn hơn 99%.

Các gốc globulin miễn dịch ảnh hưởng đến bề mặt chung giữa các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ("bề mặt chung của V_L - V_H ") là các gốc ảnh hưởng đến sự lân cận hoặc sự định hướng của hai chuỗi đối với một chuỗi khác. Các gốc đã biết có thể liên quan đến các tương tác liên chuỗi gồm các gốc V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, và 98 và các gốc V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100, và 103 (sử dụng hệ thống đánh số được đưa ra trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). US 6407213 cũng đề cập đến các gốc như các gốc 43 và 85, và các gốc V_H 43 và 60 cũng có thể liên quan đến sự tương tác này. Trong khi các gốc này chỉ ra chỉ với IgG ở người, chúng có thể ứng dụng trong các loài. Các gốc kháng thể quan trọng được mong đợi chấp nhận được có liên quan đến các tương tác liên chuỗi được chọn lọc để thay thế vào trình tự liên ứng.

Các thuật ngữ "trình tự liên ứng" và "kháng thể liên ứng" đề cập đến trình tự axit amin đề cập đến trình tự axit amin bao gồm sự xuất hiện thường xuyên nhất gốc axit amin tại mỗi vị trí trong tất cả các globulin miễn dịch trong nhóm đặc biệt, isotyp, hoặc cấu trúc dưới đơn vị, ví dụ, miền biến thiên globulin miễn dịch ở người. Trình tự liên ứng có thể dựa trên các globulin miễn dịch của các loài đặc biệt hoặc thuộc nhiều loài. Trình tự, cấu trúc, hoặc kháng thể "liên ứng" được hiểu là bao gồm trình tự liên ứng ở người như được mô tả theo các phương án nhất định, và đề cập đến trình tự axit amin

bao gồm các trình tự axit amin xuất hiện nhiều nhất tại mỗi vị trí trong tất cả các globulin miễn dịch ở người thuộc lớp đặc biệt bất kỳ, isotyp, hoặc cấu trúc dưới đơn vị. Do đó, trình tự liên ứng chứa trình tự axit amin có tại mỗi vị trí một axit amin có trong một hoặc nhiều globulin miễn dịch đã biết, nhưng không thể sao chép chính xác trình tự axit amin của globulin miễn dịch đơn bất kỳ. Trình tự liên ứng vùng biến đổi không thu được từ kháng thể được sản xuất tự nhiên hoặc globulin miễn dịch. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., và các biến thể của chúng. Các FR của các trình tự liên ứng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và các biến thể của chúng, tạo ra các trình tự hữu ích để điều chế các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người. Tham khảo, ví dụ, US 6037454 và US 6054297.

Các trình tự dòng gốc ở người được tìm thấy trong tự nhiên trong quần thể người. Sự kết hợp của các gen dòng gốc này tạo ra tính đa dạng của kháng thể. Các trình tự kháng thể dòng gốc với chuỗi nhẹ của kháng thể đến từ các gen-v và gen-j kapa hoặc lambda dòng gốc ở người được bảo tồn. Tương tự với các trình tự chuỗi nặng đến từ gen v-, d- và j dòng gốc (LeFranc, M-P, and LeFranc, G, "The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

Theo sáng chế, "biến thể", "biến thể kháng CD40", "kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người", hoặc "biến thể kháng CD40 được làm tương thích với người" mỗi cụm từ đề cập đến một kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người có ít nhất một CDR ở chuột biến thiên chuỗi nặng từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4 hoặc trình tự CDR ở chuột chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng ở chuột như được chỉ ra trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8 và các trình tự FR có nguồn gốc từ các trình tự liên ứng ở người. Các biến thể gồm các trình tự trên có một hoặc nhiều axit amin thay đổi trong một hoặc cả hai miền biến thiên chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, được đề xuất sự thay đổi axit amin cơ bản không làm suy giảm liên kết của kháng thể với CD40. Các kháng thể đã làm tương thích với người được tạo ra trong bản mô tả gồm các kháng thể được chỉ rõ dưới dạng Kháng thể A, Kháng thể B và Kháng thể C và các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác nhau giống nhau như được chỉ ra trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:26 đến SEQ ID NO:40.

Kháng thể “được phân lập” là kháng thể được xác định và tách ra và/hoặc phục hồi từ một thành phần khác thuộc môi trường tự nhiên của nó. Các thành phần gây ô nhiễm của môi trường tự nhiên của kháng thể là các vật liệu can thiệp vào việc sử dụng chuẩn đoán hoặc trị liệu của kháng thể, và có thể là các enzym, hormon, và các chất tan có protein hoặc không có protein. Theo một khía cạnh, kháng thể sẽ được tinh chế để ít nhất lớn hơn 95% sự phân lập bởi trọng lượng của kháng thể.

Kháng thể được phân lập bao gồm kháng thể tại chỗ bên trong các tế bào tái tổ hợp trong đó nó được sản xuất, khi không có ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của kháng thể. Tuy nhiên, thông thường, kháng thể được phân lập sẽ được điều chế bởi ít nhất một bước tinh chế trong đó vật liệu tế bào tái tổ hợp được loại bỏ.

Thuật ngữ "hiệu quả của kháng thể" đề cập đến các nhân tố góp phần nhận diện kháng nguyên của kháng thể hoặc sự có hiệu lực của kháng thể *in vivo*. Sự thay đổi trình tự axit amin của kháng thể có thể ảnh hưởng đến các đặc tính của kháng thể như sự gấp nếp, và có thể ảnh hưởng đến các nhân tố vật lý như tỷ lệ ban đầu của kháng thể liên kết với kháng nguyên (k_a), hằng số phân ly của kháng thể từ kháng nguyên (k_d), hằng số ái lực của kháng thể với kháng nguyên (K_d), hình dạng của kháng thể, độ ổn định protein, và chu kỳ bán thải của kháng thể.

Thuật ngữ "epitop được đánh dấu" theo sáng chế, đề cập đến kháng thể kháng CD40 được dung hợp thành "thể epitop". "Thể epitop" là một polypeptit có một số lượng axit amin đủ để tạo ra epitop cho sự sản xuất kháng thể, không được định rõ để nó không gây trở ngại với hoạt tính mong muốn của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người. Thể epitop thường là duy nhất thích hợp để kháng thể tăng cao đối với thể epitop cơ bản không phản ứng chéo với các epitop khác. Các polypeptit đánh dấu thích hợp thường chứa ít nhất 6 gốc axit amin và thường chứa khoảng từ 8 đến 50 gốc axit amin, hoặc từ khoảng 9 đến 30 gốc. Các ví dụ về các thể epitop và kháng thể liên kết với epitop gồm polypeptit đánh dấu HA cúm và kháng thể 12CA5 của nó (Field et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165); c-myc tag và kháng thể 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 và 9E10 của nó (Evan et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616; và tag glycoprotein D của virus Herpes simplex (gD) và kháng thể của nó (Paborsky et al. 1990, Protein Engineering 3(6): 547-553). Theo các phương án đã biết, thể epitop là "epitop liên kết thụ thể cứu hộ". Theo sáng chế, thuật ngữ "epitop liên kết thụ thể cứu hộ" đề cập đến

epitop của vùng Fc của phân tử IgG (như IgG₁, IgG₂, IgG₃, hoặc IgG₄) gây ra sự tăng chu kỳ bán thải của huyết thanh *in vivo* trong phân tử IgG.

Theo một vài phương án thực hiện, các kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp thành chất gây độc tế bào. Đây là chất bất kỳ ức chế hoặc ngăn chặn chức năng của các tế bào và/hoặc gây ra sự phá hủy các tế bào. Thuật ngữ được dùng để bao gồm các isotop phóng xạ (như I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, và Re¹⁸⁶), hóa chất trị liệu, và các độc tố như các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, và các đoạn của chúng. Các chất gây độc tế bào này có thể được kết hợp với các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế sử dụng các quy trình chuẩn, và được sử dụng, ví dụ, để điều trị cho bệnh nhân cần được trị liệu bởi kháng thể.

"Hóa chất trị liệu" là hợp chất hóa học hữu ích trong điều trị bệnh ung thư. Có nhiều ví dụ về các hóa chất trị liệu có thể được tiếp hợp với các kháng thể trị liệu theo sáng chế. Các ví dụ về các hóa chất trị liệu này bao gồm các chất alkyl hóa như thiotepa và xyclophosphamid; alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan, và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenthiophosphoramit, và trimetylolomelamin; axetogenin (đặc biệt là bulataxin và bulataxinon); camptothecin (gồm topotecan tương tự tổng hợp); bryostatin; calystatin; CC-1065 (bao gồm các chất tương tự adozelesin, carzelesin, và bizelesin của nó); cryptophycin (cụ thể là cryptophycin 1 và cryptophycin 8); dolastatin, auristatin, (gồm các chất tương tự monometyl-auristatin E và monometyl-auristatin F); duocarmyxin (gồm các chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CBI-TMI); eleutherobin; pancratiostatine; sarcodictyin; spongistatin; mù tạc nitơ như clorambuxil, clomaphazin, cholophosphamid, estramustin, ifosfamid, mecloretamin, mecloetamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin; trofosfamid, mù tạc uraxil; nitrosure như carmustin, clozotxin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; các chất kháng sinh như chất kháng sinh enediyn (ví dụ, calicheamixin, đặc biệt là calicheamixin gammaII và calicheamixin phiII, tham khảo ví dụ, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; dynemixin, gồm dynemixin A; bisphosphonat, như clodronat; esperamixin; cũng như neocarzinostatin chromophore và chromomophore kháng sinh enediyn protein sắc tố có liên quan), aclacinomycin, actinomycin, anthramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, carabixin, caminomycin, carzinophilin, chromomycin, dactinomycin,

daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin (Adriamycin™) (gồm morpholino-doxorubixin, xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrolino-doxorubixin, và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcelomyxin, mitomyxin như mitomyxin C, axit mycophenolic, nogalamyxin, olivomyxin, peplomyxin, potfiromyxin, puromyxin, quelamycin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tubexidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; chất chống chuyển hóa như methotrexat và 5-flouraxil (5-FU); các chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin như các chất tương tự fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; pyrimidin như anxitabin, azaxitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enoxitabin, floxuridin; các hormon nam như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; các chất kháng adranal như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; chất độn axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; democolxin; diaziqun; elfomithin; eliptinium axetat; epothilon; etoglucid; galium nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidamin; maytansinoit như maytansin và ansamitoxin; mitoguazon, mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; PSK®; razoxan; rhizoxin; sizofuran; spirogermani; axit tenuazonic; triaziqun; 2,2',2''-triclotrietylamin; trichothexen (đặc biệt là T-2 toxin, veracurin A, roridin A và anguidin); uretan; vindesin; dacarbazin; manomustin; mitabronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); xyclophosphamit; thiotepa; taxoit, ví dụ, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) và doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambuxil; gemxitabin (Gemzar™); 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; các chất tương tự platin như xisplatin và carboplatin; vinblastin; platin; etoposit (VP-16); ifosfamid; mitoxantron; vincristin; vinorelbin Navelbin™); novantron; teniposit; edatrexat; daunomyxin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; các chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); retinoit như axit retinoic; capexitabin; và các muối được dùng, axit, hoặc các dẫn xuất của các chất bất kỳ trên. Cũng nằm trong định nghĩa này là các chất kháng hormon đóng vai trò điều hòa hoặc ức chế tác dụng của hormon đối với các khối u như các chất kháng estrogen và các chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (các SERM), bao gồm, ví dụ, tamoxifen (gồm Nolvadex™), raloxifen,

droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và toremifen (Fareston™); các chất ức chế aromataza ức chế enzym aromataza, điều hòa sự sản xuất estrogen trong các phôi tử tuyến thượng thận, như, ví dụ, 4(5)-imidazol, aminoglutethimit, megestrol axetat (Megace™), exemestan, formestan, fadrozol, vorozol (Rivisor™), letrozol (Femara™), và anastrozol (Arimidex™); và các chất chống hormon nam như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; và các muối được dụng, axit, hoặc các dẫn xuất bất kỳ của các chất trên. Một hoặc nhiều chất bất kỳ trong các chất này có thể được tiếp hợp với các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế để tạo ra chất trị liệu hữu ích để điều trị các rối loạn khác nhau.

Các kháng thể cũng có thể được kết hợp với các tiền dược chất. "Tiền dược chất" là dạng tiền chất hoặc dẫn xuất của hoạt chất được có tính gây độc tế bào ít hơn cho các tế bào khối u được so sánh với thuốc gốc và có khả năng được hoạt hóa bằng enzym hoặc được chuyển hóa thành dạng hoạt hóa hơn. Tham khảo, ví dụ, Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", In Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast and Stella et al., 1985, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, In: "Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press. Các tiền dược chất hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tiền dược chất chứa phosphat, các tiền dược chất chứa thiophosphat, các tiền dược chất chứa sulfat, các tiền dược chất chứa peptit, các tiền dược chất được biến đổi axit amin D, các tiền dược chất được glycosyl hóa, các tiền dược chất chứa β -lactam, tùy ý được thể bởi các tiền dược chất chứa phenoxyaxetamit, và tùy ý được thể bởi các tiền dược chất chứa phenylaxetamit được thể, 5-floxytosin và các tiền dược chất 5-floridin khác có thể được chuyển hóa thành các thuốc không gây độc tế bào có hoạt tính hơn. Các ví dụ về các thuốc gây độc tế bào có thể được chuyển hóa thành dạng tiền dược chất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất trị liệu hóa học khác được mô tả ở trên.

Để chẩn đoán cũng như các mục đích kiểm tra trị liệu, các kháng thể theo sáng chế cũng được kết hợp vào một vị trí đánh dấu, hoặc riêng một vị trí đánh dấu hoặc một vị trí đánh dấu và một chất thứ hai khác (tiền dược chất, hóa chất trị liệu và chất tương tự). vị trí đánh dấu, được phân biệt với các chất thứ hai khác đề cập đến chất là hợp chất hoặc chế phẩm có thể phát hiện và nó có thể được tiếp hợp trực tiếp hoặc gián tiếp với kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế. Bản thân vị trí đánh dấu có thể được phát hiện (ví dụ, đánh dấu đồng vị phóng xạ hoặc đánh dấu huỳnh quang) hoặc, trong

trường hợp đánh dấu enzym, có thể xúc tác sự biến đổi hóa học của hợp chất hoặc chế phẩm nền có thể phát hiện. Kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được đánh dấu có thể được điều chế và sử dụng trong các ứng dụng khác nhau gồm các chẩn đoán *in vitro* và *in vivo*.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng một phần của chế phẩm liposom để phân phối chúng một cách hiệu quả *in vivo*. "Liposom" là một túi nhỏ gồm có các loại lipit là một túi nhỏ gồm có các loại lipit khác nhau, phospholipit, và/hoặc chất hoạt động bề mặt. Liposom hữu ích để phân phối vào động vật có vú một hợp chất hoặc chế phẩm, như kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được bộc lộ trong bản mô tả, tùy ý, được ghép hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất được và/hoặc vị trí đánh dấu. Các thành phần của liposom thường được sắp xếp trong sự tạo thành lớp kép, tương tự với sự sắp xếp lipit trong các màng sinh học.

Các khía cạnh đã biết theo sáng chế đề cập đến các axit nucleic được phân lập ghi mã một hoặc nhiều miền trong các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế. Phân tử axit nucleic "được phân lập" là phân tử axit nucleic được nhận biết và được tách ra khỏi ít nhất một phân tử axit nucleic nhiễm tạp thông thường được kết hợp trong nguồn tự nhiên của axit nucleic của kháng thể. Phân tử axit nucleic đã phân lập được phân biệt với phân tử axit nucleic khi nó tồn tại trong các tế bào tự nhiên.

Theo các khía cạnh khác nhau của sáng chế một hoặc nhiều miền kháng thể được làm tương thích với người sẽ được biểu hiện tái tổ hợp. Sự biểu hiện tái tổ hợp này có thể sử dụng một hoặc nhiều trình tự điều khiển, tức là, các trình tự polynucleotit cần thiết để biểu hiện một trình tự mã hóa được liên kết một cách có kiểm soát trong sinh vật chủ đặc biệt. Các trình tự điều khiển thích hợp để sử dụng trong các tế bào nhân sơ gồm, ví dụ, trình tự khởi động, trình tự chỉ huy, và các trình tự vị trí liên kết ribosom. Các trình tự kiểm soát của tế bào nhân thực bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi đầu, các tín hiệu polyadenyl hóa, và vùng tăng cường. Các trình tự điều khiển này có thể được sử dụng để biểu hiện và sản xuất kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người trong các tế bào chủ nhân sơ và nhân thực.

Trình tự axit nucleic "được liên kết một cách có kiểm soát" khi nó được đặt vào mối liên hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, trình tự trước của axit nucleic hoặc trình tự dẫn đầu kích thích bài tiết được liên kết một cách có kiểm soát với axit

nucleic ghi mã polypeptit nếu nó được biểu hiện dưới dạng tiền protein tham gia vào sự bài tiết polypeptit; trình tự khởi đầu hoặc vùng tăng cường được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự; hoặc vị trí liên kết ribosom được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự mã hóa nếu nó được định vị để dễ dàng dịch mã. Nói chung, "được liên kết một cách có kiểm soát" có nghĩa là các trình tự ADN được liên kết kề nhau, và, trong trường hợp trình tự dẫn đầu kích thích bài tiết, liên kề nhau và trong khung đọc. Tuy nhiên, các vùng tăng cường tùy ý liên kề nhau. Sự liên kết có thể được hoàn thiện bằng cách gắn tại các vị trí giới hạn thuận lợi. Nếu các vị trí này không tồn tại, có thể sử dụng các oligonucleotit thích ứng tổng hợp hoặc các mối liên kết.

Theo sáng chế, các thuật ngữ "tế bào", "dòng tế bào", và "giống tế bào" được sử dụng thay thế cho nhau và tất cả các cách gọi này đều nằm trong nghĩa của chúng. Do đó, "các thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp" gồm tế bào đầu tiên và giống bắt nguồn từ đó mà không quan tâm đến số lượng các lần cấy chuyển.

Thuật ngữ "động vật có vú" với các mục đích điều trị đề cập đến động vật bất kỳ được phân thành lớp động vật có vú, gồm người, được thuần hóa và động vật trong trang trại, và vườn bách thú, khu giải trí, hoặc vật nuôi, như chó, ngựa, mèo, bò cái, và các động vật tương tự. Tốt hơn là, động vật có vú là người.

"Sự rối loạn", theo sáng chế, là bệnh lý bất kỳ sẽ có lợi từ việc điều trị với kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được mô tả theo sáng chế. Sự rối loạn này gồm các rối loạn hoặc bệnh mạn tính và ác tính gồm các bệnh lý do tâm thần gây ra ảnh hưởng đến động vật có vú bị rối loạn được đề cập. Các ví dụ hoặc các rối loạn không hạn chế được điều trị theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư, các khối u ác tính về huyết học, các khối u lành và ác tính, bệnh bạch cầu và các khối u ác tính dạng bạch huyết và chứng viêm, các rối loạn hình thành mạch, rối loạn tự miễn và miễn dịch.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" và "bệnh thuộc ung thư" đề cập hoặc mô tả bệnh lý về sinh lý học ở động vật có vú thường được mô tả bởi sự phát triển của tế bào không được điều hòa. Các ví dụ về bệnh ung thư gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư biểu mô, u lympho, u nguyên bào, xacôm và bệnh bạch cầu.

Theo sáng chế, thuật ngữ "rối loạn có liên quan đến CD40" hoặc "bệnh có liên quan đến CD40" chỉ bệnh lý mà trong đó sự cải biến hoặc bài tiết các tế bào biểu hiện CD40

được chỉ ra. Các tế bào này gồm các tế bào biểu hiện CD40 chứng minh sự tăng sinh dị thường hoặc các tế bào biểu hiện CD40 có liên quan đến sự phát triển bệnh ung thư hoặc khối u ác tính. Các ví dụ cụ thể hơn về bệnh ung thư chứng minh sự biểu hiện dị thường của kháng nguyên CD40 gồm các tế bào u nguyên bào lympho B, u lympho Burkitt, đa u tủy, các u lympho tế bào T, xacôm Kaposi, xacôm xương, các khối u biểu bì và màng trong, ung thư tuyến tụy, phổi, vú, buồng trứng, ruột kết, tuyến tiền liệt, đầu và cổ, da (khối u ác tính), bàng quang, và thận. Các rối loạn trên gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh bạch cầu, u lympho, gồm u lympho tế bào B và u lympho không phải Hodgkin, đa u tủy, macroglobulin huyết Waldenstrom; các khối u rắn, gồm xacôm, như xacôm xương, xacôm Ewing, khối u ác tính, ung thư tuyến, gồm ung thư tuyến buồng trứng, xacôm Kaposi/khối u Kaposi và ung thư biểu mô tế bào hình vảy.

Rối loạn có liên quan đến CD40 cũng gồm các bệnh và rối loạn của hệ miễn dịch, như các rối loạn tự miễn và rối loạn viêm. Các bệnh lý trên gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dạng viêm khớp mạn tính tăng dần (RA), luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh cứng da, hội chứng Sjogren, đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, bệnh viêm ruột (ví dụ, viêm ruột kết gây loét và bệnh Crohn), viêm phổi, bệnh hen, và ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP).

Cụm từ "làm ngừng sự phát triển của" hoặc "ức chế sự phát triển" theo sáng chế chỉ sự ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh tế bào, đặc biệt là loại tế bào khối u biểu hiện kháng nguyên CD40. Do đó, sự ức chế sự phát triển, ví dụ, làm giảm đáng kể tỷ lệ phần trăm của các tế bào khối u trong pha S.

Thuật ngữ "truyền trong tĩnh mạch" đề cập đến sự đưa một chất vào tĩnh mạch của động vật hoặc bệnh nhân người trong một khoảng thời gian lớn hơn khoảng 15 phút, thường nằm trong khoảng từ 30 đến 90 phút.

Thuật ngữ "tiêm bolus trong tĩnh mạch" hoặc "sự đẩy tĩnh mạch" đề cập đến việc sử dụng thuốc vào tĩnh mạch của động vật hoặc động vật để cơ thể nhận thuốc trong khoảng thời gian 15 phút hoặc ít hơn, thường trong khoảng 5 phút hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ "việc sử dụng dưới da" đề cập đến việc đưa chất dưới da của động vật hoặc người bệnh, có thể ưu tiên trong túi giữa da và mô ở dưới, bằng cách phân phối được liên tục, tương đối chậm từ vật chứa thuốc. Bó chặt hoặc kéo da lên trên và tách khỏi mô phía dưới để tạo túi.

Thuật ngữ "truyền dưới da" đề cập đến việc đưa thuốc dưới da của động vật hoặc bệnh nhân người, tốt hơn là trong túi giữa da và mô phía dưới, bằng cách phân phối liên tục, tương đối chậm vật chứa thuốc trong khoảng thời gian gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 30 phút hoặc ít hơn, hoặc 90 phút hoặc ít hơn. Tùy ý, sự truyền có thể được tiến hành bằng cách cấy dưới da một bơm phân phối thuốc được cấy dưới da của động vật hoặc người bệnh, trong đó bơm phân phối một lượng thuốc định trước trong khoảng thời gian định trước, như 30 phút, 90 phút, hoặc khoảng thời gian kéo dài của chế độ điều trị.

Thuật ngữ "tiêm bolus dưới da" đề cập đến việc sử dụng thuốc ở dưới da của động vật hoặc người bệnh, trong đó sự phân phối thuốc tiêm bolus nhỏ hơn khoảng 15 phút; theo một khía cạnh khác, ít hơn 5 phút, và theo một khía cạnh khác, nhỏ hơn 60 giây. Theo một khía cạnh khác, việc sử dụng trong túi giữa da và mô phía dưới, trong đó túi có thể được tạo ra bằng cách bó chặt hoặc kéo dài da lên và tách khỏi mô phía dưới.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu trị liệu" được sử dụng đề cập đến một lượng hoạt chất làm nhẹ bớt hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn được điều trị. Trong khi đó một lượng có tác động có lợi cho bệnh nhân, ví dụ, hiệu quả làm ngừng sự phát triển hoặc gây ra sự xóa bỏ tế bào. Theo một khía cạnh, lượng hữu hiệu trị liệu có tác dụng gây chết tế bào theo chương trình, hoặc có khả năng gây ra sự chết của tế bào. Theo một khía cạnh khác, lượng hữu hiệu trị liệu đề cập đến nồng độ huyết thanh đích được chỉ ra là có hiệu quả, ví dụ, làm chậm sự tiến triển của bệnh. Tính hiệu lực có thể được đo theo các cách thông thường, phụ thuộc vào bệnh lý được điều trị. Ví dụ, trong các bệnh hoặc rối loạn khối u được mô tả bởi các tế bào biểu hiện CD40, tính hiệu lực có thể được đo bằng cách đánh giá thời gian tiến triển bệnh, hoặc xác định tỷ lệ đáp ứng.

Thuật ngữ "việc điều trị" và "trị liệu" và các phương pháp tương tự, như được sử dụng theo sáng chế, được hiểu là gồm việc trị liệu cũng như phòng ngừa, hoặc các biện pháp ngăn chặn bệnh hoặc rối loạn dẫn đến hiệu quả có lợi hoặc mong muốn về mặt lâm sàng, gồm nhưng không giới hạn với sự làm giảm bớt hoặc giảm nhẹ một hoặc nhiều triệu chứng, sự thoái lui, làm chậm hoặc ngừng sự tiến triển của bệnh hoặc rối loạn. Do đó, ví dụ, thuật ngữ điều trị gồm việc sử dụng một chất trước hoặc sau khi bắt đầu mạnh mẽ triệu chứng bệnh hoặc rối loạn nhờ đó ngăn chặn hoặc loại bỏ một hoặc nhiều dấu hiệu của bệnh hoặc rối loạn. Theo một ví dụ khác, thuật ngữ gồm việc sử dụng một chất sau khi biểu hiện lâm sàng bệnh để chống lại các triệu chứng bệnh. Hơn nữa, việc sử dụng

một chất sau khi bắt đầu mạnh mẽ hoặc sau khi các triệu chứng lâm sàng được phát triển trong đó việc sử dụng ảnh hưởng đến các thông số lâm sàng của bệnh hoặc rối loạn, như mức độ tổn thương mô hoặc lượng hoặc mở rộng sự di căn, điều trị hoặc không điều trị làm cải thiện bệnh, bao gồm "việc điều trị" hoặc "trị liệu" như được sử dụng theo sáng chế. Hơn nữa, với điều kiện là các chế phẩm theo sáng chế sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với chất trị liệu khác làm giảm bớt hoặc cải thiện ít nhất một triệu chứng của rối loạn được điều trị khi được so sánh với triệu chứng khi không sử dụng chế phẩm kháng thể CD40 được làm tương thích với người, kết quả nên được xem là việc điều trị hữu hiệu rối loạn cơ bản mà không quan tâm đến tất cả các triệu chứng của rối loạn có bị giảm bớt hay không.

Thuật ngữ "chèn vào bao bì" được sử dụng để đề cập đến các chỉ dẫn thông thường có trong các bao bì thương mại của các sản phẩm trị liệu, chứa thông tin về các chỉ dẫn, cách dùng, sử dụng, chống chỉ định và/hoặc các cảnh báo có liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu này.

Kháng thể

Kháng thể được mô tả và theo sáng chế là các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người, và các chế phẩm và vật phẩm sản xuất chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người theo sáng chế. Sáng chế cũng mô tả các chất liên kết gồm đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người. Các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người và các chất liên kết có thể làm ngừng sự phát triển của các tế bào, loại bỏ các tế bào biểu hiện CD40 hoặc nói cách khác là bao gồm hoặc gây ra tác động kìm tế bào hoặc gây độc tế bào đối với các tế bào đích. Các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người và các chất liên kết có thể được sử dụng trong điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau được mô tả bởi sự tăng sinh các tế bào biểu hiện kháng nguyên bề mặt CD40. Kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người và mỗi chất liên kết CD40 gồm ít nhất một bộ phận nhận diện đặc hiệu một epitop CD40 (tức là đoạn liên kết kháng nguyên).

Các kháng thể ở chuột mô tả ban đầu được chọn trên cơ sở sự mô tả liên kết CD40.

Từ các nghiên cứu ban đầu này, các kháng thể ở chuột được chọn có các vùng biến đổi chuỗi nặng tiếp theo được chỉ ra trong Bảng 1 và các vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chỉ ra trong Bảng 2:

Bảng 1: Các trình tự dẫn đầu CD40 ở chuột - Các trình tự VH

2H11	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYVHWVKQRPEKGLEWIGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDVAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO.1)
10F2	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYVHWVKQRPEKGLEWIGRIDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDVAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO.2)
19B10	EVQLQQSGAELVRPGASVQLSCTASGFNIKDYVHWVKQRPEKGLEWIGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSSNTVYLHLSSLTSEDVAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO.3)
20E2	EVQLVESGGGLVHPGGRKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGTSTVTVSS(SEQ ID NO.4)

Bảng 2: Các trình tự dẫn đầu CD40 ở chuột - Các trình tự VK

2H11	QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQKPGTSPKLIWYSTSNLASGVPARFSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRFTFYPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO.5)
10F2	QIVLTQSPTIMSASPGEKVIITCSATSSSVSYILWFQKPGTSPKLIWYSTSNLASGVPARFSGSGSGASYSLTISRMEAEDAATYYCQQRFTFYPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO.6)
19B10	QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQKPGTSPKLIWYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRFTFYPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO.7)
20E2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISNLQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO.8)

Các trình tự khung ở người được chọn đối với một trong các đoạn dẫn đầu ở chuột trên cơ sở tính tương đồng của vùng khung, cấu trúc CDR, các gốc được bảo tồn phù hợp với tiêu chuẩn, các gốc bao gói bề mặt chung được bảo tồn và các thông số khác.

Các CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở chuột của các kháng thể khác nhau ở chuột được chọn trong số các kháng thể tương ứng được chỉ ra trong Bảng 3 và Bảng 4:

Bảng 3:
Các trình tự chuỗi nặng CDR

Tên cấu trúc	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
2H11	<u>GFNIK</u> <u>DYYVH</u> SEQ ID NO.9	<u>RIDPEDGDSKYAPKFQG</u> SEQ ID NO.12	<u>SYVVGTYGY</u> SEQ ID NO.16
10F2	<u>GFNIK</u> <u>DYYIH</u> SEQ ID NO.10	<u>RIDPEDGDTKYDPKFQG</u> SEQ ID NO.13	<u>SYVVGTYGY</u> SEQ ID NO.16
19B10	<u>GFNIK</u> <u>DYYVH</u> SEQ ID NO.9	<u>RIDPEDGDTKFAPKFQG</u> SEQ ID NO.14	<u>SYVVGTYGY</u> SEQ ID NO.16
20E2	<u>GFTFS</u> <u>DYGMH</u> SEQ ID NO.11	<u>YISSGNRIIYYADTVKG</u> SEQ ID NO.15	<u>QDGYRYAMDY</u> SEQ ID NO.17

H-CDR1 được liệt kê ở trên sử dụng hệ thống đánh số của Chothia (Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948). Sự đánh số Kabats đối với các trình tự được chỉ ra bằng chữ viết in nghiêng đậm và sự đánh số theo IMGT được chỉ ra bởi chữ viết gạch chân các gốc trong bảng trên đối với CDR1 và CDR2. Các trình tự đối với H-CDR3 với một trong số 2H11, 10F2 và 19B10 là TTSYYVGTYGY (SEQ ID NO.77) và với 20E2 là ARQDGYRYAMDY (SEQ ID NO.78).

Bảng 4:
Các trình tự chuỗi nhẹ CDR

Tên cấu trúc	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
2H11	<u>SASSSVSYML</u> SEQ ID NO.18	<u>STSNLAS</u> SEQ ID NO.22	<u>QORTFYPT</u> SEQ ID NO.24
10F2	<u>SATSSVSYIL</u> SEQ ID NO.19	<u>STSNLAS</u> SEQ ID NO.22	<u>QORTFYPT</u> SEQ ID NO.24
19B10	<u>SASSSVSYML</u> SEQ ID NO.20	<u>STSNLAS</u> SEQ ID NO.22	<u>QORTFYPT</u> SEQ ID NO.24
20E2	<u>KSSOSLLNSGNOKNYLT</u> SEQ ID NO.21	<u>WTSTRES</u> SEQ ID NO.23	<u>QNDYTYPLT</u> SEQ ID NO.25

Mặt khác, hệ thống đánh số của Chothia được sử dụng trong Bảng 4 với sự đánh số Kabats cho các trình tự được chỉ ra bởi chữ viết in nghiêng, đậm và sự đánh số IMGT được chỉ ra bởi chữ viết được gạch chân.

Các Fab được chỉ ra liên kết tốt hơn hoặc bằng khi được so sánh với Fab gốc thể khảm được chọn để biến đổi thành IgG. Các dòng vô tính từ các loài 20E2 được biến đổi thành hai dạng IgG khác nhau: a) IgG4DM (đột biến kép) có hai đột biến trong vùng Fc / vùng khớp, Ser228Pro làm giảm bớt sự tạo thành một nửa phân tử và Leu235Glu làm giảm thêm liên kết FcγR. b) IgG1KO (bất hoạt chức năng của thụ thể) có hai đột biến

trong vùng Fc, Leu234Ala và Leu235Ala, làm giảm bớt chức năng của thụ thể như FcγR và liên kết bổ thể. Cả hai dạng IgG được mô tả trong tài liệu này. Ví dụ 1 mô tả việc làm tương thích với người của ba đối tượng được lựa chọn chi tiết hơn. Các kết quả về việc làm tương thích với người này dẫn đến các trình tự kháng thể được làm tương thích với người, có các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chỉ ra dưới đây:

Nhận dạng	Trình tự	SEQ ID NO.
Kháng thể A (Chuỗi nhẹ)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTW</u> <u>HQOKPGQPPKLLIYWTSTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI</u> FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
Kháng thể A (Chuỗi nặng, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
Kháng thể A (Chuỗi nặng, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
Kháng thể A (Chuỗi nặng, IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	29

Kháng thể A (Chuỗi nặng, IgG1KOb)	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
Kháng thể B (Chuỗi nhẹ)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLLNSGNOKNYL</u> <u>TWHQOKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISSLQAEDVAVYYCONDYTYPLTEGGGKVEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Kháng thể B (Chuỗi nặng, IgG1KO)	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Kháng thể B (Chuỗi nặng, IgG1)	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
Kháng thể B (Chuỗi nặng, IgG4 DM)	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK	34

	TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Kháng thể B (Chuỗi nặng, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
Kháng thể C (Chuỗi nhẹ)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFO</u> <u>QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> <u>TISSLQPEDFATYYCOQRTFYPTFGGGTKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Kháng thể C (Chuỗi nặng, IgG1KO)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGTLLTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
Kháng thể C (Chuỗi nặng, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGTLLTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Kháng thể C (Chuỗi nặng, IgG4)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGTLLTVSSASTKG</u>	39

DM)	PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV KPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPFEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Kháng thể C (Chuỗi nặng, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFINIKDYYVHWVKQAP</u> <u>GOGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFOGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDYAVYYCTTSYYVGTYYGYSWGQGLTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVH KPSNTKVDKRVESKCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

Theo một vài phương án, đoạn liên kết kháng nguyên có thể, ví dụ, phong bế sự tăng sinh hoặc mặt khác làm ngừng sự phát triển của tế bào hoặc gây ra sự suy yếu, chết, hoặc nói cách khác sự suy yếu của nó, ví dụ, thông qua sự liên kết với kháng nguyên bề mặt CD40. Ví dụ, trong các khối u ác tính của tế bào T và B, các tác dụng kháng khối u (ví dụ sự làm ngừng sự phát triển có hoặc không có sự suy yếu tế bào hoặc gây cơ chế gây chết tế bào theo chương trình) thường dẫn đến khi các tế bào ác tính được phơi nhiễm với sự kích thích dẫn đến sự hoạt hóa các tế bào lympho bình thường. Sự làm ngừng sự phát triển do sự hoạt hóa này gây ra được quan sát bởi các tín hiệu thông qua các thụ thể kháng nguyên hoặc các thụ thể đồng kích thích (tham khảo, ví dụ: Ashwell et al., 1987, Science 237:61; Bridges et al., 1987, J. Immunol. 139:4242; Page and Defranco, 1988, J. Immunol. 140:3717; and Beckwith et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:501). Sự kích thích CD40, là kết quả của liên kết đặc hiệu bởi kháng thể hoặc phối tử hòa tan, ức chế sự phát triển của u lympho tế bào B (tham khảo, ví dụ: Funakoshi et al., 1994, Blood 83:2787-2794). Các chất ức chế sự phát triển của tế bào ác tính theo cách này và có thể được định hướng chống lại kháng nguyên bề mặt CD40 là các ví dụ về các chất thích hợp.

Các chất đặc hiệu CD40 gồm đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người liên kết với CD40 (ví dụ, CD40 ở người hoặc biến

thể của nó). Các chất đặc hiệu với CD40 và các kháng thể có thể tùy ý được liên hợp với hoặc dung hợp với chất gây độc tế bào hoặc chất trị liệu hóa học. Theo các khía cạnh trong đó kháng thể được làm tương thích với người liên kết với kháng nguyên bề mặt CD40 và gây ra sự suy yếu của các loại tế bào biểu hiện CD40, sự liên kết thường được mô tả bằng cách đưa trở lại tế bào kháng nguyên bề mặt CD40 *in vivo*. Các chất liên kết thích hợp liên kết kháng nguyên CD40 bằng ái lực và/hoặc ái tính đủ để chất đặc hiệu CD40 hữu ích làm chất trị liệu bằng các hướng tới mục đích đặc hiệu tế bào biểu hiện kháng nguyên.

Theo một vài khía cạnh, kháng thể được làm tương thích với người làm giảm liên kết của phối tử CD40 với CD40 bởi ít nhất 45%, bởi ít nhất 50%, bởi ít nhất 60% hoặc bởi ít nhất 75% hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95%.

Theo một số phương án thực hiện, các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người, gồm các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, như các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, bao gồm trình tự axit amin của các gốc có nguồn gốc từ các CDR kháng thể A (trình tự chuỗi nặng = SEQ ID NO.27; SEQ ID NO.28; SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30; trình tự chuỗi nhẹ = SEQ ID NO.26), kháng thể B (trình tự chuỗi nặng = SEQ ID NO.32; SEQ ID NO.33; SEQ ID NO.34; hoặc SEQ ID NO.35; trình tự chuỗi nhẹ = SEQ ID NO.31) và kháng thể C (trình tự chuỗi nặng = SEQ ID NO.37; SEQ ID NO.38; SEQ ID NO.39 hoặc SEQ ID NO.40; trình tự chuỗi nhẹ = SEQ ID NO.36;) được mô tả theo sáng chế ở trên và các gốc axit amin có nguồn gốc từ các vùng khung của globulin miễn dịch ở người. Các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người tùy ý gồm sự thay thế axit amin đặc hiệu trong các vùng khung liên ứng hoặc dòng gốc.

Sự thay thế đặc hiệu trình tự axit amin trong các vị trí khung này có thể cải thiện các khía cạnh khác nhau về khả năng của kháng thể gồm ái lực và/hoặc độ ổn định liên kết, một lần nữa được chứng minh trong các kháng thể được làm tương thích với người được tạo thành bởi "sự trao đổi trực tiếp" của các CDR hoặc HVL thành các vùng khung dòng gốc ở người, như được chỉ ra trong các ví dụ dưới đây.

Theo một số phương án thực hiện, sáng chế mô tả các kháng thể đơn dòng với các trình tự chuỗi nặng (VH) nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.4 và các trình tự chuỗi nhẹ (VL) nêu trong SEQ ID NO.5 đến SEQ ID NO.8 (tham khảo các Bảng 1 và 2

ở trên). Trình tự CDR của các kháng thể chuột này được chỉ ra trong các Bảng 3 và 4 đặt các CDR này vào các FR trong các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên ứng ở người sẽ thu được các kháng thể được làm tương thích với người hữu ích theo sáng chế.

Theo một số phương án thực hiện cụ thể, kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm ít nhất một miền biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ bao gồm các CDR hoặc HVL của các kháng thể đơn dòng ở chuột như được chỉ ra trong các Bảng từ 1 đến 4 ở trên và các FR của các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ dòng gốc ở người. Theo các phương án minh họa, các kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra theo sáng chế là: Kháng thể A, Kháng thể B và Kháng thể C và các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác nhau tương tự được chỉ ra trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:26 đến SEQ ID NO:40.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể được dự tính rằng có trình tự chuỗi nặng có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 hoặc SEQ ID NO:30 kết hợp với trình tự chuỗi nhẹ là trình tự nêu trong SEQ ID NO:26. Các kháng thể khác bao gồm các kháng thể có trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 hoặc SEQ ID NO:35, kết hợp với trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:31. Theo các phương án khác, đề xuất các kháng thể được làm tương thích với người có trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:40, kết hợp với trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:36.

Các CDR trong các trình tự này được chỉ ra trong các Bảng 3 và 4. Theo các phương án cụ thể, dự tính rằng các kháng thể thể khảm với các vùng CDR được chuyển (tức là, ví dụ chuyển một hoặc hai CDR của kháng thể A với CDR tương tự với kháng thể C) giữa các globulin miễn dịch dẫn chứng này có thể thu được các kháng thể hữu ích.

Theo các phương án đã biết, kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người là đoạn kháng thể. Các đoạn kháng thể khác nhau thường đề cập ở trên và các kỹ thuật được phát triển để sản xuất các đoạn kháng thể. Các đoạn có thể có nguồn gốc thông qua sự phân cắt kháng thể nguyên vẹn (tham khảo, ví dụ, Morimoto et al., 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; and Brennan et al., 1985, *Science* 229:81). Mặt khác, các đoạn có thể được sản xuất trực tiếp trong các tế bào chủ tái tổ hợp. Ví dụ, các đoạn Fab'-SH có thể thu được trực tiếp từ *E. coli* và được ghép hóa

học tạo thành các đoạn $F(ab')_2$ (tham khảo, ví dụ, Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167). Bằng cách tiếp cận khác, các đoạn $F(ab')_2$ có thể được phân lập trực tiếp từ canh trường tế bào chủ tái tổ hợp. Các kỹ thuật khác để sản xuất các đoạn kháng thể sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương án đã biết gồm đoạn $F(ab')_2$ của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người bao gồm trình tự chuỗi nặng có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 kết hợp với trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO.26. Các kháng thể khác gồm các kháng thể có trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.34 hoặc SEQ ID NO.35, kết hợp với trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO.31. Theo các phương án khác, đề xuất các kháng thể được làm tương thích với người có trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:40, kết hợp với trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO.36. Các phương án này có thể gồm một kháng thể còn nguyên vẹn bao gồm $F(ab')_2$.

Theo một vài phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể gồm vùng hằng định làm trung hòa chức năng của thụ thể. Vùng hằng định có thể tạo ra các đáp ứng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) đối với tế bào đích biểu hiện CD40. (Các) miền thụ thể có thể, ví dụ, là vùng Fc trong phân tử Ig. Thông thường, chất liên kết CD40 phục hồi và/hoặc hoạt hóa các tế bào máu trắng gây độc tế bào (ví dụ, các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), các tế bào thực bào (ví dụ, thực khuẩn thể), và/hoặc các thành phần bổ thể của huyết thanh).

Miền tác động của kháng thể có thể từ các loài hoặc isotyp động vật có xương sống thích hợp bất kỳ. Các isotyp từ các loài động vật khác nhau khác về các khả năng làm trung gian với các chức năng của miền tác động. Ví dụ, khả năng của globulin miễn dịch ở người làm trung gian CDC và ADCC/ADCP thường tương ứng $IgM \approx IgG_1 \approx IgG_3 > IgG_2 > IgG_4$ và $IgG_1 \approx IgG_3 > IgG_2 / IgM / IgG_4$, tương ứng. Các globulin miễn dịch ở chuột thông qua CDC và ADCC/ADCP thường tương ứng $IgM \approx IgG_3 > IgG_{2b} > IgG_{2a} > IgG_1$ và $IgG_{2b} > IgG_{2a} > IgG_1 > IgG_3$ ở chuột, tương ứng. Trong một ví dụ khác, IgG_{2a} ở chuột thông qua ADCC trong khi cả hai IgG_{2a} và IgM ở chuột thông qua CDC.

Các cải biến của kháng thể

Các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người và các chất có thể gồm các cải biến của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng. Ví dụ, có thể mong muốn để biến đổi kháng thể đối với chức năng của miền tác động, để làm tăng tính có hiệu lực của kháng thể trong điều trị bệnh ung thư. Một cải biến này là sự đưa vào (các) gốc xystein vào vùng Fc, nhờ đó cho phép sự tạo thành liên kết disulfua liên chuỗi trong vùng này. Do đó, kháng thể homodime được tạo ra có thể có khả năng tiếp thu được cải thiện và/hoặc sự tiêu diệt tế bào thông qua bổ thể tăng và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Tham khảo, ví dụ, Caron et al., 1992, *J. Exp Med.* 176:1191-1195; and Shopes, 1992, *J. Immunol.* 148:2918-2922. Các kháng thể homodime có hoạt tính chống khối u tăng cao cũng có thể được điều chế bằng cách sử dụng các mối liên kết chéo hai chức năng khác loại như được mô tả trong Wolff et al., 1993, *Cancer Research* 53: 2560-2565. Mặt khác, kháng thể có thể được thiết kế để chứa các vùng Fc kép, làm tăng sự tiêu bổ thể và các khả năng của ADCC trong kháng thể. Tham khảo Stevenson et al., 1989, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230.

Các kháng thể có khả năng được cải thiện để hỗ trợ ADCC được tạo ra bằng cách biến đổi mẫu glycosyl hóa của vùng Fc của chúng. Điều này là có thể có do sự glycosyl hóa kháng thể tại gốc asparagin, N297, trong miền C_{H2} có liên quan đến sự tương tác giữa các thụ thể IgG và Fc γ là điều kiện trước hết với ADCC. Các dòng tế bào chủ được thiết kế để biểu hiện các kháng thể với sự glycosyl hóa được biến đổi, như N-acetylglucosamin cắt đôi tăng hoặc fucoza khử. Sự khử fucoza tạo ra sự tăng cường lớn hơn đối với hoạt tính của ADCC so với sự tăng khi có mặt N-acetylglucosamin chia đôi. Hơn nữa, sự tăng cường ADCC bởi các kháng thể fucoza thấp độc lập với hiện tượng đa hình của Fc γ RIIIa V/F.

Sự biến đổi trình tự axit amin trong vùng Fc của các kháng thể là sự biến đổi nhờ sự thiết kế glycosyl hóa để làm tăng ADCC. Vị trí liên kết trên IgG₁ ở người dành cho các thụ thể Fc γ được xác định bằng phép phân tích đột biến ở mức cao. Điều này dẫn đến sự tạo ra các kháng thể IgG₁ được làm tương thích với người bởi các đột biến Fc làm tăng ái lực liên kết đối với Fc γ RIIIa và làm tăng ADCC trong phòng thí nghiệm. Thêm vào đó, các biến thể Fc thu được bởi các cách hoán vị khác nhau của các đặc tính liên

kết, ví dụ, liên kết được cải thiện với các thụ thể FcγR đặc hiệu với liên kết không thay đổi hoặc được giảm bớt với các thụ thể FcγR khác.

Một khía cạnh khác gồm các liên hợp miễn dịch gồm kháng thể được làm tương thích với người hoặc các đoạn của chúng được liên hợp với với chất gây độc tế bào như chất hóa học trị liệu, độc tố (ví dụ, độc tố hoạt hóa enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các đoạn của chúng), hoặc isotop phóng xạ (tức là, một liên hợp phóng xạ).

Các chất hóa học trị liệu hữu ích đối với sự tạo ra các liên hợp miễn dịch này được mô tả ở trên. Các độc tố có hoạt tính enzym và các đoạn của chúng có thể được sử dụng để tạo thành các liên hợp miễn dịch hữu ích gồm chuỗi A bệnh bạch cầu, các đoạn hoạt hóa không liên kết có độc tố bệnh bạch cầu, chuỗi A ngoại độc tố (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A chất rixin, chuỗi A abrin, chuỗi A modexin, alpha-sarxin, các protein *Aleurites fordii*, các protein dianthin, các protein *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế *Momordica charantia*, curxin, crotin, chất ức chế *Saponaire officinalis*, gelonin, mitogelin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, tricothexen, và các chất tương tự. Các nuclit phóng xạ khác nhau có sẵn để sản xuất các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được liên hợp phóng xạ. Các ví dụ gồm ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , và ^{186}Re .

Các liên hợp của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người và tính gây độc tế bào hoặc chất hóa học trị liệu có thể được tạo thành bởi các phương pháp đã biết, sử dụng các chất ghép cặp protein hai chức khác nhau như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionat (SPDP), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCL), các este hoạt hóa (như disuccinimidyl suberat), aldehyt (như glutareldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất của bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất clo có hoạt tính bis (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al., 1987, Science 238:1098. Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được đánh dấu Cacbon-14 (MX-DTPA) là một chất tạo chelat minh họa cho sự liên hợp của nucleotit phóng xạ với kháng thể. Các liên hợp cũng có thể tạo thành bởi mỗi liên kết có thể phân cắt.

Theo một phương án khác, kháng thể có thể được liên hợp với một "thụ thể" (như streptavidin) để sử dụng trong chiến lược tiền đích của khối u. Theo phương pháp này, liên hợp kháng thể-thụ thể được sử dụng cho bệnh nhân, sau đó bằng cách loại bỏ sự liên hợp không liên kết từ sự tuần hoàn sử dụng chất làm sạch và sau đó sử dụng một "phối tử" liên kết chọn lọc với thụ thể (ví dụ, avidin), phối tử được liên hợp với chất gây độc tế bào (ví dụ, nuclit phóng xạ).

Các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người theo sáng chế cũng có thể được bào chế dưới dạng các liposom miễn dịch. Liposom chứa kháng thể được điều chế bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như được mô tả trong Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; và US 4.485.045 và US 4.544.545. Liposom có thời gian tuần hoàn tăng được bộc lộ, ví dụ, trong US 5013556.

Các liposom đặc biệt hữu ích có thể được tạo ra bằng phương pháp bay hơi pha đảo với chế phẩm lipid bao gồm phosphatidylcholin, cholesterol và phosphatidyletanolamin có nguồn gốc từ PEG (PEG-PE). Liposom được đẩy ra thông qua các bộ lọc có kích thước lỗ xác định để thu được các liposom có đường kính mong muốn. Các đoạn Fab của kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với các liposom như được mô tả trong Martin et al., 1982, J. Biol. (Chem. 257:286-288 thông qua phản ứng tương tác disulfua. Chất hóa học trị liệu (như doxorubixin) thường được chứa trong liposom. Tham khảo, ví dụ, Gabizon et al., 1989, J. National Cancer Inst. 81(19):1484.

Các kháng thể được mô tả và bộc lộ theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các phương pháp ADEPT (trị liệu với tiền được chất enzym trực tiếp kháng thể) bằng cách liên hợp kháng thể với enzym hoạt hóa tiền được chất biến đổi tiền được chất (ví dụ, chất hóa học trị liệu peptidyl), thành thuốc chống ung thư hoạt hóa. Tham khảo, ví dụ, WO 81/01145, WO 88/07378, và US 4.975.278. Thành phần enzym của liên hợp miễn dịch hữu ích đối với ADEPT là một enzym có khả năng tác dụng lên tiền được chất theo cách này để biến đổi nó thành dạng gây độc tế bào, hoạt hóa hơn của nó. Các enzym đặc hiệu hữu ích trong ADEPT gồm, nhưng không giới hạn với, phosphatasa kiềm để biến đổi các tiền được chất chứa phosphat thành các thuốc tự do; arylsulfatasa để biến đổi các tiền được chất chứa sulfat thành các thuốc tự do; xytosin deaminaza để biến đổi 5-floxytosin không gây độc thành thuốc chống ung thư, 5-flouraxil; proteaza, như seratia

proteaza, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidaza, và cathepsin (như cathepsin B và L), để biến đổi các tiền dược chất chứa peptit thành thuốc tự do; D-alanylcarboxypeptidaza, để biến đổi các tiền dược chất chứa các phần tử thể axit amin D; các enzym cắt carbohydrat như β -galactosidaza và neuraminidaza để biến đổi các tiền dược chất được glycosyl hóa thành thuốc tự do; β -lactamaza để biến đổi các thuốc có nguồn gốc từ β -lactam thành thuốc tự do; và penixilin amidaza, như penixilin V amidaza hoặc penixilin G amidaza, để biến đổi thuốc có nguồn gốc từ các nitơ amin của chúng bởi các nhóm phenoxyaxetyl hoặc phenylaxetyl, tương ứng, thành các thuốc tự do. Mặt khác, các kháng thể có hoạt tính enzym ("abzym") có thể được sử dụng để biến đổi thành các thuốc có hoạt tính tự do (tham khảo, ví dụ, Massey, 1987, Nature 328: 457-458). Các liên hợp Kháng thể-abzym có thể được điều chế theo các phương pháp đã biết để phân phối abzym vào tập hợp tế bào khối u, ví dụ, bằng cách liên kết cộng hóa trị enzym với kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người/các chất phản ứng liên kết chéo hai chức năng khác loại được thảo luận ở trên. Mặt khác, các protein dung hợp gồm ít nhất một vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế được liên kết với ít nhất một bộ phận hoạt hóa chức năng của enzym như được mô tả ở trên có thể được thiết kế bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp (tham khảo, ví dụ, Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608).

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn để sử dụng đoạn kháng thể kháng CD40, khác với kháng thể còn nguyên vẹn, để làm tăng sự thâm nhập vào khối u, ví dụ. Nó có thể mong muốn để biến đổi đoạn kháng thể để làm tăng chu kỳ bán thải của huyết thanh của nó. Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách kết hợp epitop liên kết thụ thể cứu hộ vào đoạn kháng thể. Theo một phương pháp, vùng thích hợp của đoạn kháng thể có thể bị ảnh hưởng (ví dụ, được đột biến), hoặc epitop có thể được kết hợp thành thể peptit sau đó được dung hợp thành đoạn kháng thể tại đầu hoặc ở giữa, ví dụ, nhờ sự tổng hợp ADN hoặc peptit. Tham khảo, ví dụ, WO 96/32478.

Theo các phương án khác, bao gồm cả các biến đổi cộng hóa trị của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người. Các biến đổi cộng hóa trị gồm sự biến đổi các gốc xysteiny, các gốc histidyl, lysinyl và các gốc đầu amino, các gốc arginyl, gốc tyrosyl, các nhóm bên carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl), gốc glutaminyl và asparaginyl, hoặc các gốc seryl, hoặc threonyl. Loại khác của biến đổi cộng hóa trị gồm có glycosit ghép cặp hóa học hoặc enzym với kháng thể. Các biến đổi này có thể được tiến hành bởi

sự tổng hợp hóa hoặc hoặc sự phân cắt hóa học hoặc enzym kháng thể, nếu thích hợp. Các loại biến đổi cộng hóa trị khác của kháng thể có thể được đưa vào phân tử nhờ phản ứng với các gốc axit amin định hướng của kháng thể với chất tạo dẫn xuất hữu cơ có khả năng phản ứng với các chuỗi bên được chọn hoặc các gốc đầu amino- hoặc carboxy-.

Sự loại bỏ các gốc carbohydrat bất kỳ có trên kháng thể có thể được hoàn thiện về hóa học hoặc enzym. Sự khử glycosyl hóa học được mô tả bởi Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 và bởi Edge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131. Sự phân cắt enzym của các gốc carbohydrat trên các kháng thể có thể đạt được bằng cách sử dụng các endo- và exo-glycosidaza khác nhau như được mô tả bởi Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

Loại biến đổi cộng hóa trị hữu ích khác bao gồm sự liên kết của kháng thể với một trong các polyme không có protein khác nhau, ví dụ, polyetylen glycol, polypropylen glycol, hoặc polyoxyalkylen, theo cách thức được đưa ra trong một hoặc nhiều US 4640835, US 4.496.689, US 4.301.144, US 4.670.417, US 4791192 và US 4.179.337.

Các biến thể làm tương thích với người và trình tự axit amin

Các biến thể của trình tự axit amin của kháng thể kháng CD40 có thể được điều chế bằng cách đưa vào nucleotit thích hợp thay đổi thành ADN của kháng thể kháng CD40, hoặc bởi sự tổng hợp peptit. Các biến thể này gồm, ví dụ, loại bỏ từ, và/hoặc chèn vào và/hoặc thế, các gốc trong các trình tự axit amin của các kháng thể kháng CD40 trong các ví dụ theo sáng chế. Sự kết hợp bất kỳ của sự loại bỏ, sự chèn, và sự thế được tiến hành để tạo ra sản phẩm thiết kế cuối cùng, đề xuất rằng sản phẩm thiết kế cuối cùng mang các đặc tính mong muốn. Sự thay đổi axit amin cũng có thể làm thay đổi các quy trình sau dịch mã của kháng thể kháng CD40 biến thể hoặc được làm tương thích với người, như sự thay đổi số lượng hoặc vị trí của các vị trí glycosyl hóa.

Phương pháp hữu ích để nhận biết các gốc nhất định hoặc các vùng trong kháng thể kháng CD40 là các vị trí được ưu tiên để gây ra đột biến được gọi là "sự gây đột biến quét alanin," như được mô tả bởi Cunningham và Wells (Science, 244:1081-1085 (1989)). Do đó, gốc hoặc nhóm các gốc đích được nhận biết (ví dụ, các gốc được nạp như arg, asp, his, lys, và glu) và được thay thế bởi axit amin tích điện âm hoặc trung hòa (thường là alanin) để tác động đến sự tương tác của các axit amin với kháng nguyên CD40. Các vị trí của axit amin trên chứng minh tính nhạy cảm về chức năng với các

phần tử thể khi được tinh chế bằng cách đưa vào các kháng thể khác tại, hoặc với, các vị trí thể. Do đó, trong khi vị trí đưa sự biến đổi của trình tự axit amin được định trước, bản chất của sự đột biến thực chất không cần được định trước. Ví dụ, để phân tích hiệu suất của đột biến tại vị trí đã biết, sự sàng lọc alanin hoặc sự gây đột biến ngẫu nhiên được tiến hành tại codon hoặc vùng đích và các biến thể của kháng thể kháng CD40 được biểu hiện được sàng lọc đối với hoạt tính mong muốn.

Trình tự axit amin chèn vào gồm các dung hợp đầu amino- và/hoặc đầu carboxyl- sắp xếp theo chiều dài từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm hoặc nhiều hơn các gốc, cũng như các đoạn chèn bên trong trình tự của các gốc axit amin đơn hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về các đoạn chèn đầu gồm kháng thể kháng CD40 được dung hợp với đuôi epitop. Các biến thể chèn khác của phân tử kháng thể kháng CD40 gồm đoạn dung hợp với đầu N- hoặc C-của kháng thể kháng CD40 của enzym hoặc polypeptit làm tăng chu kỳ bán thải của huyết thanh trong kháng thể.

Loại biến thể khác là biến thể thể axit amin. Các biến thể này có ít nhất một gốc axit amin trong phân tử kháng thể kháng CD40 được loại bỏ và gốc khác được chèn vào vị trí của nó. Các vị trí có mối quan tâm nhiều nhất là sự gây đột biến thể gồm các vùng biến thể cao, nhưng các biến đổi FR cũng được sự tính. Các phần tử thể bảo thủ được chỉ ra trong Bảng 5 dưới tiêu đề "các phần tử thể được ưu tiên". Nếu các phần tử thể này dẫn đến sự thay đổi về hoạt tính sinh học, thì các thay đổi đáng kể hơn, được gọi là "các phần tử thể minh họa", hoặc như được mô tả thêm dưới đây đối với các lớp axit amin, có thể được đưa vào và các sản phẩm được sàng lọc.

Bảng 5

Gốc ban đầu	Các phần tử thể minh họa	Các phần tử thể được ưu tiên
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp

Gly (G)	ala	ala
His (H)	arg; asn; gln; lys	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	ile; norleucine; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	tyr; leu; val; ile; ala;	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	phe;trp; thr; ser	phe
Val (V)	leu; ile; met; phe ala; norleucine	leu

Hóa protein, thường được chấp nhận các đặc tính sinh học của kháng thể có thể được hoàn thành bằng cách chọn lọc các phân tử thể khác đáng kể so với tác dụng của chúng đối với sự duy trì (a) cấu trúc của khung polypeptit trong vùng của phân tử thể, ví dụ, như hình dạng tấm hoặc dạng xoắn ốc, (b) sự nạp hoặc tính kỵ nước của phân tử tại vị trí đích, hoặc (c) kích thước của chuỗi bên. Các gốc xuất hiện tự nhiên được chia thành các nhóm trên cơ sở các đặc tính chuỗi bên phổ biến:

- (1) tính kỵ nước: norleuxin, met, ala, val, leu, ile;
- (2) tính ưa nước trung tính: cys, ser, thr;
- (3) tính axit: asp, glu;
- (4) tính bazơ: asn, gin, his, lys, arg;
- (5) các gốc ảnh hưởng đến sự định hướng của chuỗi: gly, pro; và
- (6) tính thơm: trp, tyr, phe.

Các phân tử thể không bảo toàn sẽ cần sự trao đổi một bộ phận trong một trong các lớp này với lớp khác.

Gốc xystein bất kỳ không bao gồm sự duy trì hình dạng thích hợp của kháng thể kháng CD40 biến đổi hoặc được làm tương thích với người cũng có thể được thể, nói chung là với serin, để cải thiện độ ổn định oxy hóa của phân tử, ngăn chặn liên kết chéo

khác thường, hoặc tạo ra các điểm được thiết lập của sự kết hợp với hợp chất gây độc tế bào hoặc kìm tế bào. Ngược lại, (các) liên kết xystein có thể được bổ sung vào kháng thể để cải thiện độ ổn định của nó (cụ thể là trong đó kháng thể là đoạn kháng thể như đoạn Fv).

Loại biến thể thay thế gồm sự thế một hoặc nhiều gốc vùng biến thể cao của kháng thể gốc (ví dụ, kháng thể ở người hoặc được làm tương thích với người). Nói chung, (các) biến thể tạo thành được chọn để phát triển thêm sẽ được cải thiện các đặc tính sinh học tương ứng với kháng thể gốc từ khi chúng được tạo ra. Cách thuận lợi để tạo ra các biến thể thế này là sự thuần thực về ái lực sử dụng sử dụng sự bộc lộ thể thực khuẩn. Một cách vắn tắt, một vài vị trí trong vùng biến đổi cao (ví dụ, các vị trí 6-7) được gây đột biến để tạo ra tất cả các phân tử thể axit amin có thể có tại mỗi vị trí. Các biến thể của kháng thể đã tạo ra được bộc lộ theo kiểu đơn trị từ các phân tử thực khuẩn thể dạng sợi như sự dung hợp với sản phẩm gen III của M13 được bao bọc bên trong mỗi phân tử. Các biến thể được bộc lộ thể thực khuẩn sau đó sàng lọc hoạt tính sinh học của chúng (ví dụ ái lực liên kết). Để nhận biết các vị trí trong vùng biến thể cao của đối tượng được lựa chọn để biến đổi, sự gây đột biến quét alanin có thể được tiến hành để nhận biết các gốc vùng biến thể cao góp phần đáng kể vào liên kết kháng nguyên. Mặt khác, hoặc thêm vào đó, nó có thể có lợi để phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để nhận biết các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và CD40 ở người. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận là các đối tượng được lựa chọn để thế theo các kỹ thuật được nói thêm chi tiết theo sáng chế. Một lần nữa các biến thể này được tạo ra, một nhóm các biến thể phụ thuộc vào sự sàng lọc như được mô tả theo sáng chế và các kháng thể có các đặc tính cao hơn trong một hoặc nhiều thử nghiệm có liên quan có thể phụ thuộc vào sự phát triển.

Loại biến thể của axit amin khác của kháng thể thay đổi mẫu glycosyl hóa ban đầu của kháng thể. Bằng cách "biến đổi" có nghĩa là xóa bỏ một hoặc nhiều gốc carbohydrat được tìm thấy trong kháng thể, và/hoặc bổ sung một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa không có trong kháng thể.

Theo một vài phương án thực hiện, có thể mong muốn để biến đổi các kháng thể theo sáng chế để bổ sung vào các vị trí glycosyl. Sự glycosyl hóa các kháng thể thường được liên kết với N hoặc liên kết với O. Được liên kết N đề cập đến sự gắn gốc

carbohydrat vào mạch bên của gốc asparagin. Các trình tự tripeptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là các trình tự nhận diện sự gắn enzym của gốc carbohydrat với chuỗi bên asparagin. Do đó, sự có mặt của các trình tự tripeptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa có hiệu lực. Glycosyl hóa được liên kết O đề cập đến sự gắn một trong các đường N-axeylgalactosamin, galactosa, hoặc xyloza với axit hydroxyamino, serin hoặc threonin phổ biến nhất, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể được sử dụng. Do đó, để glycosyl hóa protein đã biết, ví dụ, một kháng thể, trình tự axit amin của protein được thiết kế để chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit được mô tả ở trên (với các vị trí glycosyl hóa được liên kết N). Sự biến đổi cũng có thể được tiến hành bằng cách bổ sung, hoặc thay thế, một hoặc nhiều các gốc serin hoặc threonin vào trình tự của kháng thể gốc (đối với các vị trí glycosyl hóa được liên kết O).

Các phân tử axit nucleic mã hóa các biến thể của trình tự axit amin trong kháng thể kháng CD40 được điều chế bởi các phương pháp khác nhau đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phương pháp này gồm, nhưng không giới hạn với, sự phân lập từ nguồn tự nhiên (trong trường hợp các biến thể của trình tự axit amin xuất hiện tự nhiên) hoặc sự điều chế bởi sự gây đột biến được trung gian bởi oligonucleotit (hoặc được định hướng vị trí), sự gây đột biến PCR, và sự gây đột biến caset của biến thể được điều chế sớm hơn hoặc phiên bản không phải biến thể của kháng thể kháng CD40.

Polynucleotit, vectơ, các tế bào chủ và các phương pháp tái tổ hợp

Các phương án thực hiện khác bao gồm các polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người, vectơ, và các tế bào chủ bao gồm các polynucleotit, và các kỹ thuật tái tổ hợp để sản xuất kháng thể được làm tương thích với người. Các polynucleotit được phân lập có thể mã hóa dạng mong muốn bất kỳ của kháng thể kháng CD40 gồm, ví dụ, các kháng thể đơn dòng toàn bộ chiều dài, các đoạn Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, các kháng thể đặc hiệu kép tái tổ hợp, các kháng thể tuyến tính, các phân tử kháng thể chuỗi đơn, và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các đoạn kháng thể.

Một vài phương án gồm các polynucleotit được phân lập bao gồm các trình tự mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO. 1 đến SEQ ID NO.4, SEQ ID NO:27, SEQ ID

NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, hoặc SEQ ID NO: 40. Một vài phương án gồm các polynucleotit được phân lập bao gồm các trình tự mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, hoặc SEQ ID NO:36

Theo một khía cạnh, (các) trình tự polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27 và SEQ ID NO:26, tương ứng; SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:26, tương ứng; SEQ ID NO:29 và SEQ ID NO:26, tương ứng; SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:26, tương ứng; SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:31, tương ứng; SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:31, tương ứng; SEQ ID NO:34 và SEQ ID NO:31, tương ứng; SEQ ID NO:35 và SEQ ID NO:31, tương ứng; SEQ ID NO:37 và SEQ ID NO:36, tương ứng; SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:36, tương ứng; SEQ ID NO:39 và SEQ ID NO:36, tương ứng; SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:36, tương ứng.

(Các) polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người hoặc đoạn hoặc chuỗi của chúng có thể được dung hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa hoặc trình tự điều khiển, như được biến trong lĩnh vực kỹ thuật, và có thể chứa trong các vector biểu hiện thích hợp hoặc tế bào chủ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Mỗi phân tử polynucleotit mã hóa các miền biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ có thể độc lập được dung hợp thành trình tự polynucleotit mã hóa miền hằng định, như miền hằng định ở người, có khả năng sản xuất các kháng thể còn nguyên vẹn. Nói cách khác, các polynucleotit, hoặc các phần của chúng, có thể được dung hợp cùng nhau, tạo ra mẫu để sản xuất kháng thể chuỗi đơn.

Với sự sản xuất tái tổ hợp, polynucleotit mã hóa kháng thể được chèn vào vector tái bản để tách dòng (sự phóng đại của ADN) hoặc để biểu hiện. Nhiều vector thích hợp để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp sẵn có. Các thành phần vector thường gồm, nhưng không giới hạn với, một hoặc nhiều trình tự sau: trình tự tín hiệu, nguồn gốc của sự tái bản, một hoặc nhiều gen chỉ thị, yếu tố của vùng tăng cường, vùng khởi động, và trình tự kết thúc phiên mã.

Các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người cũng có thể được sản xuất dưới dạng các polypeptit dung hợp, trong đó kháng thể được dung hợp với

polypeptit khác loại, như trình tự tín hiệu hoặc các polypeptit khác có vị trí phân cắt đặc hiệu tại đầu amino của protein hoặc polypeptit trưởng thành. Trình tự tín hiệu khác loại được lựa chọn thường là trình tự được nhận diện và được xử lý (tức là được phân cắt bởi peptidaza tín hiệu) bằng tế bào chủ. Với các tế bào chủ nhân sơ không được nhận diện và xử lý trình tự tín hiệu kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người, trình tự tín hiệu có thể được thế bởi trình tự tín hiệu của tế bào nhân sơ. Trình tự tín hiệu có thể, ví dụ, là phosphatasa kiềm, penicilinaza, lipoprotein, các vùng dẫn đầu enterotoxin II ổn định nhiệt, và các vùng tương tự. Đối với sự bài tiết của nấm men, trình tự tín hiệu tự nhiên có thể được thế, ví dụ, với trình tự dẫn đầu thu được từ nhân tố alpha invertaza ở nấm men (gồm các trình tự dẫn đầu nhân tố α của *Saccharomyces* và *Kluyveromyces*), axit phosphatasa, *C. albicans* glucoamylaza, hoặc tín hiệu được mô tả trong WO90/13646. Ở các tế bào động vật có vú, các trình tự tín hiệu của động vật có vú cũng như trình tự dẫn đầu kích thích bài tiết ở virus, ví dụ, tín hiệu gD bệnh rộp da không đau, có thể được sử dụng. ADN với vùng tiền chất này được nối trong khung đọc mở với ADN mã hóa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người.

Các vector biểu hiện và các vector tách dòng chứa trình tự axit nucleic có thể là vector tái bản trong một hoặc nhiều tế bào chủ được chọn. Nói chung, trong các vector tách dòng trình tự này là trình tự có khả năng làm vector tái bản độc lập với ADN nhiễm sắc thể vật chủ, và gồm các nguồn gốc của sự tái bản hoặc các trình tự tái bản tự trị. Các trình tự này đã được biết bởi các vi khuẩn khác nhau, nấm men, và virus. Nguồn gốc của sự tái bản từ plasmid pBR322 thích hợp với hầu hết vi khuẩn Gram-âm, nguồn gốc plasmid 2- ν thích hợp cho nấm men, và các nguồn gốc virus khác nhau (SV40, polyoma, adenovirus, VSV, và BPV) hữu ích với các vector tách dòng trong các tế bào của động vật có vú. Nói chung, nguồn gốc của thành phần tái bản không cần không cần thiết với các vector biểu hiện ở động vật có vú (nguồn gốc SV40 thường có thể được sử dụng chỉ vì nó chứa trình tự khởi đầu sớm).

Các vector biểu hiện và tách dòng có thể chứa gen mã hóa chỉ thị có thể chọn lọc để dễ dàng nhận biết sự biểu hiện. Các gen chỉ thị có thể chọn lọc điển hình mã hóa protein truyền tính kháng kháng sinh hoặc các độc tố khác, ví dụ, ampicilin, neomycin, methotrexat, hoặc tetracyclin, hoặc nói cách khác, là các thiếu hụt dinh dưỡng thụ động của bộ thể, hoặc theo các cách khác bổ sung các chất dinh dưỡng đặc trưng không có trong môi trường phức hợp, ví dụ, gen mã hóa D-alanine racemaza của *Bacilli*.

Một ví dụ của sơ đồ chọn lọc sử dụng thuốc làm ngừng sự phát triển của tế bào chủ. Các tế bào khác được biến đổi thành công bởi gen khác loại tạo ra protein mang tính kháng thuốc và do đó tồn tại chế độ chọn lọc. Các ví dụ về sự chọn lọc chiếm ưu thế sử dụng các thuốc neomycin, axit mycophenolic, và hygromycin. Các chỉ thị có thể chọn lọc phổ biến với các tế bào động vật có vú là các chỉ thị có khả năng nhận biết các tế bào có hiệu lực hấp thụ axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người, như DHFR (dihydrofolat reductaza), thymidin kinaza, metallothionein-I và -II (như các gen metallothionein ở động vật linh trưởng), adenosin deaminaza, ornithin decarboxylaza, và các kháng thể tương tự. Các tế bào được biến đổi bởi gen chọn lọc DHFR ban đầu được nhận biết bằng cách cấy tất cả các thể biến nạp trong môi trường nuôi cấy chứa methotrexat (Mtx), chất đối kháng cạnh tranh của DHFR. Tế bào chủ thích hợp khi DHFR loại dại được sử dụng trong dòng tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung quốc (CHO) thiếu hụt về hoạt tính DHFR (ví dụ, DG44).

Nói cách khác, các tế bào chủ (đặc biệt là các vật chủ kiểu dại chứa DHFR nội sinh) được biến đổi hoặc được biến đổi đồng thời bởi các trình tự ADN mã hóa kháng thể kháng CD40, protein DHFR loại dại, và chỉ thị có thể chọn lọc khác như aminoglycosit 3'-phosphotransferaza (APH), có thể được chọn bằng các phát triển tế bào trong môi trường chứa chất chọn lọc với chỉ thị có thể chọn lọc như thuốc kháng sinh aminoglycosidic, ví dụ, kanamycin, neomycin, hoặc G418. Tham khảo, ví dụ US 4965199.

Trong đó sự sản xuất tái tổ hợp được tiến hành trong tế bào nấm men dưới dạng tế bào chủ, gen TRP1 có trong plasmit nấm men YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) có thể được sử dụng làm chỉ thị chọn lọc. Gen TRP1 tạo ra chỉ thị chọn lọc cho chủng đột biến của nấm men thiếu khả năng để phát triển trong tryptophan, ví dụ, ATCC Số 44076 hoặc PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). Sự có mặt của thương tổn trp1 trong bộ gen tế bào chủ nấm men tạo ra môi trường hữu hiệu để phát hiện sự biến đổi bởi sự phát triển khi không có tryptophan. Tương tự, các chủng nấm men thiếu Leu2p như ATCC 20622 và 38626 được bổ sung bởi các plasmit đã biết mang gen LEU2.

Thêm vào đó, các vectơ có nguồn gốc từ 1,6µm plasmit vòng pKD1 có thể được sử dụng để biến đổi của nấm men *Kluyveromyces*. Mặt khác, hệ thống biểu hiện để sản xuất với quy mô lớn chymosin tái tổ hợp ở bê được báo cáo với *K. lactis* (Van den Berg,

1990, Bio/Technology 8:135). Các vector biểu hiện nhiều bản sao ổn định để bài tiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp trưởng thành bởi các chủng công nghiệp của *Kluyveromyces* cũng được bộc lộ (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

Các vector biểu hiện và tách dòng thường chứa trình tự khởi đầu được nhận diện bởi sinh vật chủ và được liên kết hiệu quả với phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD40 hoặc chuỗi polypeptit của chúng. Các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng các vật chủ là tế bào nhân sơ gồm trình tự khởi đầu *phoA*, các hệ thống khởi đầu β -lactamaza và lactoza, phosphataza kiềm, hệ thống trình tự khởi đầu tryptophan (*trp*), và các trình tự khởi đầu lai như trình tự khởi đầu *tac*. Các trình tự khởi đầu vi khuẩn đã biết khác cũng thích hợp. Các trình tự khởi đầu sử dụng trong hệ thống vi khuẩn cũng sẽ chứa trình tự Shine-Dalgarno (S.D.) được liên kết hiệu quả với ADN mã hóa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người.

Nhiều trình tự khởi đầu của tế bào nhân thực đã biết. Hầu như tất cả các gen tế bào nhân thực có vùng giàu AT được định vị khoảng từ 25 đến 30 bazơ ngược chiều từ vị trí trong đó sự phiên mã được bắt đầu. Trình tự khác được tìm thấy từ 70 đến 80 bazơ ngược chiều từ khi bắt đầu phiên mã của nhiều gen là vùng CNCAAT trong đó N có thể là nucleotit bất kỳ. Tại đầu 3' của hầu hết các gen tế bào nhân thực là trình tự AATAAA có thể là tín hiệu để bổ sung đuôi poly A vào đầu 3' của trình tự mã hóa. Tất cả các trình tự này được chèn thích hợp vào các vector biểu hiện của tế bào nhân thực.

Các ví dụ về các trình tự khởi động thích hợp để sử dụng bởi các vật chủ nấm men gồm trình tự khởi đầu với 3-phosphoglyxerat kinaza hoặc các enzym phân hủy đường khác, như enolaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglyxerat mutaza, pyruvat kinaza, triosephosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza, và glucokinaza.

Trình tự khởi đầu cảm ứng được có ưu điểm khác của sự phiên mã được kiểm soát bởi các điều kiện phát triển. Trình tự khởi đầu này gồm các vùng trình tự khởi đầu nấm men dành cho dehydrogenaza 2 rượu, isoxytocrom C, phosphataza axit, các enzym dẫn xuất có liên quan đến sự chuyển hóa nitơ, metallothionein, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, và các enzym chịu trách nhiệm để sử dụng maltoza và galactoza. Các vector thích hợp và trình tự khởi đầu sử dụng trong sự biểu hiện nấm men được mô tả

thêm trong EP 73657. Các vùng tăng cường nấm men được sử dụng có lợi với các trình tự khởi đầu của nấm men.

Sự phiên mã kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người từ vector trong các tế bào vật chủ của động vật có vú được kiểm soát, ví dụ, bởi các trình tự khởi đầu thu được từ các bộ gen của virus như virus polyoma, virus fowlpox, adenovirus (như Adenovirus 2), virus u nhú của bò, virus xacôm ở chim, xytomegalovirus, retrovirus, virus viêm gan B và Virus khí 40 (SV40), từ các trình tự khởi đầu ở động vật có vú khác loại, ví dụ, trình tự khởi đầu actin hoặc trình tự khởi đầu globulin miễn dịch, hoặc từ trình tự khởi đầu sốc nhiệt, tạo ra các trình tự khởi đầu này có thể tương thích với các hệ thống tế bào chủ.

Các trình tự khởi đầu sớm và muộn của virus SV40 thu được một cách thuận lợi dưới dạng đoạn giới hạn SV40 cũng chứa virus SV40 nguồn gốc của sự tái bản. Trình tự khởi đầu sớm trung gian của xytomegalovirus ở người thu được một cách thuận lợi dưới dạng đoạn giới hạn HindIII E. Hệ thống biểu hiện ADN trong các vật chủ động vật có vú sử dụng virus u nhú ở bò dưới dạng vector được bộc lộ trong Đơn xin cấp Pat. Số 4419446. Sự cải biến hệ thống này được bộc lộ trong US 4601978. Tham khảo thêm Reyes et al., 1982, Nature 297:598-601, bộc lộ sự biểu hiện p-interferon cADN ở người trong các tế bào chuột dưới sự kiểm soát trình tự khởi đầu kinaza thymidin từ virus bệnh rộp da không đau. Nói cách khác, sự lặp lại phần cuối dài virus xacôm rous có thể được sử dụng làm trình tự khởi đầu.

Bộ phận hữu ích khác có thể được sử dụng trong vector biểu hiện tái tổ hợp là trình tự vùng tăng cường, được sử dụng để làm tăng sự phiên mã ADN mã hóa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người bởi các tế bào nhân thực cao hơn. Nhiều trình tự tăng cường đã được biết từ các gen ở động vật có vú (ví dụ, globin, elastaza, albumin, α -fetoprotein, và insulin). Tuy nhiên, thông thường, vùng tăng cường từ virus tế bào nhân thực được sử dụng. Các ví dụ gồm vùng tăng cường SV40 muộn có nguồn gốc tái bản (bp 100-270), vùng tăng cường của trình tự khởi đầu sớm, vùng tăng cường polyoma trên phía chậm có nguồn gốc tái bản, và các vùng tăng cường adenovirus. Tham khảo Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 về sự mô tả các yếu tố tăng cường để hoạt hóa các trình tự khởi đầu của tế bào nhân thực. Vùng tăng cường có thể được ghép vào vector tại

vị trí 5' hoặc 3' với trình tự mã hóa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người, nhưng tốt hơn là được định vị tại vị trí 5' từ trình tự khởi đầu.

Các vector biểu hiện được sử dụng trong các tế bào chủ nhân thực (nấm men, nấm mốc, côn trùng, thực vật, động vật, người, hoặc các tế bào có nhân từ các sinh vật đa bào khác) cũng có thể chứa các trình tự cần thiết cho sự kết thúc sự phiên mã và để ổn định mRNA. Các trình tự này thường có sẵn từ 5' và, đôi khi là 3', các vùng không được dịch mã của các ADN hoặc cADN của tế bào nhân thực hoặc virus. Các vùng này chứa các đoạn nucleotit được phiên mã dưới dạng các đoạn được polyadenyl hóa trong phần không được dịch mã của mRNA mã hóa kháng thể kháng CD40. Một thành phần kết thúc phiên mã hữu ích là vùng polyadenyl hóa sinh trưởng ở bò. Tham khảo WO94/11026 và vector biểu hiện theo sáng chế. Theo một vài phương án thực hiện, các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ thống CHEF. (Tham khảo, ví dụ, US 5888809; phần mô tả được kết hợp để tham khảo theo sáng chế.)

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện ADN trong các vector theo sáng chế là các tế bào nhân sơ, nấm men, hoặc các tế bào nhân thực bậc cao được mô tả ở trên. Các tế bào nhân sơ thích hợp với mục đích này gồm vi khuẩn thực, như các sinh vật Gram-âm hoặc Gram-dương, ví dụ, Enterobacteriaceae như *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*, Vi khuẩn trong ruột, *Erwinia*, Vi khuẩn gram âm, *Amip*, khuẩn *Salmonella*, ví dụ, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, ví dụ, *Serratia marcescans*, và *Shigella*, cũng như *Bacillus* như *B. subtilis* và *B. licheniformis* (ví dụ, *B. licheniformis* 41 P được bộc lộ trong DD 266710, 12/04/1989), *Pseudomonas* như *P. aeruginosa*, và *Streptomyces*. Một vật chủ tách dòng *E. coli* được ưu tiên là *E. coli* 294 (ATCC 31,446), mặc dù các chủng khác như *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), và *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) thích hợp. Các ví dụ này dùng để minh họa nhiều hơn là để giới hạn.

Cộng thêm các vi khuẩn nhân sơ, tế bào nhân thực như nấm sợi hoặc nấm men thích hợp với các vật chủ biểu hiện hoặc tách dòng với các vector mã hóa kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người. *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc nấm men bánh mì nói chung, được sử dụng phổ biến nhất được sử dụng trong số các vi sinh vật chủ tế bào nhân thực bậc thấp. Tuy nhiên, số lượng giống khác, loài, và các chủng có sẵn phổ biến và hữu ích theo sáng chế, như các vật chủ *Schizosaccharomyces pombe*;

Kluyveromyces như, ví dụ, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, và *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* như *Schwanniomyces occidentalis*; và nấm sợi như, ví dụ, các tế bào chủ *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, và *Aspergillus* như *A. nidulans* và *A. niger*.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được glycosylat hóa có nguồn gốc từ các sinh vật đa bào. Các ví dụ về các tế bào của loài không xương sống gồm các tế bào thực vật và các tế bào côn trùng, gồm, ví dụ, nhiều chủng baculovirus và các biến thể và các tế bào chủ côn trùng tùy ý tương ứng như *Spodoptera frugiperda* (sâu bướm), *Aedes aegypti* (muỗi), *Aedes albopictus* (muỗi), *Drosophila melanogaster* (ruồi giấm), và *Bombyx mori* (tằm). Các chủng virus khác nhau để gây nhiễm có sẵn, ví dụ, biến thể L-1 của *Autographa californica* NPV và chủng Bm-5 của *Bombyx mori* NPV, và các virus này có thể được sử dụng, đặc biệt là để gây nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các giống tế bào thực vật của bông, ngô, khoai tây, đậu tương, dứa, thảo, cà chua, và thuốc lá cũng có thể được sử dụng làm các vật chủ.

Theo một khía cạnh khác, sự biểu hiện kháng CD40 được làm tương thích với người được tiến hành trong các tế bào của động vật có xương sống. Sự nhân giống các tế bào động vật có xương sống trong canh trường (canh trường mô) đã trở thành quy trình và kỹ thuật thông thường có sẵn rộng rãi. Các ví dụ về các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến đổi bởi SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), dòng phôi thận ở người (các tế bào 293 hoặc 293 được tạo các dòng phụ cho sự phát triển trong canh trường huyền phù, (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), các tế bào thận chuột đồng sơ sinh (BHK, ATCC CCL 10), các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc/-DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; ví dụ, DG44), các tế bào sertoli ở chuột (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), các tế bào thận ở khỉ (CV1 ATCC CCL 70), các tế bào thận khỉ xanh Châu phi (VERO-76, ATCC CRL-1587), các tế bào ung thư biểu mô cổ ở người (HELA, ATCC CCL 2), các tế bào thận chó (MDCK, ATCC CCL 34), các tế bào gan ở chuột trụi (BRL 3A, ATCC

CRL 1442), các tế bào phổi người (W138, ATCC CCL 75), các tế bào gan người (Hep G2, HB 8065), khối u vú ở chuột (MMT 060562, ATCC CCL51), các tế bào TR1 (Mather et al., 1982, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68), các tế bào MRC 5, các tế bào FS4, và dòng ung thư gan ở người (Hep G2).

Các tế bào chủ được biến nạp với các vector tách dòng hoặc biểu hiện được mô tả ở trên với sự sản xuất kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người và được cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được biến đổi thích hợp để tạo ra trình tự khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp, hoặc khuếch đại các gen mã hóa các trình tự mong muốn.

Các tế bào chủ được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được mô tả theo sáng chế có thể được cấy trong môi trường khác nhau. Môi trường có bán trên thị trường như Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), và Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) thích hợp để cấy các tế bào chủ. Thêm vào đó, bất kỳ môi trường nào được mô tả trong một hoặc nhiều Ham et al., 1979, *Meth. Enz.* 58: 44, Barnes et al., 1980, *Anal. Biochem.* 102: 255, US 4767704, US 4657866, US 4.927.762, US 4.560.655, US 5122469, WO 90/103430, và WO 87/00195 có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy dành cho các tế bào chủ. Môi trường bất kỳ trong số các môi trường này có thể được bổ sung các hormon và/hoặc các yếu tố sinh trưởng khác (như insulin, transferin, hoặc yếu tố sinh trưởng biểu bì), các muối (như natri clorua, canxi, magie, và phosphat), các đệm (như HEPES), nucleotit (như adenosin và thymidin), các thuốc kháng sinh (như gentamixin), các nguyên tố vi lượng (được định rõ dưới dạng các hợp chất vô cơ thường ngăn cản tại nồng độ cuối cùng trong khoảng micromol), và glucoza hoặc nguồn năng lượng tương đương nếu cần thiết. Các phần bổ sung khác cũng có thể gồm với nồng độ thích hợp sẽ được biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, pH, và các điều kiện tương tự, là các điều kiện được sử dụng trước đây bởi tế bào chủ được chọn lọc để biểu hiện, và sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Khi sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, kháng thể có thể được sản xuất nội bào, trong khe quanh tế bào chất, hoặc được tiết ra trực tiếp vào môi trường. Nếu kháng thể được

tạo ra nội bào, các tế bào có thể bị phá vỡ để giải phóng protein như bước thứ nhất. Mảnh vỡ dạng hạt, hoặc các tế bào chủ hoặc các đoạn phân giải, có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc. Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167 mô tả quy trình phân lập các kháng thể được tiết ra vào khe quanh tế bào chất của *E. coli*. Tóm lại, hỗn hợp tế bào được làm tan khi có mặt natri axetat (pH=3,5), EDTA, và phenylmetylsulfonylflorua (PMSF) trong khoảng thời gian 30 phút. Mảnh vụn tế bào có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm. Trong đó kháng thể được tiết ra vào môi trường, phần nổi trên mặt từ các hệ thống biểu hiện này ban đầu thường được cô đặc bằng cách sử dụng máy lọc nồng độ protein có bán trên thị trường, ví dụ, bộ phận siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Chất ức chế proteaza như PMSF có thể gồm bước bất kỳ trong số các bước trước để ức chế sự phân giải protein và các thuốc kháng sinh có thể được gồm để ngăn chặn sự phát triển của các tạp chất ngẫu nhiên. Các phương pháp khác nhau có thể được sử dụng để phân lập kháng thể từ tế bào chủ.

Chế phẩm kháng thể được điều chế từ các tế bào có thể được tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, phương pháp sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách, và sắc ký ái lực, với phương pháp sắc ký ái lực là kỹ thuật tinh chế điển hình. Sự thích hợp của protein A là phối tử ái lực phụ thuộc vào loài và isotyp của miền Fc globulin miễn dịch bất kỳ có trong kháng thể. Protein A có thể được sử dụng để tinh chế các kháng thể trên cơ sở các chuỗi nặng γ_1 , γ_2 , hoặc γ_4 ở người (tham khảo, ví dụ, Lindmark et al., 1983 *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). Protein G được đưa ra với tất cả các isotyp ở chuột và với γ_3 ở người (tham khảo, ví dụ, Guss et al., 1986 *EMBO J.* 5:1567-1575). Chất nền với phối tử ái lực được gắn thường xuyên nhất là agarosa, hơn là các chất nền khác có sẵn. Các chất nền ổn định cơ học như thủy tinh lỗ rỗng được kiểm soát hoặc poly(styrenedivinyl)benzen cho phép lưu lượng nhanh hơn và thời gian xử lý ngắn hơn có thể đạt được bằng agarosa. Trong đó kháng thể bao gồm miền CH_3 , nhựa Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) hữu ích để tinh chế. Các kỹ thuật khác để tinh chế protein như sự cất phân đoạn trên cột trao đổi ion, sự kết tủa etanol, HPLC pha đảo, phương pháp sắc ký trên silic dioxit, phương pháp sắc ký trên heparin SEPHAROSE™ trên nhựa trao đổi anion hoặc cation (như cột axit polyaspartic), sắc ký tập trung, SDS-PAGE, và sự kết tủa amoni sulfat cũng phụ thuộc sẵn có vào kháng thể được thu lại.

Sau (các) bước tinh chế ban đầu bất kỳ, hỗn hợp bao gồm kháng thể đang nói đến và các tạp chất có thể phụ thuộc vào phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước có pH thấp

sử dụng đệm rửa giải tại pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, thường được tiến hành với các nồng độ muối thấp (ví dụ, từ muối nằm trong khoảng từ 0 đến 0,25M).

Ngoài ra cũng gồm các axit nucleic lai giống dưới các điều kiện có tính chính xác thấp, trung bình, và cao, như được định rõ theo sáng chế, với tất cả hoặc một phần (ví dụ, phần mã hóa vùng biến đổi) của trình tự nucleotit được thể hiện bởi (các) trình tự polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có miền biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.27 và SEQ ID NO.:26, tương ứng; SEQ ID NO.28 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.29 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.32 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.33 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.34 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.35 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.37 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID NO.38 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID NO.40 và SEQ ID NO. 36, tương ứng. Phần lai của axit nucleic lai thường ít nhất bằng 15 (ví dụ, 20, 25, 30 hoặc 50) nucleotit về chiều dài. Phần lai của axit nucleic lai ít nhất bằng 80%, ví dụ, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 98%, giống hệt trình tự của một phần hoặc tất cả axit nucleic mã hóa polypeptit kháng CD40 (ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ), hoặc vùng bổ sung của nó. Sự lai các axit nucleic thuộc loại được mô tả ở đây có thể được sử dụng, ví dụ, dưới dạng mẫu dò tách dòng, mỗi, ví dụ, mỗi PCR, hoặc mẫu dò chẩn đoán.

Một vài phương án gồm các polynucleotit được phân lập gồm các trình tự mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% so với trình tự axit amin có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, hoặc SEQ ID NO:40. Theo một số phương án bao gồm các polynucleotit được phân lập gồm các trình tự mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% so với trình tự axit amin có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31 hoặc SEQ ID NO:36.

Theo một khía cạnh, (các) trình tự polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có miền biến đổi chuỗi nặng và cùng biến đổi chuỗi nhẹ, mỗi vùng gồm một trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% so với trình tự axit amin của kháng thể hoặc đoạn kháng thể có miền biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.27 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.28 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.29 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.32 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.33 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.34 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.35 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.37 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID NO.38 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID NO.40 và SEQ ID NO. 36, tương ứng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynuceotit theo một phương án được mô tả ở trên, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn kháng thể được mã hóa gồm các trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% so với trình tự axit amin của kháng thể hoặc đoạn kháng thể có miền biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin nêu trong, theo một phương án, SEQ ID NO.27 và SEQ ID NO.26, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.28 và SEQ ID NO.26, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.29 và SEQ ID NO.26, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.26, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.32 và SEQ ID NO.31, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.33 và SEQ ID NO.31, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.34 và SEQ ID NO.31, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.35 và SEQ ID NO.31, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.37 và SEQ ID NO.36, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.38 và SEQ ID NO.36, tương ứng; theo một phương án khác, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.36, tương ứng; và theo một phương án khác, SEQ ID NO.40 và SEQ ID NO. 36, tương ứng.

Theo sáng chế, các thuật ngữ "độ tương đồng" hoặc "phần trăm tương đồng," trong ngữ cảnh của hai hoặc nhiều hơn các axit nucleic hoặc trình tự polypeptit, đề cập đến một hoặc nhiều trình tự hoặc dưới trình tự giống nhau hoặc có tỷ lệ phần trăm các nucleotit được định rõ hoặc các gốc axit amin giống nhau, khi được so sánh và được sắp

thẳng hàng để tối đa hóa sự phù hợp. Để xác định phần trăm đồng nhất, các trình tự được sắp thẳng hàng để tối ưu các mục đích so sánh (ví dụ, các khoảng trống có thể được đưa vào trình tự của trình tự axit amin thứ nhất hoặc trình tự axit nucleic để sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ hai). Các gốc axit amin hoặc nucleotit tại các vị trí axit amin hoặc vị trí nucleotit tương ứng sau đó được so sánh. Khi vị trí trong trình tự thứ nhất được chiếm bởi gốc axit amin hoặc nucleotit tương tự như vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, sau đó các phân tử giống nhau tại vị trí đó. Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là chức năng của số lượng các vị trí đồng nhất được so sánh bởi các trình tự (tức là, $\% \text{ tương đồng} = \frac{\# \text{ của các vị trí tương đồng}}{\text{tổng số } \# \text{ của các vị trí}}$ (ví dụ, các vị trí chồng lấn) $\times 100$). Theo một vài phương án, hai trình tự được so sánh có chiều dài bằng nhau sau khi các khoảng trống được đưa vào các trình tự, nếu thích hợp (ví dụ, loại trừ trình tự bổ sung kéo dài theo trình tự được so sánh). Ví dụ, khi các trình tự vùng biến đổi được so sánh, các trình tự vùng dẫn đầu và/hoặc vùng hằng định không được xem xét. Với các phép so sánh trình tự giữa hai trình tự, CDR "tương ứng" đề cập đến CDR trong vị trí tương tự trong cả hai trình tự (ví dụ, CDR-H1 của mỗi trình tự).

Sự xác định phần trăm đồng nhất hoặc phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể được hoàn thiện bằng cách sử dụng thuật toán học. Ví dụ không giới hạn, được ưu tiên của thuật toán học được sử dụng để so sánh hai trình tự là thuật toán của Karlin và Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, được biến đổi trong Karlin và Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Thuật toán này được kết hợp vào các chương trình NBLAST và XBLAST của Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Các cách tìm kiếm nucleotit bằng BLAST có thể được tiến hành bởi chương trình NBLAST, điểm=100, độ dài chuỗi ký tự=12, để thu được các trình tự nucleotit tương đồng với axit nucleic mã hóa protein quan tâm. Các cách tìm kiếm protein BLAST có thể được tiến hành bởi chương trình XBLAST, điểm=50, độ dài chuỗi ký tự=3, để thu được các trình tự axit amin đồng nhất với protein đang nói đến. Để thu được các cách sắp xếp có khoảng cách dành cho các mục đích so sánh, BLAST có khoảng cách có thể được sử dụng như được mô tả trong Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Mặt khác, PSI-Blast có thể được sử dụng để tạo thành cách tìm kiếm lặp đi lặp lại phát hiện các mối liên hệ không rõ ràng giữa các phân tử (Id.). Khi sử dụng BLAST, BLAST có khoảng cách, và các chương trình PSI-Blast, các thông số xác lập mặc định của các chương trình tương ứng (ví dụ, XBLAST và NBLAST) có thể

được sử dụng. Ví dụ không giới hạn, được ưu tiên khác của thuật toán học được sử dụng để so sánh các trình tự trong thuật toán của Myers và Miller, CABIOS (1989). Thuật toán này được kết hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0) là một phần trong gói phần mềm sắp thẳng hàng trình tự GCG. Khi sử dụng chương trình ALIGN để so sánh các trình tự axit amin, bảng gốc trọng lượng PAM120, điểm phạt về chiều dài khoảng cách 12, và điểm phạt khoảng cách 4 có thể được sử dụng. Các thuật toán khác để phân tích trình tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và gồm ADVANCE và ADAM như được sử dụng trong Torellis và Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; và FASTA được mô tả trong Pearson và Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. Trong FASTA, ktup là một lựa chọn điều khiển để cài đặt tính nhạy cảm và tốc độ của nghiên cứu. Nếu ktup=2, các vùng tương tự trong hai trình tự được so sánh được tìm thấy bằng cách xem xét các cặp chuỗi được sắp thẳng hàng; nếu ktup=1, các trình tự axit amin được sắp thẳng hàng đơn được nghiên cứu. ktup có thể được đặt đến 2 hoặc 1 với trình tự protein, hoặc từ 1 đến 6 với các trình tự ADN. Sự xác lập mặc định nếu ktup không được định rõ là 2 với protein và 6 với ADN. Mặt khác, sự sắp xếp trình tự protein có thể được tiến hành bằng cách sử dụng thuật toán CLUSTAL W, như được mô tả bởi Higgins et al., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Việc sử dụng không nhằm mục đích điều trị bệnh

Các kháng thể được mô tả theo sáng chế hữu ích làm các chất tinh chế ái lực Trong quy trình này, các kháng thể được cố định trên pha rắn như nhựa protein A, sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Kháng thể được cố định được tiếp xúc với mẫu chứa protein CD40 (hoặc đoạn của chúng) được tinh chế, và do đó chất hỗ trợ được rửa bằng dung môi thích hợp sẽ cơ bản loại bỏ tất cả vật liệu ngoại trừ protein CD40, được liên kết với kháng thể cố định. Cuối cùng, chất hỗ trợ được rửa bằng dung môi thích hợp khác sẽ giải phóng protein CD40 khỏi kháng thể.

Các kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người cũng hữu ích trong các thử nghiệm chẩn đoán để phát hiện và/hoặc định lượng protein CD40, ví dụ phát hiện sự biểu hiện của CD40 trong các tế bào, mô, hoặc huyết thanh đặc hiệu.

Điều này sẽ là một ưu điểm trong một vài phương án, ví dụ, dành cho các mục đích chẩn đoán để đánh dấu kháng thể có gốc có thể phát hiện. Nhiều các vị trí đánh dấu có thể phát hiện có sẵn, gồm các đồng vị phóng xạ, đánh dấu huỳnh quang, đánh dấu cơ

chất enzym và các cách đánh dấu tương tự. Vị trí đánh dấu có thể được kết hợp gián tiếp với kháng thể sử dụng các kỹ thuật đã biết khác nhau. Ví dụ, kháng thể có thể liên hợp với biotin và loại bất kỳ trong số ba loại đánh dấu được đề cập ở trên có thể được liên hợp với avidin, hoặc ngược lại. Biotin liên kết chọn lọc với avidin và do đó, vị trí đánh dấu có thể được liên hợp với kháng thể theo cách gián tiếp này. Mặt khác, để đạt được sự liên hợp gián tiếp của vị trí đánh dấu với kháng thể, kháng thể có thể được liên hợp với hapten nhỏ (như digoxin) và một trong các loại đánh dấu khác nhau được đề cập ở trên được liên hợp với kháng thể kháng hapten (ví dụ, kháng thể kháng digoxin). Do đó, có thể đạt được sự liên hợp gián tiếp của vị trí đánh dấu với kháng thể.

Các cách đánh dấu đồng vị phóng xạ minh họa gồm ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H và ^{131}I . Kháng thể có thể được đánh dấu bởi đồng vị phóng xạ, sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong, ví dụ, *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, 1991, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. Tính phóng xạ có thể được đo, ví dụ, bằng máy đếm xung.

Vị trí đánh dấu huỳnh quang minh họa gồm các vị trí đánh dấu có nguồn gốc từ các chelat đất hiếm (các chelat europi) hoặc florescein và các dẫn xuất của nó, rhodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, Lisamin, phycoerythrin, và Texas Red sẵn có. Các vị trí đánh dấu huỳnh quang có thể được liên hợp với kháng thể thông qua các kỹ thuật đã biết, như các kỹ thuật được bộc lộ trong *Current Protocols in Immunology*, trước đây, ví dụ. Sự phát huỳnh quang có thể được định lượng bằng cách sử dụng huỳnh quang kế.

Có các vị trí đánh dấu cơ chất enzym đã được mô tả rõ ràng khác nhau đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật (tham khảo, ví dụ, US 4275149 như một báo cáo). Enzym thường xúc tác sự biến đổi hóa học của cơ chất sinh màu có thể được đo bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau. Ví dụ, sự biến đổi có thể là sự thay đổi màu sắc trong cơ chất được đo bằng phổ quang kế. Nói cách khác, enzym có thể biến đổi sự phát huỳnh quang hoặc sự phát quang bằng phản ứng hóa học của cơ chất. Các kỹ thuật để định lượng sự thay đổi sự phát huỳnh quang đã được mô tả ở trên. Cơ chất phát quang hóa học trở nên được kích thích bởi dòng điện tử bởi phản ứng hóa học và sau đó có thể phát ra ánh sáng có thể đo được, bằng cách sử dụng máy đo sự phát quang hóa học, ví dụ, hoặc truyền năng lượng cho chất nhận huỳnh quang.

Các ví dụ về các vị trí đánh dấu enzym gồm luciferaza như luciferaza của con đom đóm và luciferaza của vi khuẩn (US 4737456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazindion, malat dehydrogenaza, ureaza, peroxidaza như peroxidaza củ cải ngựa (HRPO), phosphataza kiềm, β -galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacharit oxidaza (như glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza), oxidaza dị vòng (như uricaza và xanthin oxidaza), lactoperoxidaza, microperoxidaza, và enzym tương tự. Các kỹ thuật để liên hợp các enzym với các kháng thể được mô tả, ví dụ, trong O'Sullivan et al., 1981, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166.

Các ví dụ về các tổ hợp enzym-cơ chất gồm, ví dụ: peroxidaza củ cải ngựa (HRPO) với hydro peroxidaza là cơ chất, trong đó hydro peroxidaza oxy hóa tiền dược chất nhuộm như orthophenylen diamin (OPD) hoặc 3,3',5,5'-tetrametyl benzidin hydroclorua (TMB); phosphataza kiềm (AP) với para-Nitrophenyl phosphat là cơ chất sinh màu; và β -D-galactosidaza (β -D-Gal) với cơ chất sinh màu như p-nitrophenyl- β -D-galactosidaza hoặc cơ chất sinh huỳnh quang 4-metylbumbelliferyl- β -D-galactosidaza.

Nhiều tổ hợp enzym-cơ chất khác sẵn có bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Với báo cáo chung của những tổ hợp này, tham khảo US 4275149 và US 4.275.149 và US 4.318.980.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được sử dụng không được dán nhãn và được phát hiện bởi kháng thể được dán nhãn liên kết với kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người.

Các kháng thể được mô tả ở đây có thể được sử dụng theo phương pháp thử nghiệm đã biết bất kỳ, như các thử nghiệm liên kết cạnh tranh, các thử nghiệm kẹp trực tiếp và gián tiếp, và các thử nghiệm kết tủa miễn dịch. Tham khảo, ví dụ, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Kit chẩn đoán

Kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người có thể được sử dụng trong kit chẩn đoán, tức là, tổ hợp các chất phản ứng được đóng gói với các lượng định trước với các chỉ dẫn để tiến hành thử nghiệm chẩn đoán. Trong đó kháng thể được dán nhãn bởi enzym, kit có thể gồm các cơ chất và các đồng yếu tố cần thiết bởi enzym như tiền

chất cơ chất tạo ra nhóm mang màu hoặc chất huỳnh quang có thể phát hiện. Thêm vào đó, các chất phụ gia khác có thể được gồm như các chất ổn định, đệm (ví dụ đệm khối hoặc đệm phân giải), và các chất tương tự. Các lượng tương đối chất phản ứng khác nhau có thể được thay đổi nhiều để tạo ra các chất cô đặc trong dung dịch chứa các chất phản ứng cơ bản tối ưu tính nhạy cảm của thử nghiệm. Các chất phản ứng có thể được tạo ra dưới dạng bột khô, thường được làm đông khô, gồm các tá dược đối với sự hòa tan sẽ tạo ra dung dịch có nồng độ thích hợp.

Sử dụng để điều trị bệnh

Theo một phương án khác, kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người theo sáng chế hữu ích trong điều trị các rối loạn khác nhau có liên quan đến sự biểu hiện CD40 như được mô tả theo sáng chế.

Kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người hoặc chất được sử dụng bằng các phương pháp thích hợp, gồm ngoài ruột, dưới da, trong bụng, trong phổi, và trong mũi, và, nếu mong muốn để điều trị ức chế miễn dịch cục bộ, sử dụng trong thương tổn (gồm sự truyền dịch hoặc tiếp xúc theo cách khác mô ghép với kháng thể trước khi cấy ghép). Kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người hoặc chất có thể được sử dụng, ví dụ, dưới dạng chất lỏng được truyền hoặc dưới dạng tiêm bolus. Chất lỏng được truyền ngoài ruột gồm việc sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong bụng, hoặc dưới da. Thêm vào đó, kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người được sử dụng thích hợp bằng cách truyền mạch, cụ thể là với các liều dùng giảm dần của kháng thể. Theo một khía cạnh, việc sử dụng theo liều lượng được đưa ra bằng cách tiêm, tốt nhất là sự tiêm trong tĩnh mạch hoặc dưới da, phụ thuộc phần nào vào việc sử dụng ngắn gọn hoặc mạn tính.

Để ngăn chặn hoặc điều trị bệnh, liều dùng thích hợp kháng thể sẽ phụ thuộc vào các nhân tố khác nhau như loại bệnh được điều trị, như được định rõ ở trên, tính nghiêm trọng và diễn biến của bệnh, hoặc kháng thể được sử dụng cho các mục đích ngăn chặn hoặc trị liệu, trị liệu trước, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể, và sự thận trọng của bác sỹ điều trị. Kháng thể được cấp đúng lúc cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc qua nhiều lần điều trị.

Phụ thuộc vào loại và tính nghiêm trọng của bệnh, từ khoảng 1µg/kg đến 20mg/kg (ví dụ, từ 0,1 đến 15mg/kg) kháng thể là một liều dùng được đưa ra ban đầu để sử dụng

cho bệnh nhân, hoặc, ví dụ, bằng một hoặc nhiều liều sử dụng riêng rẽ, hoặc bằng cách truyền liên tục. Liều dùng hàng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ 1µg/kg đến 100mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các nhân tố được đề cập ở trên. Với các lần sử dụng lặp lại trong các ngày khác nhau hoặc dài hơn, phụ thuộc vào tình trạng, việc điều trị được duy trì liên tục cho đến khi sự ức chế các triệu chứng bệnh mong muốn xuất hiện. Tuy nhiên, các chế độ liều dùng khác có thể hữu ích. Sự tiến triển của liệu pháp này dễ dàng được kiểm tra bởi các kỹ thuật và phép phân tích thông thường. Chế độ liều dùng minh họa là chế độ được bộc lộ trong WO 94/04188.

Thuật ngữ “sự ức chế” được sử dụng theo sáng chế trong ngữ cảnh giống nhau là “sự cải thiện” và “làm giảm bớt” có nghĩa là làm giảm bớt một hoặc nhiều đặc tính của bệnh.

Chế phẩm kháng thể sẽ được bào chế, sử dụng theo liều lượng, và được sử dụng theo kiểu phù hợp với thực tiễn có lợi trong y học. Các yếu tố để xem xét trong ngữ cảnh này gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối của chất, phương pháp sử dụng, lên kế hoạch sử dụng, và các yếu tố khác đã được biết bởi các bác sỹ. "Liều hữu hiệu trị liệu" kháng thể được sử dụng sẽ được ảnh hưởng bởi các cách xem xét này, và là lượng tối thiểu cần để ngăn chặn, cải thiện, hoặc điều trị rối loạn có liên quan đến sự biểu hiện CD40.

Kháng thể cần đến, nhưng tùy ý, không được bào chế bởi một hoặc nhiều chất hiện nay được sử dụng để ngăn chặn hoặc điều trị rối loạn đang nói tới. Liều hữu hiệu của các chất khác phụ thuộc vào lượng kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người có trong chế phẩm, loại rối loạn hoặc cách điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận ở trên. Các chất này thường được sử dụng với các liều dùng giống nhau và với các đường dùng như được sử dụng dưới đây hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 99% liều dùng được sử dụng cho đến nay.

Các rối loạn có liên quan đến CD40

Các kháng thể kháng CD40 hoặc các chất hữu ích để điều trị hoặc ngăn chặn bệnh ung thư biểu hiện CD40 hoặc rối loạn miễn dịch được mô tả bằng cách biểu hiện CD40, ví dụ, bằng cách hoạt hóa không thích hợp các tế bào miễn dịch (ví dụ, các tế bào lympho hoặc tế bào hình tua). Sự biểu hiện CD40 này có thể là do, ví dụ, mức protein

CD40 tăng cao trên các tế bào bề mặt và/hoặc tính kháng nguyên bị biến đổi của CD40 được biểu hiện. Việc điều trị hoặc ngăn chặn rối loạn miễn dịch, theo các phương pháp được mô tả ở đây, đạt được bằng cách sử dụng cho đối tượng cần điều trị hoặc ngăn chặn một lượng hữu hiệu kháng thể kháng CD40 hoặc chất, nhờ đó kháng thể (i) liên kết với các tế bào miễn dịch được hoạt hóa biểu hiện CD40 và có liên quan đến tình trạng bệnh và (ii) tạo ra tính gây độc tế bào, tính kìm tế bào, hoặc sự ức chế miễn dịch tác động lên các tế bào miễn dịch được hoạt hóa.

Các bệnh về miễn dịch được mô tả bởi sự hoạt hóa không thích hợp các tế bào miễn dịch và có thể được điều trị hoặc ngăn chặn bởi các phương pháp được mô tả theo sáng chế có thể được phân nhóm, ví dụ, bởi (các) loại (các) phản ứng quá nhạy cảm tồn tại dưới rối loạn. Các phản ứng này thường được phân nhóm thành bốn loại: các phản ứng tính quá mẫn, các phản ứng gây độc tế bào (tiêu tế bào), các phản ứng của phức hợp miễn dịch, hoặc các phản ứng miễn dịch được trung gian tế bào (CMI) (cũng được đề cập đến dưới dạng các phản ứng quá mẫn thuộc loại bị trì hoãn (DTH)). (Tham khảo, ví dụ: *Fundamental Immunology* (William E. Paul ed., Raven Press, N.Y., 3rd ed. 1993).)

Các ví dụ đặc trưng về các bệnh miễn dịch này gồm các bệnh sau: viêm khớp mạn tính tiến triển, bệnh làm mất myelin do tự miễn (ví dụ, đa xơ cứng, viêm não tủy dị ứng), bệnh lý mắt do nội tiết, viêm màng giữa và đáy mắt, luput ban đỏ hệ thống, chứng nhược cơ năng, bệnh Grave, viêm cầu thận, rối loạn gan tự miễn, bệnh viêm ruột (ví dụ, bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng), phản vệ, phản ứng dị ứng, hội chứng Sjogren, bệnh tiểu đường typ I, bệnh xơ ống mật nguyên phát, Bệnh u hạt Wegener, rối loạn gây ra đau ở cơ và khớp, viêm đa cơ, viêm da cơ, bệnh viêm cơ, sự hồng đa nội tiết, hội chứng Schmidt, viêm màng mạch nho tự miễn, bệnh Addison, viêm tuyến thượng thận, viêm tuyến giáp, Viêm tuyến giáp Hashimoto, bệnh tuyến giáp do tự miễn, bệnh thiếu máu ác tính, teo da dày, viêm gan mạn tính, viêm gan dạng lupoit, vữa xơ động mạch, tổn thương luput ban đỏ bán cấp da, bệnh giảm năng tuyến cận giáp, hội chứng Dressler, xuất huyết giảm tiểu cầu tự miễn, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, thiếu máu tan huyết bẩm sinh, pemphigus thông thường, pemphigus, viêm da dạng mụn rộp, rụng tóc từng vùng, dạng pemphigus, bệnh cứng da, xơ cứng toàn thân tiến triển, hội chứng CREST (chứng ngấm vôi, hiện tượng Raynaud, loạn vận động thực quản, cứng bì ngón), và chứng giãn mao mạch), vô sinh do tự miễn ở nam và nữ, viêm cột sống dính khớp, viêm loét đại tràng, bệnh mô liên kết tổng hợp, viêm đa động mạch rút, viêm động mạch hoại tử hệ thống,

viêm da cơ địa, viêm mũi dị ứng, hội chứng Goodpasture, bệnh Chagas, bệnh sarcoit, sốt thấp khớp, bệnh hen, sảy thai định kỳ, hội chứng kháng phospholipit, hội chứng phổi của nhà nông, hồng ban đa dạng, hội chứng sau thủ thuật mở, hội chứng Cushing, viêm gan C kinh niên, hội chứng phổi của người bán chim, hoại tử thượng bì nhiễm độc, hội chứng Alport, chứng viêm phế nang, chứng viêm phế nang dị ứng, tăng bạch cầu ái toan máu, bệnh kẽ phổi, ban đỏ nốt, bệnh mụn da hoại thư, phản ứng truyền máu, bệnh viêm động mạch Takayasu, đau cơ dạng thấp, viêm động mạch thái dương, bệnh sán máng, viêm động mạch tế bào khổng lồ, bệnh giun đũa, bệnh nấm aspergilus, hội chứng Sampter, eczema, bệnh bạch cầu hạt dạng lympho, bệnh Behcet, hội chứng Caplan, bệnh Kawasaki, bệnh sốt xuất huyết, bệnh viêm não và dây cột sống, viêm nội mạc tim, xơ hóa màng trong tim, viêm nội nhãn, ban đỏ nổi cục rần, bệnh vẩy nến, nguyên hồng cầu huyết trẻ sơ sinh, viêm bao cơ bạch cầu ái toan, hội chứng Shulman, hội chứng Felty, bệnh giun chỉ, viêm thể mi, viêm thể mi mạn tính, viêm thể mi khác thời trị, viêm thể mi Fuch, bệnh thận IgA, ban xuất huyết Henoch-Schonlein, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ, sự thải loại mô ghép, bệnh cơ tim, hội chứng Eaton-Lambert, viêm đa sụn tái phát, cryoglobulin huyết, macroglobulin huyết Waldenstrom, hội chứng Evan, hội chứng dò mao mạch phổi không phải do tim, viêm phổi, rỗng xương, quá mẫn typ muộn và tổn thương tuyến sinh dục do tự miễn.

Do đó, các phương pháp được mô tả ở đây bao gồm việc điều trị các rối loạn của các tế bào lympho B (ví dụ, luput ban đỏ hệ thống, hội chứng Goodpasture, viêm khớp mạn tính tiến triển, và bệnh tiểu đường typ I), các tế bào lympho Th1 (ví dụ, viêm khớp mạn tính tiến triển, đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, hội chứng Sjorgren, viêm tuyến giáp Hashimoto, bệnh Grave, bệnh xơ ống mật nguyên phát, bệnh u hạt Wegener, bệnh lao, hoặc bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ), hoặc các tế bào lympho Th2 (ví dụ, viêm da cơ địa, luput ban đỏ hệ thống, hen dị ứng, viêm giác mạc, viêm mũi dị ứng, hội chứng Omenn, xơ cứng toàn thân, hoặc bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ mạn tính). Nói chung, các rối loạn gồm các tế bào hình tua có gồm các rối loạn của các tế bào lympho Th1 hoặc tế bào lympho Th2.

Viêm khớp mạn tính tiến triển (RA) là một trong các bệnh tự miễn viêm phổ biến nhất ảnh hưởng đến khoảng 1% dân số. Trong số các cách điều trị hiệu quả (ví dụ MTX và các chất kháng TNF) sẵn có, các chất này tồn tại nhu cầu về thuốc lớn chưa đạt đến, đặc biệt là đối với các bệnh nhân không đáp ứng thỏa đáng với các liệu pháp kháng TNF

(khoảng 30% số bệnh nhân). Thêm vào đó, trên 50% số bệnh nhân từ bỏ việc điều trị chất đối kháng TNF trong khoảng thời gian 5 năm, chủ yếu là do các trường hợp bất lợi mà còn do số lượng các bệnh nhân được nhận diện cao hơn mất lợi ích trị liệu. Do đó rất cần phải thiết lập các liệu pháp hữu hiệu định hướng đến chứng viêm và sự phá hủy khớp với RA nhưng không chỉ tin vào sự ức chế trực tiếp TNF. Một hướng tiếp cận rất hấp dẫn là định hướng đến các con đường tế bào đồng kích thích. Một trong các cặp thụ thể-phối tử chủ yếu đối với sự đồng kích thích là CD40/CD40L. Hệ thống này cho phép các tương tác giữa các tế bào miễn dịch, và giữa các tế bào miễn dịch và các tế bào không miễn dịch, rất cả đều quan trọng đối với sự phát sinh bệnh của RA. Sự phong bế CD40 bằng kháng thể đối kháng theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều hiệu quả đối với RA như sau:

- 1) Ức chế sự biệt hóa của tế bào B và chuyển isotyp của kháng thể;
- 2) Ức chế sự sản xuất xytokin và chemokin và điều hòa tăng các phân tử dính trong các tế bào T và các đại thực bào;
- 3) Ức chế sự hoạt hóa các tế bào hình tua; và
- 4) Ức chế sự sản xuất các xytokin, chemokin, matrix metalloproteinase, prostaglandin tiền viêm, và các phân tử điều hòa giảm đối với các tế bào không miễn dịch (ví dụ các tế bào biểu mô, màng trong và các tế bào mô giữa).

Các phương pháp để đạt được một hoặc nhiều tác dụng trên được dự tính rõ ràng theo sáng chế. Thêm vào RA, các chế phẩm theo sáng chế sẽ đặc biệt hữu ích để điều trị bệnh đa xơ cứng, bệnh vẩy nến (gồm bệnh viêm khớp vẩy nến), viêm khớp mạn tính tiến triển ở trẻ vị thành niên. Bệnh viêm ruột, luput ban đỏ hệ thống, và ghép tạng đặc. Bệnh viêm ruột, luput ban đỏ hệ thống, và ghép tạng đặc.

Viêm khớp mạn tính tiến triển (RA) là bệnh tự miễn toàn thân, mạn tính phổ biến khoảng 1% ở người trưởng thành. Bệnh liên tục gây ra tình trạng ốm yếu đáng kể và tử vong sớm (phần lớn là tử vong do bệnh tim mạch tăng nhanh). Hiện nay đã nhận biết được rằng sự phá hủy khớp xuất hiện rất sớm trong giai đoạn bệnh lớn hơn 30% trong số các bệnh nhân chỉ ra bằng chứng chụp ảnh phóng xạ sự ăn mòn xương tại thời điểm chẩn đoán, tăng lên 60% sau khoảng thời gian 1 năm. Các nguyên tắc chỉ đạo hiện nay được đưa ra bắt đầu bằng liệu pháp với các thuốc chống thấp khớp thay đổi được bệnh truyền thống (các DMARD) trong vòng 3 tháng sau một phép chẩn đoán chính xác được thiết

lập. Các DMARD có hiệu lực làm giảm hoặc ngăn chặn sự tổn thương khớp hoặc bảo vệ chức năng của khớp. Hiện nay, methotrexat được lựa chọn của bác sĩ chuyên về thấp khớp (MTX) như liệu pháp DMARD ban đầu đối với hầu hết các bệnh nhân.

Các chất đối kháng TNF etanercept (Enbrel®), infliximab (Remicade®), adalimumab (Humira®), chất đối kháng CTLA4 abatacept (Orencia®), thụ thể kháng IL-6 mAb tocilizumab và mAb rituximab kháng CD20 (Rituxan®) có hiệu quả trong điều trị RA. Các nguyên tắc chỉ đạo hiện nay thường đưa ra việc sử dụng các DMARD sinh học để điều trị RA tích cực sau đáp ứng không thích hợp đối với các DMARD truyền thống.

Các nghiên cứu mới đây ở các bệnh nhân bị RA tấn công sớm mà không điều trị MTX trước chỉ ra rằng sự kết hợp của MTX với chất đối kháng TNF là tốt hơn với mỗi bệnh nhân khi sử dụng liệu pháp đơn. Kết quả nổi bật nhất là lợi ích tia X học quan trọng của liệu pháp tổ hợp. Do đó, tổ hợp của MTX và các chất ức chế TNF nên được sử dụng trong các bệnh nhân gặp mối nguy hiểm lớn nhân đối với bệnh tấn công và kiểu hình tấn công (ví dụ điểm tác dụng cao, sự suy giảm chức năng, huyết thanh dương tính với yếu tố dạng thấp khớp (RF) hoặc kháng thể kháng peptit citrullin kháng vòng (CCP), CRP tăng cao, sự ăn mòn bằng tia X). Tuy nhiên, chúng tôi biết trước rằng trong thực tiễn lâm sàng sẽ hiếm thấy các chất đối kháng TNF được sử dụng làm liệu pháp dòng thứ nhất. Một nghiên cứu của các bác sĩ chuyên bệnh thấp khớp của Hoa Kỳ được tiến hành vào 04/2005 chỉ ra rằng các yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất đến quyết định để sử dụng chất đối kháng TNF là: sự không thích hợp của MTX hoặc nhiều DMARD, hoạt động đánh giá toàn cầu của bác sĩ, sự suy giảm chức năng, và sự trở nên xấu hơn hoặc ăn mòn của ảnh phóng xạ. Hiện nay, 20% bệnh nhân được đánh giá bởi RA tiếp nhận liệu pháp chất ức chế TNF ở Hoa Kỳ.

Phần trăm cơ bản của các bệnh nhân RA không được hỗ trợ thích hợp bởi các cách điều trị hiện nay gồm các liệu pháp sinh học, do tính không dung nạp thuốc và độc tố hoặc thiếu đáp ứng. Trên 50% số bệnh nhân từ bỏ việc điều trị chất đối kháng TNF trong khoảng thời gian 5 năm, chủ yếu là do các trường hợp bất lợi mà còn do số lượng các bệnh nhân được nhận diện tăng cao làm mất đáp ứng của họ.

Theo một vài phương án, rối loạn miễn dịch là rối loạn miễn dịch được trung gian bởi tế bào T, như rối loạn tế bào T trong đó các tế bào T được hoạt hóa có liên quan đến rối loạn biểu hiện CD40. Các kháng thể kháng CD40 hoặc các chất có thể được sử dụng

để làm tiêu các tế bào T được hoạt hóa biểu hiện CD40 này. Theo một phương án cụ thể, việc sử dụng các kháng thể kháng CD40 hoặc các chất có thể làm tiêu các tế bào T được hoạt hóa biểu hiện CD40, trong khi làm ngừng các tế bào T cơ bản không bị tiêu hủy bởi chất kháng CD40 hoặc chất. Trong ngữ cảnh này, "cơ bản không bị tiêu hủy" có nghĩa là ít hơn khoảng 60%, hoặc ít hơn khoảng 70% hoặc ít hơn khoảng 80% các tế bào T làm ngừng không bị tiêu hủy.

Các kháng thể kháng CD40 và các chất như được mô tả theo sáng chế cũng hữu ích để điều trị hoặc ngăn chặn bệnh ung thư biểu hiện CD40. Việc điều trị hoặc ngăn chặn bệnh ung thư biểu hiện CD40, theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế, đạt được bằng cách sử dụng cho đối tượng cần điều trị hoặc ngăn ngừa một lượng hữu hiệu kháng thể kháng CD40 hoặc chất, nhờ đó kháng thể hoặc chất (i) liên kết với các tế bào ung thư biểu hiện CD40 và (ii) đưa ra hiệu quả gây độc tế bào hoặc kìm tế bào để tiêu hủy hoặc ức chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư biểu hiện CD40.

Các bệnh ung thư biểu hiện CD40 có thể được điều trị hoặc ngăn chặn bởi các phương pháp được mô tả ở đây gồm, ví dụ, bệnh bạch cầu, như bệnh bạch cầu cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (ví dụ, nguyên tủy bào, tiền tủy bào, bệnh máu trắng, bệnh bạch cầu đơn nhân to, hoặc chứng tăng hồng bạch cầu), bệnh bạch cầu mạn tính, bệnh bạch cầu tủy bào (bạch cầu hạt) mạn tính, hoặc bệnh bạch cầu bạch huyết bào mạn tính; bệnh tăng hồng cầu vô căn; u lympho (ví dụ, bệnh Hodgkin hoặc bệnh không phải Hodgkin); đa u tủy, macroglobulin huyết Waldenstrom; bệnh chuỗi nặng; các khối u rắn như xacôm và ung thư biểu mô (ví dụ, xacôm xơ, xacôm niêm, xacôm mỡ, xacôm sụn, xacôm sinh xương, xacôm xương, u nguyên sống, xacôm mạch, xacôm nội mô, xacôm bạch huyết, xacôm nội mô bạch huyết, u màng hoạt dịch, u trung biểu mô, khối u Ewing, xacôm cơ trơn, xacôm cơ vân, ung thư biểu mô ruột kết, ung thư biểu mô ruột kết, ung thư tuyến tụy, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, xacôm tế bào hình vảy, xacôm tế bào đáy, ung thư tuyến, xacôm tuyến mồ hôi, xacôm tuyến bã nhờn, xacôm hình nhú, ung thư tuyến hình nhú, caxinom u tuyến, xacôm tủy xương, xacôm nảy sinh do không khí đi vào cuống phổi, xacôm tế bào thận, ung thư gan, xacôm ống mật, ung thư dạ con, u tinh, xacôm phổi, khối u Wilms, ung thư cổ, ung thư dạ con, khối u tinh hoàn, ung thư biểu mô phổi, xacôm phổi tế bào nhỏ, xacôm phổi tế bào không nhỏ, xacôm bàng quang, xacôm biểu mô, u thần kinh đệm, u bào hình sao, u nguyên bào tủy, u sọ hầu, u màng não thất, u

tuyến tủy, u nguyên bào mạch máu, u thần kinh thính giác, u thần kinh đệm ít nhất, u màng não, khối u ác tính, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào võng mạc, ung thư vòm họng, hoặc xacôm thực quản).

Dược phẩm và việc sử dụng chúng

Chế phẩm bao gồm chất liên kết CD40 (ví dụ, kháng thể kháng CD40) có thể được sử dụng cho đối tượng có hoặc với mối nguy hiểm có rối loạn miễn dịch hoặc bệnh ung thư biểu hiện CD40. Sáng chế đề xuất thêm việc sử dụng chất liên kết CD40 (ví dụ, kháng thể kháng CD40) khi sản xuất thuốc ngăn chặn hoặc điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD40 hoặc rối loạn miễn dịch. Thuật ngữ "đối tượng" như được sử dụng theo sáng chế có nghĩa là bệnh nhân là động vật có vú bất kỳ với chất liên kết CD40 có thể được sử dụng, gồm, ví dụ, động vật có vú là người và không phải người, như động vật linh trưởng, loài gặm nhấm, và chó. Các đối tượng được dùng một cách cụ thể để điều trị bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây gồm người. Các kháng thể hoặc chất có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chế phẩm khác để ngăn chặn hoặc điều trị rối loạn miễn dịch hoặc bệnh ung thư biểu hiện CD40.

Các kháng thể được ưu tiên để sử dụng trong các dược phẩm này là các kháng thể bao gồm kháng thể hoặc đoạn kháng thể được làm tương thích với người có trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự bất kỳ là SEQ ID NO. từ 1 đến 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35, SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.39, hoặc SEQ ID NO. 40.

Một vài phương án gồm các polynucleotit được phân lập bao gồm các trình tự mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự là SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.31, hoặc SEQ ID NO.36 Các kháng thể được làm tương thích với người được ưu tiên đặc biệt bao gồm kháng thể hoặc đoạn kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO.27 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.28 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.29 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.26, tương ứng; SEQ ID NO.32 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.33 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.34 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.35 và SEQ ID NO.31, tương ứng; SEQ ID NO.37 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID

NO.38 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.36, tương ứng; SEQ ID NO.40 và SEQ ID NO.36, tương ứng. Được dự tính trong sáng chế là các polynucleotit được phân lập mã hóa trình tự bất kỳ trong số các trình tự chuỗi nặng có SEQ ID NO. từ 1 đến 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 44, SEQ ID NO. 46, SEQ ID NO. 48, SEQ ID NO. 53, SEQ ID NO. 57, SEQ ID NO. 58, SEQ ID NO. 59, SEQ ID NO. 60, SEQ ID NO. 61, SEQ ID NO. 62, SEQ ID NO. 63, SEQ ID NO. 64, SEQ ID NO. 65, SEQ ID NO. 66, SEQ ID NO. 67, SEQ ID NO. 68, SEQ ID NO. 69, SEQ ID NO. 70, SEQ ID NO. 71, SEQ ID NO. 72, hoặc SEQ ID NO. 73. Các phương án thực hiện khác được định hướng với các axit nucleic được phân lập mã hóa trình tự chuỗi nhẹ có trình tự bất kỳ trong số các trình tự có SEQ ID NO. từ 5 đến SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, hoặc SEQ ID NO:76.

Theo các phương án nhất định, trong đó việc điều trị với RA được dự tính, các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo các phương pháp làm giảm dấu hiệu và triệu chứng, gây ra đáp ứng lâm sàng chủ yếu và gây ra sự tiến triển của tổn thương cấu trúc ở các bệnh nhân bị trầm trọng với RA hoạt động mãnh liệt không đáp ứng thích hợp với một mình MTX. Một ví dụ hiện nay về liệu pháp này là: Enbrel/Humira (Dữ liệu với Humira và Enbrel thu được trong cả hai tập hợp bệnh nhân khác nhau). Các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng thay cho liệu pháp Enbrel/Humira hoặc kết hợp với liệu pháp Enbrel/Humira đối với các bệnh nhân không đáp ứng với một mình MTX. Tốt hơn là, theo các phương án này, các chế phẩm theo sáng chế sẽ có hiệu quả tốt hơn đối với Enbrel +MTX trong các bệnh nhân có đáp ứng không thích hợp với methotrexat như được xác định ví dụ bởi: ACR20 ở 6 tháng >85% với hợp chất cộng với MTX (GS: Enbrel +MTX 71% đối với Placebo + MTX 27%, Humira + MTX tại 12 tháng 59% đối với Placebo + MTX 24%)*. Tiêu chuẩn bổ sung với hiệu quả tốt hơn của các chế phẩm theo sáng chế có thể gồm: Sự ức chế sự tiến triển của tổn thương cấu trúc trong khoảng thời gian một năm tương tự với Enbrel (sau khoảng thời gian 52 tuần có nghĩa là Sharp score Humira được biến đổi + MTX 0,1 đối với Placebo + MTX 2.7)*. Theo các phương

án khác, các chế phẩm tạo ra “đáp ứng lâm sàng chính” cao hơn Enbrel ở các bệnh nhân có đáp ứng không thích hợp với methotrexat như được đo bởi ACR70 (20% với Humira + MTX, 4% với Placebo + MTX)*.

Theo các phương án khác, các chế phẩm theo sáng chế có thể được chỉ ra để làm giảm dấu hiệu và triệu chứng, gây ra đáp ứng lâm sàng chủ yếu và gây ra sự tiến triển của tổn thương cấu trúc ở các bệnh nhân bị trầm trọng với RA hoạt động mãnh liệt có đáp ứng không thích hợp với các chất kháng TNF. Chế độ bản vị vàng hiện nay: liệu pháp sinh học không kháng TNF. Tốt hơn là, trong các đối tượng này các chế phẩm theo sáng chế mang hiệu quả không thấp hơn được so sánh với chế phẩm sinh học không kháng TNF (ví dụ Orencia, Rituxan) bằng cách so sánh tiền sử của các bệnh nhân có đáp ứng không thích hợp với chất kháng TNF: ACR20 ở 6 tháng >50% với hợp chất cộng với DMARD (GS: Orencia + DMARD 50% đối với giả dược + DMARD 20%). Theo các phương án thực hiện khác, các chế phẩm theo sáng chế ức chế sự tiến triển của tổn thương cấu trúc trong khoảng thời gian một năm bị ngừng bởi các phương pháp cho điểm tia X được đánh giá đối với sự ăn mòn khớp và thu hẹp khoảng cách của khớp, tương tự với Rituxan (sau khoảng thời gian 52 tuần có nghĩa là Sharp score Rituxan được biến đổi + MTX 1.0 đối với giả dược + MTX 2.31).

Các hệ thống phân phối khác nhau đã biết và có thể được sử dụng để sử dụng chất liên kết CD40. Các phương pháp đưa vào gồm nhưng không giới hạn với trong da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, gây tê ngoài màng cứng, và các đường dùng theo đường miệng. Chất liên kết CD40 có thể được sử dụng, ví dụ bằng cách truyền, tiêm bolus hoặc tiêm, và có thể được sử dụng cùng với các hoạt chất sinh học khác như các chất hóa học trị liệu. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc cục bộ. Theo các phương án được ưu tiên, việc sử dụng bằng cách tiêm dưới da. Các chế phẩm để tiêm có thể được điều chế trong ví dụ các đường rò được nạp trước có thể được sử dụng một lần hàng tuần.

Các đặc tính an toàn của kháng thể theo sáng chế sẽ được xác định và tốt hơn là gồm một hoặc nhiều đặc điểm như: không có các tương tác bất lợi đáng kể về phương diện lâm sàng với các thuốc khác thường được sử dụng để điều trị dạng viêm khớp mạn tính tiến triển (ví dụ các DMARD, Steroit, NSAID,); Tốc độ ngừng không lớn hơn do các mô an toàn hoặc các mô có khả năng dung nạp được so sánh với Enbrel; Tốc độ của

bệnh nhiễm trùng trầm trọng không lớn hơn các chất kháng TNF hoặc được sử dụng phổ biến là các chất sinh học; Tần suất và/hoặc tính nghiêm trọng của các phản ứng tại vị trí tiêm hoặc phản ứng truyền tương tự với Enbrel; Không tiến triển hoặc tiến triển rất ít tính kháng thuốc (ít hơn 5%) dựa trên các chu kỳ trị liệu lặp lại; Không có hoặc có rất ít kháng thể trung hòa; Không có bằng chứng về sự hoạt hóa/sự kết tụ tiểu cầu tăng cao có thể dẫn đến các trường hợp huyết khối tắc mạch *in vivo* hoặc rối loạn chức năng màng trong/tiểu cầu có thể dẫn đến xuất huyết.

Theo các phương án đặc biệt, chế phẩm chất liên kết được sử dụng bằng cách tiêm, bằng ống thông đường tiêu, bằng thuốc đạn, hoặc bằng mô cấy, mô cấy là vật liệu gelatin, xốp, hoặc không xốp, gồm màng, như màng sialastic, hoặc sợi. Thông thường, khi sử dụng chế phẩm, các vật liệu với kháng thể kháng CD40 hoặc chất không hấp thụ được sử dụng.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng CD40 hoặc chất được phân phối trong hệ thống giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng (tham khảo, ví dụ, Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Sefton, 1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). Theo một phương án khác, các vật liệu polyme có thể được sử dụng. (Tham khảo, ví dụ, Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. (Chem. 23:61. Tham khảo Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105.) Các hệ thống có kiểm soát khác được đề cập, ví dụ, bởi Langer, nêu trên.

Chất liên kết CD40 (ví dụ, kháng thể kháng CD40) có thể được sử dụng làm được phẩm bao gồm một lượng hữu hiệu trị liệu của chất liên kết và một hoặc nhiều thành phần tương thích về dược học.

Theo các phương án điển hình, chế phẩm được bào chế phù hợp với các quy trình thông thường dưới dạng dược phẩm phù hợp với việc sử dụng trong tĩnh mạch hoặc dưới da cho người bị bệnh. Thông thường, các chế phẩm sử dụng bằng cách tiêm là các dung dịch trong đệm chứa nước đồng neutron vô trùng. Trong đó nếu cần, dược phẩm cũng có

thể gồm chất hòa tan và gây mê cục bộ như lignocain để làm dịu cơn đau tại vị trí tiêm. Nói chung, các thành phần được bổ sung riêng rẽ hoặc được trộn cùng nhau dưới dạng liều dùng đơn vị, ví dụ, dưới dạng bột làm đông khô khô hoặc nồng độ không chứa nước trong vật chứa được bịt kín như ampun hoặc sachet chỉ rõ lượng hoạt chất. Trong đó được phẩm được sử dụng bằng cách truyền, nó có thể được phân phối bằng chai truyền chứa nước hoặc nước muối thuộc loại dược phẩm vô trùng. Trong đó dược phẩm được sử dụng bằng cách tiêm, ampun chứa nước vô trùng để tiêm hoặc nước muối có thể được tạo ra để các thành phần có thể được trộn trước khi sử dụng.

Hơn nữa, dược phẩm có thể được tạo ra dưới dạng kit dược phẩm bao gồm (a) vật chứa chứa chất liên kết CD40 (ví dụ, kháng thể kháng CD40) có dạng làm đông khô và (b) vật chứa thứ hai chứa chất pha loãng được dụng (ví dụ, nước vô trùng) để tiêm. Chất pha loãng được dụng có thể được sử dụng để hoàn nguyên hoặc pha loãng kháng thể hoặc kháng CD40 được làm đông khô. Kết hợp tùy ý với (các) vật chứa này có thể là thông báo dưới dạng được quy định bởi cơ quan chính phủ quy định việc sản xuất, sử dụng hoặc bán dược phẩm hoặc các sản phẩm sinh học, chú ý các phản ánh được phê chuẩn bởi cơ quan về việc sản xuất, sử dụng hoặc bán sản phẩm cho người sử dụng.

Lượng chất liên kết CD40 (ví dụ, kháng thể kháng CD40) có hiệu quả trong điều trị hoặc ngăn chặn rối loạn miễn dịch hoặc bệnh ung thư biểu hiện CD40 có thể được xác định bởi các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Thêm vào đó, các thử nghiệm *in vitro* tùy ý có thể được sử dụng để hỗ trợ các khoảng liều dùng tối ưu. Liều dùng chính xác được sử dụng trong chế phẩm cũng sẽ phụ thuộc vào đường dùng, và giai đoạn rối loạn miễn dịch hoặc bệnh ung thư biểu hiện CD40, và nên được quyết định theo quyết định của tòa của người đang hành nghề và mỗi trường hợp của bệnh nhân. Các liều dùng hữu hiệu có thể được ngoại suy từ đường cong đáp ứng liều dùng có nguồn gốc từ các hệ thống thí nghiệm mô hình động vật hoặc *in vitro*.

Ví dụ, hiệu quả gây độc và hiệu quả trị liệu của kháng thể kháng CD40 hoặc chất có thể được xác định trong các canh trường tế bào hoặc động vật thí nghiệm bởi các quy trình được chuẩn để xác định ED₅₀ (liều dùng trị liệu hữu hiệu bằng 50% tổng số). Chất liên kết CD40 (tức là, kháng thể kháng CD40) thể hiện chỉ số điều trị lớn được ưu tiên. Trong đó chất liên kết CD40 thể hiện các tác dụng phụ độc, hệ thống phân phối hướng chất liên kết CD40 tới vị trí của mô bị tác động có thể được sử dụng để tối thiểu hóa tổn

thương hiệu quả các tế bào không biểu hiện CD40 và, nhờ đó, làm giảm bớt các tác dụng phụ.

Dữ liệu thu được từ các thử nghiệm cạnh tranh tế bào và các nghiên cứu trên động vật được sử dụng trong bào chế nằm trong khoảng liều dùng sử dụng ở người. Liều dùng của chất liên kết CD40 thường nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn gồm ED₅₀ với một ít hoặc không có độc tố. Liều dùng có thể thay đổi trong khoảng này dựa trên dạng liều được sử dụng và đường dùng được sử dụng. Với chất liên kết CD40 bất kỳ được sử dụng trong phương pháp, liều dùng hữu hiệu trị liệu có thể được đánh giá ban đầu từ các thử nghiệm cạnh tranh tế bào. Liều dùng có thể được bào chế trong mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ huyết tương tuần hoàn gồm IC₅₀ (tức là, nồng độ của hợp chất thử nghiệm đạt được sự ức chế nửa tối đa các triệu trứng) như được xác định trong cạnh tranh tế bào. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định chính xác hơn các liều dùng hữu ích ở người. Các mức huyết thanh có thể được đo, ví dụ, bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất cao, ELISA và phương pháp tương tự.

Nói chung, liều dùng của kháng thể kháng CD40 hoặc chất liên kết CD40 được sử dụng cho bệnh nhân bị rối loạn miễn dịch hoặc ung thư biểu hiện CD40 thường nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể của đối tượng. Liều dùng được sử dụng cho đối tượng nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến khoảng 50mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến khoảng 30mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến khoảng 20mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến khoảng 15mg/kg, hoặc từ khoảng 1mg/kg đến khoảng 10mg/kg trọng lượng cơ thể của đối tượng.

Các liều dùng dẫn chứng gồm, nhưng không giới hạn với, từ 1ng/kg đến 100mg/kg. Theo một vài phương án, liều dùng bằng khoảng 0,5mg/kg, khoảng 1mg/kg, khoảng 2mg/kg, khoảng 3mg/kg, khoảng 4mg/kg, khoảng 5mg/kg, khoảng 6mg/kg, khoảng 7mg/kg, khoảng 8mg/kg, khoảng 9mg/kg, khoảng 10mg/kg, khoảng 11mg/kg, khoảng 12mg/kg, khoảng 13mg/kg, khoảng 14mg/kg, khoảng 15mg/kg hoặc khoảng 16mg/kg. Liều dùng có thể được sử dụng, ví dụ, hàng ngày, một lần một tuần (hàng tuần), hai lần một tuần, ba lần một tuần, bốn lần một tuần, năm lần một tuần, sáu lần một tuần, một tuần hai lần hoặc mỗi tháng một lần, hai tháng một lần, hoặc ba tháng một lần. Theo các phương án cụ thể, liều dùng bằng khoảng 0,5mg/kg, khoảng 1mg/kg, khoảng 2mg/kg, khoảng 3mg/kg, khoảng 4mg/kg, khoảng 5mg/kg, khoảng 6mg/kg, khoảng 7mg/kg,

khoảng 8mg/kg, khoảng 9mg/kg, khoảng 10mg/kg, khoảng 11mg/kg, khoảng 12mg/kg, khoảng 13mg/kg, khoảng 14mg/kg, khoảng 15mg/kg hoặc khoảng 16mg/kg. Theo một vài phương án, các khoảng liều dùng nằm trong khoảng từ 1mg/kg/tuần đến khoảng 15mg/kg/tuần.

Theo một vài phương án, các dược phẩm bao gồm chất liên kết CD40 có thể còn bao gồm chất trị liệu, được kết hợp hoặc không được kết hợp với chất liên kết. Kháng thể kháng CD40 hoặc chất liên kết CD40 có thể được sử dụng đồng thời kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu để điều trị hoặc ngăn chặn các rối loạn miễn dịch hoặc bệnh ung thư biểu hiện CD40. Ví dụ, liệu pháp kết hợp có thể gồm chất kìm tế bào, gây độc tế bào, hoặc ức chế miễn dịch. Liệu pháp kết hợp cũng có thể gồm, ví dụ, việc sử dụng một chất định hướng thụ thể hoặc phức hợp thụ thể khác với CD40 trên bề mặt của các tế bào lympho được hoạt hóa, các tế bào hình tua hoặc các tế bào ung thư biểu hiện CD40. Một ví dụ của chất này gồm kháng thể thứ hai, không phải CD40 liên kết với phân tử tại bề mặt của tế bào lympho được hoạt hóa, tế bào hình tua hoặc tế bào ung thư biểu hiện CD40. Một ví dụ khác gồm phối tử định hướng thụ thể hoặc phức hợp thụ thể. Thông thường, kháng thể hoặc phối tử liên kết với thụ thể bề mặt tế bào trên các tế bào lympho được hoạt hóa, tế bào hình tua hoặc tế bào ung thư biểu hiện CD40 và làm tăng tác dụng của kháng thể kháng CD40 bằng cách phân phối tín hiệu kìm tế bào hoặc gây độc tế bào với tế bào lympho được hoạt hóa, tế bào hình tua hoặc tế bào ung thư biểu hiện CD40.

Việc sử dụng liệu pháp kết hợp này có thể có tác dụng cộng tính hoặc hợp lực đối với các thông số bệnh (ví dụ, tính nghiêm trọng của triệu chứng, số lượng các triệu chứng, hoặc tần suất tái phát).

Đối với các chế độ trị liệu để sử dụng kết hợp, theo một phương án đặc trưng, kháng thể kháng CD40 hoặc chất liên kết CD40 được sử dụng đồng thời với chất trị liệu. Theo một phương án cụ thể khác, chất trị liệu được sử dụng trước hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng CD40 hoặc chất liên kết CD40, bởi ít nhất một giờ và lớn hơn một vài tháng, ví dụ ít nhất một giờ, năm giờ, 12 giờ, một ngày, một tuần, một tháng, hoặc ba tháng, trước hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng CD40 hoặc chất liên kết CD40.

Các lớp hữu ích các chất ức chế miễn dịch hoặc gây độc tế bào gồm, ví dụ, các chất kháng tubulin, auristatin (ví dụ, MMAE, hoặc MMAF), các mối liên kết của rãnh nhỏ ADN, các chất ức chế sự tái bản ADN, các chất alkyl hóa (ví dụ, các phức hợp platin như

cis-platin, mono(platinum), bis(platinum) và các phức hợp tri-nuclear platinum và carboplatin), anthracyclin, các thuốc kháng sinh, chống folat, chống chuyển hóa, chất làm nhạy hóa học trị liệu, duocarmyxin, etoposin, pyrimidin được flo hóa, ionophore, lexitropsin, nitrosourea, platinol, các hợp chất tạo thành trước, các chất chống chuyển hóa purin, puromyxin, các chất làm nhạy bức xạ, steroid, taxan, các chất ức chế topoisomeraza, các alkaloid ở cây dừa cạn, hoặc các chất tương tự.

Các chất ức chế miễn dịch hoặc gây độc tế bào riêng lẻ gồm, ví dụ, androgen, anthramyxin (AMC), asparaginaza, 5-azaxytidin, azathioprin, bleomycin, busulfan, buthionin sulfoximin, camptothecin, carboplatin, carmustin (BSNU), CC-1065, clorambucil, cisplatin, colchicin, cyclophosphamid, cytarabin, cytidin arabinosit, cytochalasin B, dacarbazin, dactinomycin (trước đây là actinomycin), daunorubicin, decarbazin, docetaxel, doxorubicin, estrogen, 5-fluorodeoxyuridin, 5-fluoraxil, gemcitabine D, hydroxyurea, idarubicin, ifosfamid, irinotecan, lomustin (CCNU), mefloretamin, melphalan, 6-mercaptopurin, methotrexat, mitomycin, mitomycin C, mitoxantron, nitroimidazol, paclitaxel, plicamycin, procarbazine, streptozotocin, tenoposin, 6-thioguanin, thioTEPA, topotecan, vinblastin, vincristin, vinorelbin, VP-16 và VM-26.

Theo một vài phương án điển hình, chất trị liệu là chất gây độc tế bào. Các chất gây độc tế bào thích hợp gồm, ví dụ, dolastatin (ví dụ, auristatin E, AFP, MMAF, MMAE, AEB hoặc AEVB), các chất liên kết rãnh nhỏ ADN (ví dụ, enediyne và lexitropsin), duocarmyxin, taxan (ví dụ, paclitaxel và docetaxel), puromycin, các alkaloid ở cây dừa cạn, CC-1065, SN-38, topotecan, morpholino-doxorubicin, rhizoxin, xanomorpholino-doxorubicin, echinomycin, combretastatin, netropsin, epothilone A và B, estramustin, cryptophysin, xemadotin, maytansinoid, discodermolite, eleutherobin, hoặc mitoxantron.

Theo một vài phương án, chất gây độc tế bào là chất hóa học trị liệu thông thường như, ví dụ, doxorubicin, paclitaxel, melphalan, các alkaloid ở cây dừa cạn, methotrexat, mitomycin C hoặc etoposin. Thêm vào đó, các chất có hiệu lực như các chất tương tự CC-1065, calicheamicin, maytansin, các chất tương tự dolastatin 10, rhizoxin, và palytoxin có thể được liên kết với các kháng thể kháng CD40 hoặc các chất của chúng.

Theo các phương án cụ thể, chất gây độc tế bào hoặc kim tế bào là auristatin E (cũng được biết trong lĩnh vực kỹ thuật dưới dạng dolastatin-10) hoặc dẫn xuất của chúng. Thông thường, dẫn xuất auristatin E là, ví dụ, một este được tạo thành giữa

auristatin E và keto axit. Ví dụ, auristatin E có thể được phản ứng với axit benzoic paraaxetyl hoặc axit benzoylvaleric để tạo ra AEB và AEVB, tương ứng. Các dẫn xuất auristatin điển hình khác gồm AFP, MMAF, và MMAE. Sự tổng hợp và cấu trúc của auristatin E và các dẫn xuất của nó được mô tả trong, ví dụ, US 2004-0157782 A1 và US 2005-0238649; PCT/US03/24209, PCT/US02/13435, và US 6884869; US 6323315; US 6239104; US 6034065; US 5780588; US 5665860; US 5663149; US 5635483; US 5599902; US 5554725; US 5530097; US 5521284; US 5504191; US 5410024; US 5138036; US 5076973; US 4986988; US 4978744; US 4879278; US 4816444; và US 4486414; các phần mô tả được kết hợp ở đây để tham khảo.

Theo các phương án cụ thể, chất gây độc tế bào là chất liên kết rãnh nhỏ ADN. (tham khảo, ví dụ, US 6130237.) Ví dụ, theo một vài phương án, các chất liên kết rãnh nhỏ là hợp chất CBI. Theo các phương án khác, chất liên kết rãnh nhỏ là enediyn (ví dụ, calicheamixin).

Các ví dụ về các chất kháng tubulin gồm, nhưng không giới hạn với, taxan (e.g., Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), các alkyloit ở cây dừa cạn (ví dụ, vincristin, vinblastin, vindesin, và vinorelbin), và dolastatin (ví dụ, auristatin E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Các chất kháng tubulin khác gồm, ví dụ, các dẫn xuất của bacatin, các chất tương tự taxan (ví dụ, epothilon A và B), nocodazol, colchixin và colximit, estramustin, cryptophysin, xemadotin, maytansinoit, combretastatin, discodermolit, và eleutherobin.

Theo một vài phương án, chất gây độc tế bào là maytansinoit, nhóm khác của chất kháng tubulin. Ví dụ, theo các phương án cụ thể, maytansinoit là maytansin hoặc DM-1 (ImmunoGen, Inc.; tham khảo Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

Theo một vài phương án, chất trị liệu là không phải là đồng vị phóng xạ.

Theo một vài phương án, chất gây độc tế bào hoặc ức chế miễn dịch là chất chống chuyển hóa. Các chất chống chuyển hóa có thể, ví dụ, là chất đối kháng purin (ví dụ, azothioprin hoặc mycophenolat mofetil), chất ức chế dihydrofolat reductaza (ví dụ, methotrexat), axyclovir, gangxyclovir, zidovudin, vidarabin, ribavarin, azidothymidin, xytidin arabinosit, amantadin, dideoxyuridin, iododeoxyuridin, poscamet, hoặc trifluridin.

Theo các phương án khác, chất gây độc tế bào hoặc ức chế miễn dịch là tacrolimus, cyclosporin hoặc rapamycin. Theo các phương án khác, chất gây độc tế bào là aldesleukin, alemtuzumab, alitretinoin, allopurinol, altretamin, amifostin, anastrozol, arsenic trioxit, bexaroten, bexaroten, calusteron, capecitabin, celecoxib, cladribin, Darbepoetin alfa, Denileukin diftotox, dexrazoxan, dromostanolon propionat, epirubixin, Epoetin alfa, estramustin, exemestan, Filgrastim, floxuridin, fludarabin, fulvestrant, gemxitabin, gemtuzumab ozogamixin, goserelin, idarubixin, ifosfamid, imatinib mesylat, Interferon alfa-2a, irinotecan, letrozol, leucovorin, levamisol, meclorethamin hoặc mù tạc nito, megestrol, mesna, methotrexat, methoxsalen, mitomycin C, mitotan, nandrolon phenpropionat, oprelvekin, oxaliplatin, pamidronat, pegademaza, pegaspargaza, pegfilgrastim, pentostatin, pipobroman, plicamycin, porfimer natri, procarbazine, quinacrin, rasburicaza, revlimid, Sargramostim, streptozoxin, tamoxifen, temozolomit, teniposid, testolacton, thioguanin, toremifen, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoin, mù tạc uraxil, valrubicin, vinblastin, vincristin, vinorelbin và zoledronat.

Theo các phương án khác, thuốc là kháng thể đơn dòng kháng HER2 được làm tương thích với người; RITUXAN (rituximab; Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.); kháng thể đơn dòng kháng CD20 thể khảm); OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; kháng thể IgG2a ở chuột); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; kháng thể thể khảm kháng EGFR IgG); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD); Campath I/H (Leukosite, MA; kháng thể IgG1 được làm tương thích với người); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; kháng thể kháng CD33 IgG được làm tương thích với người); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; kháng thể kháng CD22 IgG được làm tương thích với người); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; kháng thể kháng HLA-DR được làm tương thích với người); Oncolym (Techniclone, Inc., CA; kháng thể kháng HLA-Dr10 ở chuột được đánh dấu đồng vị phóng xạ); Allomune (BioTransplant, CA; kháng CD2 mAb được làm tương thích với người); Avastin (Genentech, Inc., CA; kháng thể kháng VEGF được làm tương thích với người); Epratuzumab (Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA; kháng thể kháng CD22); và CEAcide (Immunomedics, NJ; kháng thể kháng CEA được làm tương thích với người).

Các kháng thể thích hợp khác gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể kháng lại các kháng nguyên sau: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alpha

fetoprotein, CA 242, phosphatase kiềm trong nhau thai, kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt, phosphatase axit tuyến tiền liệt, yếu tố phát triển nội mô, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, thụ thể kháng transferin, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, Kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt, thụ thể IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, chất kích dục màng đệm ở người, CD38, mucin, P21, MPG, và sản phẩm gen đột biến gây bệnh ung thư Neu.

Theo một vài phương án, chất trị liệu là chất ức chế miễn dịch. Chất ức chế miễn dịch có thể là, ví dụ, gancyclovir, etanercept, tacrolimus, cyclosporin, rapamycin, cyclophosphamid, azathioprin, mycophenolat mofetil hoặc methotrexat. Nói cách khác, chất ức chế miễn dịch có thể là, ví dụ, glucocorticoid (ví dụ, cortisol hoặc aldosteron) hoặc chất tương tự glucocorticoid (ví dụ, prednison hoặc dexamethason).

Các chất ức chế cyclooxygenase thích hợp gồm axit meclofenamic, axit mefenamic, carprofen, diclofenac, diflunisal, fenbufen, fenoprofen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, nabumeton, naproxen, sulindac, tenoxicam, tolmetin, và axit acetylsalicylic.

Các chất ức chế lipoxygenase thích hợp gồm các chất ức chế quá trình oxy hóa khử (ví dụ, các dẫn xuất của catechol butan, axit nordihydroguaiaretic (NDGA), masoprocol, phenidon, lanopalen, indazolinon, naphazatrom, benzofuranol, alkylhydroxylamin), và các chất ức chế không oxy hóa khử (ví dụ, hydroxythiazol, metoxyalkylthiazol, benzopyran và các dẫn xuất của chúng, metoxytetrahydropyran, các axit boswellic và các dẫn xuất được acetyl hóa của axit boswellic, và các axit quinolinmetoxyphenylaxetic được thể bởi các gốc cycloalkyl), và các tiền chất của các chất ức chế sự oxy hóa khử.

Các chất ức chế lipoxygenase thích hợp khác gồm các chất chống oxy hóa (ví dụ, phenol, propyl galat, flavonoid và/hoặc cơ chất xuất hiện tự nhiên chứa flavonoid, các dẫn xuất được hydroxyl hóa của flavon, flavonol, dihydroquercetin, luteolin, galangin, orobol, các dẫn xuất của chalcon, 4,2',4'-trihydroxychalcon, ortho-aminophenol, N-hydroxyure, benzofuranol, ebselen và các loài làm tăng hoạt tính của selenoenzym khử), các chất tạo chelat sắt (ví dụ, các axit hydroxamic và các dẫn xuất của chúng, N-hydroxyure, 2-benzyl-1-naphthol, catechol, hydroxylamin, carnosol trolox C, catechol, naphthol, sulfasalazin, zileuton, axit 5-hydroxyantranilic và axit 4-(omega-

arylalkyl)phenylalkanoic), các hợp chất chứa imidazol (ví dụ, ketoconazol và itraconazol), phenothiazin, và các dẫn xuất của benzopyran.

Các chất ức chế lipoxygenaza thích hợp khác gồm các chất ức chế eicosanoit (ví dụ, các axit octadecatetraenoic, eicosatetraenoic, docosapentaenoic, eicosahexaenoic và docosahexaenoic và các este của chúng, PGE1 (prostaglandin E1), PGA2 (prostaglandin A2), viprostol, 15-monohydroxyeicosatetraenoic, 15 axit-monohydroxy-eicosatrienoic và 15 axit-monohydroxyeicosapentaenoic, và leukotrien B5, C5 và D5), các hợp chất gây trở ngại với các lưu lượng canxi, phenothiazin, diphenylbutylamin, verapamil, fuscosit, curcumin, axit chlorogenic, axit cafeic, axit 5,8,11,14-eicosatetrayenoic (ETYA), hydroxyphenylretinamit, lonapalen, esculin, diethylcarbamazin, phenantrolin, baicalein, proxicromil, thioete, dialyl sulfua và di-(1-propenyl) sulfua.

Các chất đối kháng thụ thể leukotrien gồm calxitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingleheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK và F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 và Teijin TEI-1338.

Các sản phẩm sản xuất

Theo một khía cạnh khác, sản phẩm sản xuất chứa các vật liệu hữu ích để điều trị các rối loạn được mô tả ở trên được gồm. Sản phẩm sản xuất bao gồm vật chứa và nhãn. Các vật chứa thích hợp gồm, ví dụ, các bình, lọ nhỏ, đường dò, và các ống thử nghiệm. Các vật chứa có thể được tạo thành từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa giữ chế phẩm có hiệu quả điều trị bệnh lý và có thể có lỗ nạp vô trùng. Ví dụ, vật chứa có thể là túi dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có lỗ thủng bởi kim tiêm dưới da.

Chất hoạt tính trong chế phẩm là kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người. Sự đánh dấu trên hoặc có liên quan đến vật chứa chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị bệnh lý lựa chọn. Sản phẩm sản xuất có thể còn bao gồm vật chứa thứ hai bao gồm đệm được dụng, như nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer, và dung dịch dextroza. Nó có thể còn gồm có các vật liệu khác mong muốn từ thương mại và quan điểm của người sử dụng, gồm các đệm khác, chất pha loãng, chất lọc, kim, đường rò, và bao bì chèn các chỉ dẫn sử dụng.

Sáng chế được mô tả thêm trong các ví dụ dưới đây, không được dùng để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người

Các kháng thể 20E2 ở chuột, và 2H11 được chỉ ra trong các Bảng 1 và 2 trong phần trên. Việc làm tương thích với người của các dòng vô tính 20E2, và 2H11 được hoàn thiện. Thư viện được tạo thành trong đó các gốc ở người và chuột được biến đổi theo cách để vị trí được đưa ra bất kỳ có thể là gốc ở người hoặc chuột. Thư viện này có thể được tạo thành với các axit amin này khác giữa dòng gốc người và kháng thể chuột. Chỉ các dòng vô tính giữ lại chức năng của kháng thể gốc ở chuột được chọn.

Theo cách này, kháng thể A, kháng thể B và kháng thể C là các kháng thể được làm tương thích với người có nguồn gốc từ kháng thể 20E2 ở chuột (kháng thể A và kháng thể B) hoặc 2H11 (kháng thể C) được tách dòng thành IgG1-KO ở người (KO=bất hoạt gen)/trục kapa. IgG1-KO có hai đột biến trong vùng Fc, Leu234Ala và Leu235Ala để làm giảm FcγR và liên kết bổ sung.

Các kết quả về việc làm tương thích với người này dẫn đến các trình tự biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được làm tương thích với người được chỉ ra dưới đây:

SEQ ID NO:41 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGT
KVEIK

SEQ ID NO:42 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVKSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:43 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGT
KVEIK

SEQ ID NO:44 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAM
DYWAQGTLVTVSS

SEQ ID NO:45 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGT
KVEIK

SEQ ID NO:46 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLVTVSS.

SEQ ID NO:47 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGT
KVEIK

SEQ ID NO:48 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:49 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGT
KVEIK

SEQ ID NO:50 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:51 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGT
KVEIK.

SEQ ID NO:52 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGT
KVEIK

SEQ ID NO:53 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:54 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLAS
GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO:55 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO:56 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO:57 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRID
PEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTY
GYWGQGTLVTVSS.

SEQ ID NO:58 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWMGRID
PEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTY
GYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:59 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRID
PEDGDSKYAPKFQGKVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTY
GYWGQGTLVTVSS.

SEQ ID NO:60 (trình tự được tìm thấy của chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDP
EDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYG
YWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:61 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRID
PEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTY
GYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:62 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRID
PEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTY
GYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:63 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRID
PEDGDTKFAPKFQGKVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTY
GYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:64 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDP
EDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYG
YWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:65 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWMGRID
PEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYG
GYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:66 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYVHWVKQAPGQGLEWMGRID
PEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYG
GYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:67 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYYIHWVKQRPKGLEWMGRIDP
EDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTDVAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYG
YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:68 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYYIHWVKQRPKGLEWMGRIDP
EDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTDVAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYG
YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:69 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYYIHWVKQRPKGLEWMGRIDP
EDGDTKYDPKFQGKVTMTADTSTDVAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYG
YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:70 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYYIHWVKQAPGQGLEWMGRIDP
EDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTDVAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYG
YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:71 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQRPKGKLEWMGRIDP
EDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCTTSYYVGTYG
YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:72 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQAPGKLEWIGRIDPE
DGDTKYDPKFQGKATMTADTSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCTTSYYVGTYGY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:73 (trình tự chuỗi nặng biến đổi):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYIHWVQQAPGKLEWMGRIDP
EDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCTTSYYVGTYG
YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:74 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi) 1 từ kháng thể 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:75 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi) 2 từ kháng thể 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO. 76 (trình tự chuỗi nhẹ biến đổi):

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

Các kháng thể được làm tương thích với người minh họa theo sáng chế là các kháng thể có các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đưa ra trong bảng dưới đây. Các trình tự được gạch dưới in đậm trong bảng dưới đây là các vùng biến đổi trong khi các trình tự không gạch dưới, viết thường là các chuỗi hằng định:

Nhận dạng	Trình tự	SEQ ID NO.
Kháng thể A (Chuỗi nhẹ)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTW</u> <u>HQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGGTKVEIKRTVAAPSFI</u> FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREKVVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNREGC	26
Kháng thể A (Chuỗi nặng, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
Kháng thể A (Chuỗi nặng, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
Kháng thể A (Chuỗi nặng, IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	29
Kháng thể A (Chuỗi nặng, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK	30

	ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Kháng thể B (Chuỗi nhẹ)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLLNSGNQKNYL</u> <u>TWHQOKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDFRSGSGSGTDFT</u> <u>LTISLQAEDVAVYYCONDYTYPLTFGGGTKVEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Kháng thể B (Chuỗi nặng, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Kháng thể B (Chuỗi nặng, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
Kháng thể B (Chuỗi nặng, IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK	34
Kháng thể B (Chuỗi nặng, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK	35

	ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Kháng thể C (Chuỗi nhẹ)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFO</u> <u>QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> <u>TISSLQPEDFATYYCOQRTFYPYTFGGGTKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Kháng thể C (Chuỗi nặng, IgG1KO)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQKGATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLTLTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
Kháng thể C (Chuỗi nặng, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQKGATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLTLTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Kháng thể C (Chuỗi nặng, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQKGATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLTLTVSSASTKG</u> PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN DKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	39
Kháng thể C (Chuỗi nặng, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQKGATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLTLTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

	LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
--	--	--

Các vùng biến đổi được tái tạo dòng thành một hoặc hai vectơ biểu hiện IgG thích hợp:

A) dạng IgG1-KO (bất hoạt)/kapa ở người với đột biến kép Leu234Ala, Leu235Ala trong vùng Fc để làm giảm chức năng của miền tác động như FcγR và liên kết bổ sung.

B) dạng IgG4-DM (đột biến kép)/kapa ở người với đột biến Ser228Pro trong vùng khớp để làm giảm sự xảy ra của các phân tử nửa của IgG4 và đột biến Leu235Glu để làm giảm thêm liên kết FcγR

Hai kháng thể A và kháng thể B ứng viên được lựa chọn được tinh chế và đánh giá bởi tiêu chuẩn dưới đây:

- Hình thái của CCF (tính đục)
- Các đặc tính lọc của CCF
- Sản lượng đối với rProteinA
- Tính đục dựa trên sự rửa giải và trung hòa
- Các khối kết tụ hòa tan (SEC)
- Mẫu nhiễm tạp / tinh chế (SDS)
- Mẫu nạp (IEF)

Ví dụ 2: Dữ liệu in vitro

Kháng thể A, kháng thể B và kháng thể C được mô tả cùng với các kháng thể 4D11 (Kirin/ Astellas) và PG-102 (PanGenetics) được tạo ra dựa trên các trình tự được công bố. Dữ liệu với kháng thể A, kháng thể B, kháng thể C và 4D11 được chỉ ra dưới đây. PG-102 bộc lộ kháng thể chủ vận và chỉ ức chế không hoàn toàn sự tăng sinh tế bào B (không chỉ ra). Bảng 2.2. tóm tắt dữ liệu thu được. Phần mô tả chi tiết hơn của dữ liệu dưới đây trong Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Tóm tắt dữ liệu *in vitro* của kháng thể A, kháng thể B và kháng thể C và kháng thể kháng CD40 Kirin's 4D11.

Thông số/Thử nghiệm	Kháng thể A	Kháng thể B	Kháng thể C	4D11
Kd +/- hu. Huyết thanh	<100pM	<100pM	<100pM	<100pM
Liên kết tế bào (EC50/nM ± SD	1,2 (±0,28)	1,5 (±0,68)	1,7 (±0,28)	0,9 (±0,3)
Sự tăng sinh tế bào B: Sự đối kháng (IC50/nM±SD)	0,3 (±0,13)	0,2 (±0,10)	0,1 (±0,004)	0,03 (±0,02)
Sự tăng sinh tế bào B: Sự chủ vận (SI*) (IC50/nM±SD)	Không có sự chủ vận (SI <2)	Không có sự chủ vận (SI <2)	Không có sự chủ vận (SI <2)	Không có sự chủ vận (SI <2)
Các tế bào hình tua/IL-12/23p40 Chất đối kháng (IC50/nM ± SD)	< 1nM	< 1nM	< 1nM	< 1nM
Các tế bào hình tua/IL-12/23p40 Sự chủ vận	Không có sự chủ vận	Không có sự chủ vận	Không có sự chủ vận	Không có sự chủ vận
Phản ứng chéo giữa các loài. Hu/Cyno Liên kết (các tỷ lệ EC50**)	3	2	1	Không được thử nghiệm

* SI, chỉ số kích thích; ** Tỷ lệ > 1 có nghĩa là liên kết tăng với Cyno được so sánh với người

A. Liên kết của các kháng thể được làm tương thích với người với CD40 tế bào và protein CD40 tái tổ hợp

Liên kết đặc hiệu của các kháng thể được làm tương thích với người với CD40 tế bào được phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng bằng cách sử dụng các tế bào HEK293 được gây nhiễm CD40 ở người. Liên kết thụ thuộc nồng độ của kháng thể A, kháng thể B, và kháng thể C được quan sát. Các kháng thể bộc lộ dữ liệu liên kết tương tự được chỉ ra trong Fig. 1B. Các giá trị EC50 của kháng thể theo sáng chế và kháng thể Kirin 4D11 tất cả nằm trong khoảng giống nhau ~1nM có vẻ phù hợp nhất với giới hạn nhạy của thử nghiệm do các mức cao của CD40 trong các tế bào được gây nhiễm. Liên kết đặc hiệu của các kháng thể được làm tương thích với người với CD40 tế bào trên các tế bào Ramos cũng chứng minh được liên kết phụ thuộc nồng độ. Các kháng thể bộc lộ các dữ liệu liên kết khác nhau không đáng kể (được chỉ ra trong Fig. 2) và các giá trị EC50 nằm trong khoảng từ 0,21 đến 1,22nM. Không có liên kết được phát hiện trên các

tế bào âm tính CD40 như các tế bào HEK293 không được gây nhiễm hoặc dòng tế bào T HSB-2 do đó xác nhận được sự liên kết chọn lọc với CD40 (dữ liệu không được chỉ ra).

Ái lực của kháng thể A, kháng thể B và kháng thể C liên kết với protein CD40-Fc ở người được đo thông qua ForteBio Octet và cho thấy có hằng số phân ly (K_D) là $<100\text{pM}$. Do kháng thể và các tác dụng của ái tính hóa trị hai CD40-Fc ngăn chặn các K_d thấp hơn 100pM khỏi sự chính xác được xác định. Thêm vào đó, liên kết với CD40-Fc được phân tích khi không có và có 50% huyết thanh người và không có tác dụng đáng kể của huyết thanh đối với liên kết được quan sát (dữ liệu không thể hiện).

B. Hoạt tính của các kháng thể được làm tương thích với người trong sự hoạt hóa tế bào B/ các thử nghiệm tăng sinh

Hoạt tính của các kháng thể được làm tương thích với người được thử nghiệm trong thử nghiệm tăng sinh tế bào B trong đó các tế bào B ở người có nguồn gốc từ máu ngoại vi được kích thích bởi CD40L tái tổ hợp với sự có mặt của IL-2 và IL-4. Kháng thể A, kháng thể B và kháng thể C chỉ ra sự ức chế có hiệu lực của sự tăng sinh các tế bào B (được chỉ ra trong các Fig. 3A và 3B). Sự so sánh các đường cong ức chế và các giá trị IC_{50} của các kháng thể BI và kháng thể Kirin 4D11, chỉ ra kháng thể 4D11 có hiệu lực cao hơn (Fig.3B và 4) khi thử nghiệm trong số nhiều người cho. Khi thử nghiệm hoạt tính chủ vận khi không có CD40L, các kháng thể, kháng thể B, kháng thể A và kháng thể C không gây ra sự tăng sinh tế bào B bất kỳ cao hơn các mức cơ bản với các nồng độ lớn hơn $10\mu\text{g/ml}$ (67nM) (được chỉ ra trong Fig.4) tương tự với kháng thể 4D11.

Kháng thể cạnh tranh 4D11 được xuất hiện có hiệu lực hơn không đáng kể với IC_{50} trung bình bằng $\sim 0,02\text{nM}$ và không có các tác dụng chủ vận. Dữ liệu dành cho ba kháng thể BI và 4D11 được tóm tắt trong Fig. 4 và Bảng 2.2 ở trên. Kháng thể cạnh tranh khác, PG-102 (có nguồn gốc từ dòng vô tính 5D12), cũng được thử nghiệm trong thử nghiệm này, bộc lộ các tác dụng chủ vận đáng kể kích thích sự tăng sinh của tế bào B khi không có CD40L (Fig.4). Do đó, sự thiếu hoạt tính chủ vận của những người được chọn chính của chúng tôi khác biệt rõ ràng với PG-102.

Trong thử nghiệm thứ hai các kháng thể được đánh giá về sự ức chế sự điều hòa tăng của CD86 trong các tế bào B ở người. Trong trường hợp này, thử nghiệm có thể được tiến hành bởi máu toàn phần ở người hoặc trong các tế bào B được tinh chế, cả hai với sự có mặt của CD40L ngoại sinh. Sự phù hợp với dữ liệu tăng sinh tế bào B, Kháng

thể B Kháng thể A và Kháng thể C được thử nghiệm trong máu toàn phần ở người chỉ ra sự ức chế có hiệu lực của sự điều hòa tăng của CD86 được trung gian bởi CD40 như được đo bởi máy đếm tế bào theo dòng (được chỉ ra trong Fig. 5). Kháng thể C bộc lộ tính có hiệu lực tương tự với 4D11 trong thử nghiệm này trong khi tính hiệu lực của Kháng thể B và Kháng thể A có phần yếu hơn. Sự so sánh Kháng thể B và 4D11 trên các tế bào B được tinh chế hoặc trong máu toàn phần, chỉ ra rằng tính có hiệu lực của Kháng thể B (các giá trị IC50 và IC90) không bị thay đổi tương đối với các tế bào B được tinh chế được so sánh với các tế bào B với sự có mặt của các tế bào mang CD40 khác hoặc huyết thanh, trong khi 4D11 trải qua sự dịch chuyển mạnh về tính hiệu lực trong máu toàn phần trong các điều kiện máu toàn phần (được chỉ ra trong Fig.6).

Dữ liệu tương tự được phát triển khi Kháng thể B Kháng thể A và Kháng thể C được đánh giá để ức chế sự điều hòa tăng của CD86 đối với các tế bào B ở khỉ cynomolgus khi được tiến hành với các mẫu máu toàn phần (được chỉ ra trong Fig.7). Kháng thể B, kháng thể A và kháng thể C được thử nghiệm trong máu toàn phần của khỉ cynomolgus chỉ ra sự ức chế có hiệu lực sự điều hòa tăng của CD86 được trung gian bởi CD40 như được đo bởi máy đếm tế bào theo dòng. Các kháng thể này do đó tất cả chỉ ra tính phản ứng chéo chức năng với CD40 ở khỉ cynomolgus có hiệu lực tương tự với CD40 ở người.

Tác dụng của Kháng thể B IgG1KOb và kháng thể B IgG1WT được định giá về khả năng để trung gian tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (Fig.13). Trong thử nghiệm này các tế bào RAMOS được cấy bởi các PBMC ở người với tỷ lệ của miền tác động với tế bào đích là 50:1. Kháng thể B IgG1KOb và Kháng thể B IgG1WT được chuẩn độ từ 20ug/ml và kéo dài sự chết tế bào được kiểm tra bằng sự giải phóng LDH. Dữ liệu được chỉ ra từ một thử nghiệm điển hình. Dữ liệu chỉ ra rằng kháng thể A IgG1Wt 20E2-12-RIgG1WT là một chất trung gian hữu hiệu của ADCC và Kháng thể B IgG1KOb chứa các đột biến loại trừ chức năng của miền tác động không có hoạt tính ADCC.

Ví dụ 3: Nghiên cứu dược lực học/ dược động học

A. Đưa vào trong tĩnh mạch khỉ Cynomolgus liều dùng đơn chứa kháng thể A và kháng thể B ở nồng độ 1 hoặc 10mg/kg

Kháng thể A và kháng thể B lần lượt được định lượng tại nồng độ 1 và 10 mg/kg theo đường trong tĩnh mạch ở khỉ *Cynomolgus* đực (N=3)/liều dùng. Mẫu máu được thu từ 0-504 giờ (3 tuần), huyết thanh được thu lại, và các mẫu được bảo quản tại nhiệt độ -20°C cho đến khi phân tích. Các mẫu được phân tích bằng phương pháp ELISA kẹp như mô tả trên đây. Dữ liệu về nồng độ-thời gian trong huyết thanh của cả hai huyết thanh ở khỉ sau hai liều dùng trong tĩnh mạch và thông số dược lực học được tóm tắt trong Fig.8 và Bảng 2.7.1 (kháng thể A) và 2.7.2 (kháng thể B) nêu dưới đây. Hai kháng thể này thể hiện được lực học phụ thuộc liều dùng, tức là ở liều dùng thấp, sự thanh thải có thể chủ yếu thích hợp với khuynh hướng qua trung gian mục tiêu trong đó ở liều dùng cao hơn kháng thể được thanh thải chủ yếu bởi sự chuyển hóa. Dữ liệu dược lực học phụ thuộc liều dùng tương tự đã được quan sát đối với các mục tiêu kết hợp màng nhắm đích MAbs khác (ví dụ CD19, CD20, EGFR, CD146 và HER2). Sự thanh thải kháng thể A lần lượt là 0,8 và 0,1mL/giờ/kg đối với liều lượng 1 và 10mg/kg. Sự thanh thải kháng thể B lần lượt là 0,7 và 0,1mL/giờ/kg đối với liều lượng 1 và 10mg/kg. Tương tự, chu kỳ bán hủy của kháng thể A là 1 và 13 ngày lần lượt đối với liều lượng 1 và 10mg/kg và chu kỳ bán hủy của kháng thể B là 2 và 13 ngày đối với cùng liều lượng tương ứng. Mặc dù kháng thể B có chu kỳ bán hủy biên dài hơn ở liều dùng thấp hơn so với cùng liều dùng cho kháng thể A, nhưng hi vọng sự chênh lệch này không chuyển thành sự phơi nhiễm kéo dài hơn do sự dùng kinh niên. AUC đối với cả hai hợp chất tỷ lệ thuận và thể tích phân bố (Vss) đối với cả hai hợp chất xấp xỉ tỷ lệ phân phối của thể tích huyết thanh (~40mL/kg) thể hiện sự phân bố mô giới hạn thường được thấy cho liệu pháp protein lớn, phân cực. Tổng thể, không có sự khác biệt về thông số dược lực học giữa hai kháng thể.

Bảng 2.7.1: Thông số dược lực học của kháng thể A ở khỉ *cynomolgus* đực (N=3)/liều dùng sau liều dùng đơn trong tĩnh mạch 1 và 10mg/kg.

Liều dùng (mg/kg)	CLp (mL/giờ/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (μ M,giờ)	T1/2 (ngày)	MRT (ngày)
1	0,8 $\pm$ 0,03	41 $\pm$ 6	8,0 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2
10	0,10 $\pm$ 0,02	42 $\pm$ 6	660 $\pm$ 92	12,6 $\pm$ 0,5	17,5 $\pm$ 0,3

Bảng 2.7.2: Thông số dược lực học của Kháng thể B ở chuột cynomolgus đực (N=3)/liều lượng sau liều dùng đơn trong tĩnh mạch 1 và 10mg/kg.

Liều dùng (mg/kg)	CLp (mL/giờ/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (μ M,giờ)	T1/2 (ngày)	MRT (ngày)
1	$0,7 \pm 0,16$	40 ± 2	$10,1 \pm 2,7$	$1,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,8$
10	$0,09 \pm 0,01$	41 ± 6	744 ± 55	$13,3 \pm 3,0$	$19,3 \pm 4,2$

B. Nghiên cứu dược động học *ex vivo*

Chúng tôi phân tích tác động dược động học của các kháng thể kháng CD40, là một phần của nghiên cứu PK mô tả trên đây. Cuối nghiên cứu này, mẫu máu toàn phần được ủ với CD40L tái tổ hợp qua đêm và sự tăng biểu hiện CD86 trên tế bào B được xác định bằng trắc lưu tế bào. Các mẫu được phân tích vào ngày 0 (trước xử lý), ngày 2, 7 và 14 sau định lượng. Mặc dù sự tăng biểu hiện CH86 tương đối nhỏ (~5-20-%) nhưng tác dụng phụ thuộc liều dùng đã được quan sát thấy (thể hiện trong Fig.9). Trong nhóm động vật được định lượng 10mg/kg Kháng thể A và Kháng thể B, sự gây ra CD86 bị ức chế hoàn toàn vào ngày 2, 7 và 14 thích hợp với sự phơi nhiễm kéo dài liên tục ở liều dùng này. Các động vật thử nghiệm được định lượng 1mg/kg thể hiện sự ức chế hoàn toàn vào ngày 2, sự ức chế một phần vào ngày 4 và không ức chế vào ngày 14. Sự mất tác dụng dược động học theo thời gian liên quan đến sự thanh thải nhanh hơn của kháng thể ở nhóm liều dùng thấp.

Ví dụ 4: Nghiên cứu liên quan đến độc tính: CD40 trên tiểu huyết cầu

CD40 được biểu hiện chủ yếu trên tiểu huyết cầu ở người (Henn, et al., 2001) và (Inwald, et al., 2003), trong khi đó CD40L được biểu hiện nhanh và tạm thời trên bề mặt tế bào của các tiểu huyết cầu đã hoạt hóa (Henn, et al., 2001). Mặc dù các kháng thể kháng CD40 không có sự liên kết Fc γ R hi vọng là không có tác dụng lên các tiểu huyết cầu, nhưng điều quan trọng là điều này lại xảy ra. Nghiên cứu trắc lưu tế bào được thực hiện để thể hiện sự liên kết của các kháng thể chính kháng CD40 với tiểu huyết cầu ở người và khỉ cynomolgus.

Trước đây bằng trắc lưu tế bào đã biết rằng kháng thể kháng CD40 G28.5 và mAb 89 liên kết với các tiểu huyết cầu ở người không hoạt động (Henn, et al., 2001). Điều này được xác nhận bằng cách sử dụng kháng thể G28.5 được đánh dấu FITC. Sự pha loãng lần lượt 5 lần G28.5 được thực hiện và khoảng nồng độ từ 0,5 μ g/ml đến 0,32ng/ml được

ủ trong 100µl tiểu huyết cầu thu được từ người (2 người cho) hoặc khỉ cynomolgus (3 người cho) trong khoảng thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Ngoài ra, mAb kháng CD745 được đánh dấu APC được sử dụng để nhận dạng tiểu huyết cầu đã liên kết với các loại tế bào CD40⁺ khác để loại trừ các tế bào này ra khỏi phép phân tích. Sau khi nhuộm màu kháng thể, các tiểu huyết cầu được rửa và cố định bằng Optilyse C trắc lưu tế bào được thực hiện. Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) được xác định là phép đo sự liên kết kháng thể với các tiểu huyết cầu CD45⁺.

Kháng thể 5c3 có bán trên thị trường và kháng được chọn của sáng chế là mAb ở chuột kháng CD40 được đánh dấu FITC. Sự liên kết với các tế bào Ramos được xác nhận. Số phân tử FITC trên mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 3 FITC trên một phân tử kháng thể. Pha loãng liên tiếp 5 lần mAb có bán trên thị trường và mAb kháng CD40 của sáng chế được thực hiện nằm trong khoảng từ 0,5µg/ml đến 0,32ng/ml và được ủ với tiểu huyết cầu ở người (3 người cho) và khỉ cynomolgus (2 vật cho) trong khoảng thời gian 30 phút tại nhiệt độ trong phòng.

Đồ thị đại diện thể hiện sự liên kết của mAb kháng CD40 theo sáng chế ở chuột với tiểu huyết cầu ở người được thể hiện trong Fig.11. Bốn kháng thể đơn dòng theo sáng chế thể hiện sự liên kết đặc hiệu với các tiểu huyết cầu ở người so với kháng thể đối chứng đồng vị được đánh dấu FITC. 10F2, 2H11, 19B10 và 20E2 thể hiện sự liên kết có thể so sánh được với các tiểu huyết cầu. Xu hướng tương tự được quan sát thấy đối với tiểu huyết cầu ở khỉ cynomolgus (dữ liệu không được thể hiện).

Ngoài các cuộc nghiên cứu này, kháng thể B và 4D11 được đánh dấu trực tiếp được so sánh về khả năng liên kết với các tiểu huyết cầu và tế bào B ở mẫu máu người và khỉ cynomolgus (được thể hiện trong Fig.12). 4D11 thể hiện sự liên kết tương tự (như được minh họa bởi EC50) với cả tế bào B và tiểu huyết cầu ở mẫu máu người và khỉ cynomolgus. Kháng thể B thể hiện kiểu tương tự nhưng với hiệu lực liên kết yếu hơn nhiều.

Ví dụ 5: Nghiên cứu dược học in vivo trên mô hình chuột NSG

Hiệu quả của các kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể A được đánh giá trong mô hình sản xuất kháng thể trong đó kháng thể PBMC ở người được tiêm vào chuột NSG thiếu hụt miễn dịch để tạo ra đáp ứng mảnh ghép chống lại ký chủ. Sự sản xuất đáng kể IgM (hIgM) và IgG (hIgG) ở người có thể được phát hiện bắt đầu 2

tuần sau khi ghép. Sự điều trị với kháng thể A ở liều dùng 5 và 1mg/kg ức chế đáng kể đáp ứng hIgG và hIgM tại tuần 2 và 3 sau khi ghép. Kháng thể so sánh (4D11) được đánh giá tại liều dùng đơn 5mg/kg và còn thể hiện sự phá hủy đáp ứng. Trong nghiên cứu thứ hai, tất cả kháng thể trong số kháng thể A, kháng thể B và kháng thể C được thử nghiệm tại liều dùng đơn 1mg/kg và thể hiện sự ức chế hoàn toàn đáp ứng IgM và IgG tại tuần 2 (Fig.10).

Ví dụ 6: Phân tích chỉ thị sinh học

Tăng số thụ thể: Sự tăng số thụ thể do CD40L gây ra của các thụ thể có thể được đo bằng trắc lưu tế bào. Toàn bộ máu ở người có thể được kích thích với nồng độ tối ưu của CD40L hòa tan và tỷ lệ đầy đủ của các tế bào CD20+Thụ thể+ có thể được đo bằng trắc lưu tế bào. Sự thay đổi tỷ lệ biểu hiện CD86 trên các tế bào CD20 được đo song song với thử nghiệm pk ở khí cyanomologous đánh giá các kháng thể A và B (Fig.9). Dữ liệu thể hiện sự ức chế sự tăng số thụ thể CD86 tại các thời điểm thích hợp với sự phơi nhiễm kháng thể.

Hệ protein đích: Sự bài tiết protein tăng sau sự kích thích CD40 trong máu có thể được sử dụng là (các) chỉ thị sinh học tiềm lực. Nồng độ tối ưu của của CD40L hòa tan và thời gian kích thích được thiết lập bằng cách sử dụng nền hạt đa thành phần Luminex phát hiện MDC/CCL22 và một vài protein tiết ra khác. Các mẫu lâm sàng sẽ được đánh giá từ máu người trong khoảng liều dùng đầy đủ của mAb kháng CD40.

Thời gian cư trú của thụ thể: Thời gian cư trú của thụ thể CD40 có thể được xác định trong thử nghiệm *in vitro* hoặc *ex vivo* dựa vào phép phân tích trắc lưu tế bào của tế bào B trong máu người. Kháng thể hiện tại của sáng chế và kháng thể kháng CD40 không cạnh tranh 5C3 sẽ được sử dụng để định lượng thử nghiệm thời gian cư trú của thụ thể.

Ví dụ 7: Hoạt tính kháng khối u của kháng thể kháng CD40 được làm tương thích với người

Trong một số trường hợp, có thể mong muốn xác định đặc tính kháng khối u của sáng chế. Phương pháp xác định có thể được thực hiện bằng cách thử nghiệm hoạt tính chống khối u của kháng thể kháng CD40 làm tương thích với người ở mô hình ghép ngoại lai u limpho ở chuột SCID. Mô hình SCID này có thể được tiêm tế bào ung thư để có khối u, ví dụ 5×10^6 triệu tế bào khối u có thể được tiêm dưới da vào chuột SCID

(10/nhóm) 13 ngày trước khi bắt đầu điều trị bằng thuốc. Kháng thể kháng CD40 ở chuột của sáng chế hoặc phép so sánh (ví dụ, đối chứng hoặc kháng thể làm tương thích với người khác) được đưa vào trong màng bụng 3 lần một tuần ((4mg/kg/liều dùng) với 8 hoặc 5 liều dùng. Sự phát triển và lớn lên của khối u được theo dõi ở chuột và thể tích khối u có thể được đo hàng tuần trong suốt thời gian nghiên cứu, ví dụ khoảng thời gian nghiên cứu 14 ngày. Tốt hơn là, kết quả sẽ thể hiện sự tăng gấp 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 lần hoặc lớn hơn ở sự lớn lên của khối u ở chuột đối chứng so với chuột được điều trị bằng kháng thể của sáng chế. Tốt hơn là, qua khoảng thời gian điều trị, sự phát triển của khối u ở chuột được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế là không đáng kể. Dữ liệu này có thể chứng thực rằng kháng thể làm tương thích với người được thử nghiệm có tác dụng ức chế sự phát triển khối u ở mô hình ghép ngoại lai u limpho B này.

Ví dụ 8: Khả năng sống kéo dài bởi kháng thể kháng CD40

Hiệu quả của kháng thể kháng CD40 làm tương thích với người đối với sự sống sót của chuột có khối u như mô tả trên đây có thể được thử nghiệm trong mô hình ghép ngoại lai u limpho ở chuột SCID. Chuột SCID (10/nhóm) được cấy trong tĩnh mạch 1 x 10⁶ triệu tế bào khối u ba ngày trước khi điều trị bằng kháng thể. Sau đó, chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 ở chuột hoặc làm tương thích với người của sáng chế hoặc đối chứng Ig, được đưa vào trong màng bụng một tuần hai lần (4mg/kg/liều dùng) cho tổng số năm liều dùng. Sau đó, lòng chuột có thể được kiểm tra hàng sự sống của chuột để xác định mức độ hiệu quả của các kháng thể trong việc kéo dài sự sống của đối tượng mắc bệnh ung thư.

Tài liệu tham khảo khác nhau, bao gồm đơn patent, patent, và ấn phẩm khoa học được trích dẫn ở đây, nội dung bộc lộ của chúng được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ chúng. Sự trích dẫn hoặc xác định tài liệu tham khảo bất kỳ ở đây không được coi là sự bổ sung tài liệu tham khảo có trong tình trạng kỹ thuật vào sáng chế.

Việc ứng dụng các tài liệu theo sáng chế không làm giới hạn phạm vi của sáng chế bởi các phương án cụ thể được mô tả theo sáng chế. Thực vậy, các biến thể khác nhau sẽ nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cùng với các tài liệu theo sáng chế và các ví dụ kèm theo. Các cải biến này được dự định thuộc phạm vi yêu cầu bảo hộ bên dưới.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm:

a) trình tự CDR1 chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 9 đến SEQ ID NO.11, trình tự CDR2 chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.12 đến SEQ ID NO.15, và trình tự CDR3 chuỗi nặng từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.16 đến SEQ ID NO.17; và

b) trình tự CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.18 đến SEQ ID NO.21, trình tự CDR2 chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO.22 đến SEQ ID NO.23, và trình tự CDR3 chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 đến SEQ ID NO.25.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO. 10, trình tự chuỗi nặng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 13 và trình tự chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO:16; và trong đó kháng thể này bao gồm trình tự chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO:19, trình tự chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO:22 và trình tự chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO:24.

3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO. 9, trình tự chuỗi nặng CDR2 nêu trong SEQ ID NO:14 và trình tự chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO:16; và trong đó kháng thể này bao gồm trình tự chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO:20, trình tự chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO:22 và trình tự chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO:24.

4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự CDR1 chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO. 11, trình tự chuỗi nặng CDR2 nêu trong SEQ ID NO:15 và trình tự chuỗi nặng CDR3 nêu trong SEQ ID NO:17; và trong đó kháng thể này bao gồm trình tự chuỗi nhẹ CDR1 nêu trong SEQ ID NO:21, trình tự chuỗi nhẹ CDR2 nêu trong SEQ ID NO:23 và trình tự chuỗi nhẹ CDR3 nêu trong SEQ ID NO:25.

5. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO.27 và SEQ ID NO.26;

SEQ ID NO.28 và SEQ ID NO.26; SEQ ID NO.29 và SEQ ID NO.26; SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.26; SEQ ID NO.32 và SEQ ID NO.31; SEQ ID NO.33 và SEQ ID NO.31; SEQ ID NO.34 và SEQ ID NO.31; SEQ ID NO.35 và SEQ ID NO.31; SEQ ID NO.37 và SEQ ID NO.36; SEQ ID NO.38 và SEQ ID NO.36; SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.36; SEQ ID NO.40 và SEQ ID NO. 36.

6. Được phẩm chứa: (i) kháng thể theo điểm 1; và (ii) tá được được dụng; và trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó tùy ý được liên hợp với chất thứ hai.

7. Kháng thể được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:11, trình tự CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:15 và trình tự CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:17; và trong đó kháng thể này chứa trình tự CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:21, trình tự CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:23 và trình tự CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:25.

8. Kháng thể được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự CDR1 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:9, trình tự CDR2 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:12 và trình tự CDR3 của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:16; và trong đó kháng thể này chứa trình tự CDR1 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:18, trình tự CDR2 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:22 và trình tự CDR3 của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:24.

9. Kháng thể được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:44 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:43.

10. Kháng thể được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:52.

11. Kháng thể được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:56.

12. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người chứa chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:30 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:26.

13. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người chứa chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:35 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:31.

14. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người chứa chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:40 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:36.

15. Dược phẩm chứa: (i) kháng thể theo điểm 12; và (ii) tá dược được dụng; và trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó tùy ý được liên hợp với chất thứ hai.

16. Dược phẩm chứa: (i) kháng thể theo điểm 13; và (ii) tá dược được dụng; và trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó tùy ý được liên hợp với chất thứ hai.

17. Dược phẩm chứa: (i) kháng thể theo điểm 14; và (ii) tá dược được dụng; và trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó tùy ý được liên hợp với chất thứ hai.

18. Dược phẩm chứa: (i) kháng thể theo điểm 7; và (ii) tá dược được dụng; và trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó tùy ý được liên hợp với chất thứ hai.

19. Dược phẩm chứa: (i) kháng thể theo điểm 8; và (ii) tá dược được dụng; và trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó tùy ý được liên hợp với chất thứ hai.

20. Polynucleotit phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người mà liên kết đặc hiệu với CD40 của người có trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID. NO:50, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 hoặc SEQ ID NO:73; và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm

trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:5 đến SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75 hoặc SEQ ID NO:76.

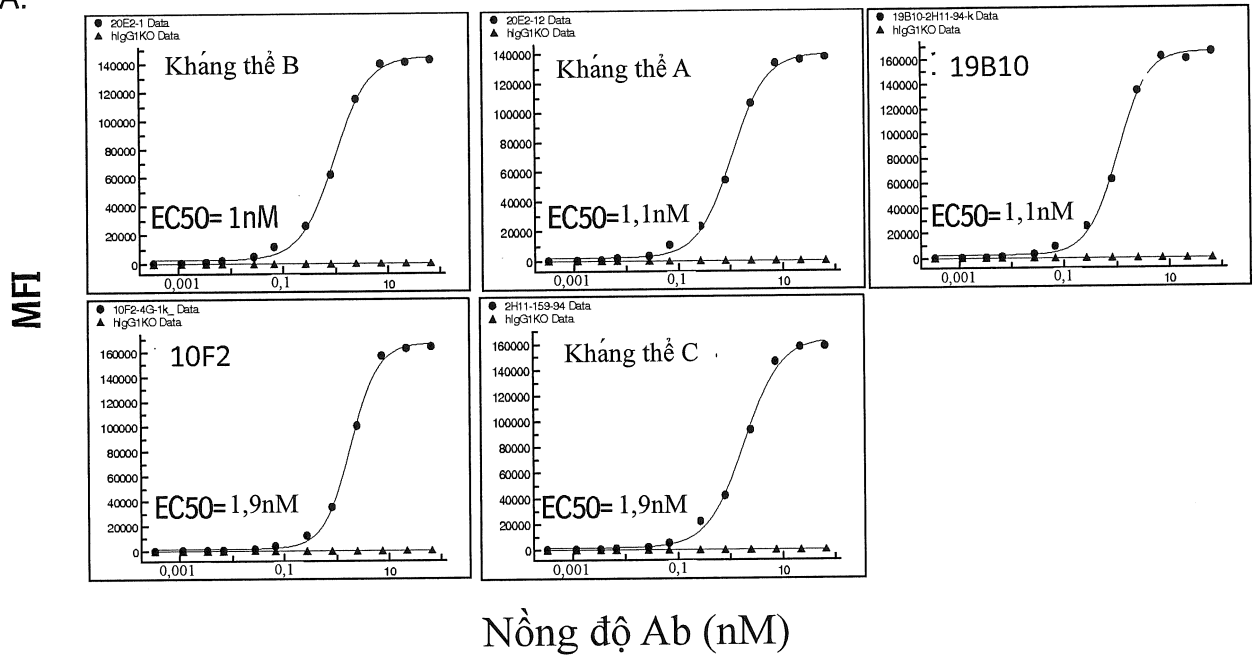
21. Polynucleotit theo điểm 20, trong đó trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:40; và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31 hoặc SEQ ID NO:36.

22. Polynucleotit theo điểm 20, trong đó trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 hoặc SEQ ID NO:73; và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75 hoặc SEQ ID NO:76.

23. Polynucleotit theo điểm 20, trong đó trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn lần lượt từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO:27 và SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:29 và SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:34 và SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:35 và SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:37 và SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:39 và SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:36.

FIG. 1

A.



B.

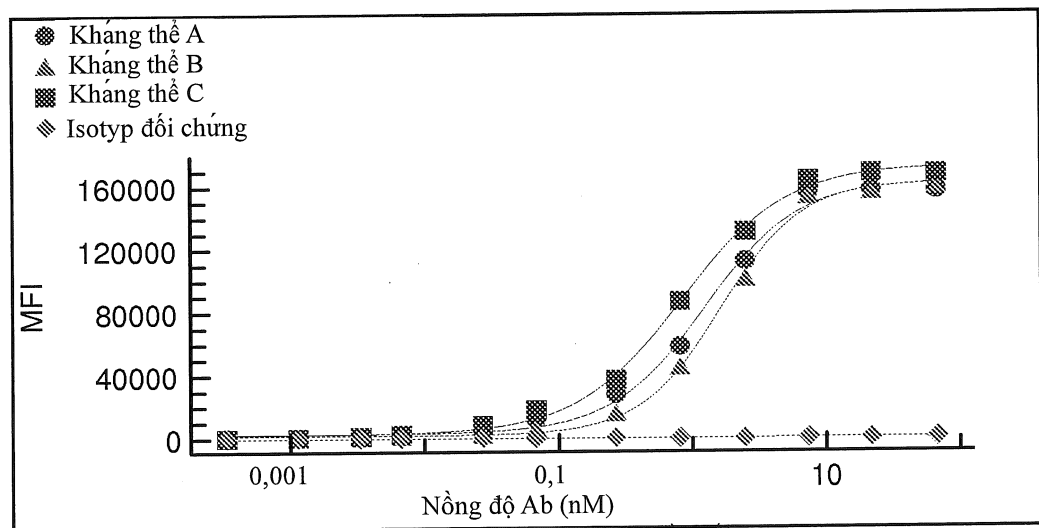


FIG. 2

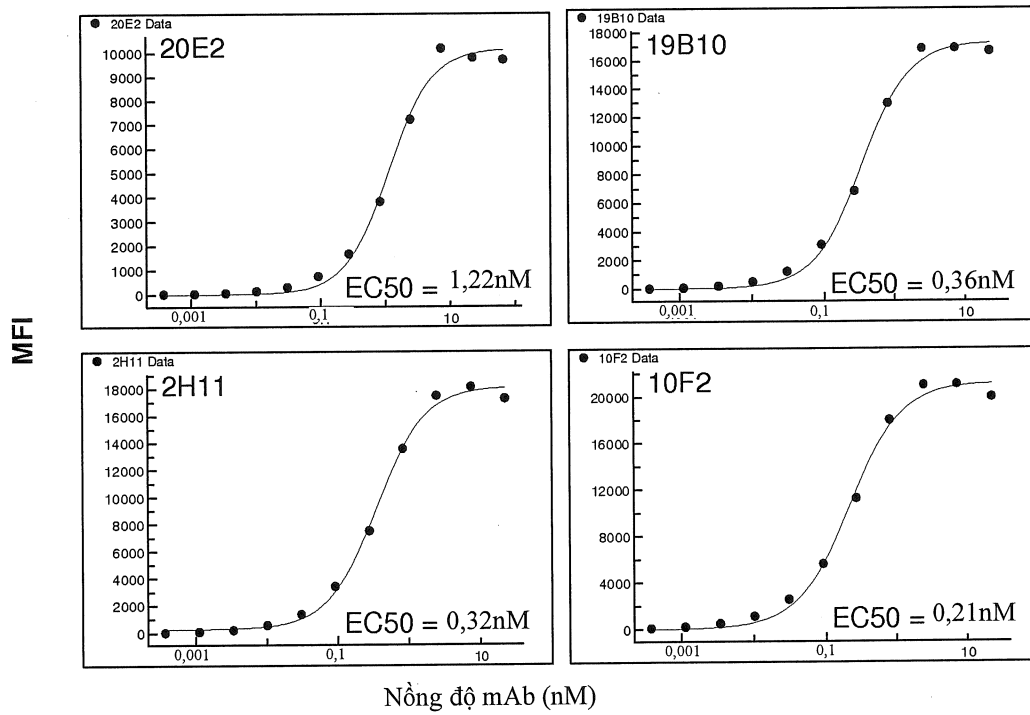
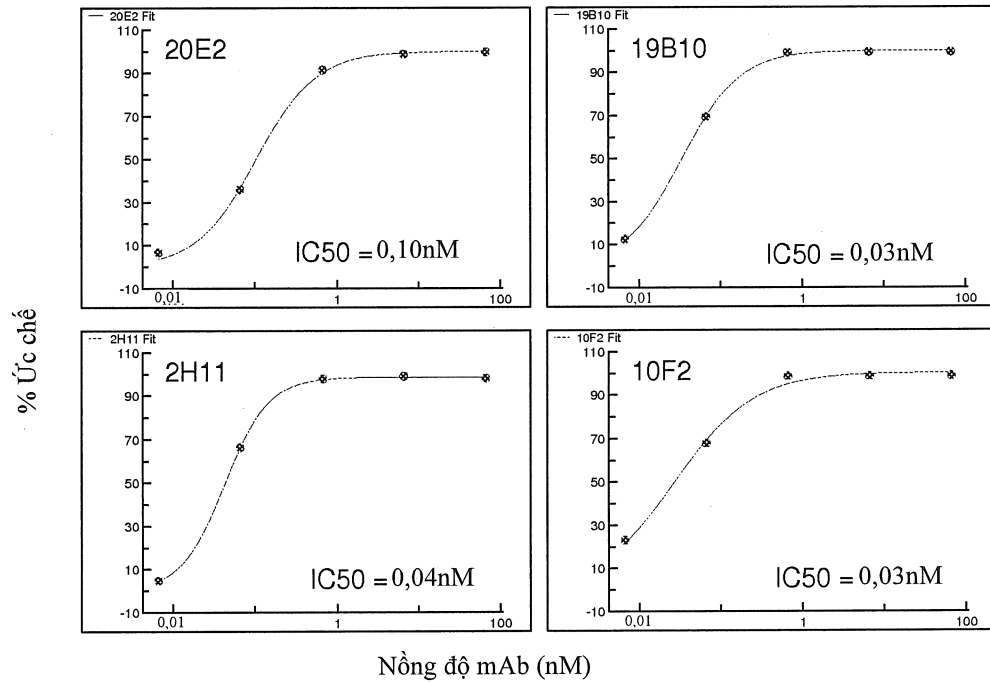


FIG. 3

A.



B.

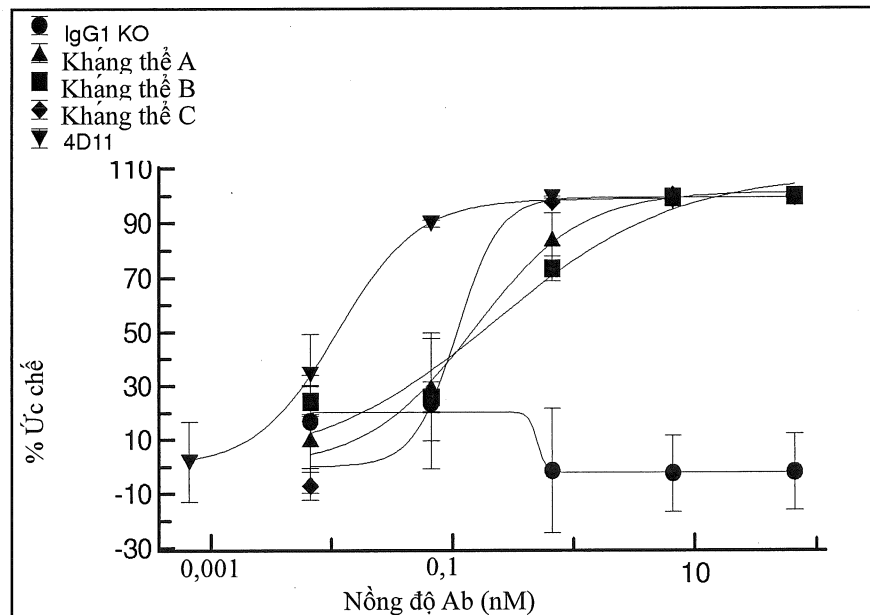


FIG. 4

Thử nghiệm tăng sinh tế bào B ở người			
		Chất đối kháng	Cơ chủ vận
Tên kháng thể	Isotyp	Avg. IC50 nM $\pm$ SEM (n)	SI $\pm$ SEM (n)
Kháng thể B	hlgG1KO	0,2 $\pm$ 0,09 (n=3)	1 $\pm$ 0,3 (n=3)
Kháng thể A	hlgG1KO	0,3 $\pm$ 0,03 (n=3)	1 $\pm$ 0,13 (n=3)
Kháng thể C	hlgG1KO	0,1 $\pm$ 0,01 (n=3)	1 $\pm$ 0,06 (n=3)
10F2	hlgG1KO	0,8 $\pm$ 0,11 (n=3)	1 $\pm$ 0,09 (n=3)
4D11	hlgG4DM	0,02 $\pm$ 0,01 (n=3)	1 $\pm$ 0,11 (n=3)
G28.5	mlgG1	NT	7 $\pm$ 1,94 (n=3)
mu5D12	hlgG4Pro	Không có sự ức chế đến 67nM	18 $\pm$ 3,1 (n=3)

NT= Không được thử nghiệm

FIG. 5

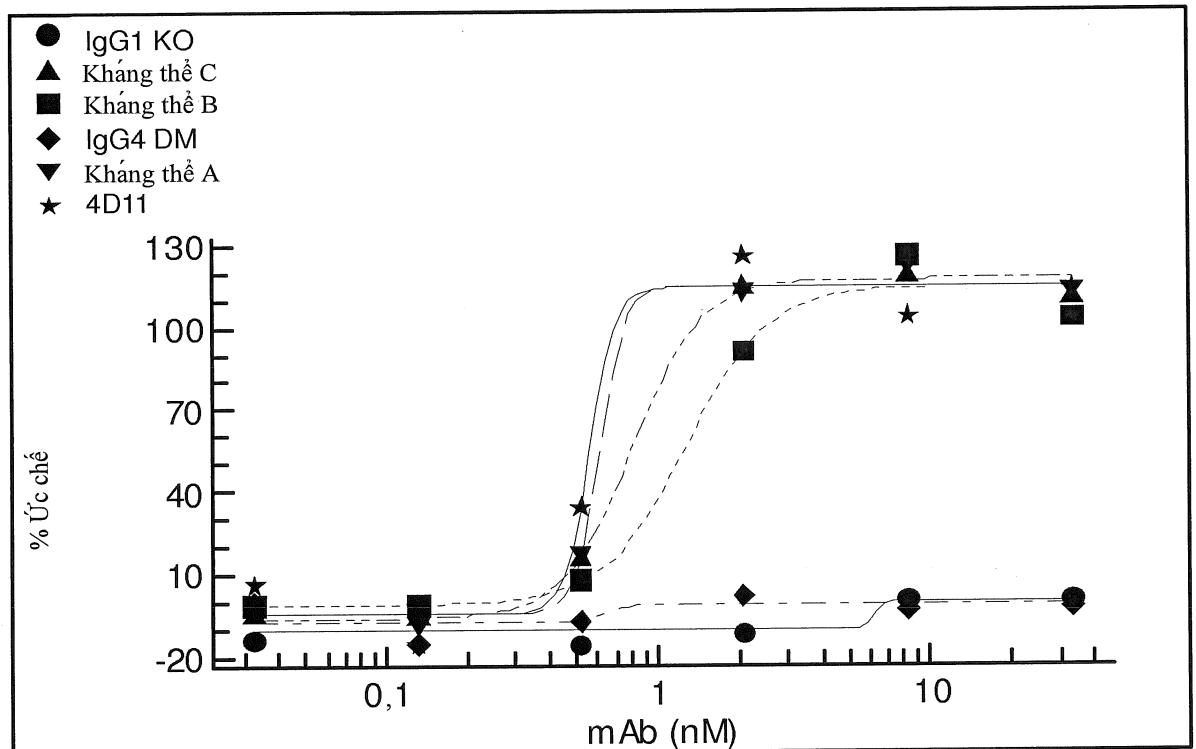


FIG. 6

A.	mAb (isotyp)	IC50 (nM +/- SEM)		Sự thay đổi gấp nếp
		Các tế bào B tinh chế	HWB	
	Kháng thể B	0,6 +/- 0,3 (n=4)	1,3 +/- 0,7 (n=4)	2,2
	4D11 (hIgG4 DM)	0,03 +/- 0,01 (n=5)	0,6 +/- 0,3 (n=4)	20,0

B.	mAb (isotyp)	IC90 (nM +/- SEM)		Sự thay đổi gấp nếp
		Các tế bào B tinh chế	HWB	
	Kháng thể B	5,3 +/- 2,4 (n=4)	4,3 +/- 2,1 (n=4)	0,8
	4D11 (hIgG4 DM)	0,05 +/- 0,02 (n=5)	1,3 +/- 0,64 (n=4)	26

FIG. 7

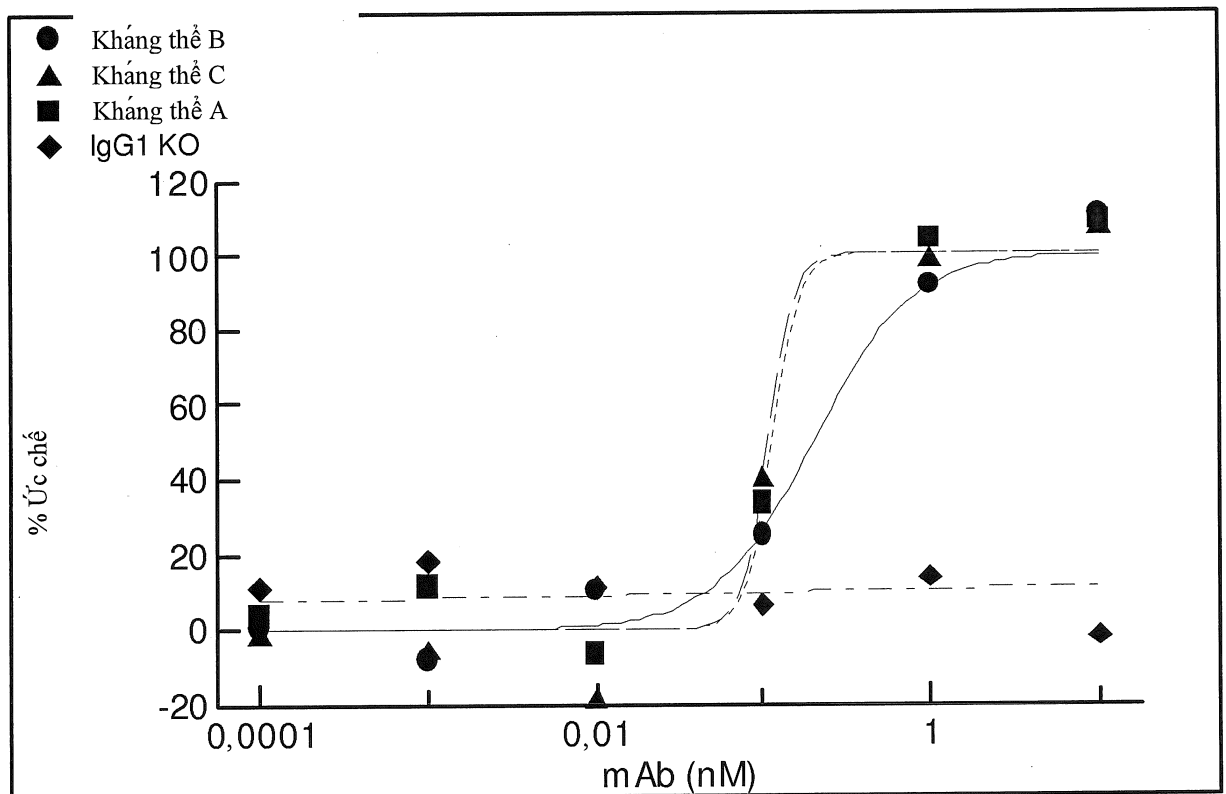


FIG. 8

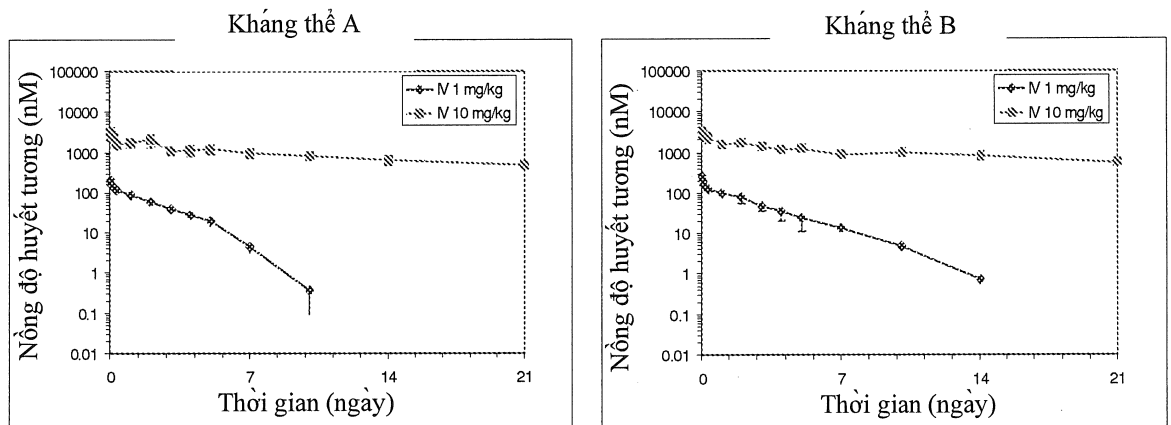


FIG. 9

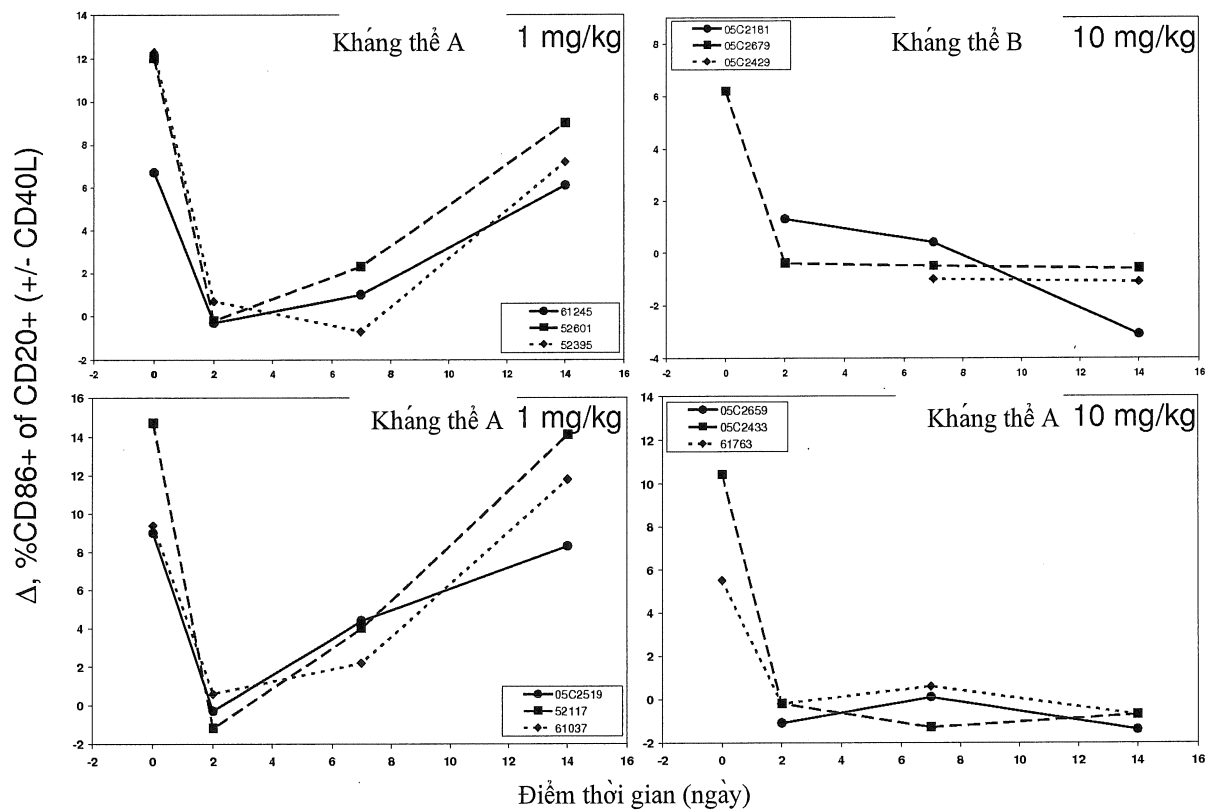
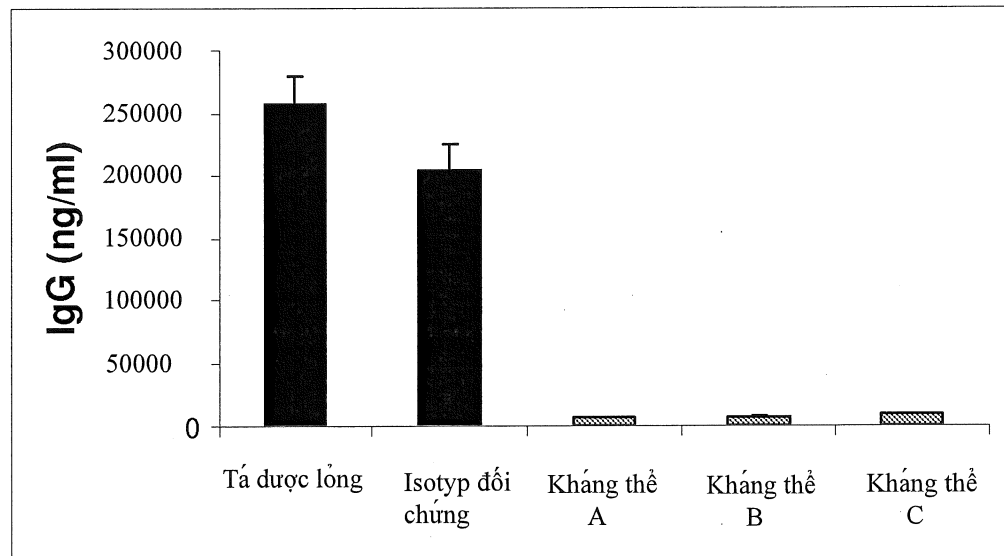


FIG. 10

A.



B.

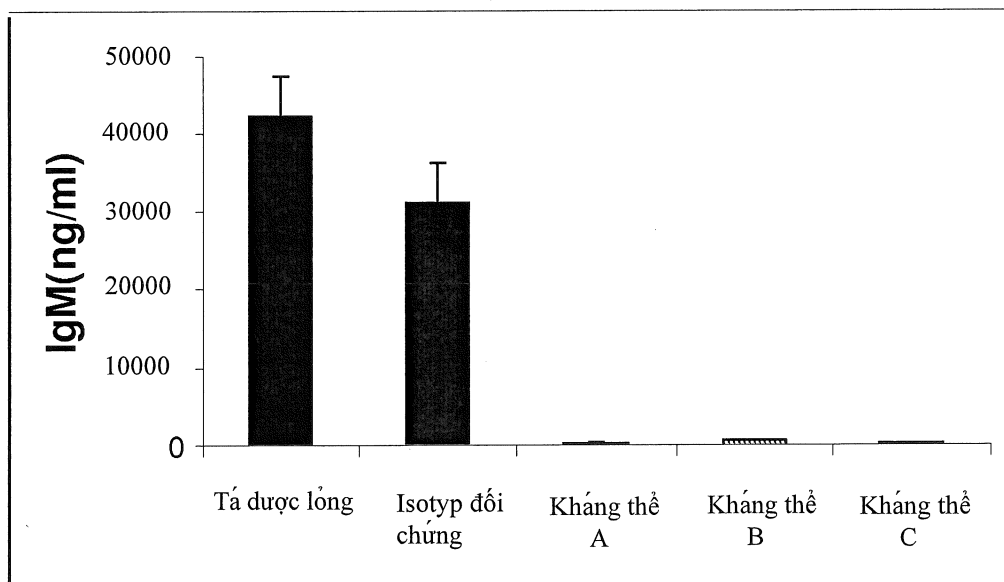


FIG. 11

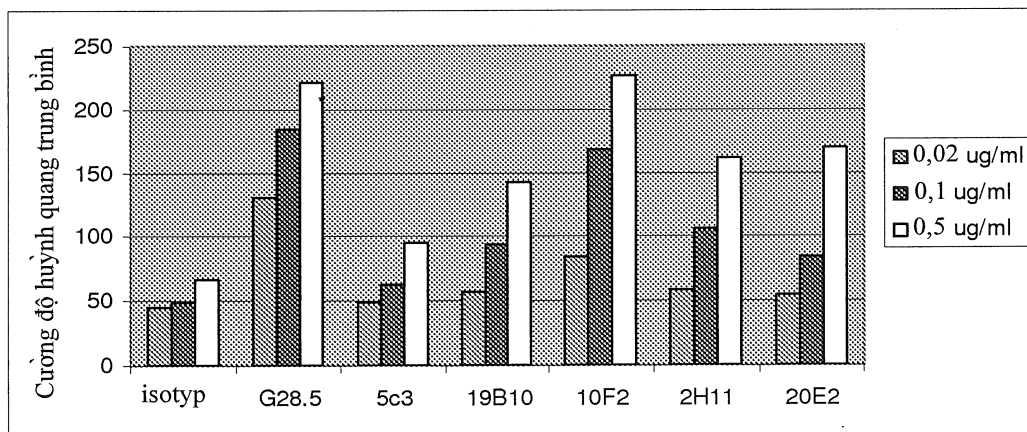
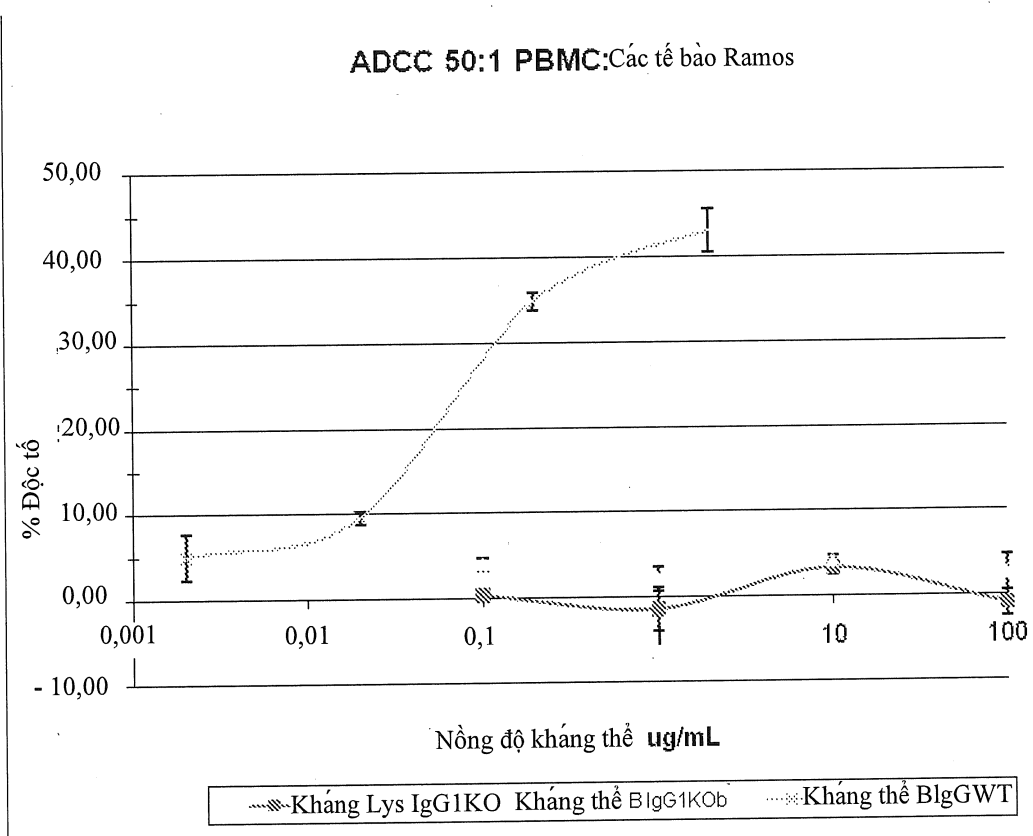


FIG. 12

	EC50 nM (khoảng)	
	Kháng thể B	4D11
Các tế bào B		
Người (n = 6)	1,8 (1,2 đến 2,3)	0,3 (0,1 đến 0,3)
Khỉ cynomolgus (n = 5)	2,1 (1,4 đến 2,9)	0,7 (0,6 đến 0,8)
Các tiểu cầu		
Người (n = 5)	4,6 (2,5 đến 5,8)	0,7 (0,4 đến 0,9)
Khỉ cynomolgus (n = 5)	3,9 (2,7 đến 6,2)	1,2 (0,9 đến 1,7)

FIG. 13



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Singh, Sanjaya
Litzenburger, Tobias
Brodeur, Scott
Canada, Keith
Barrett, Rachel

<120> Kháng thể kháng CD40, polynucleotit mã hóa kháng thể và được
phẩm chứa kháng thể này

<130> 02950-22687US01

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD40 Trình tự VH dẫn đầu ở chuột 2H11

<400> 1

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

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

Tyr	Val	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				

Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

Leu	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Thr	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		

Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser
					115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD40 trình tự VH dẫn đầu ở chuột 10F2

<400> 2

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

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD40 trình tự VH dẫn đầu ở chuột 19B10

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD40 trình tự VH dẫn đầu ở chuột 20E2

<400> 4

```

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

```

<210> 5
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD40 trình tự VK dẫn đầu ở chuột 2H11

<400> 5

```

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

```

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

<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD40 trình tự VK dẫn đầu ở chuột 10F2

<400> 6

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

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD40 trình tự VK dẫn đầu ở chuột 19B10

<400> 7

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD40 trình tự VK dẫn đầu ở chuột 20E2

<400> 8

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

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

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

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Asn Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng CDR1 của 2H11 và 19B10

<400> 9

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Val His
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1 của 10F2

<400> 10

Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Ile	His
1				5					10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1 của 20E2

<400> 11

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Gly	Met	His
1				5					10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2 của 2H11

<400> 12

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

Gly

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2 của 10F2

<400> 13

Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2 của 19B10

<400> 14

Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Asp	Thr	Lys	Phe	Ala	Pro	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2 của 20E2

<400> 15

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

Gly

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3 của 2H11, 10F2 và 19B10

<400> 16

Ser	Tyr	Tyr	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr
1				5				

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3 của 20E2

<400> 17

Gln	Asp	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1 của 2H11

<400> 18

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Leu
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR1 của 10F2

<400> 19

Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile Leu
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR1 của 19B10

<400> 20

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Leu
1 5 10

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR1 của 20E2

<400> 21

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR2 của 2H11, 10F2 và 19B10

<400> 22

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2 của 20E2

<400> 23

Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR3 của 2H11, 10F2, và 19B10

<400> 24

Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3 của 20E2

<400> 25

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ của Kháng thể A

<400> 26

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

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

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

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 27
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng IgG1K0 của Kháng thể A
 <400> 27

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435

440

445

Lys

<210> 28

<211> 449

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng IgG1 của Kháng thể A

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

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

Lys

<210> 29
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng IgG4DM của kháng thể A

<400> 29

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

50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Gln	Asp	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Ala	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145						150					155				160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
225						230					235				240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				245					250					255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
			260					265					270		
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
		275					280					285			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
305						310					315				320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325					330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			340					345					350		
Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		355					360					365			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
	370					375					380				

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

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

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 30
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng IgG1K0b của Kháng thể A

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 31
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ của Kháng thể B

<400> 31

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

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20										25					30				
Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	His	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln				
	35						40					45							
Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val				
	50					55					60								
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr				
65					70					75				80					
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn				
			85						90					95					
Asp	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile				
			100					105					110						
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp				
		115					120					125							
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn				
	130					135					140								
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu				
145					150					155					160				
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp				
			165						170					175					
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr				
			180					185					190						
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser				
		195					200					205							
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
	210					215					220								
<210> 32																			
<211> 449																			
<212> PRT																			
<213> trình tự nhân tạo																			
<220>																			
<223> Chuỗi nặng IgG1K0 của Kháng thể B																			
<400> 32																			
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly				
1				5				10						15					
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr				
		20						25					30						
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
		35					40					45							
Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Asn	Arg	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr				

65						70						75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85					90					95				
Ala	Arg	Gln	Asp	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly			
			100					105					110					
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe			
		115					120					125						
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu			
	130					135					140							
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp			
145				150						155					160			
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu			
				165					170					175				
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser			
			180					185					190					
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro			
		195					200					205						
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys			
	210					215					220							
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro			
225				230						235					240			
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser			
				245					250					255				
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp			
			260					265					270					
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn			
	275						280					285						
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val			
	290					295					300							
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu			
305				310					315						320			
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys			
				325					330					335				
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr			
			340					345					350					
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr			
		355					360					365						
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu			
	370					375					380							
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu			
385				390						395					400			

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

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

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

Lys

<210> 33

<211> 449

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng IgG1 của Kháng thể B

<400> 33

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 34
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng IgG4DM của Kháng thể B

<400> 34

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr		
			20					25					30				
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Asn	Arg	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
65					70					75					80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90						95		
Ala	Arg	Gln	Asp	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		
			100					105					110				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
		115					120					125					
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu		
	130					135						140					
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp		
145					150					155					160		
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		
				165					170					175			
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
			180					185					190				
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro		
		195					200					205					
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro		
	210					215					220						
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
225					230					235					240		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
				245					250					255			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
			260					265					270				
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
		275					280					285					
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val		
	290					295					300						
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
305					310					315					320		
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
				325					330					335			
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro		
			340					345					350				

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

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

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

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 35

<211> 449

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng IgG1K0b của Kháng thể B

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

Lys

<210> 36
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của Kháng thể C

<400> 36

```

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

```

<210> 37

<211> 448

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng IgG1K0 của Kháng thể C

<400> 37

```

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

```

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 38
<211> 448
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng IgG1 của Kháng thể C

<400> 38

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

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

```
<210> 39
<211> 445
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Chuỗi nặng IgG4DM của Kháng thể C

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr	20	25	30
Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	35	40	45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe	50	55	60
Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr	65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly	130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser	195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys	210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu	225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	325	330	335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 40
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng IgG1K0b của Kháng thể C

<400> 40

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

<210> 41
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong cả BI 655034 và BI 655035

<400> 41

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

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng biến đổi trong cả BI 655034 và BI 655035

<400> 42

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

<210> 43
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong cả BI 655036 và Kháng thể A

<400> 43

```

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

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

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

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65              70              75              80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
          85              90              95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100              105              110

Lys

```

<210> 44
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng biến đổi trong cả BI 655036 và Kháng thể A

<400> 44

```

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

```

85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong cả BI 655038 và BI 655039

<400> 45

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

<210> 46
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng biến đổi trong cả BI 655038 và BI 655039

<400> 46

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong cả BI 655040 và BI 655041

<400> 47

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

<210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng biến đổi trong cả BI 655040 và BI 655041

<400> 48

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

<210> 49
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong cả BI 655042 và BI 655043

<400> 49

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

Lys

<210> 50
 <211> 119

<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong cả BI 655042 và BI 655043

<400> 50

[illegible]

```
<210> 51
<211> 113
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Chuỗi năng biến đổi trong cả BI 655044 và BI 655045

<400> 51

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 52
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng biến đổi trong cả BI 655046 và kháng thể B

<400> 52

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

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

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

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 53
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng biến đổi trong mỗi BI 655044, BI 655045, BI 655046
 và kháng thể B

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 54
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong BI 655052

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

<210> 55
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong mỗi BI 655053, BI 655055, BI 655057,
 BI 655059 và BI 655061

<400> 55

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

<210> 56
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong mỗi BI 655054, kháng thể B, BI 655058,
 BI 655060 và BI 655062

<400> 56

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

<210> 57
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong mỗi BI 655052, BI 655053 và BI
 655054

<400> 57

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

<210> 58
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi trong cả BI 655055 và Kháng thể C
 <400> 58

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

<210> 59
 <211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng biến đổi trong cả BI 655057 và BI 655058

<400> 59

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60

<211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng biến đổi trong cả BI 655059 và BI 655060

<400> 60

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 118
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng biến đổi trong cả BI 655061 và BI 655062

<400> 61

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

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng biến đổi Version 1 từ Kháng thể 19B10-Hum

<400> 62

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63

<211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự Chuỗi nặng biến đổi Version 2 từ Kháng thể 19B10-Hum

<400> 63

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nặng biến thiên Version 3 từ Kháng thể 19B10-Hum

<400> 64

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65

<211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nặng biến thiên Version 4 từ kháng thể 19B10-Hum

<400> 65

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66

<211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nặng biến thiên Version 5 từ Kháng thể 19B10-Hum

<400> 66

```

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

```

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nặng biến thiên Version 1 từ Kháng thể 10F2Hum

<400> 67

```

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

```

<210> 68
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nặng biến thiên Version 2 từ kháng thể 10F2Hum

<400> 68

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

<210> 69
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nặng biến thiên Version 3 từ Kháng thể 10F2Hum

<400> 69

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

```

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100                    105                    110

Thr Val Thr Val Ser Ser
      115

```

```
<210> 70
<211> 118
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

```
<220>  
<223>   Trình tự nặng biến thiên Version 4 từ kháng thể 10F2Hum  
  
<400>   70
```

[illegible]

```
<210> 71
<211> 118
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

```
<220>
<223> Trình tự nặng biến thiên Version 5 từ Kháng thể 10F2Hum
<400> 71
```

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

[illegible]

<220>
<223> Trình tự năng biến thiên Version 6 từ Kháng thể 10F2Hum

<400> 72

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```
<210> 73
<211> 118
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Trình tự năng biến thiên Version 7 từ Kháng thể 10F2Hum

<400> 73

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[illegible]

```
<210> 74
<211> 106
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

```
<220>
<223> Trình tự chuỗi nhẹ biến đổi Version 1 từ kháng thể 10F2Hum
```

<400> 74

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

```
<210> 75
<211> 106
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự chuỗi nhẹ biến đổi Version 2 từ kháng thể 10F2Hum

<400> 75

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ biến đổi Version 3 từ kháng thể 10F2Hum

<400> 76

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3 với 2H11, 10F2 và 19B10

<400> 77

Thr	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr
1				5					10	

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3 với 20E2

<400> 78

Ala	Arg	Gln	Asp	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10		

70