



(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)



1-0025401

(51)⁷ A61P 37/06; C07K 16/28; A61K 39/395 (13) B

(21) 1-2014-00403

(22) 09/07/2012

(86) PCT/IB2012/053502 09/07/2012

(87) WO2013/008171 17/01/2013

(30) 61/506,491 11/07/2011 US

(45) 25/09/2020 390

(43) 25/08/2014 317A

(73) Ichnos Sciences SA (CH)

Chemin de la Combeta 5, 2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland

(72) ATTINGER Antoine (CH); BLEIN Stanislas (FR); BACK Jonathan Albert (FR);
LISSILAA Rami (FR); HOU Samuel (NZ).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ ĐỐI KHÁNG GẮN KẾT VỚI OX40, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
VÀ CÁC SẢN PHẨM CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể đối kháng hoặc các đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và/hoặc CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và/hoặc CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và/hoặc chứa CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, và/hoặc CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và/hoặc CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6. Phương pháp sản xuất và các sản phẩm chứa các kháng thể hoặc các đoạn của nó cũng được đề xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đối kháng hoặc các đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người. Đặc biệt hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và/hoặc CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và/hoặc CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và/hoặc chứa CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, và/hoặc CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và/hoặc CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

OX40 là một thành viên của họ chung TNFR của các thụ thể và được nhận diện lần đầu tiên vào năm 1987 là glycoprotein 50kDa được biểu hiện trên các tế bào T CD4+ đã hoạt hóa từ chuột (Paterson DJ et al., (1987) Mol. Immunol. 24: 1281-90). Miền gắn kết phối tử ngoại bào của OX40 bao gồm 3 miền giàu xystein đầy đủ (CRD) và CDR đầu cuối C thứ tư, không hoàn toàn (Bodmer JL et al., (2002) Trends Biochem. Sci. 27: 19-26). Phối tử cho OX40 là OX40L (CD252) và 3 bản sao của OX40 gắn kết với phối tử trimeric để tạo ra phức hợp OX40-OX40L (Compaa DM & Hymowitz SG (2006) Structure, 14: 1321-1330). OX40 là một thụ thể đã gắn kết màng; Tuy nhiên, một isoform hòa tan cũng đã được phát hiện (Taylor L & Schwarz H (2001) J. Immunol. Methods, 255: 67-72). Không giống như CD28, OX40 không chỉ biểu hiện chủ yếu trên các tế bào T chuyên cần mà còn bị sinh ra sau khi lắp ghép thụ thể tế bào T (TCR). OX40 là một phân tử đồng kích thích thứ cấp, được biểu hiện sau từ 24 tới 72 giờ sau khi hoạt hóa; phối tử của nó, OX40L, không chỉ biểu hiện trên các tế bào trình bày kháng nguyên nghỉ, mà cả sau quá trình hoạt hóa của chúng. OX40 được biểu hiện chủ yếu bởi các tế bào T CD4+ đã hoạt hóa và tới một mức độ giới hạn, bởi các tế bào T CD8+ đã hoạt hóa (Salek-Ardakani S et al., (2006) Curr. Immunol. Rev. 2: 37-53).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các kháng thể đối kháng hoặc các đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người, các phương pháp điều chế chúng để sử dụng cho các phương pháp điều trị các rối loạn thông qua trung gian OX40. Các kháng thể đối kháng hoặc các đoạn của chúng theo sáng chế gắn kết với OX40 của người là các kháng thể đối kháng và không thể hiện các tác dụng chủ vận và/hoặc hoạt hóa OX40 của người khi gắn kết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và/hoặc CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và/hoặc CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và/hoặc chứa CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, và/hoặc CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và/hoặc CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 7. Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nặng là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người được chọn từ nhóm gồm: IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22), và IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23).

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó chứa trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 32 và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nặng bao gồm ít nhất một cải biến axit amin từ vùng khung thay đổi chuỗi nặng tương ứng của kháng thể ở chuột tương ứng.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 8. Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm của hoặc có nguồn

gốc từ gen người được chọn từ nhóm gồm: IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) và IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28).

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó chứa vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một cái biến axit amin từ vùng khung tương ứng của vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể ở chuột tương ứng.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 và 38. Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 và 49.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa:

- (a) trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 37 hoặc 38; và
- (b) trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 47.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 58, 59, 79 và 80. Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 60, 86, 87 và 89.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa:

- (a) vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 58 hoặc 59; và
- (b) vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 60.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng IgG4 Fc của người, trong đó kháng thể này không có hoạt tính gây độc tế bào thông qua trung gian Fc. Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến

kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, trong đó kháng thể này chứa vùng IGHG1 Fc của người, trong đó kháng thể này có thẩm quyền đối với các cơ chế gây độc tế bào như độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Theo một khía cạnh được ưu tiên, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người có vùng IGHG1 Fc không fucosyl hóa và biểu hiện các cơ chế gây độc tế bào thông qua trung gian Fc như ADCC.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến các kháng thể được làm tương thích với người đối kháng hoặc các đoạn của chúng mà gắn kết với ái lực tương đương với OX40 của người như kháng thể khả năng tương ứng, ví dụ, lưu giữ ít nhất 75% ái lực gắn kết OX40 (K_D) của kháng thể khả năng tương ứng hoặc có ái lực gắn kết OX40 (K_D) ít nhất là tương đương hoặc cao so với kháng thể khả năng tương ứng. Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với một epitop nằm trong miền thứ hai của vùng ngoại bào OX40 của người.

Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic đã phân lập mã hóa các kháng thể và các đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người, các vật truyền và các tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vật truyền này. Các chế phẩm chứa kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng và chất mang được dùng và thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng được liên kết với chất trị liệu cũng được đề xuất.

Sáng chế cũng mô tả các phương pháp để điều trị các rối loạn thông qua trung gian OX40. Theo một khía cạnh, trong mô hình in vitro về sự tăng sinh và hoạt hóa tế bào T phản ứng (phản ứng tế bào lympho hỗn hợp; MLR), kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó có hiệu quả ức chế MLR trong hai cá thể khác nhau (các đáp ứng), với giá trị EC_{50} khoảng chừng 100ng/mL. Hơn thế nữa, trong phản ứng ghép khác loại đối với vật chủ, một mô hình về bệnh mảnh ghép chống lại mô vật chủ (GVHD) được quan sát sau khi ghép tủy xương ở bệnh nhân là con người, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó có hiệu lực ngăn chặn phản ứng GVHD.

Sáng chế cũng đề cập đến các bộ kit và các sản phẩm chứa kháng thể này hoặc các đoạn của chúng, chế phẩm hoặc thể tiếp hợp miễn dịch để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: (A) ELISA gắn kết trực tiếp trên OX40-his của người tái tổ hợp đã cố định. Sự gắn kết của các kháng thể 2F8 và 1D4 thể khảm trên OX40 của người được xác định bằng ELISA trực tiếp. Các nồng độ khác nhau (nằm trong khoảng từ 10 đến 0,01mg/ml) của 1D4 (quang đồ đen) và 2F8 (quang đồ trắng) được ủ cùng với 2mg/ml protein đã gắn nhãn tái tổ hợp OX40-his của người tái tổ hợp đã phủ qua đêm ở 4°C trong đĩa 96 lỗ. Sự gắn kết của mỗi kháng thể với OX40 được phát hiện bằng kháng thể kháng người đã tiếp hợp horseradish peroxidase (HRP). (B) ELISA cạnh tranh trên OX40-Fc của người tái tổ hợp đã cố định. Các tác dụng ức chế của 1D4 và 2F8 thể khảm trên tương tác OX40/OX40L được đánh giá bằng cách phong bế ELISA. Các nồng độ khác nhau (nằm trong khoảng từ 10 đến 0,01mg/ml) của 1D4 (quang đồ đen) và 2F8 (quang đồ trắng) được ủ cùng với 2mg/ml của protein đã gắn nhãn OX40-Fc của người tái tổ hợp được phủ qua đêm ở 4°C trong đĩa 96 lỗ. Sau năm phút, nồng độ cố định của OX40L của người tái tổ hợp đã biotinyl hóa (0,04mg/ml) được bổ sung vào từng lỗ và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sự gắn kết của OX40L với OX40 được phát hiện bằng cách sử dụng Streptavidin-HRP.

Fig.2: Phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp (MLR) một con đường được xác định bằng cách kết hợp ^3H thymidin. Các biểu đồ thể hiện sự kết hợp ^3H -thymidin trung bình (các số đếm) của ít nhất bộ ba $\pm$ sai số tiêu chuẩn trung bình. Đối chứng đồng kiểu (trastuzumab) và đối chứng dương (efalizumab) được chỉ ra. Tế bào thực hiện là chữ viết tắt chỉ cho các tế bào thực hiện. Tế bào thực hiện + đích thể hiện cho số đo trong đó các kháng thể đã được bỏ qua.

Fig.3: Phân tích đếm tế bào dòng chảy của kháng thể 1D4 thể khảm (A) Nhuộm trên các tế bào đơn nhân máu ngoại vi đã hoạt hoá của người (PBMC) và các tế bào HPB-ALL. Các đồ thị quang đồ thể hiện cường độ huỳnh quang (trục X) và số đếm tế bào tương đối (% sự kiện tối đa - trục Y). Loại tế bào được nhuộm được thể hiện. PBMC của người được hoạt hoá bằng PHA và IL-2 cho các phép đo trước 48 giờ.

(B) Nhuộm trên các PBMC của khỉ cynomologus đã hoạt hóa. Sự gắn kết của kháng thể 1D4 thể khảm với OX40 cynomologus được đánh giá bằng cách đếm tế bào dòng chảy. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được phân lập từ toàn

bộ máu được lấy từ khỉ cynomologus và 3×10^6 tế bào được nuôi cấy trong 50 giờ với sự có mặt của 10mg/ml PHA và 100U/ml rhuIL-2. PBMC đã hoạt hoá được ủ cùng với 25mg/ml hoặc là kháng thể đối chứng (profin trên (i)) hoặc kháng thể OX40 kháng người của cừu đã biotinyl hóa (profin trung bình (ii)) hoặc kháng thể 1D4 thể khảm đã biotinyl hóa (profin thấp (iii)). Sự gắn kết của mỗi kháng thể với OX40 cynomologus được phát hiện bằng streptavidin-APC.

Fig.4: Các số đo cộng hưởng plasma bề mặt cho các kháng thể kháng OX40. Các dữ liệu được biểu hiện dưới dạng số đáp ứng (viết tắt là RU; trục Y) theo thời gian (trục X).

FIG.4A - kháng thể VH1/VL1 so với thể khảm 1D4.

FIG. 4B - các kháng thể được làm tương thích với người trên cơ sở VH1, VH2, và VH3 (như được biểu thị) so với thể khảm 1D4.

FIG.4C - Các ví dụ về các gắn kết kém: VH4/VL4, VH5/VL4, VH5/VL5, và VH5/VL6.

FIG.4D - Các ví dụ về các gắn kết yếu (VH5/VL9 và VH4/VL9) và các gắn kết tốt (VH6/VL9 và VH7/VL9).

FIG.4E - các kháng thể được làm tương thích với người trên cơ sở VH7.

FIG.4F - VH6/VL9 có đặc tính gắn kết tốt nhất so với thể khảm 1D4 và VH7/VL9 biến thể được làm giống như của người.

FIG.5: Sắp thẳng hàng trình tự. Sự sắp thẳng hàng của vùng thay đổi chuỗi nặng (FIG.5A) hoặc chuỗi nhẹ (FIG.5B) của 1D4 cùng với các khung sườn tế bào mầm được chọn (IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19) và IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24)) từ IMGT và các biến thể vùng thay đổi đột biến ngược (VH1 (SEQ ID NO: 29), VH2 (SEQ ID NO: 77), VH3 (SEQ ID NO: 78), VH4 (SEQ ID NO: 79), VH5 (SEQ ID NO: 80), VH6 (SEQ ID NO: 58), VH7 (SEQ ID NO: 59), (VL1 (SEQ ID NO: 30), VL2 (SEQ ID NO: 81), VL3 (SEQ ID NO: 82), VL4 (SEQ ID NO: 83), VL5 (SEQ ID NO: 84), VL6 (SEQ ID NO: 85), VL7 (SEQ ID NO: 86), VL8 (SEQ ID NO: 87), VL9 (SEQ ID NO: 60) VL10 (SEQ ID NO: 88), VL11 (SEQ ID NO: 89).

Fig.6: Các số đo ổn định nhiệt của đoạn VH6/VL9 FAB của kháng thể kháng OX40 đã được làm giống như của người bằng cách áp dụng phép đo

nhật lượng quét vi sai. Các dữ liệu được biểu hiện dưới dạng công suất nhiệt mol dư (ký hiệu là Cp [kcal/mol/°C]; trục Y) theo nhiệt độ (trục X).

Fig.7: Đặc tả epitop. Hình vẽ này thể hiện epitop VH6/VL9 của kháng thể kháng OX40 đã làm giống như của người dựa trên cơ sở các kết quả thử nghiệm ELISA đã mô tả trong Ví dụ 7.

Fig.8: phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp (MLR) được đánh giá bởi sự kết hợp ^3H thymidin. Fig.8A và Fig.8B thể hiện các kết quả của phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp từ hai thể cho không liên quan. Sự tăng sinh được đánh giá bởi sự kết hợp ^3H -thymidin. Các đồ thị thể hiện các giá trị số đếm tuyệt đối cho mỗi điều kiện $\pm$ SEM. Các tế bào đáp ứng là các PBMC không được xử lý, các tế bào kích thích là các PBMC đã được xử lý bằng. Tất cả các điều kiện cùng với các kháng thể thử nghiệm được thực hiện cùng với các tế bào đáp ứng được trộn với các PBMC kích thích dự thể. Đối chứng dương là Efilizumab (kháng thể kháng LFA-1).

Fig.9: Mô hình phản ứng ghép khác loại so với vật chủ. Hình vẽ này thể hiện phần trăm sống sót của các nhóm gồm tám động vật cho mỗi điều kiện được đề cập. Chất dẫn thuốc: duy nhất PBS. Đường đứt nét thẳng đứng biểu thị cho ngày xử lý cuối cùng. Không thấy có tử vong và không có các triệu chứng quan sát được ở nhóm gồm hai động đối chứng được chiếu xạ không được tiếp nhận PBMC (không được thể hiện).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đối kháng và các đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người.

Thuật ngữ "OX40 của người" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các biến thể, các đồng dạng, và các các đồng loài của OX40 của người. Do đó, các kháng thể nêu trong phân mô tả này, trong các trường hợp nhất định, phản ứng chéo với với OX40 từ các loài không phải của người. Theo các phương án nhất định, các kháng thể này có thể hoàn toàn đặc hiệu với một hoặc nhiều protein OX40 của người và có thể không biểu hiện loài hoặc các dạng khác của hoạt tính phản ứng chéo không của người. Trình tự axit amin đầy đủ của OX40 của người được lấy làm ví dụ có số truy cập Swiss-Prot P43489 (TNR4_HUMAN; SEQ ID

NO: 12). OX40 cũng đã biết là CD134, TNFRSF4, ACT35 hoặc TXGP1 L. OX40 của người được ký hiệu là GeneID: 7293 theo Entrez Gene, và HGNC: 11918 theo HGNC. OX40 còn được ký hiệu là CD134 (cụm sai biệt 134). OX40 có thể được mã hoá bởi gen được ký hiệu TNFRSF4 /OX40.

Thuật ngữ "OX40 của người" được sử dụng trong phần mô tả bao hàm tất cả các dạng đã biết hoặc các dạng alen (gen tương ứng) chưa được phát hiện và các dạng đa hình của OX40 của người. Các thuật ngữ "OX40 của người", "OX40" hoặc "thụ thể OX40" được sử dụng trong phần mô tả là tương đương nhau và để chỉ "OX40 của người" nếu không có chỉ dẫn khác được chỉ ra cụ thể.

Thuật ngữ "phối tử OX40" hoặc "OX40L" là tương đương nhau và bao gồm phối tử OX40, đặc biệt là phối tử OX40 của người. OX40L là một thành viên của họ chung TNF và cũng đã biết là gp34 hoặc CD252. OX40L cũng được ký hiệu là CD252 (cụm sai biệt 252) và số truy cập cơ sở dữ liệu trình tự P23510 (Swiss-Prot) hoặc Q6FGS4 (Uniprot). OX40L được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào B đã hoạt hóa, các tế bào T, các tế bào đuôi gai và các tế bào nội mô.

Thuật ngữ "kháng thể hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người ví dụ OX40 của người ở dạng đã phân lập, với ái lực (KD) nhỏ hơn hoặc bằng 500nM, tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 200nM, nhỏ hơn hoặc bằng 150nM, nhỏ hơn hoặc bằng 120nM, thậm chí tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn 110nM. Thuật ngữ "kháng thể hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người" bao gồm các kháng thể hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Các thuật ngữ "kháng thể đối kháng" hoặc "kháng thể chất đối kháng" là tương đương nhau và bao gồm kháng thể có khả năng ức chế và/hoặc trung hòa hoạt tính tạo tín hiệu sinh học của OX40, ví dụ bằng cách phong bế gắn kết hoặc khử gần như hoàn toàn gắn kết của OX40 với phối tử OX40 và nhờ vậy ức chế hoặc khử đường tạo tín hiệu được kích động bởi OX40 và/hoặc ức chế hoặc khử đáp ứng tế bào thông qua trung gian OX40 kiểu như tăng sinh tế bào lympho, biểu hiện xytokin, hoặc sống sót tế bào lympho.

Thuật ngữ "kháng thể" được nhắc đến trong bản mô tả để chỉ bao gồm các kháng thể đầy đủ và đoạn gắn kết kháng nguyên bất kỳ hoặc các mạch đơn của

chúng. Thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ glycoprotein bao gồm ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bởi các cầu nối disulfua, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng (được ký hiệu là VH) và vùng ổn định chuỗi nặng. Vùng ổn định chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi chuỗi nhẹ (được ký hiệu là VL) và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Vùng ổn định chuỗi nhẹ bao gồm một miền, CL. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng có tính siêu biến, được gọi là các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) có tính siêu biến về trình tự và/hoặc bao gồm trong việc quyết định kháng nguyên và/hoặc các vòng xác định cấu trúc dạng thông thường, được xen giữa với các vùng hằng định hơn, còn được gọi là các vùng khung (FR hoặc FW). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FW, được bố trí từ các đầu cuối amino tới các đầu cuối carboxy theo thứ tự: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Tất cả các trình tự axit amin của FW1, FW2, FW3, và FW4 cùng nhau cấu thành "vùng không CDR" hoặc "vùng CDR không mở rộng" của VH hoặc VL như được nhắc đến trong Phần mô tả.

Thuật ngữ "vùng khung thay đổi chuỗi nặng" khi được nhắc đến trong phần mô tả bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba và/hoặc bốn) trình tự vùng khung chuỗi nặng (ví dụ, khung 1 (FW1), khung 2 (FW2), khung 3 (FW3) và/hoặc khung 4 (FW4)). Tốt hơn là, vùng thay đổi chuỗi nặng khung bao gồm FW1, FW2 và/hoặc FW3, tốt hơn nữa là FW1, FW2 và FW3. Thuật ngữ "vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ" khi được nhắc đến trong phần mô tả bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba và/hoặc bốn) trình tự vùng khung chuỗi nhẹ (ví dụ, khung 1 (FW1), khung 2 (FW2), khung 3 (FW3) và/hoặc khung 4 (FW4)). Tốt hơn là khung vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm FW1, FW2 và/hoặc FW3, tốt hơn nữa là FW1, FW2 và FW3.

Các vùng thay đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa vùng gắn kết có tương tác với kháng nguyên. Các vùng ổn định của các kháng thể có thể thông qua gắn kết của globulin miễn dịch với các yếu tố hoặc các mô vật chủ, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào tác động) và thành phần First (C1q) của hệ bổ trợ kinh điển.

Các kháng thể được nhóm lại thành các lớp, còn được gọi là các đồng kiểu, khi được xác định về mặt di truyền bởi vùng ổn định. Các chuỗi nhẹ ổn định của người được phân nhóm là các chuỗi nhẹ kappa (CK) và lambda (CL). Các chuỗi nặng được phân nhóm là mu (m), delta (d), gama (g), anpha (α), hoặc epsilon (ϵ), và xác định các đồng kiểu của kháng thể lần lượt là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Do vậy, "đồng kiểu" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ bất kỳ trong số các lớp và/hoặc các phân lớp của các globulin miễn dịch được xác định bởi các đặc tính hoá học và kháng nguyên của các vùng ổn định của chúng. Các đồng kiểu globulin miễn dịch của người đã biết là IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), và IgE (IGHE). Gen pseudo-gama IGHGP globulin miễn dịch của người trình bày gen vùng không đổi nặng globulin miễn dịch của người đã lập trình tự nhưng không mã hóa protein do một vùng chuyển đổi biến đổi (Bensmana M et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16(7): 3108). Mặc dù có một vùng chuyển đổi biến đổi, song gen pseudo-gama IGHGP globulin miễn dịch của người có các khung đọc mở cho tất cả các vùng ổn định nặng (CH1-CH3) và bản lề. Tất cả các khung đọc mở cho miền ổn định nặng của nó mã hóa vùng protein sắp thẳng hàng tốt với tất cả các vùng ổn định globulin miễn dịch của người có các dấu hiệu cấu trúc đã dự báo trước. This bổ sung pseudo-gama đồng kiểu is trong này được viết tắt là IgGP hoặc IGHGP. Khác pseudo globulin miễn dịch genes have been rephoacted như the globulin miễn dịch của người nặng constant domain epsilon P1 và P2 pseudo-genes (IGHEP1 và IGHEP2). The IgG class is the hầu hết thường được sử dụng hoặc trị liệu purposes. In người this class bao gồm các phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. In chuột nhất this class bao gồm các phân lớp IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c và IgG3.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" bao gồm các kháng thể trong đó trình tự vùng thay đổi có nguồn gốc từ một loài và trình tự vùng hằng định có nguồn gốc từ một loài khác, như kháng thể trong đó trình tự vùng thay đổi có nguồn gốc từ kháng thể chuột nhất và trình tự vùng hằng định có nguồn gốc từ kháng thể người.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người" hoặc "kháng thể kháng OX40 được làm giống như của người" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể trong đó trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng phôi của một

loài có vú khác, như chuột nhắt, được cấy vào trình tự khung của người. Những cải biến khác trong vùng khung cũng có thể được tạo ra trong các trình tự khung của người cũng như trong các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng phôi của một loài có vú khác.

Thuật ngữ "Fab" hoặc "vùng Fab" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ các polypeptit bao gồm các vùng globulin miễn dịch VH, CH1, VL, và CL. Fab có thể là để chỉ vùng này ở trạng thái phân lập, hoặc để chỉ cho vùng nằm trong kháng thể với chiều đầy đủ hoặc kháng thể đoạn.

Thuật ngữ "Fc" hoặc "vùng Fc", được sử dụng trong bản mô tả này chỉ polypeptit chứa vùng ổn định của kháng thể không bao gồm vùng globulin miễn dịch thuộc vùng ổn định thứ nhất. Do đó, Fc dùng để chỉ hai vùng globulin miễn dịch của vùng ổn định cuối cùng của IgA, IgD, và IgG, và ba globulin miễn dịch của vùng ổn định cuối cùng của IgE và IgM, và đầu cuối N của vùng bản lề mềm dẻo với các vùng này. Đối với IgA và IgM, Fc có thể bao gồm chuỗi J. Đối với IgG, Fc bao gồm các vùng globulin miễn dịch C gamma 2 và C gamma 3 (C γ 2 và C γ 3) và vùng bản lề nằm giữa C gamma 1 (C γ 1) và C gamma 2 (C γ 2). Mặc dù các ranh giới của vùng Fc có thể thay đổi, song vùng Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định là bao gồm các gốc C226 hoặc P230 tới đầu cuối cacboxyl của nó, trong đó việc đánh số là theo hệ đánh số EU. Đối với IgG1 của người, vùng Fc được xác định là bao gồm gốc P232 tới đầu cuối cacboxyl của nó, trong đó việc đánh số là theo hệ đánh số EU (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Fc có thể là để chỉ vùng ở trạng thái phân lập hoặc vùng nằm trong phạm vi của một polypeptit Fc, như một kháng thể, chẳng hạn.

Thuật ngữ "bản lề" hoặc "vùng bản lề" hoặc "vùng bản lề của kháng thể" trong phần mô tả chỉ polypeptit mềm dẻo bao gồm các axit amin nằm giữa các vùng ổn định thứ nhất và thứ hai của một kháng thể. Thuật ngữ "vùng bản lề" khi được nhắc đến trong phần mô tả chỉ vùng trình tự 6-62 axit amin trên chiều dài, chỉ có mặt trong IgA, IgD và IgG, nó bao hàm các gốc xystein làm cầu nối cho hai chuỗi nặng. Về mặt cấu trúc, vùng IgG CH1 kết thúc ở vị trí EU 220, và vùng IgG CH2 bắt đầu ở vị trí EU 237. Do đó, đối với IgG, vùng bản lề của kháng thể được dùng trong phần mô tả chỉ các vị trí 221 (D221 in IgG1) tới 231 (A231 trong IgG1), trong đó việc đánh số là theo hệ đánh số EU (Edelman GM et al., nêu trên).

Thuật ngữ "kháng thể gốc" hoặc "globulin miễn dịch gốc" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm kháng thể chưa được cải biến mà sau đó được cải biến tiếp để tạo ra một biến thể. Kháng thể gốc này có thể là một kháng thể xuất hiện trong tự nhiên, hoặc một biến thể hoặc một phiên bản được xây dựng của kháng thể xuất hiện trong tự nhiên. Kháng thể gốc này có thể được dùng để chỉ chính bản thân kháng thể này, các chế phẩm chứa kháng thể gốc này, hoặc trình tự axit amin mã hoá nó. Thuật ngữ "kháng thể kháng OX40 gốc" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ kháng thể hoặc globulin miễn dịch gắn kết OX40 của người và được cải biến để tạo ra một biến thể. Thuật ngữ "kháng thể chuột tương ứng" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ globulin miễn dịch hoặc kháng thể chuột gắn kết với OX40 của người và có thể được cải biến để tạo ra biến thể, đặc biệt là kháng thể chuột 1D4 như được mô tả trong phần mô tả.

Thuật ngữ "kháng thể biến thể" hoặc "biến thể kháng thể" được sử dụng trong bản mô tả này chứa trình tự kháng thể mà nó khác với trình tự của kháng thể gốc bởi ít nhất là một cải biến axit amin so với kháng thể gốc. Trình tự kháng thể biến thể sẽ tốt hơn là có ít nhất là khoảng 80%, tốt nhất là ít nhất là khoảng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 95% trình tự axit amin tương đồng với trình tự kháng thể gốc. Biến thể kháng thể có thể là để chỉ chính kháng thể, các chế phẩm chứa biến thể kháng thể, hoặc trình tự axit amin mã hóa nó.

Thuật ngữ "cải biến axit amin" ở đây bao gồm thay thế axit amin, sự cài xen, và/hoặc sự xóa trong trình tự polypeptit. Thuật ngữ "sự thay thế axit amin" hoặc "sự thay thế" ở đây để chỉ sự thay thế của một axit amin ở một vị trí cụ thể trong trình tự polypeptit gốc bằng một axit amin khác. Ví dụ, sự thay thế R94K dùng để chỉ một polypeptit biến thể, trong trường hợp này là biến thể vùng khung thay đổi chuỗi nặng, trong đó arginin ở vị trí 94 được thay thế bằng lysin. Đối với ví dụ nêu trên, 94K chỉ sự thay thế vị trí 94 bằng lysin. Đối với các mục đích được nêu trong này, các đa thay thế thường được ngăn cách bởi một gạch chéo. Ví dụ, R94K/L78V dùng để chỉ biến thể kép bao gồm các thay thế R94K và L78V. Thuật ngữ "sự cài xen axit amin" hoặc "sự cài xen" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ việc cộng thêm một axit amin ở một vị trí cụ thể trong một trình tự polypeptit gốc. Ví dụ, sự cài xen -94 ký hiệu cho sự cài xen ở vị trí 94. Thuật ngữ "sự xóa axit amin" hoặc "sự xóa" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ việc

loại bỏ một axit amin ở một vị trí cụ thể trong một trình tự polypeptit gốc. Ví dụ, R94- ký hiệu cho sự xóa arginin ở vị trí 94.

Được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "các cải biến bảo toàn" hoặc "các cải biến trình tự bảo toàn" dùng để chỉ các cải biến axit amin không làm ảnh hưởng hoặc làm thay đổi một cách đáng kể các đặc tính gắn kết của kháng thể chứa trình tự axit amin. Các cải biến bảo toàn như vậy bao gồm các thay thế axit amin, các cài xen và các sự xóa. Các cải biến có thể được đưa vào kháng thể theo sáng chế bởi kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phát sinh đột biến hướng vị trí và phát sinh đột biến thông qua PCR. Các thay thế axit amin bảo toàn là các thay thế mà trong đó gốc axit amin được thay thế bằng một gốc axit amin có chuỗi bên tương tự. Các họ của các gốc axit amin có các chuỗi bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các họ này bao gồm các axit amin có các chuỗi bên bazơ (ví dụ, như lysin, arginin, histidin), các chuỗi bên axit (ví dụ, như axit aspartic, axit glutamic), các chuỗi bên phân cực không điện tích (ví dụ, như glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein, tryptophan), các chuỗi bên không phân cực (ví dụ, như alanin, valin, loxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin), các chuỗi bên có mạch nhánh beta (ví dụ, như threonin, valin, isoleuxin) và các chuỗi bên thơm (ví dụ, như tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Theo đó, một hoặc nhiều gốc axit amin nằm trong các vùng CDR hoặc nằm trong các vùng khung của kháng thể theo sáng chế có thể được thay thế bằng các gốc axit amin khác với các họ chuỗi bên tương tự và kháng thể đã biến đổi (kháng thể biến thể) có thể được thử nghiệm đối với chức năng được lưu giữ.

Đối với tất cả các vùng cố định chuỗi nặng globulin miễn dịch của người, việc đánh số là theo "hệ đánh số EU" (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85).

Đối với tất cả các vùng cố định chuỗi nhẹ globulin miễn dịch kappa của người (IGKC), việc đánh số là theo "hệ đánh số EU" (Edelman GM et al., nêu trên).

Đối với tất cả các vùng cố định chuỗi nhẹ globulin miễn dịch lambda của người (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6, và IGLC7), việc đánh số là theo "hệ đánh số Kabat" (Kabat EA et al., (1991) Sequences of proteins of immunological

interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242) như được mô tả bởi Dariavach P et al., (1987) Proc Natl Acad Sci USA, 84(24): 9074-8 và Frangione B et al., (1985) Proc Natl Acad Sci USA, 82(10): 3415-9.

Thuật ngữ “vùng thay đổi” dùng để chỉ các vùng làm trung gian gắn kết kháng nguyên và xác định tính đặc hiệu của một kháng thể cụ thể cho một kháng nguyên cụ thể. Trong các kháng thể xuất hiện trong tự nhiên, vị trí gắn kết kháng nguyên bao gồm hai vùng thay đổi xác định tính đặc hiệu: một nằm trong chuỗi nặng (VH) và vùng còn lại nằm trong chuỗi nhẹ (VL). Trong một số trường hợp, tính đặc hiệu có thể chỉ nằm ở một trong hai vùng như trong các kháng thể đơn vùng từ các kháng thể chuỗi nặng được tìm thấy trong các camelid. Các vùng V thường có độ dài khoảng khoảng 110 axit amin, và gồm các đoạn trình tự axit amin tương đối bất biến còn được gọi là các vùng khung (FR) có 15-30 axit amin được phân tách bởi các vùng ngắn cực kỳ biến đổi còn được gọi là “các vùng siêu biến” có độ dài 9-12 axit amin. Vùng thay đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tự nhiên gồm bốn FR, chủ yếu là cấu hình nhịp tám, được nối bởi ba vùng siêu biến, tạo thành các vòng. Các vùng siêu biến trong mỗi chuỗi được giữ sát vào nhau bởi các FR, và cùng với các vùng siêu biến từ các chuỗi khác, góp phần hình thành vị trí gắn kết kháng nguyên của các kháng thể (xem Kabat EA et al., nêu trên). Thuật ngữ “vùng siêu biến” được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ gốc axit amin của kháng thể chịu trách nhiệm cho việc gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến nói chung bao gồm gốc axit amin từ “vùng quyết định tính hỗ trợ” hoặc “CDR”, các vùng này có sự biến đổi trình tự cao nhất và/hoặc được bao gồm trong việc nhận diện kháng nguyên. Đối với tất cả các vùng thay đổi, việc đánh số là theo Kabat (Kabat EA et al., nêu trên).

Một số định nghĩa CDR đang được sử dụng và được bao hàm trong phần mô tả. Định nghĩa Kabat dựa trên cơ sở sự biến đổi trình tự và được sử dụng phổ biến nhất (Kabat EA et al., nêu trên). Định nghĩa Chothia liên quan tới vị trí của các cấu trúc vòng (Chothia C & Lesk AM (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Định nghĩa AbM là sự kết hợp giữa định nghĩa Kabat và định nghĩa Chothia và được sử dụng bởi phần mềm lập mô hình kháng thể AbM của của Oxford Molecular (Martin ACR et al., (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86: 9268-72;

Martin ACR et al., (1991) *Methods Enzymol.* 203: 121-153; Pedersen JT et al., (1992) *Immunomethods*, 1: 126-136; Rees AR et al., (1996) In Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172). Định nghĩa tiếp xúc gần đã được giới thiệu (MacCallum RM et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 262: 732-745) và nó dựa trên cơ sở việc phân tích các cấu trúc phức tạp có sẵn trong ngân hàng Protein Databank. Định nghĩa CDR theo IMGT[®], là hệ thống thông tin quốc tế ImMunoGenTics (<http://www.imgt.org>) dựa trên cơ sở hệ đánh số IMGT cho tất cả các vùng thay đổi globulin miễn dịch và thụ thể tế bào T của tất cả các loài (IMGT[®], hệ thống thông tin quốc tế ImMunoGenTics; Lefranc MP et al., (1991) *Nucleic Acids Res.* 27(1): 209-12; Ruiz M et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1): 307-10; Lefranc MP et al., (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3): 185-203; Kaas Q et al., (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6(4): 253-64).

Tất cả các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) được mô tả theo sáng chế, được ưu tiên định nghĩa theo IMGT[®]. Các gốc vùng thay đổi cho mỗi trong số các CDR này là như sau (đánh số theo Kabat EA, et al., nêu trên): LCDR1: 27-32, LCDR2: 50-52, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2: 51-57 và HCDR3: 93-102. Thuật ngữ “vùng không CDR” của vùng VL được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các trình tự axit amin: 1-26 (FR1), 33-49 (FR2), 53-88 (FR3), và 98- khoảng chừng 107 (FR4). Thuật ngữ “vùng không CDR” của vùng VH được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các trình tự axit amin: 1-25 (FR1), 36-50 (FR2), 58-92 (FR3), và 103- khoảng chừng 113 (FR4).

Các CDR theo sáng chế có thể bao gồm "CDR mở rộng" dựa trên cơ sở các định nghĩa nêu trên và có các gốc vùng thay đổi như sau: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-36, HCDR2: 47-65, HCDR3: 93-102. Các CDR mở rộng này cũng được đánh số theo Kabat et al., nêu trên. Thuật ngữ “vùng CDR không mở rộng” của vùng VL được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các trình tự axit amin: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3), và 98- khoảng chừng 107 (FR4). Thuật ngữ “vùng CDR không mở rộng” của vùng VH được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các trình tự axit amin: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3), và 103- khoảng chừng 113 (FR4).

Thuật ngữ "kháng thể với chiều dài đầy đủ" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm cấu trúc cấu thành dạng sinh học tự nhiên của kháng thể, bao gồm các vùng thay đổi và các vùng ổn định. Ví dụ, trong phần lớn động vật có vú, bao gồm của người và chuột, kháng thể với chiều dài đầy đủ thuộc nhóm IgG là một tetrame và gồm hai cặp giống nhau của hai chuỗi globulin miễn dịch, mỗi cặp có một chuỗi nhẹ và một chuỗi nặng, mỗi chuỗi nhẹ bao gồm các vùng globulin miễn dịch VL và CL, và mỗi chuỗi nặng bao gồm các vùng globulin miễn dịch VH, CH1(C γ 1), CH2 (C γ 2), và CH3 (C γ 3). Trong một số động vật có vú, ví dụ ở lạc đà một bướu và lạc đà không bướu, các kháng thể IgG có thể gồm duy nhất hai chuỗi nặng, mỗi chuỗi nặng bao gồm một vùng thay đổi gắn vào vùng Fc.

Các đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (i) đoạn Fab gồm các vùng VL, VH, CL và CH1, gồm Fab' và Fab'-SH, (ii) đoạn Fd gồm các vùng VH và CH1, (iii) đoạn Fv gồm các vùng VL và VH của kháng thể đơn; (iv) đoạn dAb (Ward et al, 1989, Nature 341 :544-546) gồm một biến thể đơn, (v) đoạn F(ab')₂, đoạn hóa trị hai bao gồm hai đoạn Fab đã liên kết (vi) các phân tử Fv chuỗi đơn (scFv), trong đó vùng VH và vùng VL được liên kết bởi một liên kết peptit mà nó cho phép liên hợp hai vùng này để tạo ra một vị trí gắn kết kháng nguyên (Bird et al, 1988, Science 242:423-426, Huston et al, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (vii) các dime chuỗi đơn Fv lưỡng đặc hiệu (PCT/US92/09965), (viii) "các diabody" hoặc "các triabody", các đoạn đa hóa trị hoặc đa đặc hiệu được xây dựng bởi sự dung hợp gen (Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448) và (ix) scFv dung hợp về mặt di truyền với kháng thể tương tự hoặc kháng thể khác (Coloma & Morrison, 1997, Nature Biotechnology 15, 159-163).

Thuật ngữ "chức năng cảm ứng" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm khả năng sinh hóa xảy ra do sự tương tác của vùng Fc của kháng thể với phối tử hoặc thụ thể Fc. Các chức năng cảm ứng bao gồm các chức năng cảm ứng thông qua trung gian Fc γ R như ADCC (độc tính tế bào thông qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể) và ADCP (sự thực bào thông qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể), và các chức năng cảm ứng thông qua trung gian hỗ trợ như CDC (độc tố tế bào phụ thuộc hỗ trợ). Chức năng cảm ứng của một kháng thể có thể được

biến đổi bằng cách thay đổi, tức là tăng cường hoặc khử, tốt hơn là tăng cường ái lực của kháng thể đối với một phân tử cảm ứng như thụ thể Fc hoặc thành phần bổ trợ. Nói chung, ái lực gắn kết sẽ được biến đổi bằng cách cải biến vị trí gắn kết phân tử cảm ứng, và trong trường hợp này nó thích hợp để định vị cho vị trí được quan tâm và cải biến ít nhất một phần của vị trí này theo cách thích hợp. Điều cũng được dự liệu là sự thay đổi về vị trí gắn kết trên kháng thể cho nhu cầu phân tử cảm ứng không chỉ làm thay đổi đáng kể về tổng ái lực gắn kết mà có thể làm biến đổi hình thái học của sự tương tác làm mất hiệu quả cơ chế cảm ứng như trong gắn kết vô hiệu. Điều cũng được dự liệu là chức năng cảm ứng có thể cũng được biến đổi bằng cách cải biến vị trí không chỉ trực tiếp tham gia vào gắn kết phân tử cảm ứng, mà còn liên quan tới sự thực hiện của chức năng cảm ứng. bằng cách thay đổi chức năng cảm ứng của một kháng thể, có thể kiểm soát được các khía cạnh khác nhau của đáp ứng miễn dịch, ví dụ tăng cường hoặc ngăn chặn các phản ứng khác nhau của hệ miễn dịch, cũng với các tác dụng có lợi có thể có cho việc chẩn đoán và trị liệu.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “rối loạn thông qua trung gian OX40” bao gồm các tình trạng bệnh như dị ứng, hen, COPD, viêm khớp dạng thấp, vảy nến và các bệnh liên quan tới viêm và tự miễn dịch.

Được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đối tượng" bao gồm động vật không phải của người hoặc của người bất kỳ. Thuật ngữ "động vật không phải của người" bao gồm tất cả các động vật có xương sống, ví dụ như, động vật có vú và động vật không phải động vật có vú, như các động vật linh trưởng không phải của người, cừu, chó, mèo, ngựa, bò, gà, các lưỡng cư, các loài bò sát, v.v.. Tốt hơn là, đối tượng này là của người.

Các kháng thể kháng OX40

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và/hoặc CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và/hoặc CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và/hoặc chứa C2DR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, và/hoặc CDR2

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và/hoặc CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm CDR1 chuỗi nặng mở rộng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, và/hoặc CDR2 chuỗi nặng mở rộng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 14, và/hoặc CDR3 chuỗi nặng mở rộng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 15; và/hoặc bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ mở rộng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 16, và/hoặc CDR2 chuỗi nhẹ mở rộng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 17 và/hoặc CDR3 chuỗi nhẹ mở rộng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 18.

Tốt hơn là, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 và/hoặc CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6. Tốt hơn nữa là, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 và CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6.

Cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là vùng CDR3, độc lập với (các) vùng CDR1 và/hoặc CDR2, có thể xác định một mình tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể cho một kháng nguyên cùng họ và các đa kháng thể được tạo ra theo mong muốn có tính đặc hiệu gắn kết tương tự trên cơ sở trình tự CDR3 thông thường. Ví dụ, xem ấn phẩm: Klimka et al, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (mô tả việc sản xuất kháng thể kháng CD30 được làm giống như của người bằng cách sử dụng CDR3 vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD30 ở chuột Ki-4); Beiboer et al, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (mô tả các kháng thể epithelial glycoprotein-2 (EGP-2) tái tổ hợp bằng cách sử dụng duy nhất trình tự CDR3 chuỗi nặng của kháng thể kháng-EGP-2 MOC-31 ở chuột cùng họ); Rader et al, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (mô tả panen của các

kháng thể [alpha]v[beta]3 kháng integrin được làm giống như của người bằng cách sử dụng vùng CDR3 thay đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể LM609 kháng integrin [alpha]v[beta]3 ở chuột trong đó mỗi thành phần kháng thể bao gồm một trình tự riêng biệt nằm ngoài vùng CDR3 và có thể gắn kết epitop tương tự khi kháng thể chuột cùng họ có các ái lực cao hoặc cao hơn kháng thể chuột cùng họ); Barbas et al, J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162 (1994) (đề cập tới vùng CDR3 góp phần đáng kể nhất vào gắn kết kháng nguyên).

Do đó, sáng chế đề xuất các kháng thể và các đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người chứa một hoặc nhiều vùng CDR3 chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, đặc biệt là CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 và/hoặc chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, trong đó kháng thể này có khả năng gắn kết với OX40 của người. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế như vậy bao gồm một hoặc nhiều vùng CDR3 chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ từ một kháng thể không phải của người (a) có khả năng cạnh tranh để gắn kết với; (b) lưu giữ các đặc tính chức năng; (c) gắn kết với epitop tương tự; và/hoặc (d) có ái lực gắn kết tương tự như kháng thể không phải của người tương tự, ví dụ như kháng thể chuột.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 7. Theo một khía cạnh khác sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 7 và trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 8.

Theo một khía cạnh khác sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người. Do vậy, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc các đoạn của chúng có trình tự axit amin của các vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ và/hoặc nặng có mức tương đồng ít nhất là 80% (có mức tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 80%) với trình tự axit amin của các vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ và/hoặc

nặng của kháng thể chất đối kháng gốc của chuỗi nặng hoặc của chuỗi nhẹ, ví dụ, hoặc là của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ hoặc là của trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng như trong SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8, một cách tương ứng. Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể hoặc các đoạn của chúng có trình tự axit amin của các vùng CDR không mở rộng của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ và/hoặc nặng có mức tương đồng ít nhất là 80% với trình tự axit amin của các vùng CDR không mở rộng của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ và/hoặc nặng của kháng thể chất đối kháng gốc của chuỗi nặng hoặc của chuỗi nhẹ. Tốt hơn là mức tương đồng trình tự axit amin của các vùng không CDR hoặc của các vùng CDR không mở rộng của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ và/hoặc nặng ít nhất là 85%, tốt hơn nữa là ít nhất là 90%, và tốt nhất là ít nhất là 95%, đặc biệt là 96%, đặc biệt hơn là 97%, đặc biệt hơn nữa là 98%, đặc biệt nhất là 99%, ví dụ như, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và 100%. Tính đồng nhất hoặc tính tương đồng đối với trình tự axit amin được định nghĩa trong bản mô tả này là tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự nghiên cứu tương tự với kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người, sau khi sắp thẳng hàng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần thiết, để đạt được mức tương đồng về trình tự tính theo phần trăm là cực đại. Vì vậy, mức tương đồng về trình tự có thể được xác định theo các phương pháp tiêu chuẩn thường dùng để so sánh sự giống nhau về vị trí của các axit amin giữa hai polypeptit. Bằng cách sử dụng chương trình máy tính như BLAST hoặc FASTA, hai polypeptit được sắp thẳng hàng để so trùng tối ưu các axit amin tương ứng của chúng (cùng với chiều dài đầy đủ của một hoặc cả hai trình tự, hoặc cùng với phần đã được xác định trước của một hoặc cả hai trình tự). Chương trình này tạo ra điểm phạt mở mặc định và điểm phạt khuyết mặc định, và ma trận đánh giá như PAM250 (ma trận đánh giá tiêu chuẩn; xem Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3 (1978)) có thể được sử dụng cùng với chương trình máy tính này. Ví dụ, mức tương đồng theo phần trăm có thể được tính như sau: tổng số cặp giống nhau nhân với 100 và sau đó chia cho tổng chiều dài của trình tự dài hơn trong cặp được so trùng và số lượng khoảng trống được đưa vào các trình tự dài hơn để sắp thẳng hàng hai trình tự.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự vùng khung thay đổi chuỗi nặng có mức tương đồng ít nhất là 70% với trình tự vùng khung như nêu trong các SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22 hoặc 23 và/hoặc trình tự vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ có mức tương đồng ít nhất là 60% với trình tự vùng khung như nêu trong các SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27 và 28. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự vùng khung thay đổi chuỗi nặng có mức tương đồng ít nhất là 74% với trình tự vùng khung như nêu trong SEQ ID NO: 19 và/hoặc trình tự vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ có mức tương đồng ít nhất là 65% với trình tự vùng khung như nêu trong SEQ ID NO: 24.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa các CDR chuỗi nặng và hoặc chuỗi nhẹ như đã mô tả ở trên và cũng chứa vùng khung thay đổi chuỗi nặng là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người được chọn từ nhóm gồm IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22), và IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23), tốt hơn là vùng khung thay đổi chuỗi nặng là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19). Vùng khung thay đổi chuỗi nặng có thể bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba và/hoặc bốn) trình tự vùng khung chuỗi nặng (ví dụ, khung 1 (FW1), khung 2 (FW2), khung 3 (FW3) và/hoặc khung 4 (FW4)) có mặt trong sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ các gen người. Tốt hơn nữa là FW1, FW2 và FW3 có mặt trong sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người được chọn từ nhóm gồm IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22), và IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23). Trình tự vùng khung chuỗi nặng được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm FW1 (vị trí 1 tới vị trí 25), FW2 (vị trí 36 tới vị trí 49), FW3 (vị trí 66 tới vị trí 94) và FW 4 (vị trí 103 tới vị trí 113), trong đó vị trí axit amin được biểu thị bằng cách sử dụng hệ thống đánh số Kabat.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn của nó, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nặng là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19) và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nặng bao gồm ít nhất một cái biến axit amin từ vùng khung thay đổi chuỗi nặng tương ứng của kháng thể ở chuột tương ứng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 32 và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nặng bao gồm ít nhất một cái biến axit amin từ vùng khung thay đổi chuỗi nặng tương ứng của kháng thể ở chuột tương ứng.

Tốt hơn là, cái biến axit amin bao gồm thay thế axit amin ở vị trí axit amin được chọn từ nhóm gồm 23, 35b, 48, 50, 60, và 62, tốt hơn nữa là ở các vị trí axit amin được chọn từ nhóm gồm 23, 35b, 50, 60 và 62, được ưu tiên nhất ở vị trí axit amin 35b, trong đó vị trí axit amin của mỗi thành viên của nhóm được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat. Đặc biệt là, cái biến axit amin bao gồm thay thế axit amin được chọn từ nhóm gồm 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N, và 62A, tốt hơn là thay thế axit amin được chọn từ nhóm gồm T23S, S35bG, I48L, R50H, S60N và S62A, trong đó S35bG là thay thế axit amin được ưu tiên nhất trong đó vị trí axit amin của mỗi thành viên của nhóm được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat.

Theo một khía cạnh khác sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người được chọn từ nhóm gồm IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) và IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28), tốt hơn là vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24). Khung vùng thay đổi chuỗi nhẹ vùng có thể bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba và/hoặc bốn) trình tự vùng khung chuỗi nhẹ (ví dụ, khung 1 (FW1), khung 2 (FW2), khung 3 (FW3) và/hoặc khung 4 (FW4)) có mặt trong sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ các gen người. Tốt hơn là khung vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm FW1, FW2 và/hoặc FW3, tốt hơn nữa là FW1, FW2 và FW3 có mặt trong sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người được chọn từ nhóm gồm V3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID

NO: 27) và IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28). Trình tự vùng khung chuỗi nhẹ được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm FW1 (vị trí 1 tới vị trí 23), FW2 (vị trí 35 tới vị trí 49), FW3 (vị trí 57 tới vị trí 88) và FW 4 (vị trí 98 tới vị trí 108), trong đó vị trí axit amin được biểu thị bằng cách sử dụng hệ thống đánh số Kabat.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn của nó chứa vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một cải biến axit amin từ vùng khung tương ứng của vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể ở chuột tương ứng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 39 và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ của trình tự chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một cải biến axit amin từ vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ tương ứng của kháng thể ở chuột tương ứng.

Tốt hơn là, cải biến axit amin bao gồm thay thế axit amin ở vị trí axit amin được chọn từ nhóm gồm 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56, và 71 và/hoặc sự khuyết ở vị trí axit amin 31, tốt hơn nữa là thay thế axit amin ở vị trí axit amin được chọn từ nhóm gồm 33, 34, 46, 47, 54, 56, và 71 và/hoặc sự khuyết ở vị trí axit amin 31, tốt nhất là thay thế axit amin ở vị trí axit amin 46 và/hoặc 47, trong đó vị trí axit amin của mỗi thành viên của nhóm được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat. Đặc biệt là, cải biến axit amin bao gồm thay thế axit amin được chọn từ nhóm gồm 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S, và 71Y, và/hoặc sự khuyết ở T31, tốt hơn là thay thế axit amin được chọn từ nhóm gồm 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S và 71Y, tốt hơn nữa là thay thế axit amin được chọn từ nhóm gồm 33M, 34H, 46P, 47W và 71Y, trong đó 46P, 47W được ưu tiên cụ thể, trong đó vị trí axit amin của mỗi thành viên của nhóm được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat.

Theo một số phương án, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nặng là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người được chọn từ nhóm gồm V2-70*10 (SEQ ID NO: 19), V2-70*01 (SEQ ID NO: 20), V2-70*13 (SEQ ID NO: 21), V2-5*09 (SEQ ID NO: 22), và V2-70*11 (SEQ ID NO: 23) và vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người được chọn từ nhóm gồm V3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID

NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) và IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28), tốt hơn là vùng khung thay đổi chuỗi nặng là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người V2-70*10 (SEQ ID NO: 19), và vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ gen người V3-11*01 (SEQ ID NO: 24). Ngoài ra, các tổ hợp của các vùng khung thay đổi chuỗi nặng có mặt trong sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ các gen người nêu trên và/hoặc của các vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ có mặt trong sản phẩm của hoặc có nguồn gốc từ các gen người đã nêu trên cũng được bao hàm theo sáng chế.

Các trình tự ADN dòng phôi đối với các gen vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự mầm của người "VBase" (có trên Internet ở trang www.mrcce.cam.ac.uk/vbase), cũng như trong ấn phẩm: Kabat EA et al., supra; Tomlinson IM et al., (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798 and Cox JPL et al., (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836. Như một ví dụ khác, các trình tự ADN dòng phôi đối với các gen vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể tìm thấy trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen Genbank.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, trong đó ít nhất là một trong số các CDR chuỗi nặng và/hoặc ít nhất là một trong số các CDR chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất là một cải biến axit amin. Phát sinh đột biến hướng vị trí hoặc phát sinh đột biến thông qua PCR có thể được thực hiện để đưa vào (các) cải biến và tác dụng tới gắn kết kháng thể, hoặc đặc tính chức năng khác được quan tâm, có thể được đánh giá trong thử nghiệm in vitro hoặc in vivo như được mô tả ở đây và được đưa ra trong Ví dụ. Tốt hơn là, các cải biến bảo toàn được đưa vào. Các cải biến có thể là các thay thế axit amin, các bổ sung hoặc các sự xóa, nhưng tốt hơn là các thay thế. Thông thường, không nhiều hơn năm, tốt hơn là không nhiều hơn bốn, tốt hơn nữa là không nhiều hơn ba, thậm chí tốt hơn nữa là không nhiều hơn hai, tốt nhất là không nhiều hơn một cải biến axit amin được thực hiện trong một vùng CDR.

Theo các phương án nhất định, các trình tự vùng khung có thể được sử dụng để xây dựng các vùng thay đổi để tạo ra các kháng thể biến thể. Các kháng thể biến thể theo sáng chế bao gồm các kháng thể trong đó các cải biến được tạo ra đối với các gốc vùng khung nằm trong VH và/hoặc VK, ví dụ như để cải thiện các đặc tính của kháng thể. Thông thường, các cải biến vùng khung như vậy được tạo

ra để làm giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể. Ví dụ, một giải pháp để là làm "đột biến ngược" một hoặc nhiều gốc vùng khung thành trình tự chuột tương ứng hoặc để "đột biến ngược" một hoặc nhiều gốc vùng khung thành trình tự marm tương ứng.

Do vậy, theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, trong đó ít nhất một trong số các trình tự vùng khung của vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó bao gồm ít nhất một cải biến axit amin từ vùng khung tương ứng của vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể ở chuột tương ứng. Tốt hơn là cải biến axit amin là thay thế axit amin. Thông thường, không nhiều hơn sáu, tốt hơn là không nhiều hơn năm, tốt hơn là không nhiều hơn bốn, tốt hơn nữa là không nhiều hơn ba, thậm chí tốt hơn nữa là không nhiều hơn hai, tốt nhất là không nhiều hơn một cải biến axit amin được thực hiện trong một vùng khung. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, trong đó cải biến axit amin của các vùng khung của vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm thay thế axit amin ở vị trí axit amin được chọn từ nhóm gồm 23, 35b, 48, 50, 60 và 62, và trong đó vị trí axit amin của mỗi thành viên của nhóm được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat. Thay thế axit amin được ưu tiên của các vùng khung của vùng thay đổi chuỗi nặng là ở các vị trí axit amin được chọn từ nhóm gồm 23, 35b, 50, 60 và 62. Các thay thế axit amin được ưu tiên hơn của các vùng khung của vùng thay đổi chuỗi nặng là được chọn từ nhóm gồm 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N và 62A, trong đó 35bG là thay thế axit amin được ưu tiên nhất của các vùng khung của vùng thay đổi chuỗi nặng.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, trong đó ít nhất một trong số các trình tự vùng khung của vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó bao gồm ít nhất một cải biến axit amin từ vùng khung tương ứng của vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể ở chuột tương ứng. Tốt hơn là cải biến axit amin là thay thế axit amin và/hoặc sự khuyết axit amin. Thông thường, không nhiều hơn sáu, tốt hơn là không nhiều hơn năm, tốt hơn là không nhiều hơn bốn, tốt hơn nữa là không nhiều hơn ba, thậm chí tốt hơn nữa là không nhiều hơn hai, tốt nhất là

không nhiều hơn một cải biến axit amin được thực hiện trong một vùng khung. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó, trong đó cải biến axit amin của các vùng khung của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm thay thế axit amin ở vị trí axit amin được chọn từ nhóm gồm 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 và 71 và/hoặc sự khuyết ở vị trí axit amin 31. Các cải biến axit amin được ưu tiên hơn của các vùng khung của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm sự khuyết ở Y31 và/hoặc thay thế được chọn từ nhóm gồm 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S và 71Y, và trong đó vị trí axit amin của mỗi thành viên của nhóm được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat. Các cải biến axit amin được ưu tiên nhất của các vùng khung của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm sự khuyết ở T31 và/hoặc thay thế được chọn từ nhóm gồm 33M, 34H, 46P, 47W và 71Y, trong đó 46P, và/hoặc L47W được ưu tiên cụ thể. Theo một số phương án, kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó theo sáng chế có thể bao gồm các cải biến axit amin của các vùng khung của trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng như nêu trên và các cải biến axit amin của các vùng khung của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ như nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NOS: 29, 58, 59, 77, 78, 79 và 80, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 58, 59, 79 và 80 và tốt hơn nữa là từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 58 và 59. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, và 89, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 60, 86, 87 và 89, tốt hơn nữa là SEQ ID NO: 60. Theo một số phương án kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 29, 58, 59, 77, 78, 79 và 80, và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, và 89. Điều chắc chắn là mỗi trong số các trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này có thể gắn kết với OX40 của người, các trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể "được trộn lẫn và làm trùng khớp" để tạo ra các phân tử gắn kết kháng OX40 theo sáng chế. OX40 gắn kết các kháng thể đã "được trộn lẫn và làm

trùng khít" có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng các thử nghiệm gắn kết được mô tả ở dưới.

Theo một số phương án kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 58 và 59, và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 60 và 89. Theo các phương án được ưu tiên hơn, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 58 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 60, vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 58 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 89, vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 59 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 60, hoặc vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 59 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 89. Được ưu tiên nhất là kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 58 và 59, và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 60.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 và 38, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 35, 36, 37 và 38 và tốt hơn nữa là từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 37 và 38. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 và 49, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 45, 46, 47 và 49, tốt hơn nữa là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 và 38, và trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 và 49. điều chắc chắn là mỗi trong số các trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này có thể gắn kết với OX40 của người, các trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể "được trộn lẫn và làm trùng khít" để tạo ra các phân tử gắn kết kháng OX40 của sáng chế. OX40 gắn kết

với các kháng thể đã "được trộn lẫn và làm trùng khít" có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng các thử nghiệm gắn kết được mô tả ở dưới.

Theo một số phương án kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 37 và 38, và trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 47 và 49. Theo các phương án được ưu tiên hơn, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 37 và trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 47, trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 37 và trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 49, trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 38 và trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 47, hoặc trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 38 và trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 49. Được ưu tiên nhất là kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa trình tự chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 37 và 38, và trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 47.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó là kháng thể ở chuột, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm tương thích với người, tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người, tốt hơn nữa là kháng thể đơn dòng ở chuột, kháng thể khảm đơn dòng hoặc kháng thể đơn dòng được làm giống như của người.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể có hóa trị một hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, tức là kháng thể có một cánh tay gắn kết kháng nguyên đơn. Sáng chế cũng đề xuất đoạn kháng thể gắn kết với OX40 của người được chọn từ nhóm gồm Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, các đime Fv chuỗi đơn lưỡng đặc hiệu, các diabody, các triabody và scFv dung hợp về mặt di truyền với các kháng thể tương tự hoặc kháng thể khác. Các đoạn được ưu tiên gồm scFv, các đime Fv chuỗi đơn lưỡng đặc hiệu và các diabody. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể với chiều dài đầy đủ gắn kết với OX40 của người.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người còn bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, đặc biệt là vùng ổn định chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của người. Các vùng ổn định chuỗi

nặng của người có thể được chọn từ nhóm gồm các globulin miễn dịch của người gồm IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), hoặc IgE (IGHE), trong đó IgG vùng ổn định chuỗi nặng của người, cụ thể là IgG1 (IGHG1) là được ưu tiên. Vùng ổn định chuỗi nhẹ của người có thể được chọn từ nhóm gồm các globulin miễn dịch của người gồm các vùng ổn định kappa hoặc lambda, trong đó các vùng ổn định kappa của người là được ưu tiên. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người (IGHG1) và vùng ổn định kappa chuỗi nhẹ của người.

Ngoài ra hoặc theo một cách khác đối với các cải biến được tạo ra nằm trong các vùng khung hoặc các vùng CDR, các kháng thể theo sáng chế có thể được xây dựng để bao gồm các cải biến nằm trong vùng Fc, thường là để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể, như chu kỳ bán rã huyết thanh, sự cố định bổ thể, gắn kết thụ thể Fc, và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể được cải biến về mặt hóa học (ví dụ, như một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn vào kháng thể) hoặc được cải biến để làm thay đổi mức glycosyl hoá của nó. Mỗi phương án này được mô tả một cách chi tiết ở dưới. Các cải biến nằm trong vùng Fc như được nêu ở dưới là được đánh theo số gốc nằm trong vùng Fc theo chỉ số EU của hệ thống đánh số Kabat. Theo một phương án, vùng bản lề của CH1 được cải biến sao cho chỉ số của các gốc xystein trong vùng bản lề được làm thay đổi, ví dụ như, tăng hoặc giảm. Giải pháp này được mô tả tiếp trong Patent Mỹ No. 5,677,425 của Bodmer et al. Số của các gốc xystein trong vùng bản lề của CH1 được làm thay đổi, ví dụ, để tạo thuận lợi cho sự hợp khối của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc để làm tăng hoặc làm giảm độ ổn định của kháng thể. Theo một phương án khác, vùng Fc bản lề của kháng thể được gây đột biến để làm giảm chu kỳ bán rã sinh học của kháng thể. Đặc biệt hơn, một hoặc nhiều đột biến axit amin được đưa vào vùng phân giới vùng CH2-CH3 của đoạn bản lề Fc sao cho kháng thể bị suy yếu gắn kết Staphylococcal protein A (SpA) so với gắn kết SpA bản lề Fc nguyên vẹn. Giải pháp này được mô tả tiếp trong Patent Mỹ No. 6,165,745 của Ward et al. Theo một phương án khác, kháng thể được cải biến để làm tăng chu kỳ bán rã sinh học

của nó. Các giải pháp khác có thể thực hiện được. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến dưới đây có thể được đưa vào: T252L, T254S, T256F, như đã mô tả trong Patent Mỹ No. 6,277,375 của Ward. Theo một cách khác, để làm tăng chu kỳ bán rã sinh học, kháng thể có thể được làm biến đổi nằm trong vùng CH1 hoặc CL để chứa epitop gắn kết thụ thể cứu hộ lấy từ hai vòng của vùng CH2 vùng Fc của IgG, như đã mô tả trong các Patent Mỹ No. 5,869,046 và 6,121,022 của Presta et al. Theo một phương án tiếp theo, vùng Fc được làm thay đổi bởi sự thay thế ít nhất là một gốc axit amin bằng một gốc axit amin khác để làm thay đổi (các) chức năng cảm ứng của kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 and 322 có thể được thay thế bằng một gốc axit amin khác sao cho kháng thể có ái lực thay đổi đối với một phối tử tác động nhưng vẫn lưu giữ khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể gốc. Phối tử tác động mà ái lực đã làm thay đổi với nó có thể là, ví dụ, thụ thể Fc hoặc thành phần Cl của bổ thể này. Giải pháp này được mô tả chi tiết hơn trong các Patent Mỹ No. 5,624,821 và 5,648,260, đều của Winter et al. Theo một ví dụ khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 329, 331 và 322 có thể được thay thế bằng một gốc axit amin khác sao cho kháng thể đã thay đổi gắn kết C1q và/hoặc giảm hoặc mất hết tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Giải pháp này được mô tả chi tiết hơn trong Patent No. 6,194,551 của Idusogie et al. Theo một ví dụ khác, một hoặc nhiều gốc axit amin nằm trong các vị trí axit amin từ 231 tới 238 trong vùng đầu tận N của vùng CH2 được làm thay đổi để nhờ đó làm thay đổi khả năng của kháng thể để cố định bổ thể. Giải pháp này được mô tả tiếp trong Công bố PCT WO 94/29351 của Bodmer et al. Theo một ví dụ khác nữa, vùng Fc được cải biến để làm tăng khả năng của kháng thể thông qua tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc để làm tăng ái lực của kháng thể đối với thụ thể Fcγ bởi việc cải biến một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí sau: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439. Giải pháp này được mô tả tiếp trong Công bố đơn Quốc tế WO 00/42072 của Presta.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm các vùng ổn định chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của người, trong đó vùng ổn định chuỗi nặng của người bao gồm biến thể đồng kiểu chứa vùng CH1, vùng bản lề, vùng CH2 và vùng CH3 từ IgG4 của người (IGHG4) và trong đó vùng bản lề bao gồm thay thế serin ở vị trí 228 thành prolin. Tốt hơn là, kháng thể được làm tương thích với người chứa biến thể đồng kiểu là kháng thể với chiều dài đầy đủ. Một kháng thể được làm tương thích với người được ưu tiên đặc biệt hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa biến thể đồng kiểu chứa CH1 từ IgG4 của người (IGHG4), bản lề từ IgG4 của người (IGHG4), có thay thế S228P và CH2 và CH3 từ IgG4 của người (IGHG4) chứa trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 57 và trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 47. Đã phát hiện ra rằng biến thể đồng kiểu không biểu hiện các cơ chế gây độc tế bào thông qua trung gian Fc như ADCC so với kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng của người từ IgG1 của người (IGHG1) (nó thường là IgG1 tự nhiên của người), tức là khi so với kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người nó chỉ khác với biến thể đồng kiểu về vùng ổn định chuỗi nặng đã cải biến.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng IgG Fc của người, trong đó trong đó cấu trúc cacbohydrat nhân chín gắn vào vùng IgG Fc ở người thiếu fucoza (trong bản mô tả, còn được gọi theo cách khác là “không được fucosyl hóa”). Tốt hơn là, kháng thể này bao gồm vùng Fc IgG1 của người (IGHG1), trong đó cấu trúc cacbohydrat nhân chín gắn vào vùng Fc IgG1 của người (IGHG1) thiếu fucoza. Được ưu tiên hơn là kháng thể với chiều dài đầy đủ chứa vùng Fc IgG1 của người (IGHG1), trong đó cấu trúc cacbohydrat nhân chín được gắn vào vùng Fc IgG1 của người (IGHG1) thiếu fucoza. Đã biết từ WO03/035835 là việc thiếu fucoza trong cấu trúc cacbohydrat nhân chín gắn vào vùng IgG Fc của người có thể tăng cường cho ADCC. Do vậy, theo một phương án tiếp theo, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó theo sáng chế bao gồm vùng Fc IgG1 của người (IGHG1), trong đó cấu trúc cacbohydrat nhân chín được gắn vào vùng Fc IgG1 của người (IGHG1) thiếu fucoza, trong đó kháng thể thiếu fucoza có ADCC được tăng cường so với kháng

thể gốc được làm giống như của người hoặc đoạn của nó thiếu fucosa. Các phương pháp để tạo ra các kháng thể thiếu fucosa gồm, ví dụ, (a) sử dụng tế bào chủ đột biến hoặc được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền thiếu hụt sự chuyển hóa fucosa sao cho ít có khả năng (hoặc là không thể) fucosyl hóa các protein được biểu hiện trong nó; (b) nuôi cấy các tế bào dưới các điều kiện ngăn ngừa hoặc làm giảm quá trình quá trình fucosyl hóa; (c) loại bỏ sự sau dịch mã của fucosa (ví dụ bằng enzym fucosidaza); (d) bổ sung quá trình sau dịch mã của carbohydrat được mong muốn, tức là sau quá trình biểu hiện tái tổ hợp của glycoprotein không được glycosyl hóa; hoặc (e) tinh chế glycoprotein để lựa chọn sản phẩm không được fucosyl hóa. Tốt hơn là, sử dụng các phương pháp được mô tả trong Ví dụ 14, tức là các phương pháp đã được mô tả trong ấn phẩm: Longmore et al (1982), Carbohydr. Res. 365-92, or in Imai-Nishiya et al (2007), BMC Biotechnol. 7, 84.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người và gắn kết với cùng một epitop như kháng thể chứa trình tự thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 7 và/hoặc trình tự thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 8. Sáng chế cũng đề xuất hoặc epitop hoặc vùng đặc thù của OX40 của người, cụ thể là vùng ngoại bào thụ thể OX40 của người, nó được gắn kết bởi kháng thể theo sáng chế, cụ thể là bởi kháng thể chứa trình tự thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 7 và/hoặc trình tự thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO. 8. Epitop hoặc vùng đặc hiệu này của polypeptit OX40 của người có thể được nhận diện bởi phương pháp lập bản đồ epitop thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này kết hợp với bất kỳ trong số các kháng thể theo sáng chế. Các ví dụ về các phương pháp như vậy bao gồm việc sàng lọc các peptit có chiều dài thay đổi có nguồn gốc từ OX40 để gắn kết kháng thể theo sáng chế với đoạn nhỏ nhất có thể gắn kết đặc hiệu với kháng thể chứa trình tự epitop được nhận diện bởi kháng thể. Các peptit OX40 có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp hoặc bằng cách tiêu hóa bởi sự phân giải protein của polypeptit OX40. Các peptit gắn kết với kháng thể có thể được nhận diện bởi, ví dụ, phép phân tích quang phổ khối. Theo một ví dụ khác, quang phổ NMR hoặc tinh thể học tia X có thể được sử dụng để nhận diện epitop được gắn kết bởi kháng thể theo sáng chế. sau khi được nhận diện, đoạn epitop gắn

kết kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng, nếu cần, làm chất kháng nguyên để tạo ra các kháng thể đối kháng bổ sung gắn kết cùng một epitop.

Các đặc tính của kháng thể kháng OX40

Các thử nghiệm tiêu chuẩn để đánh giá khả năng gắn kết của các kháng thể hướng về OX40 của người chẳng hạn là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ bao gồm, các ELISA, BIAcore®, các thăm Tây Western blot, các RIA, và phân tích đếm tế bào dòng chảy. Các thử nghiệm thích hợp được mô tả chi tiết trong các ví dụ. Các động lực học gắn kết (ví dụ, ái lực gắn kết như KD) của các kháng thể cũng có thể được đánh giá bằng các thử nghiệm tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như bởi phép phân tích hệ thống Scatchard hoặc BIAcore®. Ái lực gắn kết tương đối K_i có thể được đánh giá bởi các thử nghiệm cạnh tranh tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất các kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người và phong bế phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp (MLR) ở người theo cách thức phụ thuộc liều lượng với một mức độ cao hơn so với kháng thể efalizumab được làm giống như của người tái tổ hợp. Kháng thể efalizumab được làm giống như của người tái tổ hợp gắn kết với cấu trúc siêu phân tử CD11a của kháng nguyên liên quan chức năng tế bào lympho 1. MLR có thể được tiến hành và được đánh giá theo Ví dụ 3.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất các kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người và chúng có khả năng nhận diện OX40 của khỉ cynomologus. Việc gắn kết của kháng thể kháng OX40 đối kháng với các tế bào đơn nhân máu ngoại vi cả người lẫn cynomologus (PBMC) có thể được tiến hành và được đánh giá theo Ví dụ 4 và được thể hiện trong Fig. 3. Kháng thể được chỉ ra là để nhận diện OX40 được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào lympho đã hoạt hóa của người và khỉ cynomologus chứng tỏ rằng kháng thể này có đặc tính phản ứng chéo.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất các kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người, đặc biệt là OX40 của người ở dạng đã phân lập, với ái lực (KD) nhỏ hơn hoặc bằng 500nM, tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 200nM, tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 150nM, tốt hơn nữa là nhỏ

hơn hoặc bằng 120nM, thậm chí tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn 110nM, ví dụ, được xác định bởi cộng hưởng plasma bề mặt (SPR) trên thiết bị BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) bởi việc bắt giữ kháng thể trong chip cảm biến loại nghiên cứu CM5 kết hợp protein-A (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland; BR-1000-14) với vùng ngoại bào thụ thể OX40 của người có hóa trị một tái tổ hợp (SEQ ID NO: 11) được sử dụng làm chất phân tích như được mô tả chi tiết trong Các ví dụ 5 và 6 và như được minh họa trong Fig.4. Thuật ngữ “hoá trị một” được sử dụng trong bản mô tả này liên quan tới các số đo ái lực bằng cách sử dụng thụ thể OX40 chỉ cho vùng thụ thể OX40 của người, như vùng ngoại bào, không được đime hóa hoặc multimer hóa nhân tạo như nó có thể nếu vùng này có thể có đầu cuối amino được ngưng tụ với phần Fc globulin miễn dịch. Theo một khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó lưu giữ ít nhất 75% ái lực gắn kết OX40 (K_D) của kháng thể khả tương ứng. Tốt hơn là, kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó gắn kết OX40 của người với ái lực tương đương với kháng thể khả tương ứng. Thuật ngữ “ái lực tương đương” chỉ trị số ái lực nằm trong khoảng từ +10% ái lực gắn kết OX40 của kháng thể khả tương ứng. Tốt hơn nữa là, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó gắn kết OX40 của người với ái lực cao hơn so với kháng thể khả tương ứng. Theo một khía cạnh được ưu tiên của sáng chế, các kháng thể đối kháng hoặc đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người được đề xuất có ái lực gắn kết (K_D) bằng hoặc nhỏ hơn 110nM, tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn 100nM, tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn 90nM, tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn 80nM, thậm chí tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn 70nM, ví dụ, được xác định bởi cộng hưởng plasma bề mặt (SPR) trên thiết bị BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) bởi việc bắt giữ kháng thể trong chip cảm biến loại nghiên cứu CM5 kết hợp protein-A (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland; BR-1000-14) với vùng ngoại bào thụ thể OX40 của người có hóa trị một tái tổ hợp (SEQ ID NO: 11) được sử dụng làm chất phân tích như được mô tả chi tiết trong Các ví dụ 5 và 6 và như được minh họa trong Fig. 4.

Một khía cạnh tiếp theo của sáng chế đề xuất các kháng thể đối kháng hoặc các đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người và có tính bền nhiệt tốt. Theo

một phương án được ưu tiên, kháng thể được làm tương thích với người có tính đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người có nhiệt độ ổn định nhiệt của đoạn FAB lớn hơn 70°C, tốt hơn là lớn hơn 75°C, tốt hơn nữa là lớn hơn 80°C và thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 85°C. Để phân tích nhiệt độ ổn định nhiệt của đoạn FAB, các phép đo nhiệt lượng quét vi sai được sử dụng, trong khi nhiệt độ nóng chảy quân bình của đoạn FAB liên quan tới IgG có chiều dài đầy đủ được nhận diện. Các dạng phép đo nhiệt lượng này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được tiến hành theo, ví dụ như trong ấn phẩm: Garber and Demarest (2007), BBRC 355:751-7, như được mô tả tiếp trong Ví dụ 6 và được thể hiện trong Fig. 6.

Theo một khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất các kháng thể đối kháng hoặc các đoạn của chúng mà gắn kết với một epitop trong vùng ngoại bào OX40 của người. Như được mô tả trong Ví dụ 7 và được thể hiện trong Fig. 7, một hoặc nhiều trong số bốn vùng ngoại bào OX40 được trao đổi giữa các trình tự của người và chuột và các protein dung hợp Fc đã tạo ra. ELISA gắn kết sau đó được thực hiện để thử nghiệm hoạt tính phản ứng của kháng thể được làm tương thích với người có tính đối kháng trong vùng ngoại bào OX40 của người, vùng ngoại bào OX40 của chuột và bốn protein thể khảm người-chuột. Do vậy, sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó có bản đồ nằm trong miền thứ hai của vùng ngoại bào OX40 của người.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể đối kháng hoặc các đoạn của chúng có thể được sử dụng để ức chế các phản ứng miễn dịch. Tác động của kháng thể kháng OX40 được làm giống như của người có tính đối kháng được thử nghiệm trong MLR (xem Ví dụ 8) được sử dụng như một mô hình in vitro của quá trình tăng sinh và hoạt hóa tế bào T phản ứng (O'Flaherty E et al., (2000) *Immunology*, 100(3): 289-99; DuPont B & Hansen JA (1976) *Adv. Immunol.* 23: 107-202). PBMC từ hai thể cho không liên quan được trộn lẫn, dẫn đến sự hoạt hóa của các tế bào T và sự tăng sinh của các tế bào lympho T. Ngoài ra, ba format khác nhau của kháng thể kháng OX40 được làm giống như của người có tính đối kháng được thử nghiệm trong thử nghiệm này: format IgG1 (IGHG1), format IgG1 không được fucosyl hóa (IGHG1) và format IgG4 (IGHG4), để xác định tiếp sự góp phần của các cơ chế gây độc tế bào như ADCC tới sự ức chế MLR. Kháng thể kháng

OX40 được làm giống như của người có tính đối kháng ức chế một cách hiệu quả MLR ở hai cá thể khác nhau (các đáp ứng) với các giá trị EC50 khoảng chừng 100 ng/mL. Tuy nhiên, các kết quả đã cho thấy sự khác nhau phụ thuộc vào format của kháng thể được sử dụng. Ở cá thể đầu tiên (đáp ứng 1), hoạt tính phản ứng tế bào T được ức chế một cách hiệu quả bởi IgG1 (IGHG1) và các format kháng thể IgG4 (IGHG4) chứng tỏ rằng các cơ chế gây độc tế bào là không quan trọng đối với cá thể này. Đối với cá thể thứ hai (đáp ứng 2) format IgG1 (IGHG1) đạt được sự ức chế trên 60%, trong đó format IgG4 (IGHG4) phong bế MLR kém. Ở cả hai cá thể, format IgG1 không fucosyl hóa (IGHG1) rất có hiệu quả với sự ức chế MLR. Những kết quả này chứng tỏ rằng việc phong bế quá trình hoạt hóa OX40 có thể thỏa đáng ở một số cá thể để ức chế MLR nhưng tác dụng này có thể bị tăng mạnh bởi các cơ chế gây độc tế bào bổ sung. Do đó, để điều trị cho bệnh nhân bị rối loạn thông qua trung gian OX40, trong đó rối loạn dường như độc lập với tình trạng đồng hoạt OX40 của bệnh nhân, ví dụ, bệnh nhân có mức biểu hiện OX40 thấp, việc cung cấp kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người và có các cơ chế gây độc tế bào tăng cường có thể là có hiệu quả đặc biệt. Một phương án được ưu tiên của sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người có tính đối kháng gắn kết với OX40 của người để điều trị cho bệnh nhân bị rối loạn thông qua trung gian OX40. Hơn thế nữa, người bệnh có thể có mức biểu hiện thấp của OX40. Tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người có tính đối kháng gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng IgG1 (IGHG1). Tốt hơn nữa là kháng thể được làm tương thích với người có tính đối kháng gắn kết với OX40 của người bao gồm vùng IgG1 không được fucosyl hóa.

Theo một khía cạnh tiếp theo của sáng chế, tác động của kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó đã được chứng minh trong phản ứng vật ghép khác loại chống ký chủ, trong đó chuột nhắt SCID được khôi phục lại trạng thái ban đầu bằng các PBMC của người. Phản ứng này đưa ra một mô hình cho bệnh mảnh ghép chống ký chủ (GVHD) được quan sát sau khi ghép tủy xương ở người bệnh. Trong mô hình này, các PBMC của người và đặc biệt là các tế bào lympho T, phát động một đáp ứng mạnh mẽ chống lại các tế bào chủ của chuột làm tăng các triệu chứng viêm trầm trọng. Như được mô tả trong Ví dụ 9 và được thể hiện trong Fig.9 và Bảng 10, kháng thể được làm tương thích với người có tính đối kháng gắn

kết với OX40 của người có hiệu lực ức chế phản ứng GVHD với liều lượng 1mg/kg. Đáng ngạc nhiên là, kháng thể này đã được chứng minh là có hiệu quả tốt hơn so với Enbrel[®], là một chất trị liệu đã được thừa nhận cho GVHD (Xhaard A et al., (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). Do đó, theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người và có hiệu quả để điều trị GVHD. Tốt hơn là, việc cung cấp kháng thể cho đối tượng dẫn đến sự cải thiện tăng gấp bốn lần khả năng sống trung bình (ngày) so với khi chỉ dùng chất dẫn thuốc. Tốt hơn nữa là, việc cung cấp kháng thể cho đối tượng dẫn đến sự cải thiện tăng gấp hai lần khả năng sống trung bình (ngày) so với khi chỉ dùng Enbrel[®]. Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn gắn kết với OX40 của người có hiệu quả hơn so với Enbrel[®] trong việc điều trị cho người bệnh có GVHD và/hoặc ức chế GVHD. Ngoài ra, điều đã được công bố là các kháng thể kháng OX40 có tính đối kháng làm thuyên giảm GVHD trong các mô hình GVHD của chuột ngoại sinh (Valzasina B et al., (2005) Blood, 105(7): 2845-51; Blazar BR et al., (2003) Blood, 101(9): 3741-8), do đó điều có thể rút ra được từ Ví dụ 9, là các kháng thể đối kháng và các đoạn của chúng theo sáng chế không có tác động chủ vận khi gắn kết OX40 của người, do không thấy có sự thuyên giảm của the GVHD trong mô hình này. Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người không có hoạt tính chủ vận khi gắn kết.

Các axit nucleic, các vật truyền và các tế bào chủ

Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic đã phân lập mã hóa các kháng thể và các đoạn của chúng mà gắn kết với OX40 của người, các vật truyền và các tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vật truyền. Axit nucleic được "phân lập" hoặc "đã làm cho gần như tinh khiết" khi được làm sạch các thành phần tế bào khác hoặc các tạp chất khác, ví dụ như, các axit nucleic thuộc tế bào khác hoặc các protein, bởi các kỹ thuật tiêu chuẩn, bao gồm việc điều trị bằng kiềm/SDS, phân giải CsCl, sắc ký trên cột, điện di trên gel agarosa và các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như xem trong ấn phẩm: F. Ausubel, et al, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New

York. Axit nucleic theo sáng chế có thể là, ví dụ, ADN hoặc ARN và có thể hoặc không thể chứa các trình tự intron. Theo một phương án được ưu tiên, axit nucleic này là một phân tử cADN.

Các axit nucleic theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn ví dụ như các cADN mã hoá các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng của kháng thể hoặc mã hoá các đoạn VH và VL có thể được tạo ra bởi các kỹ thuật tách dòng cADN hoặc khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Đối với các kháng thể được tạo ra từ ngân hàng gen globulin miễn dịch (ví dụ, như bằng cách áp dụng các kỹ thuật thể hiện thể thực khuẩn), một hoặc nhiều axit nucleic mã hoá kháng thể có thể được thu hồi từ ngân hàng này. Các phương pháp đưa axit nucleic ngoại sinh vào các tế bào chủ là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và sẽ khác nhau tùy thuộc vào tế bào chủ được sử dụng. Các kỹ thuật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn, ở các kỹ thuật chuyển nhiễm thông qua dextran, kết tủa canxi phosphate, điều trị bằng canxi clorua, chuyển nhiễm thông qua polybren, dung hợp tế bào trần, thẩm điện, nhiễm khuẩn thể thực khuẩn hoặc virus, kết bao (các) polynucleotit trong các liposom, và vi tiêm trực tiếp ADN vào các nhân tế bào. Trong trường hợp các tế bào động vật có vú, sự chuyển nhiễm có thể là nhất thời hoặc ổn định.

Các phân tử axit nucleic được ưu tiên theo sáng chế gồm các phân tử mã hóa trình tự chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 và 38 và/hoặc trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 và 49. Các phân tử axit nucleic được ưu tiên theo sáng chế gồm các phân tử mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 29, 58, 59, 77, 78, 79 và 80 và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, và 89.

Các phân tử axit nucleic được ưu tiên của sáng chế gồm các phân tử mã hóa vùng thay đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 8 và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 7, ví dụ ADN mã hóa trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng chứa axit nucleic SEQ ID NO: 9 và/hoặc ADN mã hóa trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa axit nucleic SEQ ID NO: 10. Các phân tử axit nucleic được ưu tiên hơn theo sáng chế gồm các phân tử mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng gồm các SEQ ID NO: 58 hoặc

59 và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 60, ví dụ ADN mã hóa trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng chứa axit nucleic SEQ ID NOS: 61 hoặc 62 và/hoặc ADN mã hóa trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa axit nucleic SEQ ID NO: 63, chúng được ưu tiên nhất.

Sau khi các đoạn ADN mã hoá các đoạn VH và VL được tạo ra, thì các đoạn ADN này có thể được xử lý tiếp bởi các kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn, ví dụ, để chuyển hóa các gen vùng thay đổi thành các chuỗi gen kháng thể với chiều dài đầy đủ, hoặc thành các đoạn gen tương ứng các đoạn đã mô tả ở trên như các đoạn gen Fab hoặc thành gen scFv. Trong các quá trình xử lý này, đoạn ADN mã hóa VL- hoặc VH- được liên kết có điều khiển với đoạn ADN khác mã hoá protein khác, như vùng ổn định của kháng thể hoặc một liên kết linh hoạt. Thuật ngữ "được liên kết có điều khiển", khi được sử dụng trong phần mô tả này, là để chỉ việc hai đoạn ADN được kết hợp sao cho các trình tự axit amin được mã hoá bởi hai đoạn ADN nằm lại trong khung. ADN đã phân lập mã hoá vùng VH có thể được chuyển hóa thành gen chuỗi nặng với chiều dài đầy đủ bởi việc liên kết có điều khiển ADN mã hoá VH với phân tử ADN khác mã hoá các vùng ổn định của chuỗi nặng (CH1, CH2 and CH3). Các trình tự của các gen vùng ổn định chuỗi nặng của người là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ như xem trong ấn phẩm: Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và các đoạn ADN bao hàm các vùng này có thể được tạo ra bởi kỹ thuật khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Vùng ổn định chuỗi nặng có thể là một vùng ổn định IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), hoặc IgE (IGHE), nhưng tốt nhất là vùng ổn định IgG1 (IGHG1). Đối với gen chuỗi nặng đoạn Fab, ADN mã hóa VH có thể được liên kết có điều khiển với một phân tử ADN khác mã hoá duy nhất vùng ổn định CH1 của chuỗi nặng. ADN đã phân lập mã hoá vùng VL có thể được chuyển hóa thành gen chuỗi nặng với chiều dài đầy đủ (cũng như gen chuỗi nhẹ Fab) bởi việc liên kết có điều khiển ADN mã hóa VL với một phân tử ADN khác mã hoá vùng ổn định chuỗi nhẹ, CL. Các trình tự của các gen vùng ổn định chuỗi nhẹ ở người là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ như xem trong ấn phẩm: Kabat, E. A., et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,

Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và các đoạn ADN bao gồm các vùng này có thể được tạo ra bởi kỹ thuật khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Theo các phương án được ưu tiên, vùng ổn định chuỗi nhẹ có thể là vùng ổn định kappa hoặc lambda, tốt hơn là vùng ổn định kappa. Để tạo ra gen scFv, các đoạn ADN mã hóa VH- và VL- được liên kết có điều khiển với một đoạn khác mã hoá một liên kết linh hoạt, ví dụ như, mã hoá trình tự axit amin (Gly4 -Ser)3, sao cho các trình tự VH và VL có thể được biểu hiện dưới dạng một protein chuỗi đơn liên kết, có các vùng VL và VH được kết hợp bởi liên kết linh hoạt (ví dụ như xem trong ấn phẩm: Bird et al (1988) Science 242:423-426; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al, (1990) Nature 348:552-554). Các kỹ thuật khác nhau đã được phát triển để sản xuất các đoạn kháng thể của các kháng thể được làm tương thích với người. Thông thường, các đoạn này được tạo ra thông qua sự tiêu hóa phân giải protein của các kháng thể nguyên vẹn (ví dụ như xem trong các ấn phẩm: Morimoto et al, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992); và Brennan et al, Science, 229:81 (1985)). Tuy nhiên, các đoạn này hiện thời có thể được tạo ra một cách trực tiếp bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ tái tổ hợp. Ví dụ, các đoạn kháng thể có thể được phân lập từ các thư viện thể thực khuẩn kháng thể đã đề cập ở trên. Theo một cách khác, các đoạn Fab'-SH có thể được thu hồi một cách trực tiếp từ E. coli và ngẫu nhiên hóa học để tạo ra các đoạn F(ab')₂ (Carter et al, Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). Theo một phương án khác, các đoạn F(ab')₂ có thể được phân lập một cách trực tiếp từ việc nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Các kỹ thuật khác để sản xuất các đoạn kháng thể sẽ là hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án khác, kháng thể được chọn là đoạn Fv chuỗi đơn (scFv), ví dụ như xem trong các ấn phẩm: WO 1993/16185; U.S. Pat. No. 5,571,894; và U.S. Pat. No. 5,587,458. Đoạn kháng thể này cũng có thể là “kháng thể thẳng”, ví dụ như, như đã mô tả trong U.S. Patent No. 5,641,870 chẳng hạn.

Các axit nucleic mã hoá các kháng thể theo sáng chế có thể được hợp nhất thành một vật truyền biểu hiện để biểu hiện protein. Các vật truyền biểu hiện khác nhau có thể được sử dụng để biểu hiện protein. Các vật truyền biểu hiện có thể gồm các vật truyền ngoại nhiễm sắc tự sao chép hoặc các vật truyền tích hợp vào

bộ gen vật chủ. Các vật truyền biểu hiện được xây dựng là tương thích với typ tế bào chủ. Do đó, các vật truyền biểu hiện để sử dụng theo sáng chế này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn, ở các vật truyền có thể biểu hiện protein trong các tế bào động vật có vú, vi khuẩn, các tế bào côn trùng, nấm men, và trong các hệ thống in vitro. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các vật truyền biểu hiện khác nhau là có sẵn, là thương phẩm hoặc từ các nguồn khác, chúng có thể được sử dụng theo sáng chế này để biểu hiện các kháng thể.

Các vật truyền biểu hiện thông thường bao gồm một protein được liên kết có điều khiển với các trình tự gen kiểm soát hoặc điều hòa, các gen đánh dấu có thể chọn được, các thành phần dung hợp bất kỳ, và/hoặc các thành phần bổ sung. Thuật ngữ "được liên kết có điều khiển" ở đây để chỉ việc axit nucleic được đưa vào mỗi quan hệ về mặt chức năng với một trình tự axit nucleic trình tự khác. Thuật ngữ "trình tự gen điều hòa" để chỉ bao gồm các gen khởi đầu, các gen tăng cường và các thành phần kiểm soát biểu hiện khác (ví dụ, như các tín hiệu polyadenyl hóa) kiểm soát sự phiên mã hoặc sự dịch mã của các gen chuỗi kháng thể. Các trình tự gen điều hòa như vậy đã được mô tả, ví dụ, trong ấn phẩm: Goeddel (Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Nói chung, các vật truyền biểu hiện này axit nucleic điều hòa phiên mã và dịch mã liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hoá kháng thể, và thường là thích hợp với tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện protein. Nói chung, các trình tự gen điều hòa phiên mã và dịch mã có thể bao gồm các trình tự gen khởi đầu, các vị trí gắn kết ribosomal, các trình tự khởi đầu và kết thúc phiên mã, các trình tự khởi đầu và kết thúc dịch mã, và các trình tự gen tăng cường hoặc các trình tự gen hoạt hóa. Cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các vật truyền biểu hiện thường chứa gen chọn lọc hoặc gen đánh dấu để cho phép chọn lọc các tế bào được biến nạp chứa vật truyền biểu hiện. Các gen chọn lọc là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và sẽ khác nhau tùy thuộc vào tế bào chủ được sử dụng. Ví dụ, thông thường là gen đánh dấu có thể chọn lọc được tạo ra tính kháng các thuốc, như G418, hygromycin hoặc methotrexate, trên tế bào chủ mà vật truyền này được đưa vào. Các gen đánh dấu có thể chọn lọc được ưu tiên bao gồm gen dihydrofolat reductaza (DHFR) (để dùng trong các tế bào chủ dhfr có sự khuếch đại/chọn lọc methotrexat) và gen neo (để chọn lọc G418).

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện ADN trong các vật truyền ở đây gồm sinh vật chưa có nhân điển hình, nấm men, hoặc các tế bào có nhân điển hình cao hơn. Các sinh vật chưa có nhân điển hình thích hợp cho mục đích này bao gồm vi khuẩn thực, gồm các vi sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ, Enterobacteriaceae như *Escherichia*, ví dụ như, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, ví dụ như, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, ví dụ như, *Serratia marcescens*, và *Shigella*, cũng như Bacilli như *B. subtilis* và *B. licheniformis*, *Pseudomonas* như *P. aeruginosa*, và *Streptomyces*. Các tế bào chủ tách dòng *E. coli* thích hợp gồm *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), và *F. coli* W3110 (ATCC 27,325). Ngoài các sinh vật chưa có nhân điển hình, các vi sinh vật có nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp. *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc nấm men bánh mỳ thông thường, là được sử dụng phổ biến nhất trong số các vi sinh vật có nhân điển hình thấp. Tuy nhiên, nhiều giống, loài, và chủng khác thường có sẵn và hữu ích, như *Schizosaccharomyces pombe*; các vật chủ *Kluyveromyces* gồm *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. WaltH* (AJCC 56,500), *K. drosopmarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, hoặc *K. marxianus yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* như *Schwanniomyces occidentalis*; và filamentous fungi including *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, hoặc các vật chủ *Aspergillus* như *A. nidulans* hoặc *A. niger*.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế có nguồn gốc từ vi sinh vật liên bào. Ví dụ các tế bào của động vật không xương sống gồm các tế bào plaril và các tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirut và các biến thể và các tế bào chủ côn trùng cho phép tương ứng từ các vật chủ như *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes augypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), và *Bombyx mori* đã được nhận diện. Các chủng virut khác nhau để chuyển nhiễm là có sẵn công khai, ví dụ, biến thể L-1 của *Autographa californica* NPV và chủng Bm-5 của *Bombyx mori* NPV, và các virut như vậy có thể được sử dụng, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Các dịch nuôi cấy tế bào thực vật của

bông, ngô, khoai tây, đậu tương, cây thuốc lá, cà chua, và thuốc lá cũng có thể được dùng làm các vật chủ.

Tốt hơn, nếu các tế bào chủ để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế là các tế bào chủ của động vật có vú gồm các tế bào CHO (Chinese Hamster Ovary (gồm các tế bào CHO đã được mô tả trong ấn phẩm: Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, được sử dụng cùng với gen đánh dấu có thể lựa chọn được DHFR, ví dụ như, như đã mô tả trong ấn phẩm: R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol 159:601-621), các tế bào u tủy NSO, các tế bào COS và các tế bào SP2. Đặc biệt, để sử dụng cùng với các tế bào u tủy NSO, một hệ biểu hiện được ưu tiên khác là hệ biểu hiện gen GS biểu hiện gen đã được đề cập trong các ấn phẩm: WO 87/04462 (Wilson), WO 89/01036 (Bebbington) và EP 338841 (Bebbington). Khi các gen kháng thể tái tổ hợp được đưa vào các tế bào chủ của động vật có vú, thì các kháng thể này được sản xuất bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để biểu hiện kháng thể trong các tế bào chủ, hoặc tốt hơn nữa là, để tiết kháng thể vào môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào chủ được phát triển. Các tế bào chủ hữu ích để sản xuất các kháng thể gắn kết với CD19 ở người có thể được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau. Các môi trường đang có trên thị trường như Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma or Chemie Brunschwig AG, PAA, Basel, Switzerland), và Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) là thích hợp để nuôi cấy các tế bào chủ. Các kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách áp dụng các phương pháp tinh chế protein tiêu chuẩn.

Các kháng thể có thể được liên kết có điều khiển với thành phần dung hợp để cho phép tạo đích biểu hiện protein, tinh chế, sàng lọc, thể hiện, và tương tự. Các thành phần dung hợp có thể được liên kết với trình tự kháng thể thông qua các trình tự liên kết. Trình tự liên kết nói chung gồm số ít axit amin, thường là dưới mười, mặc dù các liên kết dài hơn cũng có thể được sử dụng. Thông thường là, các trình tự liên kết là được chọn để có thể linh động và chịu quá trình thoái hóa. Điều được đánh giá cao bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này là, bất kỳ trong số một khoảng rộng của các trình tự có thể được sử dụng làm các liên kết. Ví dụ, một trình tự liên kết thông dụng gồm trình tự axit amin GGGGS. Thành phần dung hợp

có thể là trình tự tạo đích hoặc trình tự tín hiệu dẫn hướng kháng thể và các thành phần dung hợp đi về bất kỳ tới khu vực tế bào được mong muốn hoặc tới môi trường ngoại bào. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các trình tự tạo tín hiệu nhất định có thể hướng đích protein được tiết vào vào môi trường phát triển, hoặc vào khoảng trống gian bào, nằm giữa màng bên trong và màng bên ngoài của tế bào. Thành phần dung hợp cũng có thể là một trình tự mã hoá peptit hoặc protein cho phép tinh chế và/hoặc sàng lọc. Các thành phần dung hợp như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn, ở các nhãn polyhistidin (nhãn His) (ví dụ các nhãn H6 và H10 hoặc các nhãn khác để sử dụng cùng với các hệ thống sắc ký ái lực kim loại cố định (IMAC) (ví dụ như các cột ái lực Ni^{+2})), sự dung hợp GST, sự dung hợp MBP, nhãn Strep, trình tự đích biotinyl hóa BSP của enzym vi khuẩn BirA, và các nhãn epitop được tạo đích bởi các kháng thể (ví dụ, các nhãn c-myc, các nhãn flag, và tương tự). Điều được đánh giá cao bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này là, các nhãn như vậy có thể hữu ích cho việc tinh chế, cho việc sàng lọc hoặc cả hai.

Xây dựng và sản xuất các kháng thể

Các kháng thể được tạo ra để kháng polypeptit OX40 có thể được tạo ra bằng cách tiêm chủng động vật, tức là cung cấp các polypeptit cho động vật, tốt hơn là động vật không phải là người, bằng cách sử dụng các phương pháp và quy trình đã biết, ví dụ, xem trong ấn phẩm: Handbook of Experimental Immunology (Weir DM (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Nhiều động vật máu nóng, như thỏ, chuột nhắt, chuột, cừu, bò, lạc đà hoặc lợn có thể có khả năng miễn dịch. Tuy nhiên, chuột nhắt, thỏ, lợn và chuột, đặc biệt là chuột nhắt thường là thích hợp. Các kháng thể có thể được sản xuất bởi các kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, các kháng thể có thể được sản xuất bởi sự tiêu hóa học hoặc enzym các kháng thể có trong tự nhiên. Các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế có thể được xây dựng bằng cách chuyển một hoặc nhiều CDR hoặc các phần của chúng từ các vùng VH và/hoặc VL của động vật không phải ở người (ví dụ, như chuột) sang một hoặc nhiều vùng khung của các vùng VH và/hoặc VL ở người. Tùy chọn, các gốc vùng khung ở người nhờ vậy có mặt trong các vùng VH

và/hoặc VL có thể được thay thế bằng các gốc không phải ở người (ví dụ như chuột) tương ứng khi cần hoặc được mong muốn để làm giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể và/hoặc duy trì ái lực gắn kết. Tùy chọn, các gốc axit amin không phải ở người có mặt trong các CDR có thể được thay thế bằng các gốc ở người. Các kháng thể được làm tương thích với người hoặc các kháng thể thể khảm theo sáng chế có thể được điều chế trên cơ sở trình tự của kháng thể đơn dòng không phải ở người được điều chế như đã mô tả ở trên. ADN mã hoá các globulin miễn dịch chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được tạo ra từ tế bào lai không phải ở người được nghiên cứu và được tạo bằng kỹ thuật di truyền để chứa các trình tự globulin miễn dịch không phải ở chuột (ví dụ, như ở người) bằng cách áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Ví dụ, để tạo ra kháng thể thể khảm, các vùng thay đổi ở chuột có thể được liên kết với các vùng ổn định ở người bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ như xem trong ấn phẩm: U.S. Patent No. 4,816,567 của Cabilly et al). Để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người, các vùng CDR ở chuột được cài xen vào khung ở người bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ như xem trong các ấn phẩm: U.S. Patent No. 5,225,539 của Winter, và các U.S. Patent No. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 của Queen et al).

Các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế có thể được xây dựng trong đó phân tử thể nhận ở người đối với vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn dựa trên các xem xét về tính tương đồng giữa các vùng thay đổi phân tử thể nhận hiệu lực và vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể chuột. Các phân tử thể nhận ở người nghiên cứu dòng phôi được ưu tiên để khử tính sinh miễn dịch hiệu lực. Các cơ sở dữ liệu phôi được xây dựng từ các trình tự kháng thể được đọc thông qua đầu của vùng FW3 chuỗi nặng và một phần vào trình tự CDR3. Để chọn lọc vùng FW4, các cơ sở dữ liệu của các trình tự kháng thể trưởng thành có nguồn gốc từ phân tử phôi được chọn có thể được tra cứu hoặc các trình tự kháng thể có nguồn gốc từ phân tử phôi được chọn từ thể cho ở người có thể được sử dụng. Tốt hơn, nếu các phân tử thể nhận ở người được chọn từ nhóm chuỗi nặng giống như phân tử thể cho ở chuột, và có cùng cấu trúc kinh điển của vùng thay đổi của phân tử thể cho ở chuột. Các xem xét thứ cấp để chọn lọc phân tử thể nhận ở người đối với vùng thay đổi chuỗi nặng gồm tính tương đồng về độ dài CDR giữa phân tử thể

cho ở chuột và phân tử thể nhận ở người. Tốt hơn, nếu các phân tử kháng thể thể nhận ở người được chọn bằng cách tra cứu tính tương đồng với cơ sở dữ liệu V-BASE, mặc dù các cơ sở dữ liệu khác như các cơ sở dữ liệu Kabat và NCBI công khai khác cũng có thể sử dụng được.

Các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế có thể được xây dựng trong đó phân tử thể nhận ở người đối với vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn dựa trên các xem xét về tính tương đồng giữa các vùng thay đổi phân tử thể nhận hiệu lực và với vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột. Các phân tử thể nhận ở người dòng phôi được ưu tiên để khử tính sinh miễn dịch hiệu lực. Các cơ sở dữ liệu phôi được xây dựng từ các trình tự kháng thể được đọc thông qua đầu của vùng FW3 và một phần vào trình tự CDR3. Để chọn lọc vùng FW4, các cơ sở dữ liệu của các trình tự kháng thể trưởng thành có nguồn gốc từ phân tử phôi được chọn có thể được tra cứu hoặc các trình tự kháng thể có nguồn gốc từ phân tử phôi được chọn từ thể cho ở người có thể được sử dụng. Tốt hơn, nếu các phân tử thể nhận ở người được chọn từ nhóm chuỗi nặng giống như phân tử thể cho ở chuột, và có cùng cấu trúc kinh điển của vùng thay đổi của phân tử thể cho ở chuột. Các xem xét thứ cấp để chọn lọc phân tử thể nhận ở người đối với vùng thay đổi chuỗi nặng gồm tính tương đồng về độ dài CDR giữa phân tử thể cho ở chuột và phân tử thể nhận ở người. Tốt hơn, nếu các phân tử kháng thể thể nhận ở người được chọn bằng cách tra cứu tính tương đồng với cơ sở dữ liệu V-BASE, mặc dù các cơ sở dữ liệu khác như các cơ sở dữ liệu Kabat và NCBI công khai khác cũng có thể sử dụng được. Các phương pháp để làm được làm tương thích với người cho các kháng thể không phải ở người được mô tả trong Ví dụ 6 ở dưới.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ bao gồm axit nucleic đã phân lập mã hóa kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người hoặc vật truyền bao gồm axit nucleic đã phân lập mã hóa kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người để sao cho axit nucleic này được biểu hiện và kháng thể được sản xuất. Tốt hơn là, kháng thể này được phân lập. Trong số các tế bào chủ, các axit nucleic và các vật truyền, các loại đã mô tả ở trên có thể được sử dụng. Sự biểu hiện của các axit nucleic có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, kết hợp các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và các

phương pháp gen chuyển nhiễm như đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, như trong ấn phẩm: Morrison, S. (1985) Science 229:1202) và như đã lưu ý ở trên. Ví dụ, để biểu hiện các kháng thể, hoặc các đoạn kháng thể của chúng, các ADN mã hoá các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ với độ dài đầy đủ hoặc không đầy đủ, có thể được tạo ra bởi các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn (ví dụ, như khuếch đại PCR hoặc tách dòng cADN nhờ sử dụng tế bào lai biểu hiện kháng thể được nghiên cứu) và các ADN có thể được cài xen vào các vật truyền như các vật truyền biểu hiện. Các trình tự vật truyền biểu hiện và các trình tự kiểm soát biểu hiện được chọn để tương thích với tế bào chủ biểu hiện được sử dụng. Gen chuỗi nhẹ của kháng thể và gen chuỗi nặng của kháng thể được cài xen vào vật truyền tách biệt hoặc, tốt hơn là, cả hai gen được cài xen vào cùng vật truyền biểu hiện. Các gen kháng thể được cài xen vào vật truyền biểu hiện bằng các phương pháp tiêu chuẩn (ví dụ, như nối các vị trí giới hạn bổ trợ trên đoạn gen kháng thể gen đoạn và vật truyền, hoặc làm cùn mối nối đầu nếu không có các vị trí giới hạn). Các vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể được mô tả trong này có thể được sử dụng để tạo ra các gen với độ dài đầy đủ có isotyp kháng thể bất kỳ bằng cách cài xen chúng vào các vật truyền biểu hiện đã mã hoá các vùng ổn định chuỗi nhẹ và các vùng ổn định chuỗi nặng có isotyp được mong muốn để sao cho đoạn VH được liên kết có điều khiển với (các) đoạn CH1 nằm trong vật truyền và đoạn VK được liên kết có điều khiển với đoạn CK nằm trong vật truyền.

Đặc tả và tinh chế các kháng thể kháng OX40

Việc sàng lọc cho các kháng thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các thử nghiệm để đánh giá khả năng gắn kết với OX40 của người và/hoặc các thử nghiệm để đánh giá khả năng gắn kết OX40 với một phối tử của nó, là OX40L. Một ví dụ về thử nghiệm gắn kết là ELISA, đặc biệt là, bằng cách sử dụng protein dung hợp của OX40 của người và người Fc, nó được cố định trên đĩa, và sử dụng kháng thể thứ cấp đã tiếp hợp để phát hiện kháng thể kháng OX40 đã gắn kết với protein dung hợp. Một ví dụ về thử nghiệm phong bế là thử nghiệm trên cơ sở đo dòng tế bào xác định sự phong bế của protein dung hợp phối tử OX40 đã gắn kết với OX40 trong các tế bào CD4 của người. Một kháng thể thứ cấp đã đánh dấu huỳnh quang được sử dụng để phát hiện lượng protein dung hợp phối tử OX40 đã

gắn kết với tế bào. Thử nghiệm này là để phát hiện sự giảm tín hiệu khi kháng thể trong dịch nổi bên trên phong bế gắn kết của protein dung hợp phối tử với OX40. Một ví dụ tiếp theo về thử nghiệm phong bế là thử nghiệm trong đó sự phong bế sự đồng kích thích của các tế bào T của người chuyên cần thông qua trung gian là protein dung hợp phối tử OX40 đã phủ lên đĩa được xác định bằng cách xác định sự kết hợp thymidin. Trong số các thử nghiệm để đánh giá hoạt tính chức năng của các kháng thể kháng OX40, ví dụ, việc khử sự hoạt hóa tế bào T của phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp ở người (MLR) như được mô tả trong các Ví dụ 3 và 8 có thể được sử dụng. Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập hoặc được tinh chế theo các cách khác nhau đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp tinh chế tiêu chuẩn gồm kỹ thuật sắc ký, gồm các phương pháp trao đổi ion, tương tác kỵ nước, ái lực, định cỡ hoặc thẩm gel, và đảo pha, tiến hành ở áp suất khí quyển hoặc ở áp suất cao bằng cách sử dụng các hệ như FPLC và HPLC. Các phương pháp tinh chế cũng gồm các kỹ thuật điện di, miễn dịch học, kết tủa, thẩm tách, và điều tiêu sắc ký. Các kỹ thuật siêu lọc và siêu lọc kết hợp với việc cô đặc protein, cũng hữu ích. Để tinh chế các kháng thể OX40, các tế bào chủ được chọn lọc có thể được phát triển trong, ví dụ, các bình nuôi xoay để tinh chế kháng thể đơn dòng. Các dịch nổi bên trên có thể được lọc và được cô đặc trước khi tiến hành sắc ký ái lực cùng với protein A-sepharosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). IgG đã rửa giải có thể được kiểm tra bởi phép sắc ký lỏng hiệu suất cao và điện di trên gel để đảm bảo độ tinh khiết. Do đó, một kháng thể theo sáng chế được ưu tiên là kháng thể đã phân lập và/hoặc tinh chế gắn kết với OX40 của người.

Thể tiếp hợp miễn dịch

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể OX40 có tính đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, được liên kết với chất trị liệu, như độc tố tế bào, thuốc (ví dụ, chất ức chế miễn dịch) hoặc một độc tố phóng xạ. Các thể tiếp hợp như vậy được nhắc đến trong này là "các thể tiếp hợp miễn dịch". Các thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm một hoặc nhiều độc tố tế bào được gọi là "các độc tố miễn dịch". Độc tố tế bào hoặc tác nhân độc tố tế bào gồm tác nhân bất kỳ gây hại cho (ví dụ, như tiêu diệt) các tế bào. Ví dụ gồm taxol,

cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, các glucocorticoid, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, và puromycin và các chất tương tự hoặc các chất đồng đẳng của chúng. Các chất trị liệu cũng gồm, ví dụ, các chất chống chuyển hóa (ví dụ, như methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), các chất alkyl hóa (ví dụ, như mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) và lomustine (CCNU), cyclophosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, và cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), các anthracycline (ví dụ, như daunorubicin (trước đây gọi là daunomycin) và doxorubicin), các kháng sinh (ví dụ, như dactinomycin (trước đây gọi là actinomycin), bleomycin, mithramycin, và anthramycin (AMC)), và các tác nhân chống giảm phân (ví dụ, như vincristine và vinblastine). Các ví dụ khác về các độc tố tế bào trị liệu có thể liên kết được với kháng thể theo sáng chế gồm các duocarmycin, các calicheamicin, các maytansine và các auristatin, và các dẫn xuất của chúng. Một ví dụ về thể tiếp hợp kháng thể calicheamicin là đang có trên thị trường (Mylotarg(R); American Home Products). Các độc tố tế bào có thể được liên kết với các kháng thể theo sáng chế bằng cách áp dụng công nghệ liên kết có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về các dạng liên kết đã được sử dụng để tiếp hợp độc tố tế bào với một kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hydrazon, các thioete, các este, các disulfua và các liên kết chứa peptit. Liên kết có thể được chọn sao cho, ví dụ, dễ bị phân giải bởi độ pH thấp trong khoang phân giải thể hoặc dễ bị phân giải bởi các proteaza, như các proteaza được ưu tiên biểu hiện trong mô khối u như các cathepsin (ví dụ, như các cathepsin B, C, D). Các mô tả khác về các dạng của các độc tố tế bào, các liên kết và các phương pháp để tiếp hợp các chất trị liệu với các kháng thể, cũng có thể tìm thấy trong các ấn phẩm: Saito, G. et al (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 199-215; Trail, P.A. et al (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3: 1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 247-

264. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được liên kết với đồng vị phóng xạ để tạo ra các dược phẩm phóng xạ gây độc tế bào, còn được gọi là các thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ. Ví dụ về các đồng vị phóng xạ có thể tiếp hợp được với các kháng thể để dùng cho việc chẩn đoán hoặc trị liệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn, ở I^{131} , In^{111} , Y^{90} và Lu^{177} . Các phương pháp để điều trị các thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ đã được thiết lập trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về các thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ đang có trên thị trường, gồm Zevalin[®] (EDEC Pharmaceuticals) và Bexxar^(R) (Corixa Pharmaceuticals), và các phương pháp tương tự có thể được sử dụng để điều chế các thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ bằng cách sử dụng các kháng thể theo sáng chế. Các thể tiếp hợp miễn dịch kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để cải biến một đáp ứng sinh học nhất định, và gốc thuốc không chỉ giới hạn ở các chất trị liệu hóa học kinh điển. Ví dụ, gốc thuốc có thể là một protein hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học được mong muốn. Các protein như vậy có thể gồm, ví dụ, độc tố có hoạt tính enzym, hoặc đoạn hoạt tính của nó, như abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, hoặc độc tố diphtheria; protein như yếu tố hoại tử khối u hoặc interferon-[gamma]; hoặc các tác nhân cải biến đáp ứng sinh học như, ví dụ, các lymphokin, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), các yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt đại thực bào ("GM-CSF"), yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt ("G-CSF"), hoặc các yếu tố phát triển khác.

Các kỹ thuật để liên kết các chất trị liệu như vậy với các kháng thể là đã biết, ví dụ, như trong các ấn phẩm: Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al., (eds.), pp. 243- 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al., (eds.), pp. 303-16

(Academic Press 1985), và Thorpe PE & Ross WC (1982) Immunol. Rev. 62: 119-58.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể OX40 có tính đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người, được dùng đồng thời cùng với chất trị liệu, như độc tố tế bào, thuốc (ví dụ, chất ức chế miễn dịch) hoặc một độc tố phóng xạ.

Các dược phẩm

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, ví dụ, như dược phẩm, bao gồm kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó, theo sáng chế, và chất mang dược dụng. Các chế phẩm như vậy có thể chứa một hoặc tổ hợp của (ví dụ, như hai hoặc nhiều loại khác nhau) các kháng thể hoặc các thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa hỗn hợp của các kháng thể (hoặc các thể tiếp hợp miễn dịch) gắn kết với các epitop khác nhau trên kháng nguyên đích hoặc có các hoạt tính bổ trợ. Các dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được áp dụng trong việc trị liệu kết hợp, tức là, kết hợp với các tác nhân khác. Ví dụ, việc trị liệu kết hợp có thể bao gồm kháng thể OX40 có tính đối kháng theo sáng chế được trộn hợp với ít nhất là một tác nhân kháng viêm hoặc ức chế miễn dịch khác.

Được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất mang dược dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, các môi chất phân tán, các lớp bao, các tác nhân kháng khuẩn và kháng nấm, các tác nhân làm chậm hấp thụ và đẳng trương, và tương tự tương thích về mặt sinh lý học. Tốt hơn là, chất mang thích hợp để cung cấp qua các đường trong tĩnh mạch, trong bắp, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, cột sống hoặc biểu bì (ví dụ, như bằng cách tiêm hoặc truyền). Tùy thuộc vào đường dùng thuốc, hoạt chất, tức là, kháng thể hoặc thể tiếp hợp miễn dịch, có thể được bao trong chất liệu để bảo vệ hoạt chất không bị tác động của các axit và các điều kiện tự nhiên khác có thể làm bất hoạt hoạt chất. Các chất mang dược dụng gồm các thể phân tán hoặc dung dịch nước vô trùng và bột vô trùng để điều chế ngay tức thì thể phân tán hoặc dung dịch tiêm vô trùng. Việc sử dụng các môi chất như vậy và các tác nhân cho các hoạt chất được tính là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trừ trường hợp không tương thích với hoạt chất, việc sử dụng tác nhân

hoặc môi chất thông thường trong các dược phẩm theo sáng chế đều được dự liệu. Các hoạt chất bổ trợ cũng có thể được kết hợp vào các chế phẩm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người được liên kết với chất trị liệu và chất mang dược dụng. Thể tiếp hợp miễn dịch và các chất trị liệu có thể được sử dụng như đã mô tả ở trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó theo sáng chế còn bao gồm một hoạt chất dược dụng khác. Tốt hơn là, hoạt chất dược dụng khác là một hoặc nhiều trong số: a) chất đối kháng với OX40 của người, b) chất làm giảm đau và c) chất ức chế miễn dịch, như glucocorticoid như prednison.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa chất chống oxy hoá dược dụng. Ví dụ về các chất chống oxy hoá dược dụng gồm: (1) các chất chống oxy hoá tan trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfat, natri sulfit và tương tự; (2) các chất chống oxy hoá tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxylanisol đã butyl hóa (BHA), hydroxytoluen đã butyl (BHT), lexithin, propyl galat, anpha-tocopherol, và tương tự; và (3) các tác nhân càng hóa kim loại, như axit xitric, etylendiamin tetraaxetic-axit (EDTA), sorbitol, axit tartaric, axit phosphoric, và tương tự. Ví dụ về các chất mang trong nước hoặc không nước thích hợp có thể được dùng trong các dược phẩm theo sáng chế gồm nước, etanol, các rượu polyhydric (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và tương tự), và các hỗn hợp thích hợp của chúng, các dầu thực vật, như dầu ôliu, và các este hữu cơ có thể tiêm truyền được, như etyl oleat. Trạng thái lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng các chất liệu bao, như lexithin, bằng cách duy trì cỡ hạt cần thiết trong trường hợp thể phân tán, và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Các chế phẩm này cũng có thể chứa các tá dược như các chất bảo quản, các tác nhân thẩm ướt, các tác nhân nhũ hóa và các tác nhân phân tán. Việc ngăn ngừa sự có mặt của các vi sinh vật có thể được đảm bảo bởi cả quy trình làm tiệt trùng lẫn bằng cách đưa vào các tác nhân kháng nấm và kháng khuẩn khác nhau, ví dụ, paraben, clorobutanol, axit phenol sorbic, và tương tự. Cũng có thể được mong muốn nếu đưa các tác nhân đắng tương, như các đường, natri clorua, và tương tự vào các chế phẩm. Ngoài ra, sự hấp thu kéo

dài của dạng dược phẩm tiêm truyền có thể được tạo ra bằng cách đưa vào các tác nhân làm chậm quá trình hấp thu như nhôm monostearat và gelatin.

Các ứng dụng trị liệu và các ứng dụng khác

Các kháng thể đối kháng theo sáng chế có nhiều ứng dụng chẩn đoán và trị liệu in vitro và in vivo bao gồm việc chẩn đoán và điều trị các rối loạn thông qua trung gian OX40. Ví dụ, các phân tử này có thể được áp dụng cho các tế bào trong môi trường nuôi cấy, in vitro hoặc ex vivo, hoặc cho đối tượng là người, ví dụ, in vivo, để điều trị, ngăn ngừa và để chẩn đoán các rối loạn thông qua trung gian OX40 khác nhau. Các đối tượng được ưu tiên là người và bao gồm bệnh nhân có các rối loạn thông qua trung gian hoạt tính OX40 (các rối loạn thông qua trung gian OX40). Các kháng thể đối kháng theo sáng chế có thể có hiệu quả cho việc điều trị bệnh nhân không phụ thuộc trạng thái đồng kích thích OX40 của chúng. Các đối tượng được ưu tiên hơn gồm người và bao gồm bệnh nhân biểu hiện mức độ thấp của OX40.

Thuật ngữ "bệnh nhân" được sử dụng ở đây cho các mục đích của sáng chế bao gồm cả người lẫn các động vật khác, tốt hơn là động vật có vú và tốt nhất là người. Do vậy, các kháng thể theo sáng chế có cả ứng dụng điều trị ở người lẫn các ứng dụng thú y. Thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị" trong sáng chế này là để chỉ bao gồm việc điều trị trị liệu, cũng như các biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn chặn cho bệnh hoặc rối loạn. Theo đó, ví dụ, việc áp dụng thành công kháng thể trước khi khởi phát bệnh là kết quả của việc điều trị bệnh. Một ví dụ khác đó là việc áp dụng thành công kháng thể sau khi khởi phát lâm sàng của bệnh để ngăn chặn các triệu chứng của bệnh bao gồm việc điều trị bệnh. Các thuật ngữ "điều trị" và "việc điều trị" cũng bao hàm việc áp dụng kháng thể sau khi phát bệnh để trừ diệt bệnh. Việc áp dụng thành công kháng thể sau khi khởi phát và sau các triệu chứng lâm sàng đã được nghiên cứu phát triển, cùng với việc làm thuyên giảm tới mức có thể các triệu chứng lâm sàng và có thể cải thiện bệnh, bao gồm việc điều trị bệnh. Thuật ngữ "cần điều trị" bao gồm động vật có vú đã có bệnh hoặc rối loạn, cũng như người có bệnh hoặc rối loạn, mà trong đó bệnh hoặc rối loạn cần được ngăn chặn.

Theo một phương án cụ thể, các kháng thể đối kháng được sử dụng để điều trị in vivo, ngăn ngừa hoặc chẩn đoán nhiều rối loạn thông qua trung gian OX40. Do vậy, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40 ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó. Các rối loạn thông qua trung gian OX40 được lấy làm ví dụ bao gồm các nhiễm trùng (virut, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng), sốc nội độc tố liên quan đến nhiễm trùng, bệnh khớp, viêm khớp dạng thấp, bệnh hen, bệnh phổi nghẽn mãn tính (COPD), bệnh viêm vùng chậu, bệnh Alzheimer, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Peyronie, bệnh tiêu chảy mãn, bệnh túi mật, bệnh Pilonidal, bệnh sung màng bụng, bệnh vảy nến, viêm mạch, dính phẫu thuật, đột quy, đái tháo đường typ 1, bệnh Lyme, bệnh khớp, viêm màng não, viêm màng bồ đào tự miễn, các rối loạn viêm thông qua trung gian miễn dịch của hệ thần kinh trung ương và ngoại vi như bệnh đa xơ cứng, bệnh Luput (như Luput đỏ hệ thống) và hội chứng Guillain-Barré, viêm da dị ứng, viêm gan tự miễn, viêm phế nang xơ hóa, bệnh Grave, bệnh thận IgA, tự phát ban xuất huyết giảm tiểu cầu, bệnh Meniere, bệnh bong nước, xơ gan mật tiên, bệnh Scleroderma, bệnh cứng bì, u hạt Wegener, viêm tụy, chấn thương (phẫu thuật), bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), sự thải ghép, bệnh tim mạch bao gồm các bệnh thiếu máu cục bộ như nhồi máu cơ tim cũng như bệnh xơ vữa động mạch, đông máu nội mạch, tiêu xương, loãng xương, viêm xương khớp, viêm nha chu, giảm toan dịch vị và viêm tủy thị thần kinh.

Các rối loạn thông qua trung gian OX40 được lấy làm ví dụ khác bao gồm các nhiễm trùng (virut, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng), sốc nội độc tố liên quan đến nhiễm trùng, bệnh khớp, viêm khớp dạng thấp, bệnh hen, bệnh viêm phế quản, bệnh cúm, virut hợp bào hô hấp, viêm phổi, bệnh phổi nghẽn mãn tính (COPD), xơ hóa phổi tự phát (IPF), viêm phế nang xơ hóa căn nguyên ẩn (CFA), viêm phổi kẽ dạng sợi tự phát, tràn khí, bệnh viêm vùng chậu, bệnh Alzheimer, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Peyronie, bệnh tiêu chảy mãn, bệnh túi mật, bệnh Pilonidal, bệnh sung màng bụng, bệnh vảy nến, viêm mạch, dính phẫu thuật, đột quy, đái tháo đường typ 1, bệnh Lyme, bệnh khớp, viêm màng não, viêm màng bồ đào tự miễn, các rối loạn viêm thông qua trung gian miễn dịch của hệ thần kinh trung ương và ngoại vi như bệnh đa xơ cứng, bệnh Luput (như Luput đỏ

hệ thống) và hội chứng Guillain-Barr, viêm da dị ứng, viêm gan tự miễn, viêm phế nang xơ hóa, bệnh Grave, bệnh thận IgA, tự phát ban xuất huyết giảm tiểu cầu, bệnh Meniere, bệnh bong nước, xơ gan mật tiên, bệnh saccit, bệnh cứng bì, u hạt Wegener, viêm tụy, chấn thương (phẫu thuật), bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), sự thải ghép, bệnh tim mạch bao gồm các bệnh thiếu máu cục bộ như nhồi máu cơ tim cũng như bệnh xơ vữa động mạch, đông máu nội mạch, tiêu xương, loãng xương, viêm xương khớp, viêm nha chu, giảm toan dịch vị và viêm tủy thị thần kinh.

Các rối loạn thông qua trung gian OX40 được ưu tiên để xử lý bằng kháng thể theo sáng chế được chọn từ nhóm gồm bệnh đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, sung ruột già, bệnh vảy nến, bệnh hen, COPD, IPF, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), bệnh xơ vữa động mạch và bệnh đái đường. Các rối loạn thông qua trung gian OX40 được ưu tiên đặc biệt để xử lý bằng kháng thể theo sáng chế là bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể để dùng để điều trị chứng đau, đặc biệt chứng đau liên quan đến sự viêm.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện các mức OX40, hoặc các mức tế bào chứa OX40 trên bề mặt màng của chúng, các mức này sau đó có thể có liên quan tới các triệu chứng bệnh nhất định. Theo một cách khác, các kháng thể có thể được sử dụng để ức chế hoặc phong bế chức năng OX40, bản thân chức năng này có thể có liên quan tới việc ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm các triệu chứng bệnh nhất định, trong đó OX40 như một tác nhân trung gian của bệnh. Điều này có thể đạt được bằng cách cho mẫu và mẫu đối chứng tiếp xúc với kháng thể kháng OX40 dưới các điều kiện mà chúng cho phép tạo ra một các phức hợp giữa kháng thể và OX40. Các phức hợp bất kỳ được tạo ra giữa kháng thể và OX40 được phát hiện và được so sánh trong mẫu và mẫu đối chứng. Trên cơ sở việc gắn kết đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế đối với OX40, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện một cách đặc biệt OX40 biểu hiện trên bề mặt của các tế bào và, ngoài ra, có thể được sử dụng để tinh chế OX40 thông qua quá trình tinh chế ái lực miễn dịch.

Do vậy sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc in vitro để phát hiện người bệnh có mức biểu hiện thấp của OX40, bao gồm các bước:

- (a) tinh chế các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ mẫu máu người bệnh;
- (b) tiến hành phân tích đo đặc tế bào theo dòng chảy cho các PBMC; và
- (c) xác định số lượng số lượng tế bào dương tính OX40 trong các tế bào CD4⁺ và/hoặc CD8⁺ T và so sánh các mức này với đối chứng.

Theo một phương án được ưu tiên, mức biểu hiện thấp của OX40 được biểu thị bởi sự gia tăng về mức biểu hiện về số lượng tế bào dương tính OX40 khi so sánh với các mức đối chứng là lên tới 10%, tốt hơn nữa là lên tới 20% và thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 30%. Phương pháp xác định sự biểu hiện OX40 được mô tả chi tiết hơn trong các ấn phẩm: Kotani A et al., (2001) Blood, 98: 3162-4 và Xiaoyan Z et al., (2005) Clin. Exp. Immunol. 143: 110-6.

Theo một phương án khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được thử nghiệm từ đầu về hoạt tính gắn kết liên quan tới việc áp dụng trị liệu hoặc chẩn đoán in vitro. Ví dụ, các chế phẩm theo sáng chế có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm đo đặc tế bào theo dòng chảy được mô tả trong phần ví dụ ở dưới.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó làm thuốc và sử dụng kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó để bào chế thuốc để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40. Theo một phương án tiếp theo sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó để dùng làm thuốc. Cũng được đề xuất bởi sáng chế là kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó để sử dụng trong phương pháp điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40. Các rối loạn thông qua trung gian OX40 là các rối loạn như đã mô tả ở trên. Kháng thể đối kháng theo sáng chế có thể đặc biệt hữu ích cho việc điều trị các rối loạn thông qua trung gian OX40 không phụ thuộc vào tình trạng đồng kích thích OX40 của người bệnh. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó có thể được sử dụng để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40 trong đó người bệnh biểu hiện mức độ thấp của OX40.

Như đã mô tả ở trên, các kháng thể OX40 có tính đối kháng theo sáng chế có thể cùng được áp dụng với một hoặc nhiều chất trị liệu, ví dụ như, tác nhân gây

độc tế bào, tác nhân gây độc phóng xạ hoặc tác nhân chống miễn dịch. Kháng thể có thể được liên kết với tác nhân này (dưới dạng một phức hợp miễn dịch) hoặc có thể được áp dụng một cách tách biệt với tác nhân. Trong trường hợp sau (áp dụng tách biệt), kháng thể có thể được áp dụng trước, sau hoặc đồng thời cùng với tác nhân hoặc có thể cùng được áp dụng với các trị liệu đã biết khác, ví dụ như, điều trị chống ung thư, ví dụ như, phóng xạ.

Để áp dụng kháng thể, liều lượng là nằm trong khoảng từ 0,0001 tới 100 mg/kg, và phổ biến hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 tới 10mg/kg, thể trọng của vật chủ. Phác đồ điều trị được lấy làm ví dụ là áp dụng mỗi lần một tuần, mỗi lần trong hai tuần, mỗi lần trong ba tuần, mỗi lần trong bốn tuần, mỗi lần trong một tháng, mỗi lần trong 3 tháng hoặc mỗi lần trong từ 3 tới sáu tháng. Kháng thể được áp dụng thông thường vào nhiều dịp. Khoảng thời gian cách nhau giữa các liều dùng đơn có thể là, ví dụ, hàng tuần, hàng tháng, mỗi từ ba tới sáu tháng hoặc hàng năm. Các khoảng thời gian cách nhau cũng có thể là không đều khi được chỉ báo bằng cách đo các lượng kháng thể trong máu tới kháng nguyên đích ở bệnh nhân. Trong một số phương pháp, liều lượng được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể trong huyết tương nằm trong khoảng 1-1000 μ g/ml và trong một số phương pháp là nằm trong khoảng 25-300 μ g/ml. Theo một cách khác, kháng thể có thể được áp dụng dưới dạng chế phẩm giải phóng kéo dài, trong trường hợp này việc áp dụng tần suất ít hơn được áp dụng. Liều lượng và tần suất thay đổi tùy thuộc vào chu kỳ bán rã của kháng thể trong bệnh nhân. Liều lượng và tần suất áp dụng có thể thay đổi tùy thuộc và việc điều trị là trị liệu hay phòng ngừa. Trong các ứng dụng phòng ngừa, liều lượng tương đối thấp được áp dụng với khoảng thời gian cách nhau tương đối không thường xuyên trong một khoảng thời gian dài. Một số bệnh nhân liên tục tiếp nhận việc điều trị trong khoảng đời của lại của họ. Trong một số ứng dụng trị liệu, liều lượng tương đối cao với khoảng thời gian cách nhau tương đối ngắn đôi khi là cần thiết cho đến khi sự tiến triển bệnh thuyên giảm hoặc chấm dứt.

Các mức liều lượng thực tế của các hoạt chất, cụ thể là, kháng thể trong các được phẩm theo sáng chế có thể thay đổi để sao cho tạo ra một lượng hoạt chất đủ hiệu quả để đạt được đáp ứng trị liệu mong muốn cho bệnh nhân, hỗn hợp, và phác đồ dùng thuốc cụ thể, mà không gây độc cho bệnh nhân. Mức liều lượng được

chọn sẽ tùy thuộc vào các yếu tố được động khác nhau bao gồm hoạt tính của các chế phẩm cụ thể theo sáng chế được áp dụng, đường dùng thuốc, thời gian áp dụng, mức bài tiết của kháng thể cụ thể được áp dụng, khoảng thời gian điều trị, các thuốc khác, các hợp chất và/hoặc các chất liệu được sử dụng kết hợp với các chế phẩm cụ thể được áp dụng, độ tuổi, giới tính, thể trọng, tình trạng bệnh, sức khỏe nói chung và tiền sử y học của bệnh nhân được điều trị, và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

"Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu" của kháng thể OX40 theo sáng chế tốt hơn là dẫn đến làm giảm mức độ trầm trọng của các triệu chứng bệnh, kéo dài tần suất và khoảng thời gian không xuất hiện triệu chứng bệnh, và/hoặc ngăn ngừa sự suy nhược hoặc sự ốm yếu do bệnh. Khả năng của một hợp chất để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40 có thể được đánh giá trong hệ mô hình động vật chỉ báo hiệu quả ở người. Theo một cách khác, đặc tính này của một chế phẩm có thể được đánh giá bằng cách kiểm tra khả năng của một hợp chất trong việc ức chế sự phát triển tế bào, sự ức chế có thể được xác định trong thử nghiệm in vitro đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể xác định được các lượng như vậy trên cơ sở các yếu tố như thể trạng của đối tượng, mức độ trầm trọng bệnh của đối tượng, và chế phẩm hoặc đường dùng thuốc cụ thể được chọn.

Kháng thể hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được áp dụng qua một hoặc nhiều đường dùng thuốc bằng cách áp dụng một hoặc nhiều trong số các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như đã được khẳng định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, đường dùng và/hoặc phác đồ sẽ thay đổi tùy thuộc vào các kết quả được mong muốn. Các đường dùng thuốc được ưu tiên bao gồm các đường dùng thuốc trong tĩnh mạch, tiêm bắp, trong da, trong màng bụng, dưới da, cột sống hoặc các đường ngoài đường tiêu hóa khác, ví dụ bằng cách tiêm hoặc tiêm truyền. Các đường dùng thuốc được ưu tiên là trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Thuật ngữ "dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các chế độ áp dụng khác với việc áp dụng theo đường tiêu hóa và áp dụng khu trú, thường là bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiêm và tiêm truyền trong tĩnh mạch, bắp, trong động mạch, nội tủy mạch, trong bao, trong hốc mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng, qua khí

quản, tiêm dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, ngoài màng và trong xương ức. Theo một cách khác, kháng thể theo sáng chế có thể được áp dụng qua đường dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa, như các đường dùng thuốc khu trú, biểu bì hoặc qua đường niêm mạc, ví dụ, trong mũi, qua đường miệng, âm đạo, trực tràng, dưới lưỡi hoặc khu trú.

Sản phẩm và bộ kit

Theo một phương án khác của sáng chế, sản phẩm bao gồm kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó, hỗn hợp hoặc thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế dùng để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40 được đề xuất. Sản phẩm có thể gồm đồ chứa và nhãn hoặc tờ rơi bên trong hoặc đi kèm đồ chứa. Các đồ chứa thích hợp gồm, ví dụ, các chai, các lọ hoặc xyranh. Các đồ chứa có thể được tạo ra từ nhiều nguyên liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Đồ chứa mang chế phẩm có thể hữu hiệu cho việc điều trị tình trạng bệnh và có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ, như đồ chứa có thể là túi đựng dung dịch dùng trong tĩnh mạch dung dịch hoặc lọ có nút mà kim tiêm dưới da có thể đâm qua). Ít nhất là một hoạt chất trong chế phẩm có thể là kháng thể được làm tương thích với người được nêu trong phần mô tả. Nhãn hoặc tờ rơi có thể chỉ ra rằng chế phẩm này có thể sử dụng để điều trị tình trạng bệnh được chọn, như ung thư. Theo một phương án, nhãn hoặc tờ rơi có thể chỉ ra rằng chế phẩm chứa kháng thể được làm tương thích với người có thể sử dụng được để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40.

Ngoài ra, sản phẩm có thể chứa (a) đồ chứa thứ nhất có chứa chế phẩm trong nó, trong đó chế phẩm này chứa kháng thể được làm tương thích với người trong nó, và (b) đồ chứa thứ hai có chứa chế phẩm trong nó, trong đó chế phẩm này chứa tác nhân trị liệu khác với kháng thể được làm tương thích với người. Sản phẩm theo phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm tờ rơi chỉ ra rằng chế phẩm thứ nhất và chế phẩm thứ hai có thể được sử dụng kết hợp để điều trị bệnh hoặc rối loạn thông qua trung gian OX40. Tác nhân trị liệu như vậy có thể là chất trị liệu bổ trợ bất kỳ được mô tả ở phần trước (ví dụ, thuốc làm tan huyết khối, chất huỷ tiểu cầu, chất hoá trị liệu, chất chống tạo mạch, hợp chất kháng-hormon, thuốc bảo vệ tim, và/hoặc chất điều hoà chức năng miễn dịch ở động vật có vú,

bao gồm xytokin). Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, sản phẩm có thể còn bao gồm đồ chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa dung dịch đệm được dụng, như nước kim khuẩn để tiêm (bacteriostatic water for injection - BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Sản phẩm còn có thể bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn trên quan điểm thương mại và quan điểm của người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, các chất pha loãng, các màng lọc, kim, và xyranh.

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các bộ kit chứa kháng thể, chế phẩm hoặc thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế và các chỉ dẫn sử dụng. Bộ kit này có thể còn chứa một hoặc nhiều chất phản ứng bổ sung, như thuốc thử chống miễn dịch, tác nhân gây độc tế bào hoặc tác nhân gây độc phóng xạ, hoặc một hoặc nhiều kháng thể đối kháng bổ sung theo sáng chế (ví dụ, kháng thể đối kháng có hoạt tính hỗ trợ gắn kết với epitop trong kháng nguyên OX40 khác với kháng thể chất đối kháng thứ nhất).

Không mô tả kỹ hơn, tin rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể, bằng cách sử dụng phân mô tả trên đây và phân ví dụ minh họa sau đây, tạo ra và sử dụng các chất theo sáng chế và thực hiện các phương pháp được yêu cầu bảo hộ. Các ví dụ thực hiện sau được đưa ra để tạo điều kiện thuận lợi cho việc thực hiện sáng chế, và không được hiểu là nhằm giới hạn phần còn lại của bản mô tả theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tạo và sàng lọc các kháng thể OX40 kháng người của chuột

Để tạo ra protein OX40-Fc của người tái tổ hợp, cADN cho TNFRSF4 của người có bán từ hãng imaGenes (dòng vô tính số: RZPDB737H0329D; Berlin, Germany). cADN này được sử dụng làm khuôn mẫu để khuếch đại bằng PCR vùng mã hóa ADN của vùng ngoại bào TNFRSF4 của người (SEQ ID NO: 11). Trong một phản ứng PCR tách biệt, vùng Fc của IgG1 của người (các vị trí EU 223-451) được khuếch đại bởi việc bổ sung PCR một tác nhân liên kết 5' GSGGG và một tác nhân liên kết 3' SA-6xHis và các điểm giới hạn để tách dòng. sau đó, hai sản phẩm thu được được dung hợp bằng cách sử dụng PCR mở rộng chồng lấp

cùng với các đoạn môi bọc sườn, bổ sung các điểm giới hạn cho việc tách dòng tiếp sau thành một vật truyền biểu hiện động vật có vú đã cải biến trên cơ sở pcADN3.1(-) plasmit từ Invitrogen (Invitrogen AG, Basel, Switzerland, Cat. No. V795-20), chứa promoter CMV của người có đoạn acceptor thể cho Ig (intron đầu tiên) đã mô tả trong US Patent 5924939, trình tự OriP (Koons MD et al., (2001) J Virol. 75(22): 10582-92), đoạn tăng cường SV40, và SV40 polyA đã dung hợp với nhân tố kết thúc gastrin như được mô tả bởi Kim D, et al., (2003) Biotechnol. Prog. 19(5): 1620-2. Plasmit tái tổ hợp này cho phép biểu hiện protein dung hợp vùng ngoại bào TNFRSF4- Fc của người trong các tế bào động vật có vú cùng với sự tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào được được phát động bởi peptit tín hiệu tự nhiên của protein TNFRSF4 của người. Để sản xuất protein tái tổ hợp, vật truyền tái tổ hợp nêu trên được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK 293 đã làm thích ứng dạng hỗn dịch (số ATCC: CRL 1573) bằng cách sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, France; nhà phân phối: Brunschwig, Basel, Switzerland). Dịch nuôi cấy tế bào nổi bên trên được thu gom sau năm ngày và được tinh chế bằng cách sử dụng cột tinh chế ái lực protein A (HiTrap Protein A sepharose column; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) vận hành trong hệ thống fKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland).

Để tạo ra protein OX40-his của người tái tổ hợp, vùng ngoại bào của TNFRSF4 của người (SEQ ID NO: 11) được khuếch đại bởi việc bổ sung PCR một tác nhân liên kết GSG-6xHis và các điểm giới hạn để tách dòng. Sau đó, sản phẩm PCR được tách dòng trong pcADN3.1(-) plasmit đã mô tả ở trên. Plasmit tái tổ hợp này cho phép biểu hiện OX40-his của người protein trong các tế bào động vật có vú cùng với sự tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào được phát động bởi peptit tín hiệu tự nhiên của TNFRSF4 của người. Để sản xuất protein, vật truyền tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK 293 đã thích ứng ở dạng hỗn dịch (số ATCC: CRL 1573) bằng cách sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, France; nhà phân phối: Brunschwig, Basel, Switzerland). Dịch nuôi cấy tế bào nổi bên trên được thu gom năm ngày sau khi chuyển nhiễm và tinh chế bằng cách sử dụng cột tinh chế ái lực Ni²⁺-NTA (HiTrap Ni²⁺-NTA sepharose column; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg,

Switzerland) vận hành trên hệ thống *f*KTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland). OX40-Fc của người tái tổ hợp và các protein OX40-his được chỉ ra là có độ tinh khiết 95% như được cho thấy bằng phép phân tích SDS-PAGE, và được trao đổi chất đệm tiếp vào muối đệm phosphat (PBS) trước khi sử dụng.

Protein OX40-Fc của người tái tổ hợp đã hoà tan trong PBS được trộn với một thể tích tương đương của chất điều chỉnh Stimune (Prionics, Switzerland, ref: 7925000) và nhũ tương được điều chế. Nhũ tương này được chuyển vào các xiranh insulin 0,5 mL (BD Pharmingen, Allschwil, Switzerland) và các động vật BALB/c (Harlan, Netelvàs) được chủng miễn dịch dưới da ở mặt dưới gan bàn chân, thana đuôi và cổ bằng 50µg protein đã nhũ hóa. Việc chủng miễn dịch được lặp lại hai tuần sau đó với cùng lượng kháng nguyên và cùng đường tiêm truyền.

Sự có mặt của các kháng thể kháng OX40 của người tuần hoàn trong huyết thanh chuột đã được gây miễn dịch được đánh giá bằng ELISA trực tiếp bằng cách sử dụng các đĩa được phủ bằng protein OX40-his của người tái tổ hợp. Dây pha loãng (từ $1:10^0$ tới $1:10^9$) của các huyết thanh chuột khác nhau được bổ sung vào đĩa và các kháng thể đã gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng phân tử-HRP đầy đủ kháng chuột H+L của dê (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland). Một nhắc lại dưới da cuối cùng bằng 50µg kháng nguyên mà không có chất điều chỉnh được thực hiện ở các động vật biểu hiện độ chuẩn huyết thanh IgG kháng OX40 của người tốt ba ngày trước khi giết chết.

Các động vật bị giết chết và các hạch ở bẹn, nách, cánh tay, những chân và các hạch bạch huyết được thu thập để điều chế huyền phù tế bào đơn lẻ bởi việc xáo trộn hạch bạch huyết bằng hai lá kim 25G trong dung dịch DNase (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Switzerland) và collagenaza (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Switzerland). Các huyền phù tế bào đơn lẻ được dung hợp với dòng tế bào u tủy X63AG8,653 (dòng tế bào u tủy BALB/c của chuột; số truy cập ATCC: CRL 1580; Kearney JF et al., (1979) J. Immunol. 123(4): 1548-1550) với tỷ lệ 7:1 (giữa đối tác dung hợp và các tế bào hạch bạch huyết đã thu hoạch) cùng với polyetylen glycol 1500 (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Switzerland). Các tế bào đã dung hợp được dàn vào các đĩa đáy phẳng 96 lỗ chứa các đại thực bào của chuột trong môi trường DMEM-10

(Invitrogen AG, Basel, Switzerland) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS, PAA Laboratories, Pasching, Austria), 2mM L-glutamin, 100U/ml (Biochrom AG, Germany) Penixilin, 100µg/ml streptomycin (Biochrom AG, Germany), 10mM HEPES (Invitrogen AG, Basel, Switzerland), 50µM β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), HAT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) và 1% yếu tố phát triển (Hybridokine, Interchim/Uptima, Montluçon, France).

Khoảng chừng 800 lỗ từ các dung hợp được sàng lọc bằng ELISA để trình bày IgG của chuột nhận diện cho OX40 của người và phong bế gắn kết của OX40L của người trong thụ thể của nó. Các lỗ dương tính được mong đợi và được tiến hành hai vòng tách dòng. Các tế bào được thu gom và các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tách dòng và lập trình tự.

Ví dụ 2

Tác động và lập trình tự các chuỗi VH và VL của các kháng thể kháng OX40 từ các tế bào lai

Đối với mỗi tế bào lai được chọn dương tính, ARN tổng được điều chế, được phiên mã ngược thành cADN và các gen VH và VL lần lượt được khuếch đại bằng PCR. Các sản phẩm PCR này được thất thành một vật truyền cứu (vật truyền pDrive; QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland; Cat. No. 231124), cho phép lập trình tự ADN cho các sản phẩm PCR riêng rẽ và xác định khả năng tách đơn dòng hoặc đa dòng của các tế bào lai được chọn. Vật truyền này cho phép việc chọn lọc xanh da trời/trắng trong các đĩa LB-aga chứa IPTG và X-gal (các khuẩn lạc không có cài xen có màu xanh da trời do sự thoái biến của X-gal bởi α-peptid LacZ). Các plasmit tái tổ hợp từ các dòng vi khuẩn dương tính (trắng) được điều chế và lập trình tự bằng cách sử dụng các đoạn môi tạo chuỗi ADN tiêu chuẩn đặc tả cho mạch chính của vật truyền (M13rev, M13fwd, T7 hoặc SP6). Các trình tự ADN sau cùng được tách dòng phụ thành một vật truyền biểu hiện để biểu hiện tái tổ hợp của kháng thể được nghiên cứu trong các tế bào động vật có vú.

Phân lập ARN

ARN tổng được phân lập từ $2-10 \times 10^6$ tế bào bằng cách sử dụng RNeasy Mini Kit của hãng QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland; Cat. No. 74106) theo quy trình được đưa ra của nhà sản xuất; các mẫu được định lượng bằng cách sử dụng quang phổ kế NanoDrop ND-1000 (WITEC AG, Littau, Switzerland).

RT-PCR một bước

Các chế phẩm ARN tổng nêu trên được phiên mã ngược tiếp thành cADN, và các đoạn VH và VL được khuếch đại bằng PCR nhờ sử dụng hai hỗn hợp khác nhau của các đoạn môi đã thoái biến, mỗi hỗn hợp cho phép thu hồi toàn bộ các phân họ khác nhau của các vùng thay đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch của chuột và các vùng nối chuỗi nặng thay đổi hoặc thu hồi tất cả các vùng thay đổi kappa chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của chuột và các vùng nối kappa chuỗi nhẹ thay đổi. Các đoạn môi được sử dụng để phiên mã ngược và khuếch đại được tổng hợp bằng Microsynth (Balgach, Switzerland), và được phân tích HPLC (các Bảng 1-4). Cả quá trình phiên mã ngược lẫn quá trình khuếch đại PCR được thực hiện một cách đồng thời nhờ sử dụng QIAGEN one step RT-PCR Kit (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland; Cat. No. 210212). Do kỹ thuật được sử dụng đặc tả cho các đoạn môi, nên mỗi mẫu mARN được xử lý sau đó hai lần để cho phép phiên mã ngược và khuếch đại riêng biệt các đoạn VH hoặc các đoạn VL. $2 \mu\text{g}$ ARN tổng được hoà tan vào nước không ARNza tới thể tích cuối là $30 \mu\text{l}$ được trộn với: $10 \mu\text{l}$ dung dịch nguyên liệu 5x của chất đệm QIAGEN OneStep RT-PCR, $2 \mu\text{l}$ hỗn hợp các dNTP ở nồng độ 10mM , $3 \mu\text{l}$ hỗn hợp đoạn môi ở nồng độ $10 \mu\text{M}$ và $2 \mu\text{l}$ hỗn hợp enzym QIAGEN OneStep RT-PCR. Sau đó, hỗn hợp cuối được đưa vào trong ống PCR, và được quay vòng trong PCR-thermocycler (Biorad iCycler version 4.006, Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Switzerland) sử dụng các thiết lập sau:

30 phút ở 50°C

15 phút ở 95°C

40 chu kỳ: 30 giây ở 94°C

30 giây ở 55°C

1 phút ở 72°C

10 phút ở 72 °C

Giữ ở 4°C

Tách dòng pDrive

Các sản phẩm PCR được chạy trên các gel 2% agarose. Sau quá trình điện di chuyển ADN, các đoạn nghiên cứu (khoảng 450bp) được cắt từ các gel agarose, và được chiết bằng cách sử dụng Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II kit 250 (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland; Cat. No. 740609,250). Để lập trình tự ADN, các sản phẩm PCR đã được chiết được tách dòng vào vật truyền cứu đã mô tả ở trên (vật truyền pDrive, QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland; Cat. No. 231124) và được biến đổi thành chủng E. coli TOP10 (Invitrogen AG, Basel, Switzerland; Cat. No. C404006)

Chiết Miniprep

Các khuẩn lạc dương tính được nuôi cấy qua đêm ở 37°C (lắc 250 vòng/phút) trong 1,5ml môi trường Luria Bertani (LB) có bổ sung 100µg/ml ampicillin đã được gieo trong đĩa Macherey-Nagel Square-well Block (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland; Cat. No. 740488,24). Việc chiết ADN miniprep ngày tiếp theo được thực hiện nhờ sử dụng NucleoSpin Multi-8 Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland; Cat. No. 740620,5).

Lập trình tự và phân tích trình tự

Các mẫu được gửi để lập trình tự ADN cho công ty dịch vụ lập trình tự ADN Fasteris (Plan-les-Ouates, Switzerland). Các đoạn mồi tiêu chuẩn: M13rev, M13fwd, T7, SP6 được sử dụng (Bảng 5). Để phân tích các trình tự ADN, Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific & Educational Software, NC, USA) và BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, TA(1999) Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98) được sử dụng.

Tách dòng vật truyền biểu hiện để biểu hiện kháng thể khả năng tái tổ hợp

Để biểu hiện tái tổ hợp trong các tế bào động vật có vú, các đoạn VH và VL của chuột đã phân lập được format dưới dạng các globulin miễn dịch thể khả năng bằng cách áp dụng các phương pháp PCR trên cơ sở lắp ráp. các kháng thể khả năng này gồm chuỗi nặng trong đó chuỗi nặng vùng thay đổi của chuột được dung hợp với vùng cố định chuỗi nặng IgG1 của người (các vùng $\gamma 1$, bản lề, $\gamma 2$, và $\gamma 3$) và chuỗi nhẹ trong đó vùng thay đổi chuỗi nhẹ của chuột được dung hợp với vùng cố định kappa của người (Ck). Các phần cố định của người và thay đổi của chuột đã lắp ráp PCR sau đó được tách dòng thành vật truyền biểu hiện động vật có vú đã cải biến dựa trên cơ sở vật truyền pcADN3.1(-) đã cải biến từ Invitrogen được nêu trong Ví dụ 1 chỉ khác là peptit dẫn đầu kappa chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của người được sử dụng để phát động sự tiết protein. Để sản xuất protein của các đối tượng nghiên cứu globulin miễn dịch, các lượng như nhau của ADN vật truyền chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đồng chuyển nhiễm vào HEK-293 đã làm thích ứng dạng huyền phù (số ATCC: CRL-1573). Dịch nuôi cấy tế bào nổi bên trên được thu gom sau năm ngày và tinh chế bằng cách sử dụng cột tinh chế ái lực Protein A (HiTrap Protein A sepharose column) vận hành trên hệ thống fKTA FPLC (cả hai đều của hãng GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland).

Bảng 1: hỗn hợp đoạn mỗi VH - ngược

```

GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC

```

GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC

Bảng 2: hỗn hợp đoạn môi VH - xuôi

CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT

Bảng 3: hỗn hợp đoạn môi VL - ngược

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC
 GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC

GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC

Bảng 4: hỗn hợp đoạn môi VL - xuôi

ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG

Bảng 5: lập trình tự các đoạn môi

M13-Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-Rev	AACAGCTATGACCATG
T7	TAATACGACTCACTATAGG
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG

Ví dụ 3

Đặc tả sinh học các kháng thể kháng OX40 của người

ELISA phát hiện kháng thể OX40-đặc hiệu

Các độ chuẩn kháng thể, tính đặc hiệu và sự sản xuất bởi các tế bào lai và các đối tượng nghiên cứu kháng thể được xác định bằng ELISA trực tiếp. Nói một cách ngắn gọn, các đĩa vi chuẩn 96 lỗ (Cosstar USA, distributor VWR AG, Nyon, Switzerland) được phủ bằng 100 μ l OX40-his của người tái tổ hợp với 2 μ g/ml trong PBS (xem Ví dụ 1 để tạo ra protein OX40-his). Các đĩa được ủ qua đêm ở 4°C và sau đó được phong bế bằng PBS 2% BSA (Bovine Serum Albumine, PAA Laboratories, Pasching, Austria) ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong một giờ. Dung dịch phong bế này được loại bỏ và dịch nổi bên trên của các tế bào lai hoặc các kháng thể đã tinh chế được bổ sung vào. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó được rửa chín lần bằng PBS 0,01% Tween-20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) và kháng thể phát hiện H+Lkháng chuột của dê đã được đánh dấu bằng Horseradish Peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) được bổ sung với mức pha loãng

1:1000. Để phát hiện các kháng thể khảm tái tổ hợp (xem Ví dụ 2) có Fc của người, kháng thể IgG kháng người của thỏ đã gắn nhãn HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) với mức pha loãng 1:1000 được sử dụng làm kháng thể dò. Các đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT), được rửa chín lần bằng PBS 0,01% Tween-20 và cơ chất TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Switzerland) được bổ sung vào đĩa này và phản ứng được dừng sau sáu phút bằng cách bổ sung H_2SO_4 . Mức độ hấp thụ sau đó được đọc ở 450nm bằng máy đọc vi đĩa (Biotek, USA; nhà phân phối: WITTEC AG, Littau, Switzerland). Fig.1A thể hiện kháng thể 1D4 thể khảm và kháng thể 2F8 thể khảm nhận diện protein đã được phủ OX40-his.

ELISA phong bế OX40L

Protein phối tử OX40 của người tái tổ hợp (OX40L) được tạo ra như sau: cADN cho TNFSF4 của người (tên dòng vô tính: IOH46203) có bán từ hãng imaGenes (Berlin, Germany) và phần ngoại bào (axit amin 51-183) của phối tử TNFSF4 của người (đánh số theo trình tự Uniprot Q6FGS4) được khuếch đại cùng với các điểm giới hạn bọc sườn. Sản phẩm PCR thu được bao hàm tác nhân liên kết ASA và trình tự nhãn 8-His ở đầu 5' của nó sau đó được tách dòng vào một vùng đã cải biến của vật truyền pREP4 từ Invitrogen (Invitrogen AG, Basel, Switzerland) mang chất trợ xúc tác CMV, quá trình poly-adenyl hóa Bovine Growth Hormone, và peptit dẫn đầu VJ2C của chuột để phát động sự tiết protein tái tổ hợp. Để sản xuất protein tái tổ hợp, vật truyền tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK 293 đã thích ứng ở dạng hỗn dịch (số ATCC: CRL 1573) bằng cách sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, France; nhà phân phối: Brunschwig, Basel, Switzerland). Dịch nổi bên trên của dịch nuôi cấy tế bào được thu gom sau năm ngày và tinh chế bằng cách sử dụng cột tinh chế ái lực Protein A (HiTrap Protein A sepharose column; GE Healthcare Europe GmbH, Glatbrugg, Switzerland) vận hành trên hệ thống fKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glatbrugg, Switzerland).

Để xác định liệu rằng các kháng thể kháng OX40 đã tạo ra có thể phong bế gắn kết OX40L với thụ thể OX40 hay không, ELISA phong bế được phát triển. Các vi chuẩn độ 96 lỗ (Costar, USA; distributor VWR AG, Nyon, Switzerland)

được phủ bằng 100 μ l OX40-Fc của người tái tổ hợp (xem Ví dụ 1) cùng với 2 μ g/ml trong PBS. Các đĩa này được ủ qua đêm ở 4°C và sau đó được phong bế bằng PBS 2% BSA ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Dung dịch phong bế này được loại bỏ và dịch nổi bên trên của các tế bào lai hoặc các kháng thể đã tinh chế được bổ sung vào đĩa này. Năm phút sau, 50 μ l OX40L của người tái tổ hợp đã biotinyl hóa với 0,04mg/ml được bổ sung vào mỗi lỗ. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút, sau đó được rửa chín lần bằng PBS 0,01% Tween-20 và HRP-streptavidin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) được bổ sung với mức pha loãng 1:2000. Các đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, được rửa 9 lần bằng PBS 0,01% Tween-20 và cơ chất TMB (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Switzerland) được bổ sung vào đĩa này và phản ứng được dừng sau 6 phút bằng cách bổ sung H₂SO₄. Mức độ hấp thụ sau đó được đọc ở 450nm bằng máy đọc vi đĩa (Biotek, USA; nhà phân phối: WITTEC AG, Littau, Switzerland). Fig.1B cho thấy rằng kháng thể 1D4 thể khảm có khả năng phong bế sự tương tác giữa OX40 và OX40L theo cách thức phụ thuộc liều lượng, trong đó kháng thể 2F8 thể khảm không thể phong bế sự tương tác giữa OX40 và OX40L.

Phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp ở người (MLR)

Máu từ hai thể cho khác nhau được thu gom trong ba 10mL S-Monovette cùng với xitrat làm chất chống đông tụ (Sarstedt, Numbrecht, Germany). Các tế bào từ thể cho N° 1 được sử dụng làm các tế bào tác động trong đó các tế bào từ thể cho N° 2 được sử dụng làm các tế bào đích. Các PBMC (các tế bào đơn nhân máu ngoại vi) từ 2 thể cho được tinh chế bằng cách sử dụng các ống Blood-Sep-Filter Tube loại 50mL (nhà phân phối: Brunschwig, Basel, Switzerland) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được rửa 2 lần bằng môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) mà không có FBS. Các tế bào đích được ủ cùng với 50 μ g/ml mitomycin C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) trong 30 phút ở 37°C. Sau đó, các tế bào được rửa 3 lần bằng RPMI mà không có FBS và treo lắng lại với 1x10⁶ tế bào/mL trong RPMI, 10% FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 2mM L-glutamin (Lonza, Leuven, Belgium), 100U/ml Penixilin, 100 μ g/ml streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany). Trong vi đĩa đáy hình chữ U 96 lỗ (TPP, Trasadingen,

Switzerland), 50'000 các tế bào đích và 80'000 tế bào tác động được phân bố trong thể tích cuối là 100 μ l cho mỗi lỗ. Một trăm μ l chất pha loãng kháng thể được bổ sung vào các lỗ. Các đĩa được ủ trong 7 ngày ở 37°C trong máy ủ 5% CO₂. Bảy ngày sau khi bắt đầu MLR, các tế bào được tạo xung bằng 0,5 μ Ci ³H thymidin (Perkin Elmer). 18 giờ sau khi tạo xung, các tế bào được thu hoạch và đã kết hợp hoạt tính phóng xạ được định lượng trên máy đếm Wallac beta. Fig.2 cho thấy rằng kháng thể 1D4 thể khả năng phong bế MLR theo cách thức phụ thuộc liều lượng ở mức cao hơn so với đối chứng dương.

Ví dụ 4

Gắn kết của kháng thể kháng OX40 của người trên các tế bào đơn nhân máu ngoại vi đã hoạt hóa đặc thù người và các động vật có vú khác (PBMC) bằng cách đếm tế bào dòng chảy

Các tế bào người

Các bộ lọc chứa các bạch cầu của người được thu thập từ Blood Collection Center của La Chaux-de-Fonds, Switzerland (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Serologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Các tế bào được loại bỏ ra khỏi các bộ lọc bằng cách rửa ngược bằng 60mL PBS chứa 10U/mL liquemin (Drossapharm AG, Lucern, Switzerland). Sau đó, các PBMC được tinh chế bằng các ống Blood-Sep-Filter Tube loại 50mL (nhà phân phối: Brunswick, Basel, Switzerland) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được rửa 3 lần bằng môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) có FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Các tế bào được treo lắng lại với 3x10⁶ các tế bào/ml trong RPMI, 10% FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 2mM Ultraglutamin (Lonza, Leuven, Belgium), 100U/ml Penixilin, 100 μ g/ml streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany), 10 μ g/ml Phytohemagglutinin (PHA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) + 100 U/mL của rHu IL-2 (Proleukin, Novartis, Basel, Switzerland) trong đĩa 24 lỗ (TPP, Trasadingen, Switzerland). Sau bốn tám giờ, các tế bào được thu gom và được phân tích bằng cách đếm tế bào dòng chảy như mô tả ở dưới.

Các tế bào HPB-ALL (dòng tế bào bạch cầu lympho cấp tính T, từ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Braunschweig, Germany) được nuôi cấy trong RPMI, 10% FBS. 2×10^5 tế bào được phân bố đĩa đáy hình chữ V 96 lỗ (TPP, Trasadingen, Switzerland), và được ly tâm trong ba phút ở 1300 vòng/phút; dịch nổi bên trên được bỏ đi, các tế bào được thu gom và được phân tích bằng cách đếm tế bào dòng chảy như mô tả ở dưới.

Các PBMC và các tế bào HPB-ALL đã điều chế ở trên được treo lắng lại trong 50µl chất đệm FACS (PBS, 2% FBS, 10% Versene (Invitrogen, USA) cùng với 5µg/mL kháng thể 1D4 thể khảm hoặc 5µg/mL của đối chứng đồng kiểu thích hợp hoặc 20µl của kháng thể kháng OX40 của người thương mại đã đánh dấu bằng PE (dòng vô tính L106, BD Biosciences, Allschwil, Switzerland). Các tế bào được ủ trong 30 phút trong đá, được rửa hai lần và treo lắng lại trong 50µl chất đệm FACS. IgG-Phycoerythrin-PE kháng người (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) đã pha loãng 1/200 được sử dụng để phát hiện kháng thể 1D4 thể khảm và kháng thể đối chứng đồng kiểu. Các tế bào được ủ trong 15 phút trong đá, được rửa một lần, treo lắng lại trong 400µl chất đệm FACS và được phân tích trên thiết bị FACS (Cyan, Beckman Coulter International S.A., Nyon, Switzerland).

Các tế bào sơ cấp của khỉ cynomolgus

Máu nguyên vẹn từ khỉ Cynomolgus (lấy từ Professor Eric Rouiller, Phòng thí nghiệm của Neurophysiology, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland), được thu thập trong các ống xitrat (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland). Hai mL PBS được trộn cùng với 3 mL máu và hỗn hợp này tách lớp trên đỉnh của 10 mL của hỗn hợp 85:15 Ficoll:PBS (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland). Các mẫu được ly tâm trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng mà không làm phá vỡ. Lớp PBMC được thu gom và được rửa ba lần bằng PBS. Các tế bào được treo lắng lại với 3×10^6 tế bào/mL trong môi trường Eagle đã cải biến của Dulbecco (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Austria), 10% FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria), axit amin không cơ bản (PAA Laboratories, Pasching, Austria) 1mM Natri Pyruvat (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 2mM Ultraglutamin (Lonza, Belgium), 100U/ml Penixilin (Biochrom AG, Germany), 100µg/ml streptomycin (Biochrom AG, Germany). Một mL huyền phù tế bào được phân bố trong đĩa 24 lỗ (TPP, Trasadingen, Switzerland) và 10µg/ml

PHA (PHA/M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) 100 U/mL rHu IL-2 (Proleukin, Novartis, Basel, Switzerland) được bổ sung vào. Các tế bào được ủ trong 50 giờ ở 37°C trong máy ủ 5% CO₂. PBMC đã hoạt hóa được thu gom và treo lắng lại trong PBS/2,5% FBS (chất đệm FACS). Bốn mươi nghìn tế bào trong 50µl chất đệm FACS được phân bố đĩa đáy hình chữ V 96 lỗ và kháng thể 1D4 OX40-thể khảm kháng người đã biotinyl hóa hoặc kháng thể đối chứng đồng kiểu đã biotinyl hóa hoặc OX40 kháng người thương phẩm đã biotinyl hóa được phát triển trong cừu (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) được bổ sung vào các lỗ với 25µg/ml. Các mẫu được ủ trong 20 phút trên đá và sau đó các tế bào được rửa hai lần bằng chất đệm FACS lạnh và sau đó được ủ cùng với Streptavidin-PE (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) với mức pha loãng 1:20 trong 15 phút trong đá. Các tế bào được rửa một lần bằng chất đệm và sau đó treo lắng lại trong 300µl chất đệm FACS. Propidi iodua với thể tích 2µl (PI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) được bổ sung trong mỗi mẫu để loại trừ ra các tế bào chết. Các tế bào được phân tích bằng cách đếm tế bào dòng chảy (Cyan, Beckman Coulter International S.A., Nyon, Switzerland).

Fig.3A và Fig.3B cho thấy rằng kháng thể 1D4 thể khảm có khả năng nhận diện OX40 được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào lympho đã hoạt hóa của người và của khỉ cynomologus, một cách tương ứng, nhờ vậy có hoạt tính phản ứng chéo rất được mong muốn cho việc phát triển thuốc.

Ví dụ 5

Hằng số ái lực gắn kết động học của kháng thể 1D4 thể khảm cho vùng ngoại bào thụ thể OX40 của người bởi cộng hưởng plasma bề mặt (SPR)

Hằng số ái lực gắn kết động học (KD) được xác định trên kháng thể đã bắt giữ protein-A bằng cách sử dụng vùng ngoại bào thụ thể OX40 của người hướng đích histidin tái tổ hợp như được mô tả trong Ví dụ 1 làm chất phân tích. Việc đo được tiến hành trên BIAcore 2000 (GE Healthcare - BIAcore, Uppsala, Sweden) ở nhiệt độ trong phòng, và được phân tích bằng phần mềm BiaEvaluation (BIAcore; v4.1).

Chip cảm biến loại nghiên cứu CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland; BR-1000-14) được hoạt hoá bằng cách tiêm 35µl dung

dịch 1:1 N-hydroxysulfosuxinimit (NHS)/1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimitt hydroclorua (EDC) (thể tích/thể tích; lưu lượng 5µl/phút; trên các đường chảy 1 và 2). Protein-A (ref. P7837; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) được pha loãng tới nồng độ cuối là 50µg/ml trong chất đệm axetat có độ pH 4,5 (GE, BR-1003-50; một đơn vị pH dưới pI) và sau đó cố định trong chip cảm biến CM5 đã hoạt hóa từ trước bằng cách tiêm 35µl trên cả hai đường chảy 1 và 2 (5µl/phút); nó tương ứng với khoảng chừng 1500 đơn vị đáp ứng (RU). Chip cảm biến protein-A-CM5 sau đó được khử hoạt tính bằng cách tiêm 35µl dung dịch etanolamin (5µl/phút). Cuối cùng, hai lần tiêm 10µl dung dịch glyxin (GE, ref. BR-1003-54; 10 mM; pH 1,5) được thực hiện để giải phóng các phân tử protein-A không liên kết ngang.

Trước khi đo ái lực, thử nghiệm giới hạn chuyển khối được thực hiện bằng cách tiêm nồng độ cố định của chất phân tích vào lượng cố định của kháng thể bắt giữ protein-A với các lưu lượng khác nhau (5, 15, 30, 50, 75µl/phút trong 2 phút). Phép phân tích các hệ số góc theo lưu lượng ở các lưu lượng khác nhau biểu thị cho sự chuyển khối.

Để đo ái lực, kháng thể 1D4 thể khảm được lưu giữ trong 1 x chất đệm PBS đã được pha loãng tới nồng độ cuối là 15 nM trong chất đệm HBS-EP (GE, ref. BR-1001-88; 0,01 M Hepes, 0,15 M NaCl, EDTA 3mM, 0,005% Chất hoạt động bề mặt P20, độ pH 7,4). 10µl nguyên liệu đã pha loãng này sau đó được phun trên đường chảy 2 của chip protein-A CM5 (30µl/phút) để đạt 200-250 RU. Sau bước bắt giữ này, vùng ngoại bào thụ thể OX40 của người hương đích histidin tái tổ hợp được phun với các nồng độ khác nhau (50nM tới 0,4µM) trên các đường chảy 1 và 2 (đường chảy 1 được sử dụng làm tham chiếu) với lượng 30µl/phút. Sau mỗi sự kiện gắn kết, bề mặt được tái sinh bằng chất đệm glyxin với độ pH 1,5 được phun trong 1 phút (10µl/phút).

Việc đo (sensorgram: fc2-fc1) được làm thích ứng tốt nhất với mô hình chất phân tích hóa trị hai 2:1 có sự chuyển khối. Để tính toán cho các biến thể thử nghiệm trong kháng thể bẫy protein-A khi bắt đầu mỗi phép đo, giá trị R_{max} được thiết lập để định vị trong tất cả các thích ứng. Các khoảng thời gian phân ly ít nhất là 300-600 giây. Phép đo được thực hiện hai lần và bao gồm các mẫu nồng không

để tham chiếu. Giá trị Chi2 thể hiện tổng các giá trị khác biệt bình phương giữa dữ liệu thử nghiệm và dữ liệu tham chiếu ở mỗi điểm; trong khi các biểu đồ của các số dư biểu thị sự chênh lệch dữ liệu thử nghiệm và dữ liệu tham chiếu cho mỗi điểm trên đường thích ứng. Cả giá trị Chi2 lẫn các giá trị dư được sử dụng để đánh giá chất lượng thích ứng giữa dữ liệu thử nghiệm và các mô hình gắn kết riêng.

Việc đo được thực hiện hai lần với kháng thể OX40 kháng người thể khả năng đã bắt giữ được cố định trên chip cảm biến protein-A và vùng ngoại bào thụ thể OX40 của người hướng đích histidin tái tổ hợp làm chất phân tích. Giá trị KD nằm trong khoảng từ 91 đến 116 nM cùng với các giá trị Chi2 < 1,25.

Ví dụ 6

Làm tương thích với người kháng thể 1D4 đơn dòng của chuột

Quá trình làm tương thích với người kháng thể 1D4 của chuột OX40 kháng người bao gồm việc chọn lọc các khung thể nhận ở người, các đột biến ngược, và các đột biến lưu giữ cơ bản và/hoặc cải thiện các đặc tính gắn kết của các khung thể nhận đã ghép hợp CDR ở người đã được mô tả.

Thiết kế các vùng thay đổi được tạo hình lại

Việc so trùng tính tương đồng được áp dụng để chọn lọc các khung thể nhận ở người để ghép hợp với các 1D4 CDR. Các cơ sở dữ liệu, ví dụ, cơ sở dữ liệu các gen thay đổi dòng phôi từ loci globulin miễn dịch của người và chuột (cơ sở dữ liệu IMGT (The international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc MP et al., (1999)Nucleic Acids Res. 27(1): 209-12; Ruiz M et al., (2000)Nucleic Acids Res. 28(1): 219-21; Lefranc MP(2001)Nucleic Acids Res. 29(1): 207-9; Lefranc MP(2003)Nucleic Acids Res. 31(1): 307-10; Lefranc MP et al., (2005)Dev. Comp. Immunol. 29(3): 185-203; Kaas Q et al., (2007)Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4):253-64) or the VBASE2 (Retter I et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33, Database issue D671-D674) hoặc cơ sở dữ liệu Kabat (Johnson G et al., (2000) Nucleic Acids Res. 28: 214-218)) hoặc các công bố (ví dụ, Kabat EA et al., nêu trên) có thể được sử dụng để nhận diện các phân họ ở người mà các vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ V ở chuột thuộc chúng và xác định khung dòng phôi ở người phù hợp nhất để sử dụng làm phân tử thể nhận. Việc

chọn lọc các trình tự VH và VL thuộc các phân họ để sử dụng làm thể nhận có thể dựa trên cơ sở tính tương đồng về mặt trình tự và/hoặc sự so trùng cấu trúc của các vùng CDR1 và CDR2 giúp cho việc bảo toàn sự trình bày tương đối thích hợp của sáu CDR sau khi ghép hợp.

Ví dụ, việc sử dụng cơ sở dữ liệu IMGT cho thấy có mức độ tương đồng tốt giữa chuỗi nặng vùng thay đổi khung 1D4 và các thành viên của phân họ vùng thay đổi chuỗi nặng của người 2. Tính tương đồng cao nhất và tính đồng nhất của cả hai CDR và các trình tự vùng khung được quan sát đối với các trình tự dòng phôi: IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22), và IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23), tất cả chúng đều có mức tương đồng trình tự lớn hơn 73% cho toàn bộ trình tự lên tới CDR3. IGHV 2-70*10, IGHV2-70*01, và IGHV2-70*13 có mức tương đồng trình tự là 74%; trong khi IGHV2-5*09, và IGHV2-70*11 lần lượt có mức tương đồng trình tự là 73,5% và 73%.

Bằng cách sử dụng cùng phương pháp này, trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ 1D4 có mức tương đồng trình tự tốt với các thành viên của phân họ kappa vùng thay đổi chuỗi nhẹ của người 3. Tính tương đồng cao nhất và tính đồng nhất của cả hai CDR và các trình tự vùng khung được quan sát đối với các trình tự dòng phôi: IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) (mức tương đồng: 65,3%), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25) (mức tương đồng: 64,9%), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26) (mức tương đồng: 64,9%), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) (mức tương đồng: 64,2%), và IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28) (mức tương đồng: 62,5%).

Trong số các điểm khởi đầu cho quy trình làm tương thích với người, các vùng thay đổi IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19), và IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) của người được chọn làm các thể nhận đối với các 1D4 CDR. IGHV 2-70*10 được chọn so với các vùng thay đổi chuỗi nặng của người khác nhờ mức tương đồng siêu việt của nó với 1D4 trong vùng khung của nó.

Một kháng thể được làm tương thích với người thứ nhất của đồng kiểu gama của người được điều chế (xem ở dưới). Kháng thể này bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng lai người-chuột và vùng thay đổi chuỗi nhẹ lai người-chuột. Vùng thay đổi chuỗi nặng lai này dựa trên cơ sở vùng thay đổi chuỗi nặng của người IGHV 2-70*10 trong đó dòng phôi CDR1 và 2 lần lượt được thay thế cho 1D4

chuỗi nặng CDR1 và 2. Trình tự đoạn JH phù hợp nhất với khung thể nhận của người được nhận diện từ các tra cứu IMGT đã nêu trên. Trình tự thay đổi chuỗi nặng lai người-chuột thu được có các vùng khung IGHV 2-70*10 của người, các CDR của chuột 1D4, và JH phù hợp nhất với thể nhận của người được nhắc đến trong Bản mô tả là chuỗi nặng vùng thay đổi VH1 có SEQ ID NO: 29. Tương tự, vùng thay đổi chuỗi nhẹ lai người-chuột được sử dụng cho đối tượng nghiên cứu kháng thể được làm tương thích với người thứ nhất có các vùng khung IGKV3-11*01 của người, các CDR của chuột 1D4, và JK phù hợp nhất với thể nhận của người, và được nhắc đến trong Bản mô tả là chuỗi nhẹ vùng thay đổi VL1 có SEQ ID NO: 30. Kháng thể được làm tương thích với người thứ nhất này bao gồm VH1 và VL1 được viết tắt ở đây là kháng thể VH1/VL1.

Tạo đồng kiểu kháng thể được làm tương thích với người thứ nhất

Các trình tự ADN mã hóa (cADN) cho VH1 và VL1 được tổng hợp theo format scFv bởi GENEART AG (Regensburg, Germany) nhờ đó cho phép một trình tự ADN đơn bao hàm cả hai vùng thay đổi (SEQ ID NO: 31). Các vùng thay đổi cADN riêng được lấy ra từ cấu trúc scFv này bởi PCR, và được lắp ráp tiếp phía trước (các) trình tự cADN vùng ổn định tương ứng của chúng bằng cách sử dụng kỹ thuật lắp ráp PCR. Cuối cùng, các cADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ được buộc trong các vật truyền độc lập dựa trên cơ sở vật truyền pcADN3.1 đã cải biến (Invitrogen, CA, USA) mang chất trợ xúc tác CMV và tín hiệu poly-adenyl hóa Bovine Growth Hormone. Vật truyền đặc thù chuỗi nhẹ cho phép biểu hiện các các chuỗi nhẹ đồng kiểu kappa của người bởi việc nối vùng thay đổi chuỗi nhẹ cADN được quan tâm phía trước của cADN vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa sử dụng các vị trí giới hạn enzyme BamHI và BsiWI; trong khi vật truyền đặc thù chuỗi nặng được xây dựng để cho phép nối chuỗi nặng vùng thay đổi cADN được quan tâm nằm phía trước trình tự cADN mã hóa các vùng ổn định IGHG1 CH1, vùng bản lề IGHG1, IGHG1 CH2, và IGHG1 CH3 của người bằng cách sử dụng các vị trí giới hạn enzyme BamHI và SalI. Trong cả hai vật truyền biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, sự tiết được phát động bởi peptit dẫn đầu VJ2C của chuột chứa vị trí BamHI. Vị trí giới hạn enzyme BsiWI nằm trong vùng ổn định kappa; trong đó vị trí giới hạn enzyme SalI được tìm thấy trong vùng IGHG1 CH1 domain.

Kháng thể VH1/VL1 được sản xuất nhanh bởi việc đồng chuyển nhiễm các lượng tương đương của các vật truyền chuỗi nặng và chuỗi nhẹ vào các tế bào HEK293-EBNA1 đã làm thích ứng ở dạng huyền phù (chỉ số danh mục ATCC®: CRL-10852) nhờ sử dụng polyetylenimin (PEI, Sigma, Buchs, Switzerland). Thông thường, 100ml tế bào trong huyền phù với mật độ 0,8-1,2 triệu tế bào trên ml được chuyển nhiễm bằng hỗn hợp ADN-PEI chứa 50µg vật truyền biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và 50µg vật truyền biểu hiện mã hóa chuỗi nhẹ. Khi các vật truyền biểu hiện tái tổ hợp mã hóa các gen kháng thể được đưa vào các tế bào chủ, thì các kháng thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy tiếp các tế bào trong khoảng thời gian 4 tới 5 ngày để cho phép tiết vào môi trường nuôi cấy (EX-CELL 293, môi trường không huyết thanh HEK293; Sigma, Buchs, Switzerland), có bổ sung 0,1% axit pluronic, 4 mM glutamin, và 0,25µg/ml genetixin).

Kháng thể VH1/VL1 được tinh chế từ dịch nổi bên trên không tế bào bằng cách sử dụng môi trường dòng protein-A tái tổ hợp (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland), và được trao đổi với muối đệm phosphat trước các thử nghiệm. Sự gắn kết với OX40 của người được xác định bởi SPR như được mô tả trong Ví dụ 5.

Các đột biến ngược của các khung ở người đã ghép

Do việc ghép hợp thẳng các CDR từ kháng thể của chuột 1D4 dẫn đến việc đối tượng nghiên cứu không có gắn kết với OX40 của người (Bảng 6 và FIG. 4), nên sự đột biến trong đó các gốc của người được thế cho các gốc của chuột được bắt đầu. Quy trình này còn được gọi là sự gây đột biến ngược và nó là một quá trình khó dự đoán nhất trong việc làm tương thích với người cho các kháng thể đơn dòng. Nó đòi hỏi việc nhận diện và chọn lọc các gốc khung tới hạn từ kháng thể của chuột cần được lưu giữ để bảo toàn ái lực, đồng thời giảm thiểu tính sinh miễn dịch hiệu lực trong kháng thể được làm tương thích với người. Bảng 7, Bảng 8, và FIG. 5 thể hiện các gốc (hệ đánh số Kabat) khác nhau giữa các khung kháng thể của người và của chuột. Các gốc có thể ảnh hưởng tới hình thể của các CDR hoặc bọc gói bên trong vùng thay đổi của đối tượng nghiên cứu cụ thể do chúng có thể có tác động mạnh nhất tới ái lực kháng thể.

Để nhận diện các gốc có thể ảnh hưởng tới hình thể của các CDR hoặc bọc gói bên trong vùng thay đổi, một mô hình 3D cho cặp VH1-VL1 của các vùng thay đổi được tính toán nhờ sử dụng máy chủ lập mô hình tương đồng cấu trúc SWISS-MODEL (Arnold K et al., (2006) Bioinformatics, 22(2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>) được thiết lập ở chế độ tự động. Phép phana tích mẫu cho phép chọn lọc một tập phụ của các vị trí dựa trên cơ sở ảnh hưởng giả định của chúng tới các vùng CDR vùng và/hoặc gói vùng thay đổi chuỗi nặng-chuỗi nhẹ. Tập phụ này của các vị trí gồm các vị trí chuỗi nặng thay đổi: 23, 35b, 48, 50, 60, và 62 cũng như các vị trí chuỗi nhẹ thay đổi: 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56, và 71 (hệ đánh số Kabat). Ngoài các đột biến ngược này, vị trí chuỗi nhẹ Y31 được tìm thấy trong kháng thể VH1/VL1 đã được xóa trong một số đối tượng nghiên cứu.

Các đối tượng nghiên cứu được làm tương thích với người khác dựa trên cơ sở các kết hợp khác nhau của các thay thế chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được điều chế trong phạm vi trình tự kháng thể VH1/VL1 bằng cách sử dụng các đột biến tiêu chuẩn và các phương pháp đã mô tả ở trên. Các đối tượng nghiên cứu kháng thể được làm tương thích với người được thử nghiệm về ái lực gắn kết của chúng bằng SPR như được mô tả trong Ví dụ 5.

Hiệu suất và đặc tính gắn kết của một số kháng thể được làm tương thích với người dựa trên cơ sở các thay thế đơn lẻ hoặc các tổ hợp thay thế được thể hiện trong Bảng 6. Ngoài 28 kháng thể có biểu hiện, chín đối tượng nghiên cứu không có sự gắn kết bất kỳ với OX40 của người, và một nhóm chín đối tượng khác có gắn kết từ yếu tới tối. Các kháng thể được làm tương thích với người trên cơ sở VL9 thể hiện nhất quán nhất sự gắn kết yếu với OX40 của người bởi SPR. Duy nhất hai kháng thể, VH6/VL9 và VH7/VL9 thể hiện sự gắn kết tốt với OX40 của người. Cả hai kháng thể được làm tương thích với người đều có các đột biến ngược ở các vị trí chuỗi nặng thay đổi: 23, 35b, 50, 60, và 62 và các vị trí chuỗi nhẹ thay đổi: 33, 34, 46, 47 và 71 (hệ đánh số Kabat). Ngoài các đột biến ngược này, cả hai VH6/VL9 và VH7/VL9 đều có lợi từ việc loại bỏ vị trí chuỗi nhẹ 31. Điều đáng ngạc nhiên là VH7/VL9 có ái lực được cải thiện cho OX40 của người so với kháng thể khảm 1D4 và biến thể VH6/VL9. Các ái lực gắn kết của các kháng thể được làm tương thích với người được tóm tắt trong Bảng 9.

Độ ổn định nhiệt của các kháng thể kháng OX40 đã được làm tương thích với người được chọn theo phép đo nhiệt lượng quét vi sai

Việc đo độ ổn định nhiệt của của các kháng thể được làm tương thích với người được đo bằng cách áp dụng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC). Profin nóng chảy của các kháng thể đơn dòng là đặc tả cho các đồng kiểu của chúng (Garber and Demarest (2007), BBRC 355:751-7), tuy nhiên nhiệt độ nóng chảy quân bình của đoạn FAB có thể được nhận được dễ dàng ngay cả trong trường hợp IgG với chiều dài đầy đủ. Sự nóng chảy quân bình của phần FAB được sử dụng để theo dõi độ ổn định đơn dòng của các đối tượng nghiên cứu đã được làm tương thích với người.

Các phép đo nhiệt lượng được tiến hành trên vi nhiệt lượng kế vi sai VP-DSC (MicroCal, Northampton, UK). Thể tích tế bào là 0,128ml, tốc độ gia nhiệt là 200°C/giờ, và áp suất dư được giữ ở 65psi (448,5KPa). Tất cả các đoạn protein được sử dụng với nồng độ 1mg/ml trong PBS (độ pH = 7,4). Nhiệt dung mol của mỗi protein được ước tính bằng cách so sánh với hai mẫu chứa chất đệm giống hệt nhưng có mặt protein. Các đồ thị nhiệt dung mol riêng phần và nóng chảy được phân tích bằng cách áp dụng các quy trình tiêu chuẩn. Các biểu đồ nhiệt được hiệu chỉnh trên cơ sở đường nền và nồng độ được chuẩn hóa trước khi được phân tích bằng cách sử dụng mô hình Non-Two State trong phần mềm Origin v7.0.

Đoạn VH6/VL9 FAB biến thể được làm tương thích với người biểu hiện sự chuyển đổi duy nhất ở 76,3°C với hình dạng và biên độ phù hợp với một không cuộn gấp hợp tác xã thường quan sát được đối với các đoạn FAB được cuộn chặt chứng tỏ rằng quy trình xây dựng đã thành công về việc lưu giữ tính ổn định FAB. Toàn bộ biến thể được làm tương thích với người đều có tính ổn định nhiệt tốt.

Bảng 6: Các kháng thể OX40 kháng người đã được làm tương thích với người

Biến thể kháng thể đã được làm tương thích với người (IGHG1)	SEQ ID NO	Các đột biến VH/VL	Biểu hiện nhất thời (mg/l)	Gắn kết với OX40 của người
VH1/VL1	32, 39	N.A./N.A.	40	Không
VH1/VL2	32, 40	N.A./L33M	21	Không
VH1/VL3	32, 41	N.A./F71Y	17	Không
VH2/VL1	33, 39	T23S/N.A.	13	Không
VH2/VL2	33, 40	T23S/L33M	17	Không
VH2/VL3	33, 41	T23S/F71Y	14	Không
VH3/VL1	34, 39	R50H/N.A.	23	Không
VH3/VL2	34, 40	R50H /L33M	22	Không
VH3/VL3	34, 41	R50H /F71Y	18	Không
VH4/VL4	35, 42	T23S-R50H/L33M-F71Y	15	Kém
VH4/VL9	35, 47	T23S-R50H/ Khuyết Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	Yếu
VH5/VL4	36, 42	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-F71Y	15	Kém
VH5/VL5	36, 43	T23S-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Kém
VH5/VL6	36, 44	T23S-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Kém
VH5/VL9	36, 47	T23S-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	6	Yếu
VH6/VL5	37, 43	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	0	N.D.
VH6/VL6	37, 44	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	0,5	N.D.
VH6/VL7	37, 45	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-F71Y	14	N.D.
VH6/VL8	37, 46	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-A34H-F71Y	7	N.D.
VH6/VL9	37, 47	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3,5	Tốt
VH6/VL10	37, 48	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M -R54L-T56S-F71Y	0,5	N.D.
VH6/VL11	37, 49	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	5,5	N.D.
VH7/VL5	38, 43	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/	1	N.D.

Biến thể kháng thể đã mđược làm tương thích với người (IGHG1)	SEQ ID NO	Các đột biến VH/VL	Biểu hiện nhất thời (mg/l)	Gắn kết với OX40 của người
		L33M-L46P-L47W-F71Y		
VH7/VL6	38, 44	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
VH7/VL7	38, 45	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-F71Y	1,5	Yếu
VH7/VL8	38, 46	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-A34H-F71Y	10	Yếu
VH7/VL9	38, 47	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-A34H-L46P-L47W- F71Y	3	Tốt
VH7/VL11	38, 49	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Khuyết Y31-L33M-A34H-R54L-T56S- F71Y	11,5	Yếu/ Tốt

N.D.: không xác định

Bảng 7: so sánh các khung IGHV 2-70*10 thay đổi chuỗi nặng thể nhận của người và 1D4

Vị trí Kabat	1D4	CDR đã ghép hợp IGHV 2-70*10
10	G	A
11	I	L
12	L	V
13	Q	K
15	S	T
19	S	T
23	S	T
35b	G	S
41	S	P
44	G	A
48	L	I
50	H	R
60	N	S
62	A	S
65	S	T
66	G	R
79	F	V
81	K	T
82	I	M
82a	A	T
82b	S	N
82c	Y	M
84	T	P
85	T	V

Bảng 8: so sánh các khung IGKV 3-11*01 thay đổi chuỗi nhẹ thể nhận của người và 1D4

Vị trí Kabat	1D4	CDR đã ghép hợp IGKV 3-11*01
1	Q	E
10	I	T
13	A	L
18	K	R
19	V	A
21	M	L
22	T	S
33	M	L
34	H	A
42	S	Q
43	S	A
45	K	R
46	P	L
47	W	L
54	L	R
56	S	T
58	V	I
70	S	D
71	Y	F
72	S	T
76	N	S
77	R	S
78	V	L
80	A	P
83	A	F
85	T	V

Bảng 9: các đặc tính gắn kết của các kháng thể kháng OX40 thể khảm và đã được làm tương thích với người được chọn.

Các biến thể đã được làm tương thích với người	SEQ ID NO	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
Thể khảm 1D4	50, 51	$3,4 \times 10^4$	$3,08 \times 10^{-3}$	91
VH6/VL9	37, 47	$3,54 \times 10^4$	$3,56 \times 10^{-3}$	101
VH7/VL9	38, 47	$4,45 \times 10^4$	$3,12 \times 10^{-3}$	70

Ví dụ 7

Đặc tả epitop các kháng thể kháng OX40 đã được làm tương thích với người.

Để đặc tả epitop của các kháng thể kháng OX40 đã được làm tương thích với người, kháng thể VH6/VL9 được lập bản đồ để xác định vùng ngoại bào OX40 của người bằng cách sử dụng các protein thể khảm OX40 của người-chuột khác nhau.

Điều chế các protein thể khảm OX40 của người-chuột và ELISA

Các protein OX40 của chuột và của người-chuột được format dưới dạng các protein dung hợp Fc theo phương pháp đã mô tả trong Ví dụ 1. Đối với ELISA, các protein OX40 được phủ với mức $2\mu\text{g/mL}$, trong PBS, qua đêm ở 4°C trong các đĩa 96 lỗ gắn kết cao (Coastar). Đĩa này được phong bế bằng PBS 2% Bovine Serum Albumin (BSA) trước khi ủ cùng với kháng thể VH6/VL9 hoặc kháng thể đối chứng đồng kiểu. Sau đó, đĩa này được rửa và được ủ cùng với đoạn Ig F(ab')₂ kháng người-dê đặc hiệu cho HRP (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket, UK). Sau khi rửa, đĩa được ủ cùng với cơ chất TMB (Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Switzerland) để lộ ra gắn kết kháng thể. Phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ và mật độ quang được đọc ở 450nm (OD 450nm) trên quang phổ kế Synergy HT2 (Biotek, USA; nhà phân phối: WITTEC AG, Littau, Switzerland).

Các kết quả

Không phụ thuộc vào nguồn gốc, vùng ngoại bào OX40 được chia thành bốn môđun cấu trúc chỉ cho các miền 1, 2, 3 và 4 (Compaa DM & Hymowitz SG (2006) *Structure*, 14(8): 1321-30). Các protein OX40 thể khảm tương ứng với vùng ngoại bào của OX40 của người (axit amin 29-214 của TNFRSF4 của người, đánh số theo trình tự Uniprot P43489) được xây dựng bằng cách trao đổi một hoặc nhiều trong số bốn miền giữa các trình tự người và chuột. Ví dụ, protein RHRR OX40 thể khảm tương ứng với vùng ngoại bào OX40 của chuột trong đó vùng thứ hai đã được thay thế bằng trình tự miền của người tương ứng.

ELISA gắn kết được thực hiện để thử nghiệm hoạt tính phản ứng của kháng thể VH6/VL9 trên vùng ngoại bào OX40 của người (viết tắt là HHHH với SEQ ID NO: 11), vùng ngoại bào OX40 của chuột (viết tắt RRRR có SEQ ID NO: 52), và trên bốn protein thể khảm người-chuột: RHRR (SEQ ID NO: 53), HRRR (SEQ ID NO: 54), HHRR (SEQ ID NO: 55), và RRHH (SEQ ID NO: 56). Kết quả của ELISA này được thể hiện trên Fig.7. Như một điều kiện tiên quyết cho thử nghiệm lập bản đồ epitop này, việc kháng thể VH6/VL9 được thể hiện là có gắn kết protein OX40 của người nhưng không gắn kết protein OX40 của chuột, chứng tỏ rằng không có hoạt tính phản ứng chéo với OX40 của chuột. Điều đã được chỉ ra là việc kháng thể VH6/VL9 gắn kết RHRR và HHRR nhưng không gắn kết HRRR hoặc RRHH, chứng tỏ rằng các bản đồ epitop VH6/VL9 nằm trong miền thứ hai của vùng ngoại bào OX40 của người.

Ví dụ 8:

Kháng thể VH6/VL9 phong bế phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp bởi các cơ chế tiêu diệt và phong bế

Hiệu lực của kháng thể VH6/VL9 để ức chế in vitro các phản ứng miễn dịch được thử nghiệm trong phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp di sinh một con đường (MLR). MLR là một mô hình in vitro của quá trình hoạt hóa tế bào T phản ứng của sự tăng sinh (O'Flaherty E et al., (2000) *Immunology*, 100(3): 289-99; DuPont B & Hansen JA (1976) *Adv. Immunol.* 23: 107-202). Khi các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ hai thể cho không liên quan được pha trộn, các tế bào T tạo sự hoạt hóa thông qua việc nhận diện các phân tử đồng loại tương thích mô chính (MHC). Sự hoạt hóa này dẫn đến sự tăng sinh của các tế

bào lympho T. Phản ứng MLR thường được sử dụng để chứng minh tác động của các thuốc chống miễn dịch hướng đích tế bào T (Bromelow KV et al., (2001) J. Immunol. Methods, 247(1-2): 1-8). Các thuốc chống miễn dịch, như cyclosporin tác động chủ yếu thông qua việc ức chế sự hoạt hóa tế bào T. Bên cạnh thử nghiệm phong bế tác động bởi kháng thể VH6/VL9, sự góp phần của các cơ chế gây độc tế bào như độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) tới sự ức chế MLR cũng được nghiên cứu. Ba format kháng thể khác nhau của kháng thể VH6/VL9 được thử nghiệm trong thử nghiệm này: format IGHG1 (trong này được viết tắt là VH6/VL9), format IGHG1 (IgG1) không được fucosyl hóa (trong này được viết tắt là VH6/VL9 không được fucosyl hóa), và format IGHG4 (IgG4) (trong này được viết tắt là VH6/VL9 IGHG4 S228P). Các kháng thể IGHG1 (IgG1) đã biết là có năng lực cho cơ chế độc tính tế bào như ADCC. Các kháng thể IGHG1 không fucosyl hóa đã biết là có biểu hiện tăng cường hoạt tính ADCC do ái lực cao hơn đối với FcγRIIIa được biểu hiện trên các tế bào độc tố như các tế bào giết tự nhiên (các tế bào NK) (Mizushima T et al., (2011) Genes Cells, 16(11): 1071-80). Trong đó, các kháng thể IGHG4 (IgG4) đã biết là không có các cơ chế gây độc tế bào thông qua trung gian Fc như ADCC.

Format kháng thể VH6/VL9

Việc format globulin miễn dịch IGHG4 có thay thế S228P đạt được bằng cách thay thế trình tự cADN mã hóa các vùng cố định IGHG1 CH1, vùng bản lề IGHG1, IGHG1 CH2, và IGHG1 CH3 cho trình tự cADN mã hóa các vùng cố định IGHG4 CH1, vùng bản lề IGHG4 có thay thế S228P, IGHG4 CH2 và IGHG4 CH3 trong vật truyền đặc thù chuỗi nặng đã mô tả trong Ví dụ 6. Thay thế S228P được đưa vào khuôn mẫu cADN chuỗi nặng IGHG4 của người bằng kỹ thuật gây đột biến PCR tiêu chuẩn. Chuỗi nặng thu được có SEQ ID NO: 57. Việc tạo kháng thể VH6/VL9 IGHG1 không fucosyl hóa theo quy trình đã mô tả trong Ví dụ 14 trong công bố WO2010/095031.

Phản ứng chuyển dạng lympho nuôi cấy hỗn hợp

Máu từ hai thể cho của người khác nhau được thu thập trong ba S-Monovette loại 10mL với xitrat làm chất chống đông tụ (Sarstedt, Numbrecht,

Germany). Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ hai thể cho của người được tinh chế bằng cách sử dụng các ống lọc 50ML Blood-Sep-Filter Tube (nhà phân phối: Brunschwig, Basel, Switzerland) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được rửa hai lần bằng môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) mà không có FBS. Các tế bào kích thích từ hai thể cho này được điều chế bằng cách ủ cùng với 50µg/ml mitomycin C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) trong 30 phút ở 37°C. Sau đó, các tế bào được rửa ba lần bằng RPMI mà không có FBS và treo lắng lại với 1×10^6 tế bào/mL trong RPMI, 10% FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 2mM L-glutamin (Lonza, Leuven, Belgium), 100U/ml Penixilin và 100µg/ml streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany). Các tế bào đáp ứng được treo lắng lại trong RPMI, 10%FBS, L-glutamin, 100U/ml Penixilin và 100µg/ml streptomycin trong vi đĩa đáy hình chữ U 96 lỗ (TPP, Trasadingen, Switzerland). 50'000 các tế bào kích thích và 80'000 các tế bào đáp ứng được phân bố trong thể tích cuối là 100µl cho mỗi lỗ. 100µl chất pha loãng kháng thể (hoặc môi trường duy nhất) được bổ sung vào các lỗ. Đĩa được ủ trong 7 ngày ở 37°C trong máy ủ 5% CO₂. Các tế bào được tạo xung cùng với 0,5µCi của ³H thymidin (Perkin Elmer, Basel Switzerland) trong 18 giờ cuối. Các tế bào được thu hoạch trên bộ lọc filtermat (Perkin Elmer) và hoạt tính phóng xạ đã kết hợp được định lượng trên máy đếm Wallac beta counter (Perkin Elmer).

Các kết quả

Các kết quả thể hiện trên Fig.8 chứng tỏ rằng kháng thể VH6/VL9 có khả năng ức chế hiệu quả MLR cho hai cá thể khác nhau (các đáp ứng) với giá trị EC₅₀ khoảng 100ng/mL. Các kết quả cũng thể hiện một đáp ứng tùy thuộc vào format kháng thể được sử dụng và sự chênh lệch về sự góp phần phong bế và các cơ chế gây độc tế bào được quan sát trong MLR từ các cá thể khác nhau.

Hoạt tính phản ứng của các tế bào T từ đáp ứng 1 (Fig.8A) được ức chế một cách hiệu quả bởi IGHG1 và các format IGHG4 chứng tỏ rằng các cơ chế gây độc tế bào là không quan trọng với đáp ứng 1. Trong đó, format IGHG4 chỉ kém phong bế MLR từ đáp ứng 2 (Fig.8B) ở nồng độ cao và mất rất nhanh chóng hiệu

quả của nó ở các nồng độ thấp, trong đó format IGHG1 có thể đạt mức độ ức chế trên 60%, đối với đáp ứng 2, cơ chế giết cho hầu hết tác động ức chế.

Sự khác nhau này về chế độ tác động có thể là do thực tế là sự hoạt hóa, sự tăng sinh và sự sống sót của các tế bào T trong phản ứng MLR là phụ thuộc biến thiên vào các tín hiệu đồng kích thích OX40 giữa các cá thể, tùy thuộc vào mức độ hoạt tính phản ứng dị ứng nguyên và các tín hiệu đồng kích thích có khả năng khác. Đối với các cá thể phụ thuộc ít vào các tín hiệu đồng kích thích có nguồn gốc từ OX40, sự loại trừ các tế bào T đã hoạt hóa bởi cơ chế ADCC là một cơ chế chính cho tác động của VH6/VL9.

Đáng ngạc nhiên là, format IGHG1 không fucosyl hóa đã biểu hiện khả năng rất hiệu lực để ức chế MLR cho cả hai đáp ứng. Sự quan sát này nổi bật ở chỗ ngay cả khi cơ chế phòng bế có thể thỏa đáng để đạt được sự ức chế MLR, thì việc bổ sung hoặc tăng cường cơ chế giết cải thiện tác động ức chế của các kháng thể kháng OX40. Sự tăng cường như vậy đặc biệt hữu ích cho việc điều trị các rối loạn thông qua trung gian OX40 không phụ thuộc vào tình trạng đồng kích thích OX40 của bệnh nhân, ví dụ, khi bệnh nhân có mức biểu hiện OX40 thấp.

Ví dụ 9:

Khang thể VH6/VL9 phong bế bệnh mảnh ghép khác loại chống lại ký chủ

Phản ứng mảnh ghép khác loại chống lại ký chủ (GVH) là một mô hình cho bệnh mảnh ghép khác loại chống lại ký chủ (GVHD) quan sát được sau khi ghép tủy xương ở bệnh nhân là người. Phản ứng GVH là một đáp ứng miễn dịch cấp tính qua trung gian các tế bào miễn dịch được cấy ghép tấn công môi trường vật chủ là kết quả của việc nhận diện MHC dị sinh hoặc khác loài (Murphy WJ et al., (1996) Semin. Immunol. 8(4): 233-41). Các tế bào lympho T là các tế bào tác động chính của các phản ứng GVH. Hiệu lực chống miễn dịch của kháng thể VH6/VL9 được thử nghiệm trong mô hình GVHD khác loại dựa trên cơ sở hoàn nguyên chuột nhắt SCID bằng các PBMC của người. Trong mô hình này, các PBMC của người và các tế bào lympho T sơ cấp thể hiện đáp ứng mạnh chống lại các tế bào chủ của chuột. Phản ứng này dẫn đến viêm ruột và da trầm trọng đi kèm với giảm trọng lượng. Dữ liệu thu thập liên quan nhất từ mô hình này là sự sống sót của các động vật.

Phương pháp

Các động vật (chuột nhắt SCID) được chiếu sáng ở dưới mức gây chết trước khi được hoàn nguyên bằng 30 triệu PBMC của người bằng cách tiêm trong màng bụng. Các chuột nhắt cũng được làm nghèo đối với các tế bào NK của chuột bởi hai lần tiêm mỗi tuần kháng thể TMbeta1. Việc xử lý bằng kháng thể VH6/VL9, Enbrel[®] hoặc chất dẫn thuốc được tiêm truyền tĩnh mạch mỗi tuần cho năm liều liên tiếp và bắt đầu hai ngày trước khi tiêm PBMC. Các động vật được xử lý hoặc là bằng chất dẫn thuốc (PBS) hoặc bằng kháng thể VH6/VL9 với mức 10mg/kg hoặc 1 mg/kg, hoặc Enbrel[®] (protein dung hợp của he người tan thụ thể TNF hòa tan của người 2 đã dung hợp với thành phần Fc của IgG1 của người, Amgen-Pfizer) với mức 8mg/kg. Các động vật được kiểm tra và được chấm điểm ba lần mỗi tuần đối với các triệu chứng GVHD bao gồm giảm cân, tiêu chảy, trụi lông và hành vi chung. Các động vật được coi là đã chết nếu như các triệu chứng được xem là quá nghiêm trọng.

Các kết quả

Fig.9 cho thấy rằng kháng thể VH6/VL9 có hiệu lực ức chế phản ứng GVHD ngay cả với liều lượng thấp 1mg/kg. Đáng ngạc nhiên là, kháng thể VH6/VL9 đã chứng tỏ có hiệu quả hơn so với Enbrel[®] là một chất trị liệu đã được thừa nhận cho GVHD ở người (Xhaard A et al., (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). Thời gian sống sót trung bình của các động vật được xử lý bằng kháng thể VH6/VL9 với liều dùng 1 hoặc 10 mg/kg là gấp bốn lần so với nhóm được xử lý bằng chất dẫn thuốc (Bảng 10) và hai lần so với Enbrel[®]. Ngoài ra, kết quả này nhấn mạnh rằng kháng thể VH6/VL9 không có hoạt tính chủ vận, kháng thể kháng OX40 có tính chủ vận đã được công bố làm giảm bớt GVHD trong các mô hình GVHD của chuột dị sinh (Valzasina B et al., (2005) Blood, 105(7): 2845-51; Blazar BR et al., (2003) Blood, 101(9): 3741-8), là một sự kiện không được quan sát thấy trong nghiên cứu này.

Bảng 10: Thời gian sống sót trung bình (tính theo ngày) của các nhóm xử lý được chỉ ra

Xử lý	Chất dẫn thuốc	Enbrel [®]	1D4 (1mg/kg)	1D4 (10mg/kg)
Sự sống sót trung bình (ngày)	11,5	20,5	42	47,5

Chất dẫn thuốc: duy nhất PBS. 1D4: kháng thể GBR 830-1D4; Enbrel[®] là sản phẩm lâm sàng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đối kháng hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người chứa CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và chứa CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, và CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 6.
2. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó là kháng thể ở chuột, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm tương thích với người.
3. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 7, 58, 59, 79 và 80; hoặc bao gồm vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng có mức tương đồng ít nhất là 80% với vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 7, 58, 59, 79 hoặc 80.
4. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NOS: 35, 36, 37 và 38; hoặc bao gồm vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng có mức tương đồng ít nhất là 80% với vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 35, 36, 37 hoặc 38.
5. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nặng là sản phẩm hoặc có nguồn gốc từ gen của người được chọn từ nhóm bao gồm IGHV2-70*10 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 19, IGHV2-70*11 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, IGHV2-70*13 có

trình tự axit amin SEQ ID NO: 21, IGHV2-5*09 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 22, và IGHV2-70*11 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 23.

6. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nặng là sản phẩm hoặc có nguồn gốc từ gen của người IGHV2-70*10 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 19 và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nặng bao gồm ít nhất một cái biến axit amin từ vùng khung thay đổi chuỗi nặng tương ứng của kháng thể ở chuột tương ứng.

7. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 32 và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nặng bao gồm ít nhất một cái biến axit amin từ vùng khung thay đổi chuỗi nặng tương ứng của kháng thể ở chuột tương ứng.

8. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 6 hoặc 7 mà đã được làm tương thích với người, trong đó cái biến axit amin bao gồm thay thế axit amin ở vị trí axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 23, 35b, 48, 50, 60, và 62, trong đó vị trí axit amin của mỗi thành viên của nhóm được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat.

9. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, 60, 86, 87 và 89; hoặc vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ có mức tương đồng ít nhất là 80% với vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NOS: 8, 60, 86, 87 và 89.

10. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 45, 46, 47 và 49; hoặc vùng không CDR có mức tương đồng ít nhất là 80% với vùng không CDR của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ của trình tự chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 45, 46, 47 hoặc 49.

11. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm hoặc có nguồn gốc từ gen của người được chọn từ nhóm bao gồm IGKV3-11*01 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 24, IGKV1-39*10 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 25, IGKV1D-39*01 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 26, IGKV3-11*02 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 27 và IGKV3-20*10 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 28.

12. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó bao gồm vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ là sản phẩm hoặc có nguồn gốc từ gen của người IGHV3-11*10 (SEQ ID NO: 24) và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ này bao gồm ít nhất một cải biến axit amin từ vùng khung tương ứng của vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể ở chuột tương ứng.

13. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 39 và trong đó vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ này bao gồm ít nhất một cải biến axit amin từ vùng khung thay đổi chuỗi nhẹ tương ứng của kháng thể ở chuột tương ứng.

14. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 12 hoặc 13 đã được làm tương thích với người, trong đó cải biến axit amin bao gồm thay thế axit amin ở vị trí axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56, và 71, trong đó vị trí axit amin của mỗi thành viên của nhóm được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat.

15. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 12 hoặc 13 đã được làm tương thích với người, trong đó cải biến axit amin bao gồm sự khuyết axit amin ở vị trí axit amin 31, trong đó vị trí axit amin được biểu thị theo hệ thống đánh số Kabat.

16. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó bao gồm: (a) trình tự chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 37 hoặc SEQ ID NO: 38; và (b) trình tự chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 47.

17. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó bao gồm: (a) trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 58 hoặc SEQ ID NO: 59; và (b) trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 60.

18. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 17, trong đó nó còn chứa các vùng ổn định chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ trong đó vùng ổn định chuỗi nặng của người được chọn từ nhóm gồm các globulin miễn dịch của người gồm IGHG1, IGHG1 không được fucosyl hoá và IGHG4.

19. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 18, trong đó kháng thể này được chọn từ nhóm: kháng thể hoá trị một, kháng thể với chiều dài đầy đủ, đoạn kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', Fab-SH, Fd, Fv, F(ab')₂, scFv, các dime chuỗi đơn Fv lưỡng đặc hiệu, các diabody, các triabody và scFv dung hợp về mặt di truyền với kháng thể tương tự hoặc kháng thể kháng.

20. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 18, trong đó kháng thể này bao gồm vùng Fc biến thể Fc có ít nhất một cải biến axit amin so với vùng Fc của kháng thể gốc, trong đó kháng thể này có vùng Fc biến thể thay đổi có chức năng cảm ứng thay đổi so với kháng thể gốc.

21. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 20, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó gắn kết với OX40 của người với ái lực là 110nM hoặc nhỏ hơn.

22. Axit nucleic đã phân lập mã hóa kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 21.

23. Vật truyền chứa axit nucleic đã phân lập theo điểm 22.

24. Tế bào chủ chứa axit nucleic đã phân lập theo điểm 22 hoặc vật truyền theo điểm 23.

25. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn của nó mà gắn kết với OX40 của người bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 24 để sao cho axit nucleic được biểu hiện và kháng thể được sản xuất.

26. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 21 và chất mang được dụng.

27. Chế phẩm theo điểm 26, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoạt chất được dụng khác bao gồm chất đối kháng với OX40 của người, chất làm giảm đau và chất ức chế miễn dịch.

28. Thẻ tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 21 được liên kết với chất trị liệu.

29. Bộ kit chứa kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 21 dùng để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40.

30. Bộ kit chứa chế phẩm theo điểm 26 hoặc 27 dùng để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40.

31. Bộ kit chứa thẻ tiếp hợp miễn dịch theo điểm 28 dùng để điều trị rối loạn thông qua trung gian OX40.

Danh mục trình tự

<110> Glenmark Pharmaceutical SA

<120> Các kháng thể đối kháng gắn kết với OX40, phương pháp sản xuất và các sản phẩm chứa nó

<130> 17741/US

<150> US 61/506,491

<151> 2011-07-11

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> chuỗi nặng CDR 1 của 1D4

<400> 1

Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly
1				5					10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> chuỗi nặng CDR 2 của 1D4

<400> 2

Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys
1				5		

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> chuỗi nặng CDR 3 của 1D4

<400> 3

Ala	Arg	Ile	Asp	Trp	Asp	Gly	Phe	Ala	Tyr
1				5					10

<210> 4

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR 1 của 1D4

<400> 4

Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR 2 của 1D4

<400> 5

Ala Thr Ser
 1

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

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR 3 của 1D4

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng của 1D4

<400> 7

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Gly Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ của 1D4

<400> 8

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala 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 Asn Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 9
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> Trình tự ADN của trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng của 1D4

<400> 9
 caggtgacgc tgaaggagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg
 60

acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt
 120

cagccttcag ggaagggctc ggagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgataagtac
 180

tataacacag ccctgaagag cgggctcaca atctccaagg atacctcaa aaaccaggtc
 240

tctctcaaga tcgccagtgt ggacactaca gatactgcca catactactg tgctcgaata
 300

gactgggacg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc ctca
 354

<210> 10
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> Trình tự ADN của trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ của 1D4

<400> 10
 cagattgtac tgactcagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca
 60

atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga
 120

tcctcccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc
 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcaacagagt ggaggctgaa
 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtg agtagtaacc cgtggacgtt cgggtggaggc
 300

accaagctgg agataaaa
318

<210> 11
<211> 186
<212> PRT
<213> Người

<220>
<223> miễn ngoại bào OX40 ở người (các axit amin 29-214 của P43489)
<400> 11

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
65 70 75 80

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

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
130 135 140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr
145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr
165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
180 185

<210> 12
<211> 277
<212> PRT
<213> Người

<220>
<223> thụ thể OX40 của người (P43489)

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Ala Lys Ile
 275

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

<220>
 <223> chuỗi nặng mở rộng CDR 1 của 1D4

<400> 13

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
 1 5 10

<210> 14
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> chuỗi nặng mở rộng CDR 2 của 1D4

<400> 14

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 1 5 10 15

Leu Lys Ser

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> chuỗi nặng mở rộng CDR 3 của 1D4
 <400> 15

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> chuỗi nhẹ mở rộng CDR 1 của 1D4
 <400> 16

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> chuỗi nhẹ mở rộng CDR 2 của 1D4
 <400> 17

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5 10

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt

<220>
 <223> chuỗi nhẹ mở rộng CDR 3 của 1D4
 <400> 18

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <223> IGHV2-70*10 ở người

<400> 19

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 20
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <223> IGHV2-70*01 ở người

<400> 20

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> Người

<220>
<223> IGHV2-70*13 ở người

<400> 21

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <223> IGHV2-5*09 ở người

<400> 22

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Gly Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala His Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 23
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Người

<220>

<223> IGHV2-70*11 ở người

<400> 23

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Người

<220>

<223> IGKV3-11*01 ở người

<400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <223> IGKV1-39*01 ở người

<400> 25

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Người

<220>

<223> IGKV1D-39*01 ở người

<400> 26

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Người

<220>

<223> IGKV3-11*02

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> Người

<220>
<223> IGKV3-20*01 ở người

<400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Vùng thay đổi chuỗi nặng VH1

<400> 29

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Vùng thay đổi chuỗi nhẹ VL1

<400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 31
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH1-VL1 scFv cDNA

<400> 31
 caggtcacac tgaaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccaccagac actgaccctg
 60

acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc acaagcggca tgggcgtgtc ctggatcaga
 120

cagcctcctg gcaaggccct ggaatggatc gcccggattt ggtgggacga cgacaagtac
 180

tacagcacca gcctgaaaac ccggctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg
 240

gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgctg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc
 300

gactgggacg gcttcgccta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtgtc tagcggaggc
 360

ggaggatctg gcggcggagg aagtggcgga gggggatctg agatcgtgct gacacagagc
 420

cccgccaccc tgtctctgag ccctggcgaa agagccaccc tgagctgtag agccagcagc
 480

agcgtgtcct actacctggc ctggtatcag cagaagcccg gccaggctcc ccggctgctg
 540

atctacgcca ccagcaatcg ggccacaggc atccctgcca gattttctgg cagcggctcc
 600

ggcaccgact tcaccctgac catctccagc ctggaacccg aggacttcgc cgtgtactac
 660

tgccagcagt ggtccagcaa cccctggaca tttggccagg gcaccaaggt ggaaatcaag
720

<210> 32

<211> 448

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng VH1 IGHG1

<400> 32

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 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> 33
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng VH2 IGHG1

<400> 33

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 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> 34

<211> 448

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng VH3 IGHG1

<400> 34

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 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> 35
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng VH4 IGHG1

<400> 35

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 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> 36

<211> 448

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng VH5 IGHG1

<400> 36

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 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> 37
<211> 448
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng VH6 IGHG1

<400> 37

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 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> 38
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng VH7 IGHG1

<400> 38

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 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> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ VL1

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 40
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ VL2

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 41
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ VL3

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 42
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ VL4

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 43
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ VL5

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ VL6

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 45
<211> 213
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ VL7

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln 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> 46

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ VL8

<400> 46

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gln 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> 47

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ VL9

<400> 47

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gln 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> 48
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ VL10

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gln 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> 49
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ VL11

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gln 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> 50
<211> 448
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng của thể khảm 1D4

<400> 50

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Gly Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 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> 51
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ của thể khảm 1D4

<400> 51

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala 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 Asn Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 52
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Chuột cống

<220>
 <223> miễn ngoại bào OX40 của chuột

<400> 52

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
 1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
 20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr
 35 40 45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn
 50 55 60

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp
65 70 75 80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser
100 105 110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser
115 120 125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys
130 135 140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr
145 150 155 160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr
165 170 175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
180 185 190

<210> 53
<211> 191
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> thể khảm miễn ngoại bào OX40 của chuột-người RHRR

<400> 53

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp
65 70 75 80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser
100 105 110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser
115 120 125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys
130 135 140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr
145 150 155 160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr
165 170 175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
180 185 190

<210> 54

<211> 190

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> thể khâm miễn ngoại bào OX40 của chuột-người RHHH

<400> 54

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp
65 70 75 80

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

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly
100 105 110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys
115 120 125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala
145 150 155 160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln
165 170 175

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

<210> 55
<211> 187
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> thể khảm miễn ngoại bào OX40 của chuột-người HHRR

<400> 55

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Gln
65 70 75 80

Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser His Lys Leu Gly
85 90 95

Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Ser Asn
100 105 110

Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile
115 120 125

Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser
130 135 140

Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro
145 150 155 160

Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro
165 170 175

Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro
180 185

<210> 56
<211> 189
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> thể khảm miễn ngoại bào OX40 của chuột-người RRHH

<400> 56

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys
20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn
50 55 60

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp
65 70 75 80

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

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly
100 105 110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys
115 120 125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala
145 150 155 160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln
165 170 175

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg
180 185

<210> 57
<211> 445
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng VH6 IGHG4 S228P

<400> 57

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

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 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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
305 310 315 320

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> 58

<211> 118

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miễn thay đổi chuỗi nặng VH6

<400> 58

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 118
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miễn thay đổi chuỗi nặng VH7

<400> 59

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 106
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miễn thay đổi chuỗi nhẹ VL9

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 61
<211> 354
<212> DNA
<213> Nhân tạo

<220>
<223> trình tự mã hóa ADN miễn thay đổi chuỗi nặng VH6

<400> 61
caggtcacac tgaaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccacccagac actgaccctg
60

acctgcagct tcagcggcctt cagcctgagc acaagcggca tgggcgtggg ctggatcaga
120

cagcctcctg gcaaggccct ggaatggatc gcccatatTTT ggtgggatga tgataaatat
180

tataacaccg ccctgaaaac ccgcctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg
240

gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc
300

gactgggacg gcttcgccta ttggggccag ggaaccctgg tgaccgtgag cagc
354

<210> 62

<211> 354

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> trình tự mã hóa ADN miền thay đổi chuỗi nặng VH7

<400> 62

caggtcacac tgaaagagtc tggacccgcc ctggtcaagc ccaccagac actgaccctg
60

acctgcagct tcagcggctt cagcctgagc acaagcggca tgggcgtggg ctggatcaga
120

cagcctcctg gcaaggccct ggaatggctc gccacatTTT ggtgggatga tgataaatat
180

tataacaccg ccctgaaaac ccgcctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg
240

gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc
300

gactgggacg gcttcgccta ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc
354

<210> 63

<211> 318

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> trình tự mã hóa ADN miền thay đổi chuỗi nhẹ VL9

<400> 63

gagatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga aagagccacc
60

ctgagctgta gagccagcag cagcgtgtcc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc
120

caggcgccgc gcccgtagat ttatgcgacc agcaatcggg ccacaggcat ccctgccaga
180

ttttctggca gcggctccgg caccgactac accctgacca tctccagcct ggaacccgag
240

gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg tccagcaacc cctggacatt tggccagggc
300

accaaagtgg aaattaaa
318

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Chuột nhất

<220>
<223> chuỗi nặng CDR 1 của VH6

<400> 64

Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly
1				5					10

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhất

<220>
<223> chuỗi nặng CDR 2 của VH6

<400> 65

Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys
1				5		

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Chuột nhất

<220>
<223> chuỗi nặng CDR 3 của VH6

<400> 66

Ala	Arg	Ile	Asp	Trp	Asp	Gly	Phe	Ala	Tyr
1				5					10

<210> 67
<211> 5
<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR 1 của VL9

<400> 67

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 68

<211> 3

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR 2 của VL9

<400> 68

Ala Thr Ser
1

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR 3 của VL9

<400> 69

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> chuỗi nặng mở rộng CDR 1 của VH6

<400> 70

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
1 5 10

<210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng mở rộng CDR 2 của VH6

<400> 71

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 1 5 10 15

Leu Lys Thr

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Chuột nhất

<220>

<223> chuỗi nặng mở rộng CDR 3 của VH6

<400> 72

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Chuột nhất

<220>

<223> chuỗi nhẹ mở rộng CDR 1 của VL9

<400> 73

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
 1 5 10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ mở rộng CDR 2 của VL9

<400> 74

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5 10

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> chuỗi nhẹ mở rộng CDR 3 của VL9

<400> 75

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr
1 5

<210> 76

<211> 44

<212> PRT

<213> Người

<220>

<223> modul 2 của miền ngoại bào OX40 ở người

<400> 76

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
1 5 10 15

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
20 25 30

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
35 40

<210> 77

<211> 118

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền thay đổi chuỗi nặng VH2

<400> 77

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 118
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miễn thay đổi chuỗi nặng VH3

<400> 78

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền thay đổi chuỗi nặng VH4

<400> 79

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền thay đổi chuỗi nặng VH5

<400> 80

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20

25

30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miễn thay đổi chuỗi nhẹ VL2

<400> 81

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 82
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miễn thay đổi chuỗi nhẹ VL3

<400> 82

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miễn thay đổi chuỗi nhẹ VL4

<400> 83

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 84
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miễn thay đổi chuỗi nhẹ VL5

<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miền thay đổi chuỗi nhẹ VL6

<400> 85

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr
20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 106
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> miền thay đổi chuỗi nhẹ VL7

<400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20

25

30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 87
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miễn thay đổi chuỗi nhẹ VL8

<400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 88
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miễn thay đổi chuỗi nhẹ VL10

<400> 88

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 89
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miễn thay đổi chuỗi nhẹ VL11

<400> 89

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

FIG. 1A

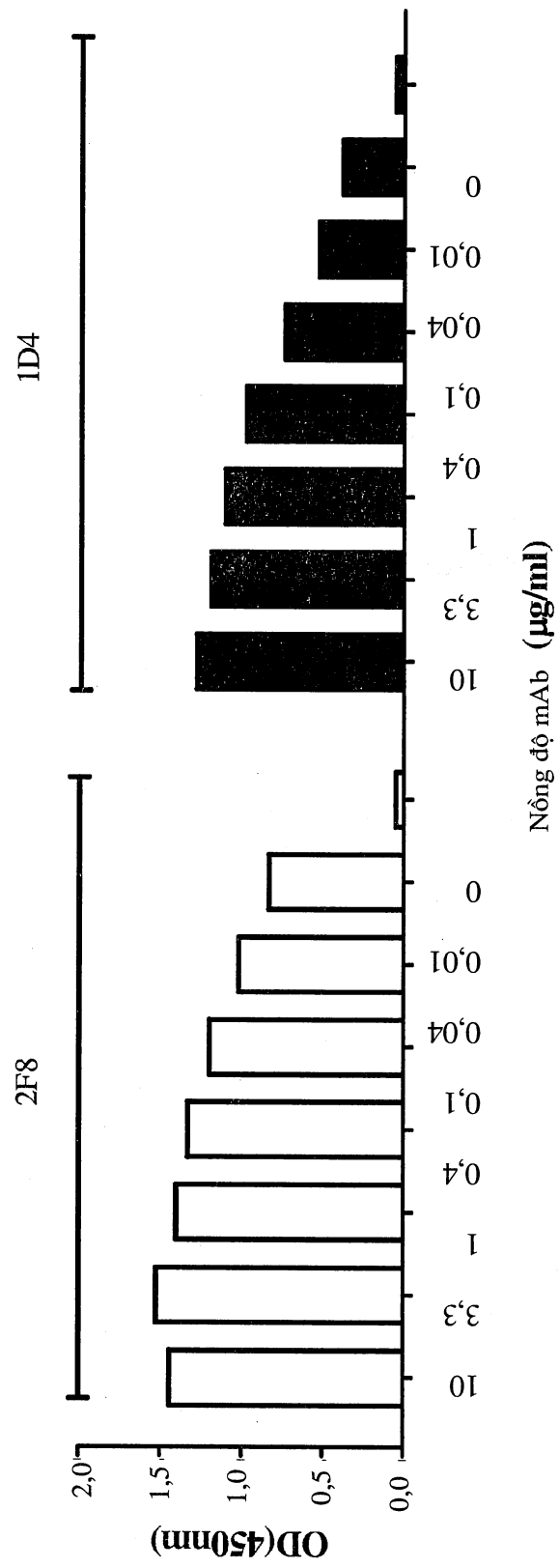


FIG. 1B

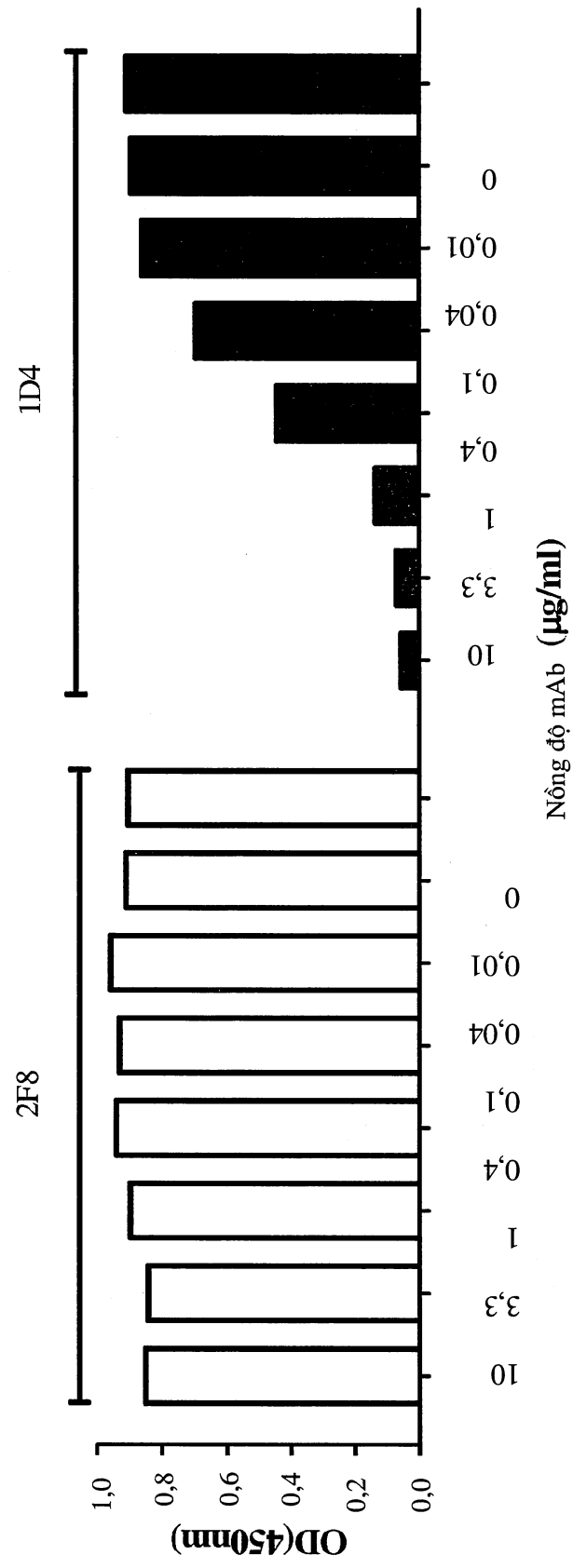


FIG. 2

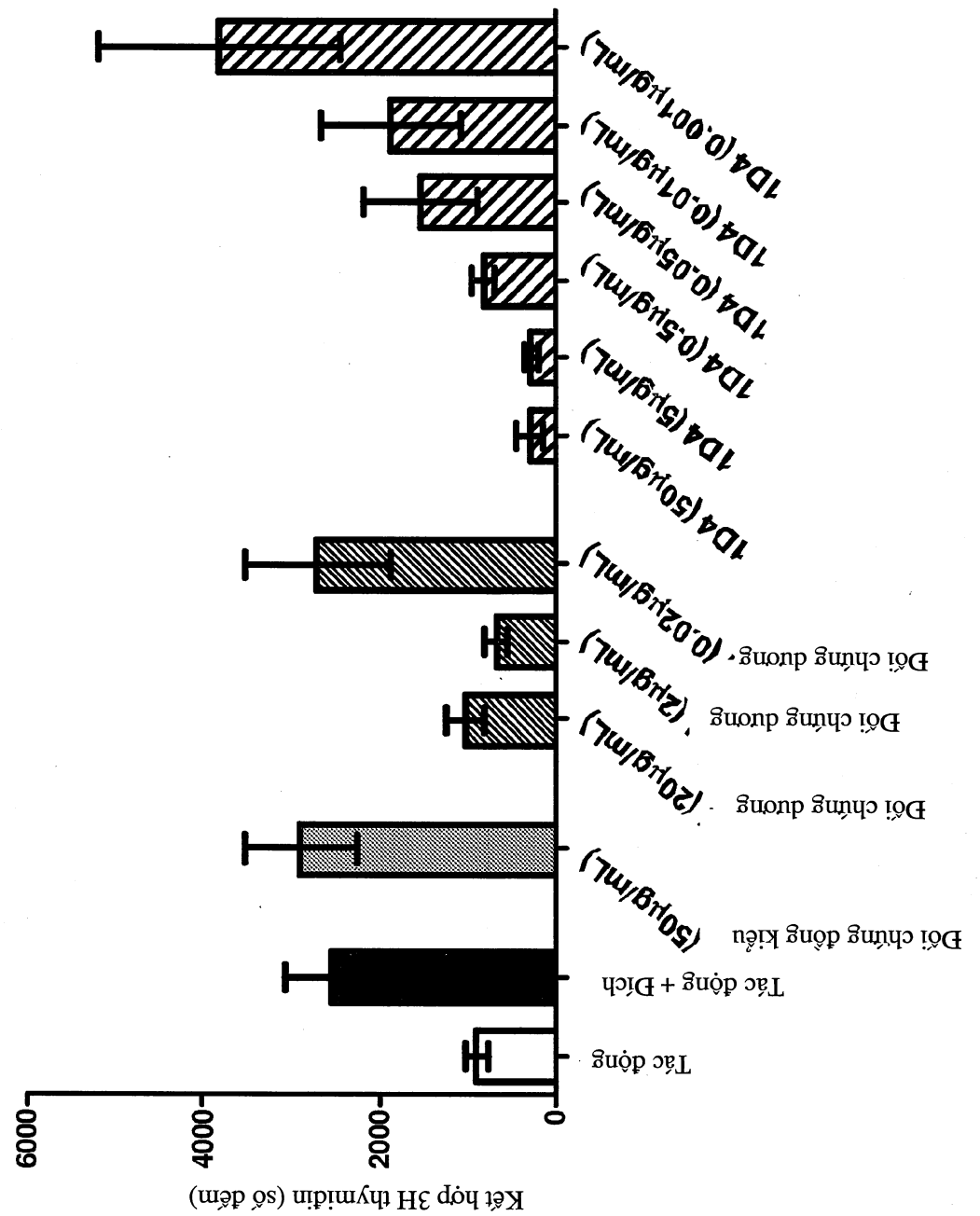


FIG. 3A

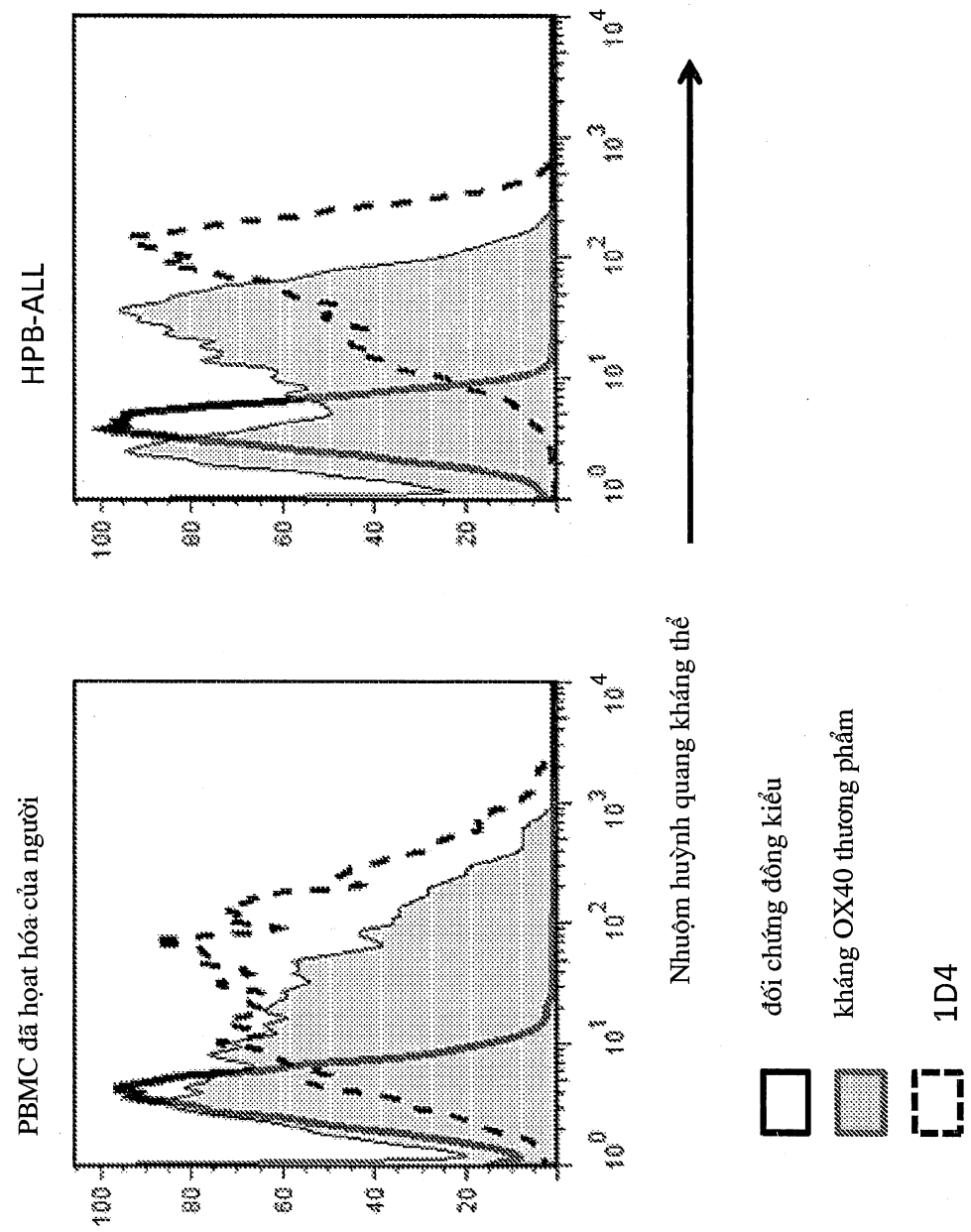


FIG. 3B

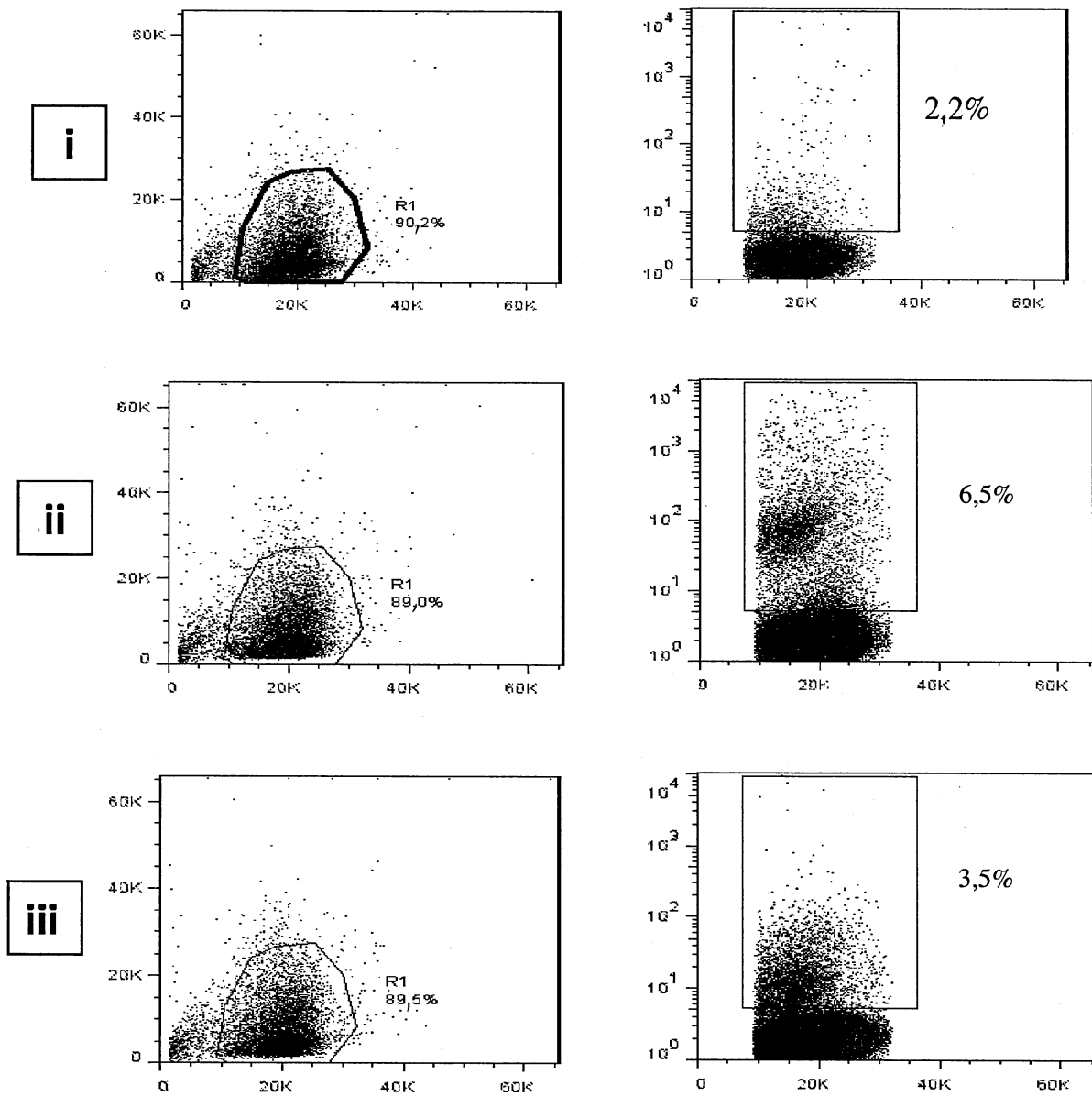


FIG. 4A

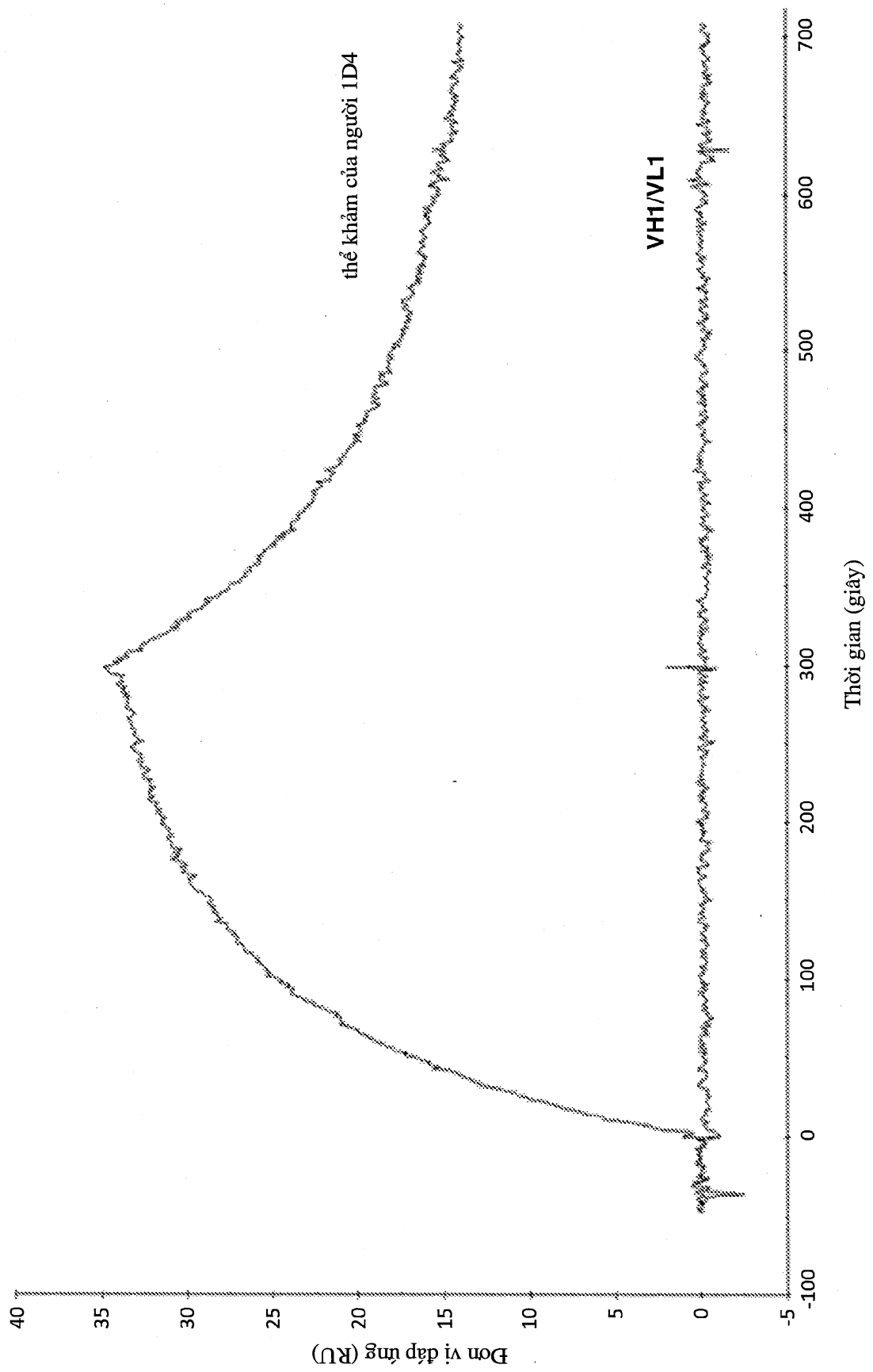


FIG. 4B

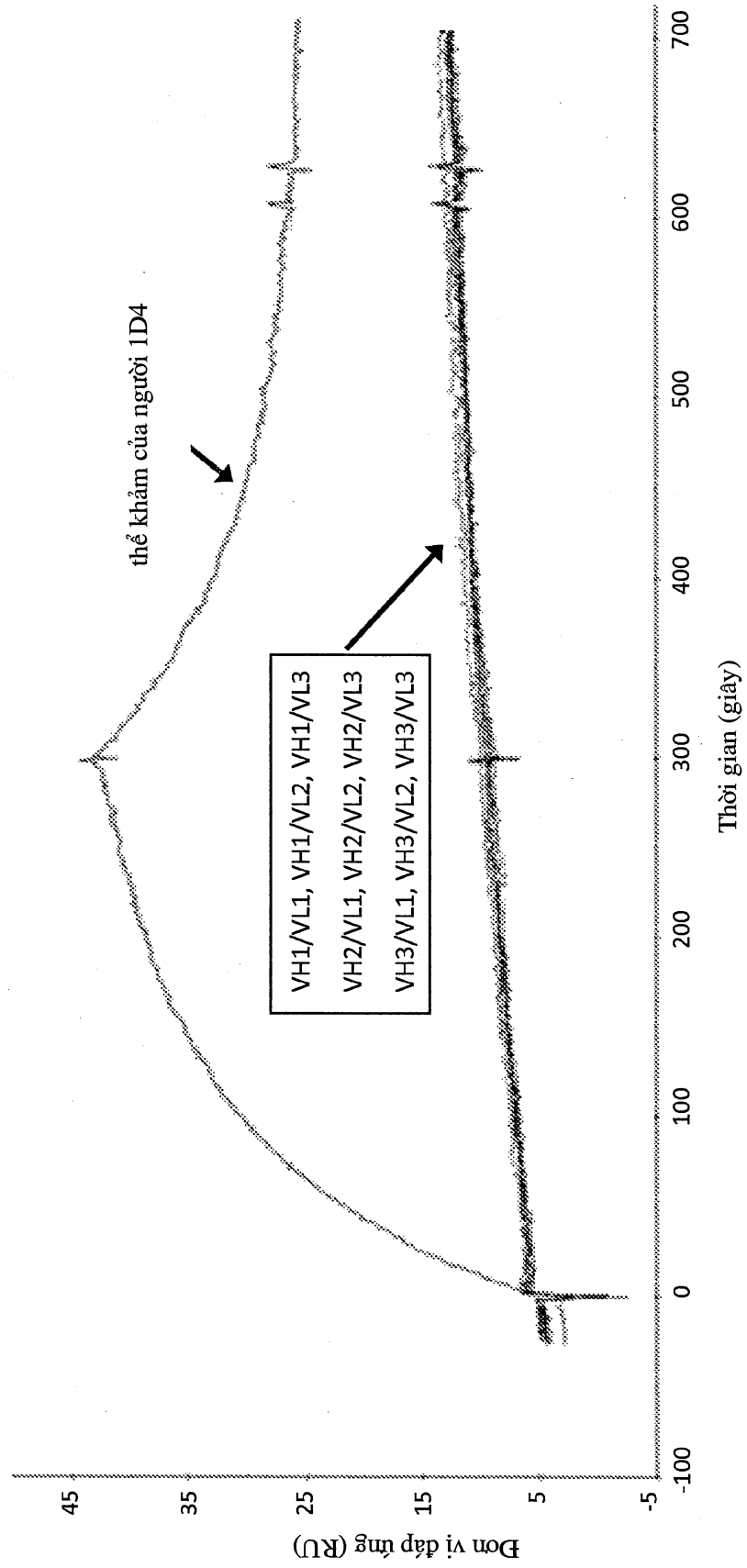


FIG. 4C

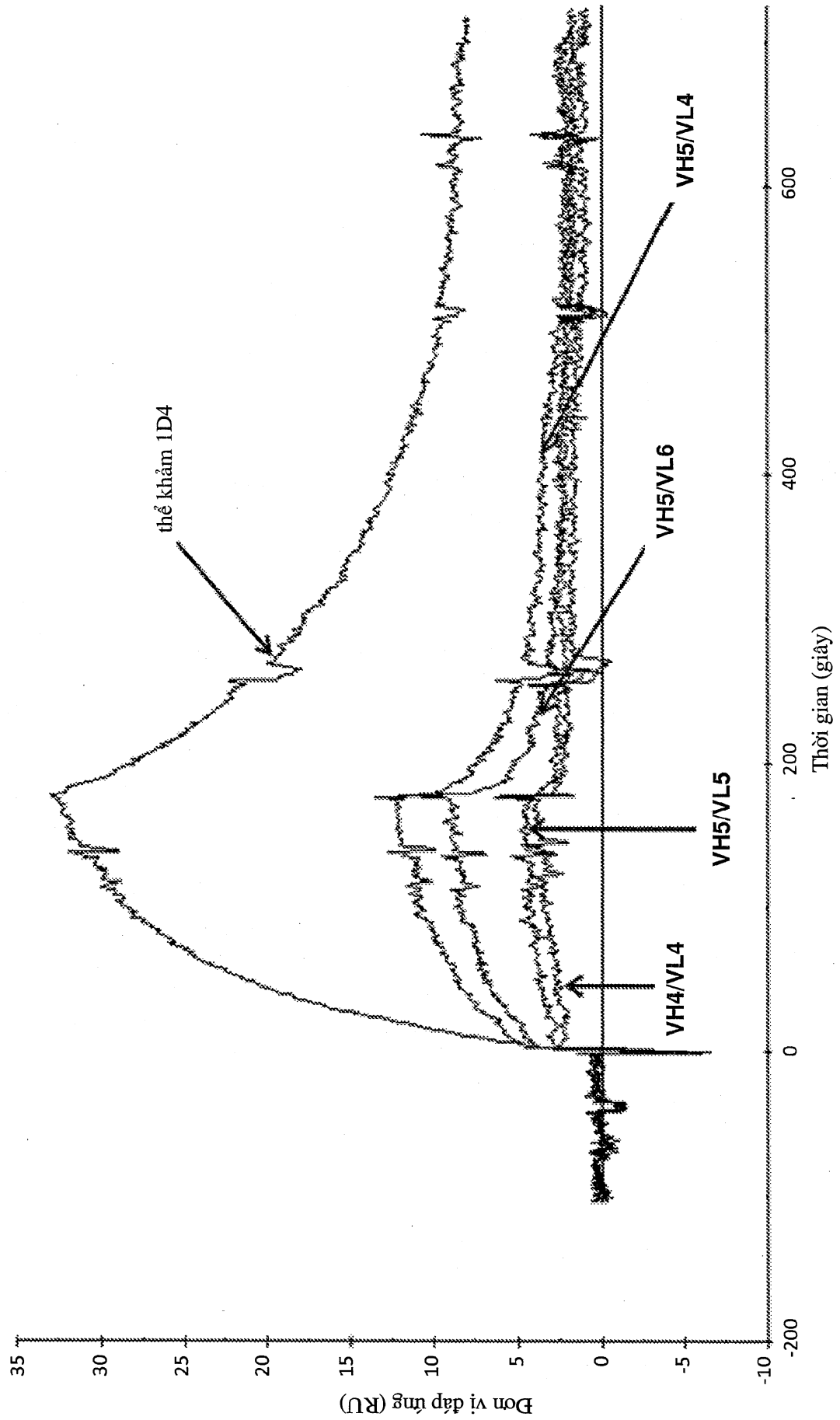


FIG. 4D

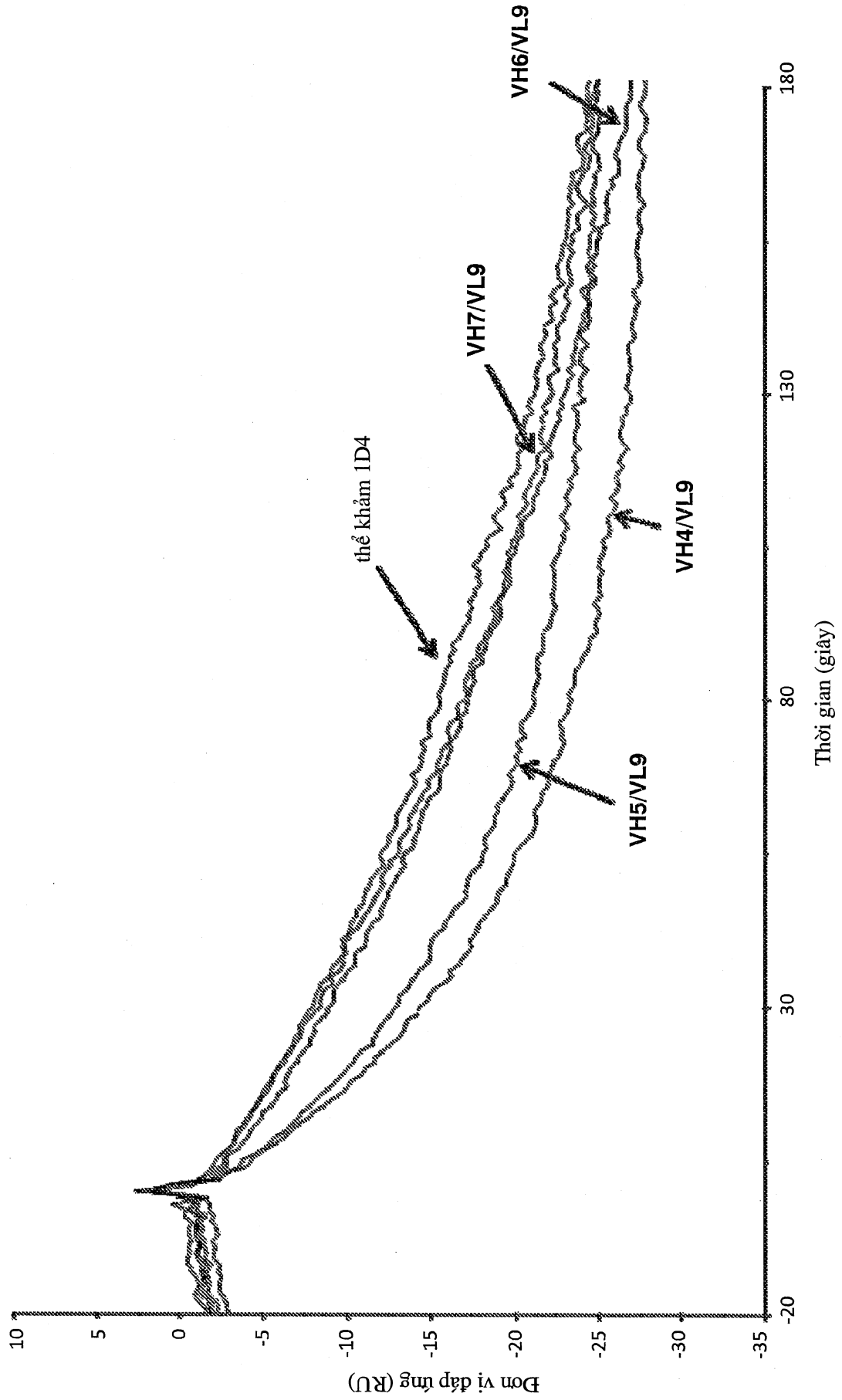


FIG. 4E

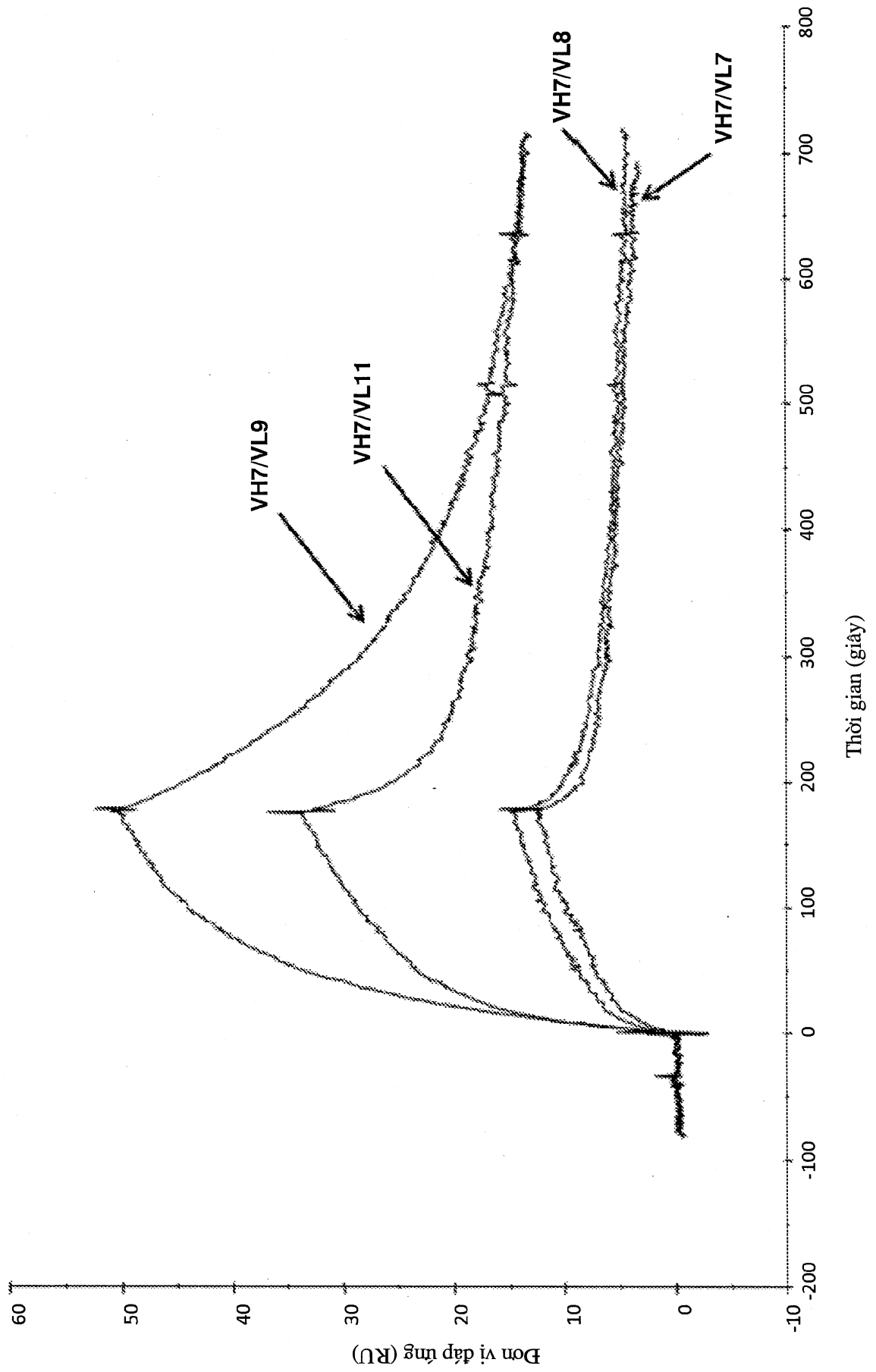
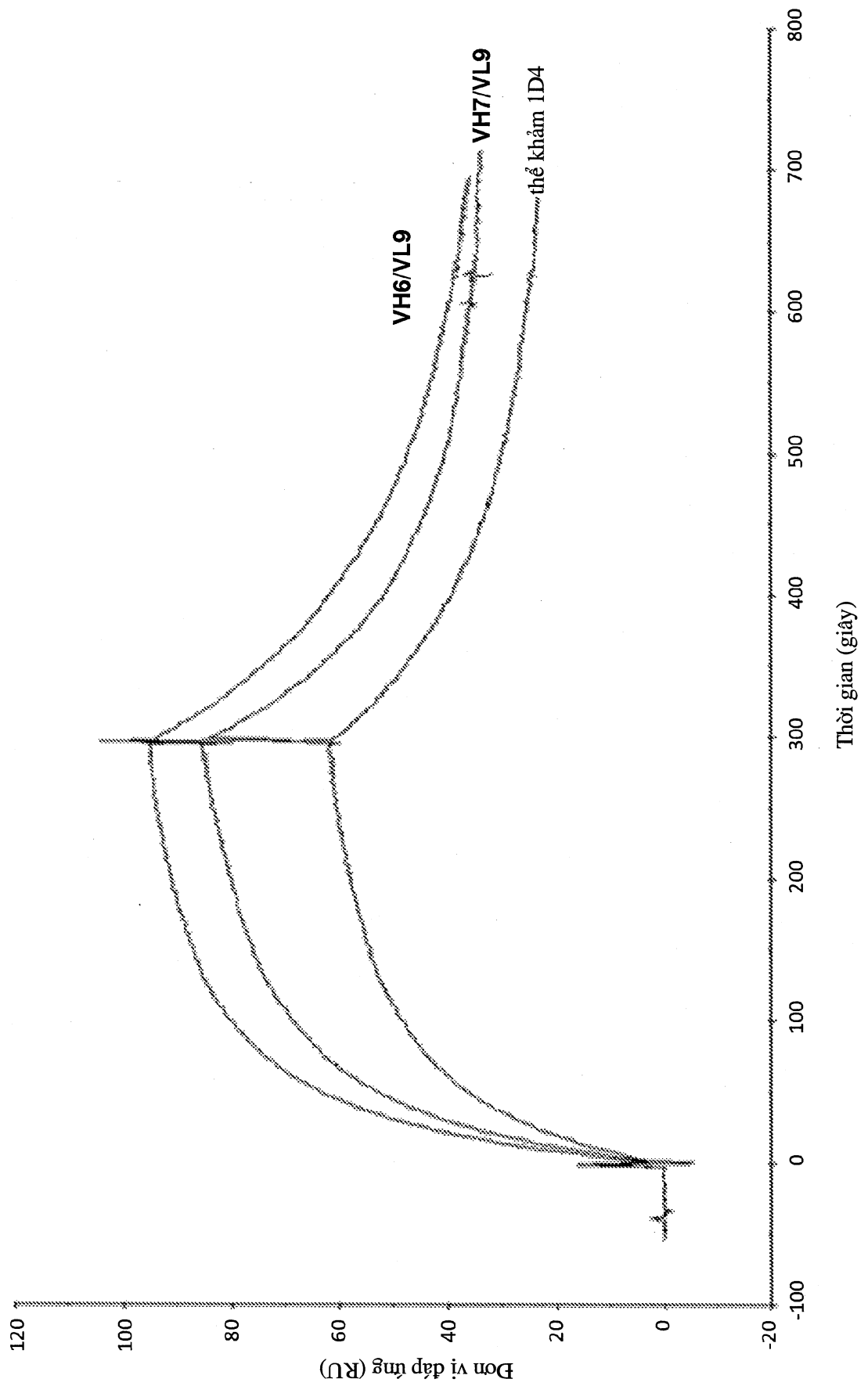


FIG. 4F



Kabat VH#

1D4 VH

1D4 VH

IGHV2-70*10 của người

VH1

VH2 [T23S]

VH3 [R50H]

VH4 [T23S/R50H]

VH5 [T23S/R50H/S60N/S62A]

VH6 [T23S/S35bG/R50H/S60N/S62A

VH7 [T23S/S35bG/I48L/R50H/S60N

[illegible]

FIG. 5B

	10	20	30	40	50	60	70
Kabat VL#	123456789012345678901234567890123456789012345678901234	123456789012345678901234567890123456789012345678901234	123456789012345678901234567890123456789012345678901234	123456789012345678901234567890123456789012345678901234	123456789012345678901234567890123456789012345678901234	123456789012345678901234567890123456789012345678901234	123456789012345678901234567890123456789012345678901234
1D4 VL	QIVLTQSPATLSASPGKEKVTMTCRASS	QIVLTQSPATLSASPGKEKVTMTCRASS	QIVLTQSPATLSASPGKEKVTMTCRASS	QIVLTQSPATLSASPGKEKVTMTCRASS	QIVLTQSPATLSASPGKEKVTMTCRASS	QIVLTQSPATLSASPGKEKVTMTCRASS	QIVLTQSPATLSASPGKEKVTMTCRASS
IGKV 3-11*01 của người	VL1	VL2 [L33M]	VL3 [F71Y]	VL4 [L33M/F71Y]	VL5 [L33M/L46P/L47W/F71Y]	VL6 [E1Q/L33M/L46P/L47W/F71Y]	VL7 [Y31del/L33M/F71Y]
	VL8 [Y31del/L33M/A34H/F71Y]	VL9 [Y31del/L33M/A34H/L46P/L47W/F71Y]	VL10 [Y31del/L33M/R54L/T56S/F71W]	VL11 [Y31del/L33M/A34H/R54L/T56S/F71Y]			

	80	90	100
Kabat VL#	5678901234567890123456789012345678901234567890123456a7	5678901234567890123456789012345678901234567890123456a7	5678901234567890123456789012345678901234567890123456a7
1D4 VL	INRVEAEDAATYYCCQWSSNP	INRVEAEDAATYYCCQWSSNP	INRVEAEDAATYYCCQWSSNP
IGKV 3-11*01 của người	VL1	VL2 [L33M]	VL3 [F71Y]
	VL4 [L33M/F71Y]	VL5 [L33M/L46P/L47W/F71Y]	VL6 [E1Q/L33M/L46P/L47W/F71Y]
	VL7 [Y31del/L33M/F71Y]	VL8 [Y31del/L33M/A34H/F71Y]	VL9 [Y31del/L33M/A34H/L46P/L47W/F71Y]
	VL10 [Y31del/L33M/R54L/T56S/F71Y]	VL11 [Y31del/L33M/A34H/R54L/T56S/F71Y]	

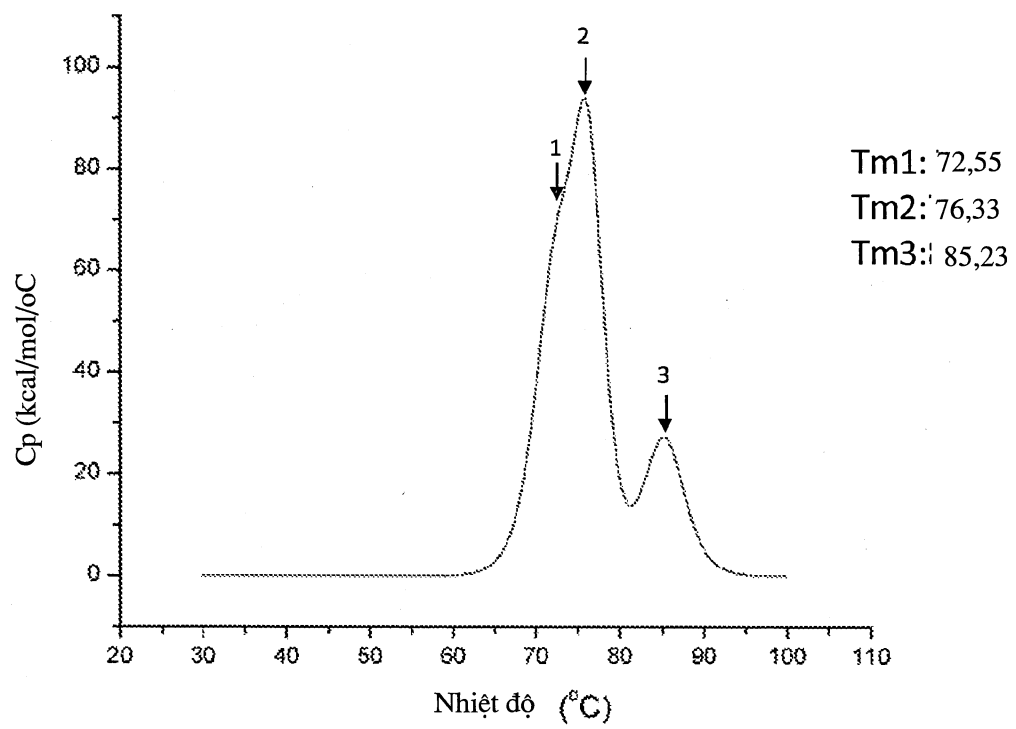
FIG. 6

FIG. 7

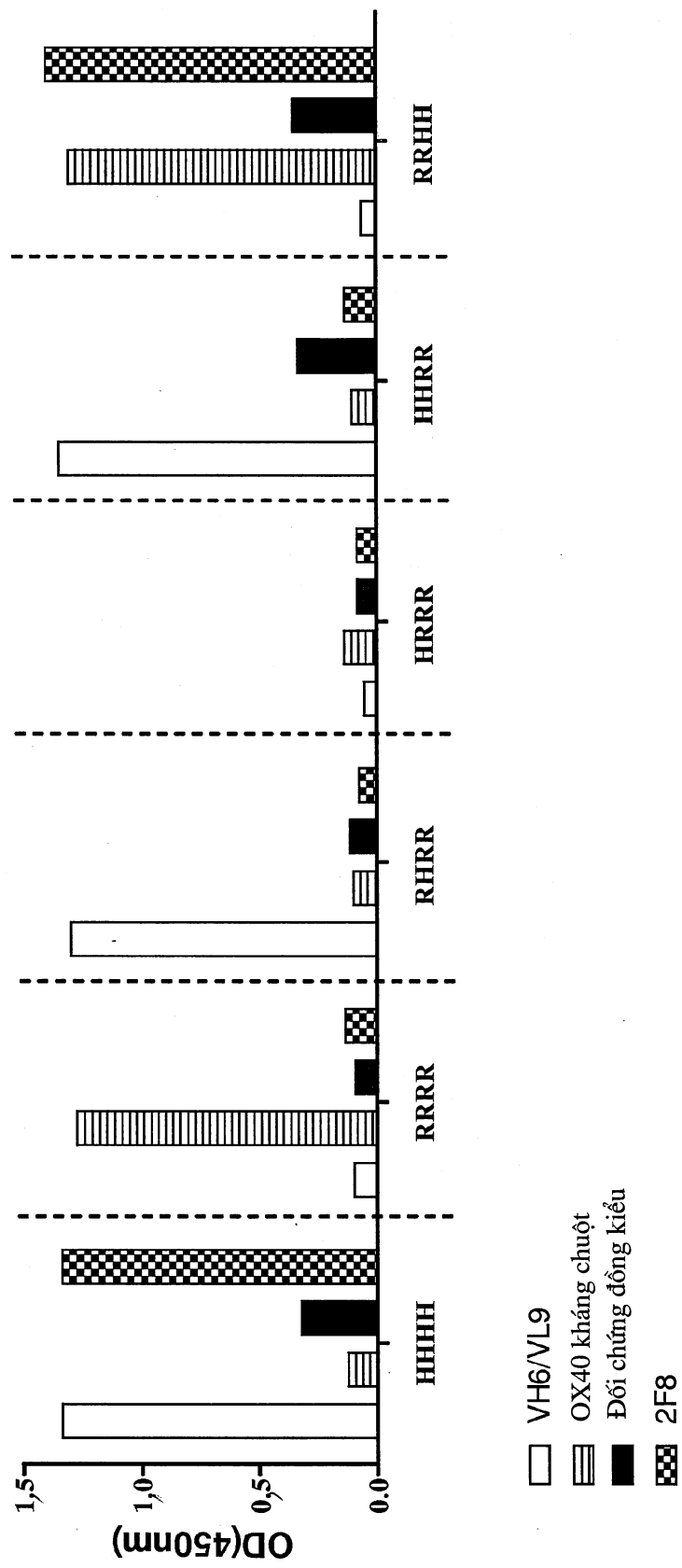
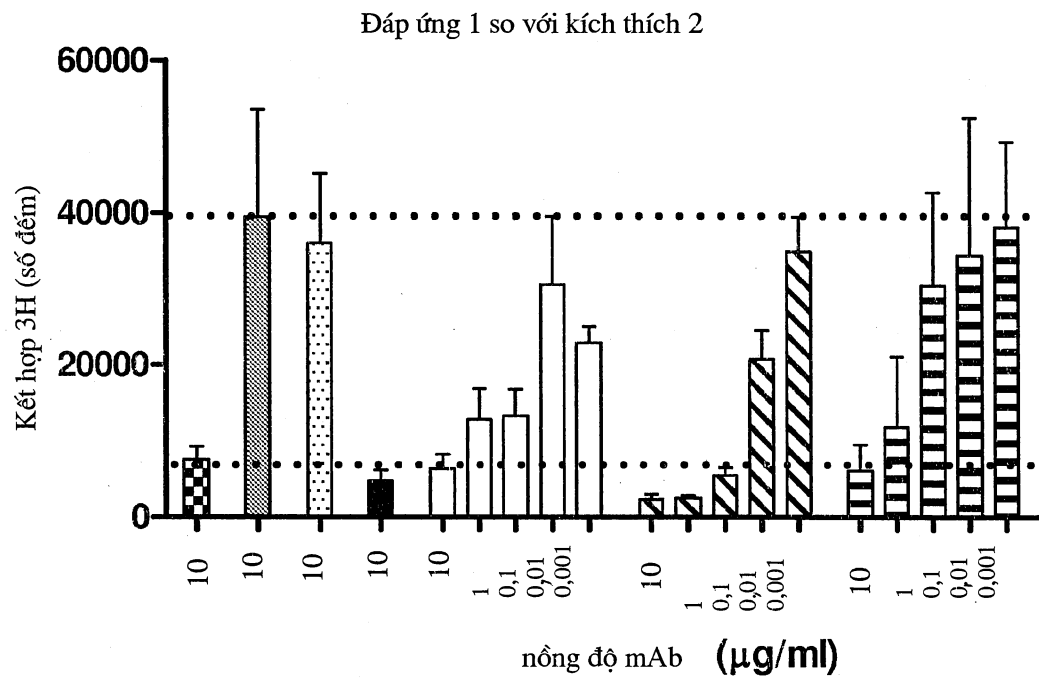
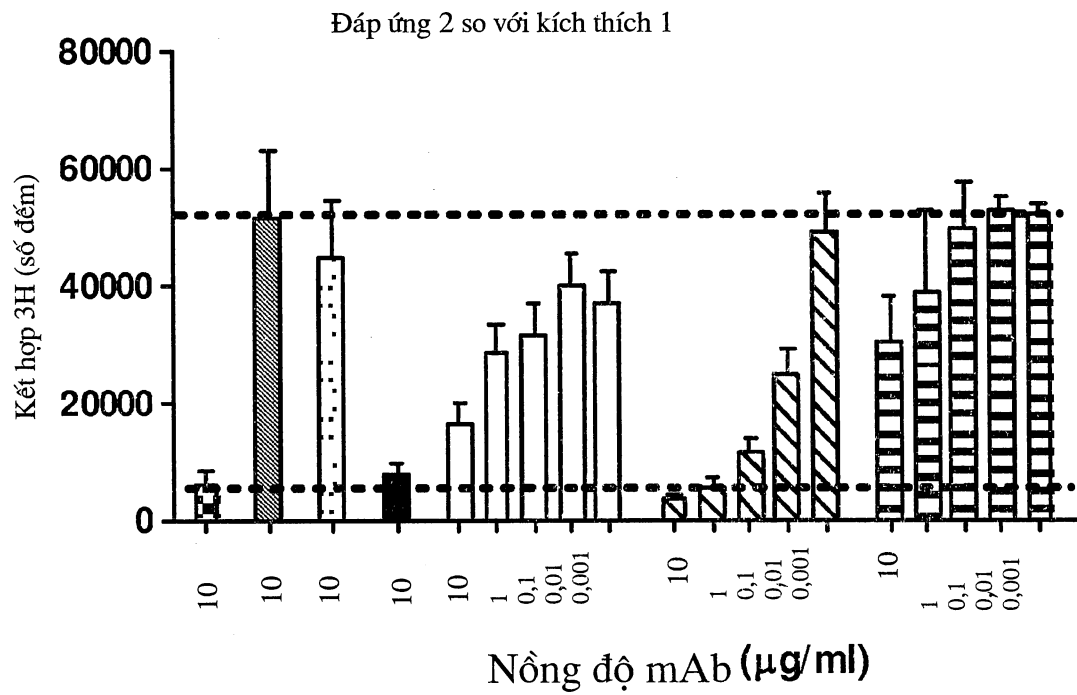


FIG. 8A

-  Đáp ứng 1 + Kích thích 1
-  Đáp ứng 1 + Kích thích 2
-  Đối chứng đồng kiểu
-  Đối chứng dương
-  VH6/VL9
-  VH6/VL9 không được fucosyl hóa
-  VH6/VL9 IGHG4 S228P

FIG. 8B

- Đáp ứng 2 + Kích thích 2
- Đáp ứng 2 + Kích thích 1
- Đối chứng đồng kiểu
- Đối chứng dương
- VH6/VL9
- VH6/VL9 không được fucosyl hóa
- VH6/VL9 IGHG4 S228P

FIG. 9

