



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027168

(51)⁷ A61K 39/395

(13) B

(21) 1-2015-03292

(22) 04/03/2014

(86) PCT/US2014/020064 04/03/2014

(87) WO2014/137962 12/09/2014

(30) 61/774,732 08/03/2013 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/12/2015 333A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) BEIDLER, Catherine Brautigam (US); BRIGHT, Stuart Willis (US); GIRARD, Daniel Scott (US); KIKLY, Kristine Kay (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT VỚI INTERLEUKIN-23 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người và được đặc trưng ở chỗ có ái lực cao, có các đặc tính chọn lọc và trung hòa. Kháng thể là hữu dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng tự miễn hoặc viêm được lựa chọn từ nhóm bao gồm, đa xơ cứng, viêm khớp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm ruột, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, hội chứng luput và chuyển hóa. Kháng thể cũng hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư. Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất kháng thể này và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với interleukin-23 (IL-23) của người và việc sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin-23 (IL-23) là xytokin heterodime được liên kết disulfit bao gồm dưới đơn vị p19 và p40. Nó là một phần của họ interleukin-12 (IL-12) của xytokin. IL-12 là xytokin heterodime khối lượng 70kDa bao gồm dưới đơn vị p40 và p35 được liên kết cộng hóa trị. IL-12 đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của đáp ứng miễn dịch bảo vệ bẩm sinh và miễn dịch thu được và trong sự giám sát khối u. IL-12 cũng liên quan đến đáp ứng viêm thông qua khả năng thúc đẩy các đáp ứng tế bào T hỗ trợ loại 1 (T helper type 1 -Th1). Tuy nhiên, vai trò chức năng của IL-12 trong đáp ứng viêm đã được đánh giá lại với sự phát hiện về xytokin liên quan, IL-23. IL-23 cũng bao gồm dưới đơn vị p40 như IL-12 nhưng nó được gắn cặp cộng hóa trị với dưới đơn vị p19. Rất nhiều thuốc thử được sử dụng để đánh giá vai trò của IL-12 được định hướng so với dưới đơn vị chung p40 của IL-12/IL-23, thấy rằng các hoạt tính trước đây được cho là của IL-12 có thể được trung gian qua IL-23. Sự phát triển của các chuột thiếu hụt IL-23 khiến các nhà nghiên cứu phân biệt được các hoạt tính của IL-12 và IL-23 và IL-23 được nhận diện là chất trung gian thiết yếu của đáp ứng tự miễn/viêm.

Thụ thể chức năng IL-23 là heterodime của dưới đơn vị IL-12R β 1, chung với thụ thể IL-12, và dưới đơn vị IL-23R. Thụ thể cho IL-23 có liên quan về mặt cấu trúc với Janus kinaza 2 (Jak2) và hoạt hóa một cách vượt trội STAT3, và hoạt hóa STAT4 ít hơn so với IL-12.

Thụ thể IL-23 được biểu hiện trên các tế bào T được hoạt hóa/nhớ và các tế bào giết tự nhiên (Natural Killer -NK). Các bạch cầu đơn nhân, các đại thực bào và các tế bào sợi nhánh cũng biểu hiện thụ thể IL-23 ở mức thấp. IL-23 hỗ trợ sự biệt hóa và duy trì của các tế bào T CD4⁺ tự nhiên vào tập con mới của các tế bào được gọi là các

tế bào Th17, phân biệt với các tế bào Th1 và Th2 thông thường. Các tế bào Th17 tạo ra interleukin-17A (IL-17A) và interleukin-17F (IL-17F). Các tế bào Th17 tạo ra nhiều nhân tố khác đã được biết là dẫn các đáp ứng viêm, bao gồm các nhân tố gây chết hoại khối u được biết là dẫn các đáp ứng viêm, bao gồm nhân tố gây chết hoại khối u alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nhân tố kích thích đại thực bào và bạch cầu hạt (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor -GM-CSF), CXCL1 và CCL20. Các tế bào NK và các tế bào lymphô bẩm sinh như các tế bào giống cảm ứng mô lymphô (LTi) biểu hiện thụ thể IL-23 và thụ thể mô côi liên quan đến axit retinoic (Retinoic-acid-related Orphan Receptor -ROR) gamma và tạo ra IL-17 đáp ứng với IL-23. IL-1 β và IL-23 cũng đồng kích thích tế bào T gamma-delta để thúc đẩy tạo ra IL-17 mà không cần gắn thụ thể tế bào T.

Có bằng chứng thực tế rằng các tế bào đáp ứng IL-23 có liên quan tới các bệnh viêm tự miễn và bệnh ung thư. Cụ thể, chất ức chế đặc hiệu IL-23 (đó là chất ức chế mà ức chế IL-23 nhưng không ức chế IL-12) có thể hữu dụng một cách đặc biệt là ức chế IL-23 mà không ảnh hưởng tới IL-12 được giả thuyết rằng để tối đa hóa lợi ích điều trị trong khi giảm đến mức tối đa nguy cơ ức chế sự bảo vệ của vật chủ.

Các kháng thể liên kết một cách đặc hiệu với dưới đơn vị p19 của IL-23 có tiềm năng làm các chất ức chế hữu dụng, xem, ví dụ, WO 2007/024846 và WO 2007/027714. Vấn đề với các kháng thể bộc lộ trong WO 2007/024846, ít nhất là có tiềm năng phản ứng chéo ở mô, cụ thể là, tiềm năng liên kết mô vồng mạc, là lo ngại về sự an toàn. Ngoài ra, các kháng thể bộc lộ trong WO 2007/024846, ít nhất là có các đặc tính vật lý-hóa học dưới mức tối ưu, ví dụ, tính hoàn toàn không ưa nước dẫn đến sự kết tụ, là rào cản lớn đối với việc sản xuất các kháng thể trên quy mô công nghiệp. Thêm vào đó, không có kháng thể hướng đích dưới đơn vị p19 của IL-23 đã được chấp thuận để dùng cho mục đích chữa bệnh.

Do đó, có nhu cầu đối với các kháng thể IL-23. Cụ thể, có nhu cầu đối với các kháng thể IL-23 liên kết với ái lực cao với dưới đơn vị p19 của IL-23, cụ thể là, IL-23 của người, và không liên kết với dưới đơn vị p40 của thành phần thuộc họ xytokin liên quan, IL-12. Cụ thể hơn, có nhu cầu đối với các kháng thể IL-23 liên kết với ái lực cao với dưới đơn vị p19 của IL-23 và không ức chế một cách đáng kể phản ứng chéo

ở mô, cụ thể là, phản ứng chéo ở mô võng mạc. Cũng có nhu cầu đối với các kháng thể IL-23 có các đặc tính vật lý-hóa học được dụng tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển, sản xuất hoặc tạo dạng bào chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR) và chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR), trong đó LCVR chứa các trình tự axit amin LCDR1, LCDR2, và LCDR3, và HCVR chứa các trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, và HCDR3, trong đó LCDR1 là SEQ ID NO:4, LCDR2 là SEQ ID NO:5, LCDR3 là SEQ ID NO:6, HCDR1 là SEQ ID NO:1, HCDR2 là SEQ ID NO:2, và HCDR3 là SEQ ID NO:3.

Theo phương án của sáng chế, kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) và chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR), trong đó trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO: 8 và trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO: 7.

Theo phương án khác của sáng chế, kháng thể bao gồm hai vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) và hai vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR), trong đó trình tự axit amin của mỗi LCVR là SEQ ID NO: 8 và trình tự axit amin của mỗi HCVR là SEQ ID NO: 7.

Trong phương án khác của sáng chế, kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 10 và trình tự axit amin của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 9.

Trong phương án khác của sáng chế, kháng thể bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, trong đó trình tự axit amin của mỗi chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 10 và trình tự axit amin của mỗi chuỗi nặng là SEQ ID NO: 9.

Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong đó chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

(LCVR) và chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR), trong đó LCVR bao gồm các vùng quyết định bổ sung LCDR1, LCDR2, và LCDR3, và HCVR bao gồm các vùng quyết định bổ sung HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và trong đó LCDR1 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO:4, LCDR2 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO:5, LCDR3 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO:6, HCDR1 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO:1, HCDR2 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO:2, và HCDR3 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO:3.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) và chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR), trong đó chuỗi LCVR gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8 và chuỗi HCVR gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 9.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, trong đó mỗi chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 và mỗi chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9.

Các trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế được thể hiện dưới đây.

SEQ ID NO				
Kháng thể	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	HCVR	LCVR
I	9	10	7	8
Kháng thể	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1
I	1	2	3	4

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người ở epitop cấu trúc trong các vị trí axit amin 81-99 và 115-140 của SEQ ID NO: 15.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người ở epitop cấu trúc trong các vị trí axit amin 81-99 và 115-140 của SEQ ID NO: 15, trong đó kháng thể tiếp xúc ở ít nhất các gốc axit amin 94P, 95S, 97L, 98P, 99D, 123W, 130S, 133P và 137W của SEQ ID NO: 15.

Trong phương án khác của sáng chế, kháng thể có lựa chọn đối với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người.

Khi được liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người, kháng thể theo sáng chế ngăn ngừa sự liên kết của IL-23 của người với dưới đơn vị IL-23 của thụ thể IL-23. Do đó, kháng thể theo sáng chế ức chế hoạt tính của IL-23 của người ở dưới đơn vị IL-23 của người của thụ thể IL-23.

Kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự liên kết của IL-23 của người với dưới đơn vị IL-12R β 1 của thụ thể IL-23 và do đó không ức chế hoạt tính của IL-23 của người ở dưới đơn vị IL-12R β 1 của thụ thể IL-23.

Kháng thể không liên kết theo cách có thể nhận thấy được đối với dưới đơn vị p40 có chung IL-23 và IL-12 của người.

Trong phương án khác của sáng chế, kháng thể có hoạt tính trung hòa đối với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người.

Trong phương án khác của sáng chế, kháng thể theo sáng chế có trị số IC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 90 pM. Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế có trị số IC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 74 pM. Các trị số IC₅₀ được đo trong thử nghiệm với tế bào lách của chuột *in vitro* như được mô tả trong phần “*In Vitro Neutralization of Human or Cynomolgus Monkey IL-23 by Antibody I in Murine Splenocytes*” trong Ví dụ 1.

Trong phương án khác của sáng chế, kháng thể theo sáng chế là chọn lọc và có hoạt tính trung hòa đối với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người.

Trong phương án khác của sáng chế, kháng thể theo sáng chế có hằng số cân bằng phân ly, K_D, là khoảng 10 pM đến khoảng 30 pM đối với IL-23 của người. Tốt

hơn là, kháng thể theo sáng chế có K_D khoảng 21 pM đối với IL-23 của người. Các trị số K_D được thiết lập bằng liên kết động học ở 37°C như được mô tả trong phần “Đo ái lực liên kết bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore cho kháng thể I” trong Ví dụ 1. Kháng thể theo sáng chế còn được mô tả đặc điểm với tỉ lệ k_{on} đối với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người là từ khoảng $2,2 \times 10^6 M^{-1}giây^{-1}$ tới khoảng $2,6 \times 10^6 M^{-1}giây^{-1}$. Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế có tỉ lệ k_{on} đối với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người là khoảng $2,43 \times 10^6 M^{-1}giây^{-1}$. Kháng thể theo sáng chế còn được mô tả đặc điểm với tỉ lệ k_{off} đối với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người từ khoảng $0,30 \times 10^{-4} giây^{-1}$ tới khoảng $0,70 \times 10^{-4} giây^{-1}$. Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế có tỉ lệ k_{off} đối với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người khoảng $0,52 \times 10^{-4} giây^{-1}$.

Kháng thể theo sáng chế liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người với ái lực cao. Cho mục đích bộc lộ của sáng chế, thuật ngữ “ái lực cao” đề cập đến K_D ít nhất khoảng 21 pM. Các trị số K_D được thiết lập bằng động học liên kết ở 37°C như được mô tả trong phần “Đo ái lực liên kết bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore đối với kháng thể I” trong Ví dụ 1.

Không giống các kháng thể trong tình trạng kỹ thuật liên kết với IL-23 của người, kháng thể theo sáng chế không ức chế theo cách có thể quan sát được sự phản ứng chéo ở mô. Cụ thể là, kháng thể theo sáng chế không liên kết theo cách có thể quan sát được với mô vồng mạc.

Kháng thể theo sáng chế có các đặc tính vật lý hóa học được dụng, bao gồm độ hòa tan được dụng trong các điều kiện phòng thí nghiệm và sinh lý, và độ ổn định hóa học và vật lý được dụng trong đó kháng thể duy trì ở dạng kết tụ monome và các kết tụ khối lượng phân tử cao (High Molecular Weight -HMW) rất ít quan sát thấy ở nhiều loại điều kiện khác nhau như được mô tả trong phần “Các đặc tính vật lý – hóa học của kháng thể IL-23” trong Ví dụ 1.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa kháng thể theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang được dụng, chất pha loãng hoặc tá được. Cụ thể hơn, được phẩm theo sáng chế còn bao gồm thêm một hoặc nhiều chất có tác dụng điều trị bổ sung.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng ở bệnh nhân, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hiệu quả của kháng thể

theo sáng chế, trong đó tình trạng là tình trạng tự miễn hoặc viêm được lựa chọn từ nhóm bao gồm, đa xơ cứng, viêm khớp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm ruột, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, hội chứng luput và chuyển hóa.

Sáng chế cũng đề xuất điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng ở bệnh nhân, bao gồm bước dùng cho bệnh nhân cần điều trị lượng hiệu quả của kháng thể theo sáng chế, trong đó tình trạng bệnh là ung thư.

Theo phương án của sáng chế, ung thư là khối u ác tính, ung thư ruột kết, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư phổi, ung thư vú hoặc ung thư dạ dày.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể theo sáng chế để sử dụng trong điều trị.

Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất kháng thể theo sáng chế để dùng trong điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng tự miễn hoặc viêm được lựa chọn từ nhóm bao gồm, đa xơ cứng, viêm khớp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm ruột, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, hội chứng luput và chuyển hóa.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể theo sáng chế để dùng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

Theo phương án của sáng chế, ung thư là khối u ác tính, ung thư ruột kết, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư phổi, ung thư vú hoặc ung thư dạ dày.

Sáng chế đề xuất việc dùng kháng thể theo sáng chế trong sản thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng được lựa chọn từ nhóm bao gồm, đa xơ cứng, viêm khớp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm ruột, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, hội chứng luput và chuyển hóa.

Sáng chế cũng đề xuất việc dùng kháng thể theo sáng chế trong sản thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

Theo phương án của sáng chế, ung thư là khối u ác tính, ung thư ruột kết, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư phổi, ung thư vú hoặc ung thư dạ dày.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế được mô tả trên đây.

Sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế, trong đó HCVR được mã hóa bởi SEQ ID NO: 11 và LCVR được mã hóa bởi SEQ ID NO: 12.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế, trong đó chuỗi nặng được mã hóa bởi SEQ ID NO: 13 và chuỗi nhẹ được mã hóa bởi SEQ ID NO: 14.

Polynucleotit theo sáng chế có thể ở dạng ARN hoặc ở dạng DNA, trong đó ADN bao gồm cADN, và ADN tổng hợp. ADN có thể là chuỗi đơn hoặc chuỗi kép. Các trình tự mã hóa mã hóa kháng thể theo sáng chế có thể khác nhau là kết quả của sự thừa hoặc thoái hóa mã di truyền.

Các polynucleotit mã hóa cho kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm: các trình tự chỉ mã hóa cho kháng thể, trình tự mã hóa cho kháng thể và trình tự mã hóa bổ sung như trình tự dẫn đầu hoặc trình tự kích thích bài tiết hoặc trình tự tiền protein; trình tự mã hóa cho kháng thể và trình tự không mã hóa, như các intron hoặc trình tự không mã hóa 5' và/hoặc 3' của trình tự mã hóa cho protein. Do đó, thuật ngữ "polynucleotit mã hóa kháng thể" bao gồm polynucleotit mà có thể bao gồm không chỉ các trình tự mã hóa protein mà còn bao gồm các polynucleotit bao gồm các trình tự mã hóa bổ sung và/hoặc trình tự không mã hóa.

Polynucleotit theo sáng chế có thể được biểu diễn trong tế bào vật chủ sau khi trình tự được liên kết hoạt động với trình tự điều khiển biểu hiện. Các vector biểu hiện là có thể sao chép một cách điển hình trong các sinh vật chủ ở dạng thể bổ sung hoặc phần kết hợp của ADN nhiễm sắc thể của vật chủ. Thông thường, các vector biểu hiện sẽ bao gồm các đánh dấu lựa chọn, ví dụ, tetracyclin, neomycin, và dihydrofolat reductaza, để cho phép dò các tế bào này được biến nạp với các trình tự ADN mong muốn.

Sáng chế đề xuất tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa phân tử ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ polypeptide có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và phân tử ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9, tế bào có khả năng biểu hiện kháng thể chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 9 và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 10.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất một cách dễ dàng trong các tế bào động vật có vú như tế bào CHO, NS0, HEK293 hoặc COS; trong tế bào vi khuẩn như *E. coli*, *Bacillus subtilis*, hoặc *Pseudomonas fluorescence*; hoặc trong các tế bào nấm mốc hoặc nấm men. Các tế bào vật chủ là được nuôi cấy, sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các vector chứa các trình tự polynucleotit quan tâm (đó là, các polynucleotit mã hóa các polypeptit của kháng thể và các trình tự kiểm soát biểu hiện) có thể được chuyển vào tế bào vật chủ bằng các phương pháp đã được biết đến rộng rãi, là khác nhau phụ thuộc vào loại tế bào vật chủ. Ví dụ, sự biến đổi canxi clorua thì thường được dùng cho các tế bào tiền nhân, trong khi việc xử lý bằng canxi phosphat hoặc điện chuyển có thể được sử dụng cho các tế bào vật chủ khác.

Các phương pháp làm tinh sạch protein khác nhau có thể được sử dụng và các phương pháp này là được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và được mô tả, ví dụ, trong tài liệu của Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) và trong tài liệu của Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, tái bản lần thứ 3, Springer, NY (1994).

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, quy trình này bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào vào vật chủ tái tổ hợp theo điểm 7 trong điều kiện sao cho kháng thể được biểu hiện; và
- b) thu hồi kháng thể được biểu hiện từ tế bào vật chủ.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 9 và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 10, quy trình bao gồm các bước:

- a) Nuôi cấy tế bào vào vật chủ tái tổ hợp chứa trình tự polynucleotit thứ nhất mã hóa trình tự polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 9 và trình tự polynucleotit thứ hai mã hóa trình tự polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 10, trong điều kiện sao cho trình tự polypeptit đã nêu được biểu hiện; và
- b) Thu hồi kháng thể từ tế bào vật chủ chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó trình tự polypeptit của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 9 và trình tự polypeptit của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của quy trình được mô tả trên đây, trình tự polynucleotit thứ nhất mã hóa trình tự polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 9 và trình tự polynucleotit thứ hai mã hóa trình tự polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 10 là một phần của cùng phân tử axit nucleic.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được sản xuất bởi phương pháp nêu trên.

Theo phương án khác, kháng thể được sản xuất bằng phương pháp nêu trên có hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, trong đó trình tự polypeptit của mỗi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 9 và trình tự polypeptit của mỗi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Kháng thể theo sáng chế là kháng thể IgG có bốn chuỗi axit amin (hai chuỗi “nặng” và hai chuỗi “nhẹ”) được liên kết chéo thông qua các liên kết disulfit trong và ngoài chuỗi. Khi được biểu hiện trong các hệ sinh học cụ thể, các kháng thể có trình tự Fc tự nhiên của người được glycosyl hóa trong vùng Fc. Các kháng thể cũng có thể được glycosyl hóa ở các vị trí khác.

Mỗi chuỗi nặng bao gồm HCVR đầu N và vùng cố định của chuỗi nặng (Heavy Chain Constant Region - “HCCR”). Các chuỗi nặng của người được phân loại là gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể tương ứng là

IgG, IgM, IgA, IgD, hoặc IgE. Các kháng thể IgG của người có thể được chia thành các lớp nhỏ, như, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế có phần Fc dẫn xuất từ vùng Fc của IgG₄ của người vì khả năng gắn kết với các cơ cấu gây viêm được trung gian bởi thụ thể Fc giảm hoặc để hoạt hóa sự bổ thể dẫn đến chức năng phản ứng lại kích thích giảm.

Tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế bao gồm phần PAA Fc IgG₄. Phần PAA Fc IgG₄ có đột biến từ serin thành prolin ở vị trí 223 (S223P; SEQ ID NO: 9), đột biến từ phenylalanin thành alanin ở vị trí 229 (F229A; SEQ ID NO: 9) và đột biến từ leuxin thành alanin ở vị trí 230 (L230A; SEQ ID NO: 9). Đột biến S223P là đột biến mấu chốt giúp ngăn ngừa sự tạo thành nửa kháng thể (hiện tượng trao đổi động lực của nửa phân tử trong kháng thể IgG₄). Các đột biến F229A và L230A còn làm giảm chức năng phản ứng lại kích thích vốn đã thấp của isotyp IgG₄ của người.

Mỗi loại chuỗi nặng cũng được đặc trưng bởi vùng cố định cụ thể với trình tự đã biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. Vùng cố định của chuỗi nặng bao gồm ba vùng (CH1, CH2, và CH3) đối với IgG.

Chuỗi nhẹ được phân loại là kappa hoặc lambda, mỗi loại được đặc trưng bởi vùng cố định cụ thể như đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm LCVR và vùng cố định của chuỗi nhẹ (Light Chain Constant Region -“LCCR”). Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế bao gồm chuỗi nhẹ kappa.

Vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ /chuỗi nặng tạo thành vị trí liên kết kháng thể. Vùng HCVR và LCVR có thể còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến đổi, được gọi thuật ngữ là các vùng quyết định bổ sung (“CDR”), cùng với các vùng bảo thủ hơn, được gọi là vùng khung (Framework Region -“FR”). Mỗi HCVR và LCVR bao gồm ba CDRs và bốn FRs, được bố trí từ đầu amino đến đầu cacboxy theo trật tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Ở đây, ba CDR của chuỗi nặng được đề cập là “HCDR1, HCDR2, và HCDR3” và ba CDR của chuỗi nhẹ được đề cập là “LCDR1, LCDR2 và LCDR3”. CDR chứa hầu hết các gốc tạo thành tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Hiện nay có ba hệ thống để phân CDR cho kháng thể được sử dụng cho mô tả trình tự. Định nghĩa CDR của Kabat (Kabat *et al.*, “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md.

(1991)) được dựa trên sự biến đổi trình tự của kháng thể. Định nghĩa CDR của Chothia (Chothia *et al.*, “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani *et al.*, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) được dựa trên cấu trúc ba chiều của kháng thể và địa hình học của vòng CDR. Các định nghĩa CDR của Chothia là giống với các định nghĩa CDR của Kabat ngoại trừ HCDR1 và HCDR2. Định nghĩa CDR của North (North *et al.*, “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations”, Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) được dựa trên sự truyền ái lực tập hợp với số lượng lớn các cấu trúc tinh thể.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cho các mục đích của sáng chế, sự kết hợp của ba phương pháp này được sử dụng để định nghĩa CDR. Trong trường hợp CDR chuỗi nhẹ, các định nghĩa về CDR của Kabat và Chothia được sử dụng. Trong trường hợp HCDR1, sự kết hợp các định nghĩa CDR của Kabat và Chothia được sử dụng. Theo định nghĩa của Kabat, HCDR1 bắt đầu sau xystein thứ nhất của chuỗi nặng tám gốc và có chiều dài là năm gốc, trong khi theo định nghĩa của Chothia, HCDR1 bắt đầu sau xystein này ba gốc và có chiều dài là 7 gốc. HCDR1 của kháng thể theo sáng chế được xác định bởi vị trí bắt đầu theo Chothia và vị trí kết thúc theo Kabat. Trong trường hợp HCDR2, các định nghĩa về CDR của Kabat được sử dụng. Trong trường hợp HCDR3, sự kết hợp giữa các định nghĩa của North, Kabat và Chothia về CDR được sử dụng. Định nghĩa của Kabat về HCDR3 bao gồm các gốc 95-102 của chuỗi nặng (SEQ ID NO: 13 cho kháng thể theo sáng chế) và điển hình là bắt đầu sau xystein ba gốc. Định nghĩa của Chothia về HCDR3 là giống với định nghĩa của Kabat. Định nghĩa của North về HCDR3 bao gồm các gốc 93-102 của chuỗi nặng (SEQ ID NO: 13 cho kháng thể theo sáng chế) và điển hình là bắt đầu ngay sau gốc xystein. HCDR3 của kháng thể theo sáng chế được xác định bởi North khởi đầu vị trí và HCDR3 của kháng thể theo sáng chế được xác định bởi Kabat/Chothia/North kết thúc vị trí.

Bảng 1 thể hiện sự chỉ định CDR làm ví dụ của kháng thể theo sáng chế.

Bảng 1: Sự chỉ định CDR

CDR	Định nghĩa bắt đầu	Định nghĩa kết thúc
LCDR1	Kabat/Chothia/North	Kabat/Chothia/North
LCDR2	Kabat/Chothia	Kabat/Chothia/North
LCDR3	Kabat/Chothia/North	Kabat/Chothia/North
HCDR1	Chothia	Kabat/North
HCDR2	Kabat/North	Kabat
HCDR3	North	Kabat/Chothia/North

Kháng thể theo sáng chế là kháng thể được xử lý đã được thiết kế để có khung, các vùng bản lề và các vùng cố định có nguồn gốc của người mà giống với hoặc về cơ bản giống với (về cơ bản là được làm giống với của người) với các vùng khung và các vùng cố định có nguồn gốc từ các trình tự hệ gen của người. Các vùng khung, vùng bản lề và vùng cố định hoàn toàn của người là các vùng khung, vùng bản lề và vùng cố định mà trình tự gốc của người cũng như các trình tự với các đột biến soma xảy ra một cách tự nhiên và các trình tự với các đột biến được thiết kế. Kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm vùng khung, vùng bản lề hoặc vùng cố định có nguồn gốc từ vùng khung, vùng bản lề và vùng cố định hoàn toàn của người có sự thể, xóa hoặc bổ sung một hoặc nhiều axit amin trong đó. Ngoài ra, tốt hơn nếu kháng thể theo sáng chế về cơ bản không có khả năng sinh miễn dịch ở người.

Nhiều trình tự khung của người khác nhau có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp là cơ sở cho kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn là, các vùng khung của kháng thể theo sáng chế là có nguồn gốc từ người hoặc về cơ bản là giống của người (ít nhất 95%, 97% hoặc 99% có nguồn gốc từ người). Các trình tự vùng khung có nguồn gốc từ người có thể thu được theo tài liệu *The Immunoglobulin Factsbook*, by Marie-Paule Lafranc, Gerard Lefranc, Academic Press 2001, ISBN 012441351.

Trình tự vùng khung cho kháng thể theo sáng chế đóng vai trò làm vùng khung biến đổi “cho” và có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể bổ sung với cùng các CDR nêu ở đây sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ngoài ra, trình tự khung cho kháng thể theo sáng chế có thể được so sánh với các trình tự vùng khung của người đã biết khác để tạo ra các kháng thể bổ sung. Do đó, thông tin này có thể

được sử dụng để “đột biến ngược” vùng khung đồng đẳng được lựa chọn khác của người cho gốc axit amin ở các vị trí này. Ngoài ra, bất kì axit amin “hiếm” nào có thể được phát hiện trong vùng khung của người bổ sung sao cho gốc axit amin liên ứng hoặc cho có thể được sử dụng ở vị trí thích hợp.

Các phương pháp để sản xuất và tinh sạch kháng thể là đã được biết đến một cách rộng rãi trong lĩnh vực kỹ và có thể tìm thấy, ví dụ, trong tài liệu của Harlow và Lane (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, chương 5-8 và 15. Ví dụ, chuột có thể được gây miễn dịch với IL-23 của người, hoặc đoạn của kháng thể này, và các kháng thể thu được có thể được thu hồi, tinh sạch và các trình tự axit amin được xác định sử dụng các phương pháp thông thường đã được biết đến một cách rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. Kháng thể theo sáng chế được xử lý để chứa một hoặc nhiều vùng khung của người xung quanh các CDR được dẫn xuất từ kháng thể không phải của người. Trình tự vùng khung gốc của người có thể lấy từ ImMunoGeneTics (IMGT) thông qua trang web của công ty <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ tài liệu *The Immunoglobulin Facts Book* của Marie-Paule Lefranc và Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Cụ thể, các vùng khung của chuỗi nhẹ gốc để sử dụng trong kháng thể theo sáng chế bao gồm 02.

Cụ thể là, các vùng khung của chuỗi nặng gốc để sử dụng trong kháng thể theo sáng chế bao gồm VH1-69.

Các kháng thể được thiết kế theo sáng chế có thể được tạo ra và được tinh sạch sử dụng các phương pháp đã biết. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa chuỗi nặng (ví dụ, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9) và chuỗi nhẹ (ví dụ, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10) có thể được tách dòng và được xử lý thành vector biểu hiện glutamin synthetaza (GS - Glutamine Synthetase). Vector biểu hiện globulin miễn dịch được xử lý sau đó có thể được chuyển nhiễm một cách ổn định trong các tế bào CHO. Sự biểu hiện kháng thể ở động vật có vú sẽ dẫn đến sự glycosyl hóa, diễn hình tại các vị trí N glycosyl hóa bảo thủ cao trong vùng Fc. Sự tách dòng ổn định có thể xác minh sự biểu hiện của kháng thể liên kết đặc hiệu với IL-23 của người. Sự tách dòng tích cực có thể được mở rộng vào môi trường nuôi cấy không huyết thanh để sản xuất

kháng thể trong các thiết bị phản ứng sinh học. Môi trường, trong đó kháng thể đã được tiết, có thể được tinh sạch bằng các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, môi trường có thể được áp dụng một cách thích hợp với Protein A hoặc cột Sepharose FF G đã được làm cân bằng bằng đệm tương hợp, như muối đệm phosphat. Cột được rửa để loại bỏ các thành phần liên kết không đặc hiệu. Kháng thể được liên kết được rửa giải, ví dụ, bằng gradient pH và các phân đoạn kháng thể được dò, ví dụ bằng SDS-PAGE, và sau đó được tập hợp lại. Kháng thể được cô đặc và/hoặc được lọc vô trùng sử dụng các kỹ thuật thông thường. Các kết tụ có thể tan được và các đa me có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường. Sản phẩm có thể được kết đông ngay lập tức, ví dụ ở -70°C , hoặc có thể được làm đông khô.

Kháng thể theo sáng chế là các kháng thể đơn dòng. "Kháng thể đơn dòng" hoặc "mAb", được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến kháng thể được dẫn xuất từ bản sao đơn hoặc dòng bao gồm, ví dụ, bất kì dòng tiền nhân, nhân thật, thể thực khuẩn và không phải các phương pháp mà nhờ đó kháng thể được tạo thành không phải bởi phương pháp mà nhờ đó nó được tạo thành. Các kháng thể đơn dòng của nó có thể được sản xuất, ví dụ, bằng các kỹ thuật lai, kỹ thuật tái tổ hợp, và kỹ thuật biểu diễn thể thực khuẩn, kỹ thuật tổng hợp, ví dụ, ghép CDR, hoặc tổ hợp của các kỹ thuật này hoặc các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Trong phương án kháng của sáng chế, kháng thể, hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể được đề xuất ở dạng phân lập.

Kháng thể theo sáng chế, hoặc dược phẩm chứa kháng thể có thể được dùng theo đường ngoài ruột (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong bụng, trong cơ, hoặc qua da).

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng các phương pháp đã được biết đến một cách rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, tái bản lần thứ 19 (1995), (A. Gennaro *et al.*, Mack Publishing Co.) và chứa kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này, và một hoặc nhiều chất mang dược dụng, chất pha loãng hoặc tá dược. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế được tạo thành dạng bào chế với các tác nhân như natri xitrat, axit xitric, polysorbat 80, natri clorua và sucroza và dược phẩm thu được có thể được đông khô

và được lưu ở 2°C - 8°C. Dược phẩm đông khô sau đó có thể được hoàn nguyên với nước tiệt trùng để tiêm trước khi dùng.

Thuật ngữ “liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến sự tương tác có thể phát hiện được của kháng thể theo sáng chế với epitop trên dưới đơn vị p19 của IL-23 của người nêu bởi trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15. Sự tương tác giữa kháng thể theo sáng chế và dưới đơn vị p19 của IL-23 của người được đo bằng các động học liên kết ở 37°C như được mô tả trong phần “Đo ái lực liên kết bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore) cho kháng thể I” trong Ví dụ 1.

Thuật ngữ "epitop" như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến các gốc axit amin nằm gần nhau trên bề mặt protein (kháng nguyên) và tương tác với kháng thể. Có hai lớp epitop chính: đó là epitop mạch thẳng và epitop cấu trúc.

Thuật ngữ “epitop mạch thẳng” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến trình tự axit amin sơ cấp liên tục của vùng đặc biệt của protein.

Thuật ngữ “epitop cấu trúc” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến các khu vực không liên tục của trình tự axit amin của kháng nguyên mà được tiếp xúc bởi kháng thể theo sáng chế. Các epitop cấu trúc được xác định bởi cấu cũng cũng như trình tự của protein nguyên bản; các epitop này có thể liên tục hoặc không liên tục. Các hợp phần của epitop có thể nằm trên các phần khác nhau của protein, được đưa lại gần nhau trong cấu trúc protein nguyên bản gấp nếp. Trong ngữ cảnh của sáng chế, kháng thể theo sáng chế liên kết với epitop cấu trúc trong các vị trí axit amin 81-99 và 115-140 của SEQ ID NO: 15, trong đó kháng thể tiếp xúc với ít nhất các gốc axit amin 94P, 95S, 97L, 98P, 99D, 123W, 130S, 133P và 137W của SEQ ID NO: 15. Epitop cấu trúc tuy nhiên không chỉ bị giới hạn ở các gốc axit amin này mà có thể còn bao gồm các gốc axit amin bổ sung trong các vị trí axit amin 81-99 và 115-140 của SEQ ID NO: 15.

Thuật ngữ “không liên kết với mô vông mạc theo cách có thể thấy được”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến sự vắng mặt của các tương tác có thể phát hiện được của kháng thể theo sáng chế với mô vông mạc của người và khỉ cynomolgus. Sự tương tác giữa kháng thể theo sáng chế và mô vông mạc của người và

khí cynomolgus được đánh giá trong thử nghiệm hóa mô miễn dịch như được mô tả trong phần “Phản ứng chéo mô vồng mạc: Phân tích *In Vitro* bằng thử nghiệm hóa mô miễn dịch” trong Ví dụ 1. Thuật ngữ “có thể quan sát thấy” như được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế đề cập đến sự đánh giá bằng mắt của mô vồng mạc ở người và khí cynomolgus để xác định liệu kháng thể theo sáng chế có liên kết với mô vồng mạc của người và khí cynomolgus hay không.

Thuật ngữ “chọn lọc” như được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến kháng thể theo sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người nhưng không liên kết với dưới đơn vị p40 có chung IL-23 và IL-12 ở người.

Thuật ngữ “trung hòa” đề cập đến “kháng thể trung hòa”, như được sử dụng trong bản mô tả này, được nhằm để đề cập đến sự ức chế hoạt tính sinh học của IL-23 của người. Việc đo một hoặc nhiều chất chỉ thị của hoạt tính sinh học của IL-23 như được xác định sử dụng thử nghiệm tế bào lách ở chuột (xem phần “Trung hòa *In Vitro* IL-23 của người hoặc khí cynomolgus bằng kháng thể I trong các tế bào lách của chuột” trong Ví dụ 1) hoặc thử nghiệm trung hòa IL-23 của người (xem phần “Trung hòa IL-23 của người: Cấp tính, khu trú” trong Ví dụ 1) có thể đánh giá sự ức chế hoạt tính sinh học của IL-23 của người.

Thuật ngữ “ K_D ”, như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm đề cập đến hằng số phân ly của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Nó được tính toán bằng công thức:

$$K_{off}/K_{on} = K_D$$

Thuật ngữ “ k_{on} ”, như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm đề cập đến sự kết hợp hoặc hằng số kết hợp, hoặc tốc độ phản ứng đặc hiệu, của phản ứng tiếp diễn hoặc tạo phức, được đo bằng đơn vị: $M^{-1}giây^{-1}$.

Thuật ngữ “ k_{off} ”, như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm đề cập đến sự phân ly hoặc hằng số phân ly, hoặc tốc độ phản ứng đặc hiệu cho sự phân ly của kháng thể từ phức hợp kháng thể/kháng nguyên, được đo bằng đơn vị: $giây^{-1}$.

Thuật ngữ “IC₅₀”, như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm đề cập đến nồng độ có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế cần để trung hòa 50% hoạt tính sinh học của IL-23 ở tế bào lách của chuột trong thử nghiệm sinh học được mô tả trong phần “Trung hòa *In Vitro* IL-23 của người hoặc khỉ cynomolgus bằng kháng thể I trong các tế bào lách của chuột” trong Ví dụ 1.

Thuật ngữ “polynucleotit”, như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm bao gồm các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là mạch đơn hoặc mạch kép.

Thuật ngữ “phân lập”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến protein, peptit hoặc axit nucleic không có hoặc về cơ bản không có từ các đại phân tử được tìm thấy trong môi trường tế bào.

Thuật ngữ “về cơ bản không có”, như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là protein, peptit hoặc axit nucleic quan tâm bao gồm hơn 80% (trên cơ sở mol) các đại phân tử có mặt, tốt hơn là 90% và tốt hơn nữa là lớn hơn 95%.

“Bệnh nhân” là động vật có vú, tốt hơn là người.

Thuật ngữ “điều trị” (hoặc “sự điều trị”) đề cập đến việc làm chậm, làm gián đoạn, hãm lại, làm thuyên giảm, làm ngừng, làm giảm, hoặc đảo chiều sự phát triển hoặc độ nặng của triệu chứng, chứng rối loạn, tình trạng hoặc bệnh hiện tại.

Thuật ngữ “lượng hiệu quả”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến lượng hoặc liều kháng thể theo sáng chế mà trên cơ sở dùng liều đơn hoặc liều đa cho bệnh nhân, tạo ra hiệu quả ở bệnh nhân được điều trị. Lượng hiệu quả có thể được xác định một cách dễ dàng bởi bác sĩ chẩn đoán bệnh, là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, bằng cách xem xét các nhân tố như loài động vật có vú; kích thước, tuổi, và sức khỏe tổng thể; bệnh cụ thể mắc phải; mức độ hoặc độ nặng của bệnh; đáp ứng của bệnh nhân; kháng thể cụ thể đã dùng; chế độ sử dụng; các đặc tính sinh khả dụng của chế phẩm sử dụng; liều điều trị lựa chọn; và việc sử dụng kèm của bất kỳ thuốc khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phần ví dụ sau đây sẽ minh họa thêm sáng chế. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, phần Ví dụ được đưa ra để minh họa và không giới hạn, và rằng các biến đổi khác có thể được tạo bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Ví dụ 1

Sản xuất kháng thể

Kháng thể I của ví dụ này bao gồm hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nặng có trình tự axit amin của nêu trong SEQ ID NO: 9 và mỗi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của nêu trong SEQ ID NO: 10. Kháng thể I có thể được tạo thành và được tinh sạch như sau. Tế bào chủ thích hợp, như HEK 293 hoặc CHO, được chuyển nhiễm nhất thời hoặc ổn định hệ biểu hiện để tiết kháng thể sử dụng tỉ lệ vector HC:LC đã xác định tối ưu hoặc hệ truyền đơn mã hóa cả chuỗi nặng (SEQ ID NO: 9) và chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 10). Môi trường được lọc gạn, trong đó kháng thể được tiết, được tinh sạch sử dụng bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật thường được sử dụng. Ví dụ, môi trường có thể được áp dụng một cách thuận tiện với cột Protein A hoặc G mà đã được làm cân bằng với đệm tương hợp, như muối đệm phosphat (độ pH 7,4). Cột được rửa để loại bỏ các thành phần liên kết không đặc hiệu. Kháng thể gắn kết được rửa giải, ví dụ, bằng gradien pH (như đệm natri phosphat 0,1 M, độ pH 6,8 đến đệm natri xitrat 0,1 M, độ pH 2,5). Các phân đoạn kháng thể được trung hòa (ví dụ bằng cách thêm 1/10 thể tích TRIS 1M ở độ pH 8,0), được phát hiện, như bởi SDS-PAGE, và sau đó được tập hợp lại. Việc tinh sạch thêm là tùy ý, phụ thuộc vào mục đích sử dụng. Kháng thể có thể được cô đặc và/hoặc được lọc vô trùng sử dụng các kỹ thuật thông thường. Các kết tụ có thể tan được và các multime có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại kích thước, tương tác kỵ nước, trao đổi ion, hoặc hydroxyapatit. Độ tinh sạch của kháng thể sau các bước sắc ký là lớn hơn 99%. Sản phẩm có thể được làm đông tức thì ở -70°C hoặc có thể được làm đông khô.

Đo ái lực liên kết bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore)

Ái lực của kháng thể (K_D) đối với IL-23 của người, của khỉ cynomolgus hoặc của thỏ được xác định sử dụng máy cảm biến sinh học BIAcore Biosensor 2000 và phần mềm BIAevaluation với việc tạo liên kết 1:1 với mẫu chuyển sinh khối. Protein bắt giữ (Protein A, Calbiochem) được bắt cặp thông qua nhóm amin tự do với các nhóm cacboxyl trên các tế bào dòng 1 và 2 của chip sinh học CM4 sử dụng hỗn hợp N-ethyl-N-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS). Các tế bào dòng sau đó được giám sát với tỉ lệ dòng là 80 μ L/phút sử dụng đệm chứa HEPES 0,01 M, độ pH 7,4, NaCl 150 mM, chất hoạt động bề mặt P20. Kháng thể I bị giữ trên tế bào dòng 2 để tạo thành tổng từ 40 đến 60 đơn vị đáp ứng (Response Units - RU). Nhiều chu trình tăng nồng độ của IL-23 sau đó được tiêm vào tế bào dòng 1 và 2 (0,62 nM đến 30 nM đối với IL-23 của người, và khỉ và 30 nM đến 240 nM đối với IL-23 của thỏ) tiếp theo bởi bước tái sinh sử dụng glyxin-HCl (độ pH 1,5) giữa mỗi chu kì. Tế bào dòng 1 được sử dụng làm đối chứng để giám sát sự liên kết không đặc hiệu của IL-23 và dữ liệu phản ánh tế bào dòng 2 trừ tế bào dòng 1. Mỗi chu kì bao gồm bước bắt giữ kháng thể sau khi tiêm IL-23 ở một nồng độ trong giai đoạn phân ly 30 phút, sau đó là tái sinh. Hai chu kì khi đệm được tiêm vào vị trí của IL-23, đóng vai trò là mẫu đối chứng để trừ đường gốc và hiệu chỉnh để độ lệch liên quan đến sự phân ly của kháng thể I từ bề mặt protein A. Ái lực được đo ở 37 °C. Thử nghiệm được thực hiện 2 lần với IL-23 của người, của khỉ hoặc của thỏ. Kháng thể I được thử nghiệm 2 lần với mỗi IL-23 của chuột nhất ở 333 nM, IL-23 chuột cống ở 200 nM, IL-12 của người ở 333 nM, IL-27 của người ở 500 nM hoặc IL-35 của người ở 833 nM.

Hằng số kết hợp (k_{on}) và hằng số phân ly (k_{off}) đối với mỗi kháng nguyên được đánh giá sử dụng liên kết 1:1 với mẫu chuyển sinh khối. Ái lực (K_D) được tính toán từ động học liên kết theo mối quan hệ: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Bảng 2 – Các thông số liên kết cho kháng thể I

Kháng nguyên	Hằng số kết hợp (k_{on}) (Avg $\pm$ SD) ($M^{-1}s^{-1}$) (10^6)	Hằng số phân ly (k_{off}) (Avg $\pm$ SD) (s^{-1}) (10^{-4})	Ái lực (K_D^a) (Avg $\pm$ SD) (pM)
--------------	--	---	---

IL-12 của người	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được
IL-23 của người	$2,43 \pm 0,16$	$0,52 \pm 0,21$	$21 \pm 9,9$
IL-27 của người	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được
IL-35 của người	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được
IL-23 của khí	$1,28 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,11$	$55 \pm 6,4$
IL-23 của thỏ	$0,09 \pm 0,001$	$47,9 \pm 0,4$	$53,000 \pm 1131$
IL-23 của chuột nhắt	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được
IL-23 của chuột cống	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được	Không có liên kết có thể phát hiện được
^a được tính toán là $K_D = k_{off}/k_{on}$			
n = 2 cho mỗi kháng nguyên. IL-12 được thử nghiệm ở nồng độ 400x mà có thể dò được đối với IL-23. IL-27 và IL-35 được thử nghiệm ở nồng độ 800x mà có thể dò được đối với IL-23. IL-23 của chuột nhắt và chuột cống được thử nghiệm ở các nồng độ 500x và 300x mà có thể dò được đối với IL-23 của người.			

Kháng thể I tạo ra đáp ứng liên kết phụ thuộc nồng độ với IL-23 của người, của khí cynomolgus và của thỏ sử dụng phương pháp này. Sự bão hòa của liên kết của IL-23 thu được ở nồng độ 30 nM (với người và khí) và 240 nM (với thỏ) sử dụng đơn vị đáp ứng 80-100 của kháng thể I được giữ trên bề mặt chip. Trong các điều kiện thử nghiệm, ái lực liên kết (K_D) của IL-23 của người, của khí hoặc của thỏ với kháng thể I là 21, 55 hoặc 53,000 pM một cách tương ứng (Bảng 1). IL-23 của chuột nhắt, IL-23 của chuột cống, IL-12 của người, IL-27 của người hoặc IL-35 của người không liên kết với kháng thể I trong các điều kiện này.

Sự ức chế *In Vitro* của liên kết của IL-23 với thụ thể IL-23

IL-23 R/Fc tái tổ hợp của người được bắt cặp thông qua các nhóm amin tự do với các nhóm cacboxyl trên tế bào dòng 2 của chip sinh học CM4 sử dụng hỗn hợp của N-ethyl-N-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS). IgG₁ Fc tái tổ hợp của người (R&D Systems, Inc.) được bắt cặp sử dụng phương pháp giống với tế bào dòng 1 của cùng chip. Kháng thể kháng 6X HIS của chuột nhắt (R&D Systems, Inc.) được bắt cặp sử dụng cùng phương pháp với tế bào dòng 4 của cùng chip. Kháng thể kháng 6X HIS của chuột nhắt được sử dụng để bắt đầu sự bắt giữ IL-12Rβ1/Fc của người (R&D Systems, Inc.) chứa mảnh HIS. Các tế bào dòng được giám sát với tỉ lệ dòng là 30 µL/phút sử dụng đệm chứa 0,01 M HEPES, pH 7,4, NaCl 150 mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%. IL-23 tái tổ hợp của người được ủ trước trong 90 phút có bổ sung hoặc không bổ sung 16X mol dư của kháng thể I. Mỗi phần phối hợp được tiêm vào các tế bào dòng 1, 2 và 4 với tổng thể tích là 150 µL tiếp theo bởi bước tái sinh sử dụng glyxin-HCl (độ pH 1,5) giữa mỗi thử nghiệm. Tế bào dòng 1 được sử dụng làm đối chứng để giám sát sự liên kết không đặc hiệu của IL-23 với chip. Phần mềm đánh giá BIA được sử dụng để tạo ra các lớp phủ của mỗi gam cảm biến liên kết.

Kháng thể I trung hòa IL-23 của người sử dụng thử nghiệm chức năng *in vitro*. Ngoài ra, kháng thể I ngăn ngừa sự liên kết của IL-23 với IL-23R/Fc. Dữ liệu trong bảng 3 thể hiện:

- (A) IL-23 liên kết với IL-23R/Fc;
- (B) Phức hợp kháng thể I/IL-23 không liên kết với IL-23R/Fc;
- (C) IL-23 liên kết với IL-12Rβ1/Fc; và
- (D) Phức hợp kháng thể I/IL-23 liên kết với IL-12Rβ1/Fc.

Bảng 3: Hiệu quả của kháng thể I đối với liên kết của IL-23 với IL-23R

<i>Xytokin</i>	<i>Kháng thể</i>	<i>Liên kết với IL-23R</i>	<i>Liên kết với IL-12Rβ1</i>
IL-23	không	Có	không
IL-23	I	không	có

Do đó, kháng thể I trung hòa IL-23 vì nó ức chế sự liên kết của IL-23 với dưới đơn vị IL-23R. Thêm vào đó, kháng thể I không ức chế sự liên kết của IL-23 với dưới đơn vị IL-12R β 1.

Sự trung hòa *In Vitro* của IL-23 của người hoặc của khỉ *Cynomolgus* bởi kháng thể I trong tế bào lách của chuột

Để đánh giá kháng thể I, nồng độ của IL-23 của người hoặc của khỉ *cynomolgus* mà giúp tạo ra xấp xỉ 50% sự sản xuất IL-17 tối ưu được sử dụng (16 pM). Đáp ứng nằm trong khoảng từ 800.000 đến 4,4 pM kháng thể I được đánh giá. Kháng thể I hoặc kháng thể I IgG₄ đối chứng kết hợp với IL-23 của người hoặc của khỉ *cynomolgus* trong giếng tách biệt trong 90 phút ở 37°C trước khi bổ sung vào các tế bào (trộn trước khi ủ).

Các tế bào lách C57BL/6 của chuột nhắt được kích thích bằng IL-23 và IL-2 tạo ra IL-17 (Aggarwal, S. et al., "Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17", *Journal of Biological Chemistry*, 278 (3): 1910-1914 2003). Các tế bào lách chuột nhắt được tái tạo huyền phù ở 5×10^6 WBC/mL trong môi trường thử nghiệm (RPMI1640 với L-glutamin chứa FBS 10 %, các axit amin không thiết yếu 1 %, natri pyruvat 1 mM, penixilin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/ml, 2-mercaptoetanol 0,00035 %, IL-2 của người 50 ng/mL) và phân tán trong thể tích 100 μ L trên giếng vào đĩa nuôi cấy 96 giếng. Hỗn hợp trộn trước khi ủ của kháng thể I/ IL-23 được phân tán là 100 μ L trên giếng và được ủ ở 37 °C trong CO₂ 5 %. 48 giờ sau, các dịch nổi nuôi cấy được thử nghiệm mIL-17 sử dụng kit ELISA bán trên thị trường của R&D Systems (DY421) theo hướng dẫn trong bộ kit sử dụng các giếng kép ở mỗi nồng độ pha loãng. IC₅₀ được xác định sử dụng phép phân tích hồi quy khớp đường cong 4 thông số cho dữ liệu.

Các tế bào lách của chuột nhắt tạo ra IL-17 đáp ứng với IL-23 của người hoặc khỉ *cynomolgus*. Kháng thể I trung hòa IL-23 của người hoặc khỉ *cynomolgus*. Trị số IC₅₀ tính toán là 82 ± 11 pM cho IL-23 người và 120 ± 14 pM cho IL-23 của khỉ

cynomolgus, n=2 trong hai trường hợp (Bảng 4). Các kết quả này chứng minh rằng kháng thể I có khả năng trung hòa IL-23 của người hoặc khỉ cynomolgus *in vitro*.

Bảng 4: IC₅₀ trong thử nghiệm trung hòa IL-23 của người và khỉ cynomolgus *in vitro*

Loài	Thử nghiệm #	Kháng thể	IC ₅₀ (pM)
Người	1	I	90
Người	2	I	74
Người		Trung bình (SD)	82 (11)
Cyno	3	I	110
Cyno	4	I	130
Cyno		Trung bình (SD)	120 (14)

Sự trung hòa IL-23 của người: cấp tính, cục bộ

Các động vật (C57BL/sáu con cái, 8 tuần tuổi của Jackson Labs) được nhốt trong chuồng (tối thiểu là 72 giờ sau khi đem đến) và được cho ăn bình thường trước khi thử nghiệm và trong thời gian thử nghiệm. Lông được cắt trên lưng của chuột bằng máy cắt điện, và 3 ngày sau chuột (n=10 trên nhóm) được tiêm dưới da kháng thể I hoặc kháng thể đối chứng isotuyp IgG₄ (0,54 mg trên chuột). 2 ngày sau, chuột được tiêm trong da bằng IL-23 của người ở một vị trí trên một phía của lưng (1 µg trong 50 µL được pha loãng bằng nước muối vô trùng) sử dụng kim 29-gauge. Muối tiệt trùng được sử dụng làm đối tá được đối chứng trên phía khác của lưng. Giết chuột sau 24 sau khi tiêm IL-23 của người lần cuối và mẫu da được lấy ra từ phía tiêm IL-23 và từ phía tiêm nước muối vô trùng, giữ khoảng cách ít nhất 5 mm so với đường biên giáp lông. Mẫu da được làm đông trực tiếp trong nitơ lỏng cho các nghiên cứu mRNA.

ARN tổng số được phân lập từ mô da đã kết đông bằng cách đồng nhất hóa trong ống lắc dung giải Matrix A (Qiogene Inc./Bio101 Systems), tiếp theo bởi kit làm sạch RNeasy Mini (Qiagen, Inc.). Các nồng độ ARN được xác định từ sự hấp thụ quang phổ ở 260 nm. ARN được phiên mã ngược thành cADN sử dụng bộ kit phiên

mã ngược cADN hiệu suất cao (High-Capacity cADN Reverse Transcription kit) (PE Applied Biosystems). Các phản ứng được thực hiện lặp lại ba lần trên ABI Prism 7900HT (PE Applied Biosystems) để xác định sự thừa tương đối của mRNA được thử nghiệm. Các cặp mẫu dò môi cho IL-17A của chuột (Mm00439618_m1), IL-17F của chuột (Mm00521423_m1) và keratin-16 của chuột (Mm00492979_g1) có nguồn gốc từ PE Applied Biosystems. Cả 18S và GAPD được đo là mẫu đối chứng nội sinh để làm bình thường hóa sự khác nhau ở mức biểu hiện gen. Dữ liệu biểu hiện được phân tích sử dụng phương pháp Delta ($\Delta\Delta$) Ct. Mỗi trị số Ct được tính toán là trung bình của ba lần đo. Các thử nghiệm được tiến hành hai lần. Thử nghiệm T không bắt cặp được sử dụng khi thích hợp. $P < 0,05$ được thấy là trị số thống kê đáng kể.

Để xác định liệu việc dùng một cách có hệ thống kháng thể I có khả năng trung hòa đáp ứng cục bộ đối với IL-23 của người, protein IL-23 của người được tiêm trong da vào chuột để điều tra các hậu quả xuôi dòng của việc phơi nhiễm IL-23 ở da. Da của chuột kiểu đại được xử lý bằng dung dịch muối hàng ngày không thể hiện mức có thể phát hiện được IL-17A của chuột hoặc IL-17F của chuột.

Tuy nhiên, việc tiêm IL-23 của người cảm ứng sự biểu hiện mRNA của IL-17A của chuột và IL-17F của chuột (Bảng 5). Sự điều trị bằng kháng thể I mà không phải kháng thể đối chứng isotyp loại bỏ sự biểu hiện mRNA IL-17A và IL-17F được cảm ứng bởi IL-23 của người.

Bảng 5: Sự trung hòa *In vivo* của IL-23 của người gây ra sự biểu hiện mRNA IL-17A và IL-17F ở chuột.

		Các giá trị Ct		
		PBS	IL-23	
Đối chứng isotyp	IL-17A	IL-17F	IL-17A	IL-17F
	≥40	≥40	35,4	31,6
Kháng thể I	IL-17A	IL-17F	IL-17A	IL-17F
	≥40	≥40	≥40	≥40

Ngoài ra, việc tiêm IL-23 của người gây ra sự làm dày biểu bì liên quan đến sự biểu hiện gia tăng của keratin-16, cytokeratin liên quan đến sự tăng sinh. Sự cảm ứng của keratin-16 bị ức chế một cách đáng kể bởi việc dùng kháng thể I (sự cảm ứng của keratin-16 ở chuột là $5,21 \pm 2,72$ đối với kháng thể đối chứng isotyp so với $1,23 \pm 0,72$ đối với kháng thể I; $p = 0,0003$).

Tóm lại, các kết quả này cho thấy rằng kháng thể I ức chế một cách hiệu quả sự sản xuất mRNA IL-17A, IL-17F và keratin-16 của chuột được cảm ứng bởi IL-23 của người trong thử nghiệm *in vivo* cục bộ cấp tính.

Sự phản ứng chéo ở mô vồng mạc: Sự phân tích *In Vitro* bằng hóa mô miễn dịch

Các phần của mô vồng mạc đông lạnh của người và của khỉ cynomolgus (5-7µm độ dày) được cắt trên máy cắt mẫu tiêu bản có làm lạnh (cryostat). Các phần này được cố định trong axeton trong khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó được làm khô qua đêm ở nhiệt độ phòng và được lưu ở xấp xỉ -80°C đến khi sử dụng. Các lát cắt được cố định axeton sau đó được lấy ra khỏi tủ đông và được làm khô qua đêm ở nhiệt độ phòng. Các bước tiếp theo được thực hiện ở nhiệt độ phòng. Các lát cắt được ủ trong Morphosave™ 1X trong khoảng xấp xỉ 15 phút duy trì hình thái học. Các lát được rửa 10 phút trong PBS 1X và sau đó được ủ trong H_2O_2 0,3% trong PBS 1X ở nhiệt độ phòng trong khoảng xấp xỉ 20 phút để làm ngừng hoạt tính peroxidaza nội sinh. Sau khi ủ, các lát được rửa hai lần trong khoảng xấp xỉ 5 phút trong PBS 1X. Biotin nội sinh được chặn bằng cách ủ liên tiếp (xấp xỉ 15 phút mỗi lần) trong dung dịch avidin và biotin. Sau khi ủ trong biotin, các phần mô được chặn với dung dịch kháng thể chặn trong 30 phút. Kháng thể I hoặc IgG₄ của người làm đối chứng được dùng cho các phần này ở các nồng độ tối ưu (2,5 hoặc 5 µg/mL) hoặc 5 lần các nồng độ tối ưu (25 µg/mL) và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các lát được rửa và được ủ với kháng thể của chuột kháng IgG₄ của người được biotin hóa (2,5 µg/mL) trong 30 phút. Các phức hợp kháng thể sơ cấp /thứ cấp đã liên kết được dò bằng thể tiếp hợp streptavidin-biotin-proxidaza cải ngựa và cơ chất diaminobenzidin chromagen.

Các tế bào CHO được chuyển nhiễm IL-23 của người được sử dụng làm mẫu đối chứng dương trong các thử nghiệm. Các tế bào CHO bố mẹ (không được chuyển nhiễm) được sử dụng làm mẫu đối chứng âm không được nhuộm. Sự liên kết không quan sát thấy trong các phần theo chuỗi được nhuộm với kháng thể đối chứng isotyp (IgG₄ của người). Kháng thể I không liên kết với mô vồng mạc theo cách có thể quan sát thấy được.

Lập bản đồ epitop cho kháng thể I: quét alanin

Cơ sở cho việc lập bản đồ epitop sử dụng kháng nguyên biểu hiện ở nấm men

Các nghiên cứu về việc lập bản đồ epitop được thực hiện để xác định các axit amin cụ thể trong dưới đơn vị p19 của IL-23 của người (SEQ ID NO: 15) mà được yêu cầu cho sự liên kết với kháng thể I. Việc lập bản đồ epitop của kháng thể I được thực hiện bằng cách quét alanin trong sự kết hợp với nền biểu hiện ở nấm men.

Các vị trí axit amin quan sát thấy của dưới đơn vị p19 của IL-23 của người được nhận diện bằng cách phân tích trong PyMOL. Các vị trí lộ ra hoặc lộ ra một phần của dưới đơn vị p19 của IL-23 được thể hiện trong bảng 6. Các vị trí này mà được xác định không để lộ ra được lược bỏ khỏi thử nghiệm này, đó là các vị trí axit amin của dưới đơn vị p19 của IL-23 của người mà lộ ra hoặc lộ ra một phần được đột biến. Do đó, không phải tất cả các vị trí đều được nghiên cứu.

Mặc dù việc lập bản đồ epitop chỉ được thực hiện trên dưới đơn vị p19 của IL-23 (việc lập bản đồ epitop không được thực hiện trên dưới đơn vị p40 của IL-23 do kháng thể I không liên kết theo cách có thể phát hiện được đối với dưới đơn vị p40), cả dưới đơn vị p19 và dưới đơn vị p40 của IL-23 của người phải được cùng biểu hiện trong nền biểu hiện ở nấm men.

Nấm men đơn thể hiện các đột biến alanin của dưới đơn vị p19 của IL-23 của người được xây dựng và sự liên kết kháng thể được xác định nhằm nhận diện epitop. Bằng cách đo ái lực của các đột biến kháng thể so với kháng nguyên biểu hiện ở nấm men kiểu dại, có thể xác định được sự đóng góp mạnh mẽ của chuỗi bên axit amin đối với sự liên kết kháng thể.

Xây dựng thư viện đột biến

Gen p40 được tách dòng vào plasmit biểu hiệu tan, pYKY, có đoạn đánh dấu lựa chọn uracil. Gen dưới đơn vị p19 được tách dòng vào plasmit biểu hiện của nấm men, pEMD3, có đoạn đánh dấu lựa chọn tryptophan và mảnh V5 tag ở đầu N và đến protein mỏ neo GPDL2 ở đầu C cho phép sự biểu diễn trên bề mặt của nấm men trong đoạn đánh dấu lựa chọn tryptophan. Các vị trí giới hạn được lựa chọn để tách dòng tương ứng là *XhoI* và *BamHI* trong plasmit pYKY và *AvrII* và *XmaI* trong plasmit pEMD3.

Các đột biến alanin được thực hiện ở mọi vị trí lộ ra và được thử nghiệm cho sự nhuộm dương tính kép với kháng thể V5 và kháng thể I. Các kênh đột biến alanin ở p19 được xây dựng trong các plasmit pEMD3 sử dụng các tác nhân gây đột biến định hướng vị trí (Kunkel Mutagenesis). Tóm lại, uracil bao gồm các ssADN của vector pEMD3 được tạo ra sau khi biến nạp vào CJ236 (New England Biolabs). Dòng biến nạp đơn được phát triển qua đêm và ssDNA được lấy sau khi gây nhiễm với pha giải M13K07 (New England Biolabs) và ssDNA được tinh sạch sử dụng bộ kit QIAprep spin M13. Các oligonucleotit mã hóa các đột biến alanin được tôi ở tỉ lệ mol là 20:1 đối với mẫu uracil bằng cách làm biến tính ở 85°C trong 5 phút, giảm xuống 55°C trong vòng 1 giờ, giữ ở 55°C trong 5 phút, sau đó làm lạnh trên đá. Sự tổng hợp mạch thứ hai sau đó được thực hiện với polymeraza T4, ligaza T4 và dNTPs (Invitrogen). Phản ứng được điện chuyển vào Top10 *E.coli* (Invitrogen) và các khuẩn lạc đơn được tách lấy, dsDNA được tạo sử dụng bộ kit QIAprep miniprep (Qiagen) và các đột biến được xác nhận bằng cách đọc trình tự. Các đột biến p19 sau đó được đồng biến nạp vào nấm men BJ5464 (ATCC) với plasmit p40 pYKY và được phát triển trong môi trường đầy đủ ở mức tối thiểu không có tryptophan và uracil.

Lựa chọn thư viện kháng nguyên đột biến cho sự mất liên kết kháng nguyên

Nhằm nhận diện epitop kháng thể, thư viện kháng nguyên đột biến được lựa chọn cho sự mất liên kết của kháng thể bằng cách đếm dòng. Các tế bào nấm men được nhuộm với hai kháng thể, một kháng thể được lập bản đồ và kháng thể còn lại không được lập bản đồ. Các đột biến kháng nguyên biểu hiện ở nấm men được lựa chọn cho thử nghiệm mất liên kết với kháng thể thứ nhất, nhưng có liên kết với kháng

thể thứ hai. Sự duy trì liên kết với kháng thể thứ hai đảm bảo rằng các đột biến là được chọn lọc trên cơ sở các đột biến trong epitop, hơn là sự chọn lọc các đột biến biểu hoặc được biểu hiện một cách hiện không rõ.

Cho mục đích phân tích của sáng chế, kháng thể thứ nhất (đó là kháng thể mà epitop của nó được lập bản đồ) là kháng thể I và kháng thể thứ hai là kháng thể kháng V5. Nấm men được nhuộm với kháng thể kháng V5 (Invitrogen) và kháng thể I và sau đó là với IgG_{2a} kháng chuột ở hệ thống thứ hai (Invitrogen, Alexa Fluor® 647) để dò kháng thể kháng V5 (biểu hiện/biểu diễn) và kappa RPE kháng người của dê (Southern Biotech) để dò kháng thể I. Nấm men được phân tích bằng đếm dòng đếm dòng trên Becton Dickinson LSRII, trong đó 50,000 sự kiện được tập hợp dựa trên lọc tế bào theo biểu đồ tán xạ ánh sáng, V5/Alexa647 và kháng thể I/nuộm PE. Phân tích dữ liệu cho sự liên kết của mỗi kháng thể I và kháng thể kháng V5 được thực hiện sử dụng phần mềm FACSDiva v6.1.2, giúp tính toán phần trăm các tế bào nấm men được nhuộm kép.

Kết quả

Do sự chia phần protein biểu hiện, ở mức tốt nhất là 50% nấm men biểu hiện p19 của IL-23. Sự phát hiện tế bào nấm men dương tính kép chứng minh rằng vị trí axit amin nghiên cứu không có sự liên kết của kháng thể I với IL-23. Việc chỉ phát hiện được nhuộm V5 chứng minh rằng protein được biểu hiện hoặc biểu diễn trên bề mặt của nấm men và rằng vị trí axit amin nghiên cứu là quan trọng đối với sự liên kết của kháng thể I. Cũng xác định được rằng các gốc này chứng minh rằng sự giảm >50% mức nhuộm dương tính kép so với các gốc liền kề là quan trọng đối với sự liên kết. Các gốc này được đánh dấu trong bảng 7. Một số vị trí chứng minh sự thiếu vắng liên kết của cả kháng thể V5 và kháng thể I, gợi ý rằng gốc axit amin có thể là cần thiết đối với sự cấu thành protein. Sự nghiên cứu hệ thống của mỗi vị trí axit amin lộ ra hoặc lộ ra một phần trên dưới đơn vị p19 của IL-23 (SEQ ID NO: 15) chứng minh rằng các vị trí 94P, 95S, 97L, 98P, 99D, 123W, 130S, 133P, và 137W là quan trọng đối với sự liên kết của kháng thể I với IL-23 của người trên cơ sở lượng giảm của mức nhuộm dương tính kép đối với liên kết của V5 và kháng thể I (Bảng 7).

Việc lập bản đồ epitop cũng được thực hiện sử dụng trao đổi hydro - đoteri. Kết quả của việc lập bản đồ epitop trên cơ sở trao đổi hydro - đoteri chứng minh rằng epitop của kháng thể I là epitop cấu trúc với các gốc 81-99 và 115-140 của IL-23 của người (SEQ ID NO: 15).

Bảng 6: Trình tự axit amin lộ ra hoặc lộ ra một phần của dưới đơn vị p19 của IL-23 của người trưởng thành

Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Axit amin	R	A	V	P	G	G	S	S	P	A
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Vị trí	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Axit amin	W	T	Q	C	Q	Q	L	S	Q	K
Lộ ra/lộ ra một phần		x	x		x	x	x		x	x
Vị trí	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Axit amin	L	C	T	L	A	W	S	A	H	P
Lộ ra/lộ ra một phần			x	x			x		x	x
Vị trí	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Axit amin	L	V	G	H	M	D	L	R	E	E
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Vị trí	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Axit amin	G	D	E	E	T	T	N	D	V	P
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Vị trí	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Axit amin	H	I	Q	C	G	D	G	C	D	P
Lộ ra/lộ ra một phần			x		x	x	x		x	

Vị trí	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Axit amin	Q	G	L	R	D	N	S	Q	F	C
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x		x	x	x		x	x	
Vị trí	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Axit amin	L	Q	R	I	H	Q	G	L	I	F
Lộ ra/lộ ra một phần		x	x			x			x	x
Vị trí	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Axit amin	Y	E	K	L	L	G	S	D	I	F
Lộ ra/lộ ra một phần		x	x	x		x	x	x		
Vị trí	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Axit amin	T	G	E	P	S	L	L	P	D	S
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Vị trí	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
Axit amin	P	V	G	Q	L	H	A	S	L	L
Lộ ra/lộ ra một phần			x	x		x	x	x		x
Vị trí	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Axit amin	G	L	S	Q	L	L	Q	P	E	G
Lộ ra/lộ ra một phần	x			x	x		x		x	x
Vị trí	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
Axit amin	H	H	W	E	T	Q	Q	I	P	S
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x		x	x	x	x	x	x	x
Vị trí	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140

Axit amin	L	S	P	S	Q	P	W	Q	R	L
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Vị trí	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
Axit amin	L	L	R	F	K	I	L	R	S	L
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x	x	x	x			x		
Vị trí	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
Axit amin	Q	A	F	V	A	V	A	A	R	V
Lộ ra/lộ ra một phần							x	x	x	x
Vị trí	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
Axit amin	F	A	H	G	A	A	T	L	S	P
Lộ ra/lộ ra một phần	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Bảng 7: Ngày lập bản đồ epitop cho kháng thể I

Các vị trí axit amin	% nhuộm dương tính kép (V5 và kháng thể I)
87	26
88	27
91	37
92	29
94	16
95	12
96	35
97	7
98	10
99	7
100	22

Các vị trí axit amin	% nhuộm dương tính kép (V5 và kháng thể I)
118	31
119	28
120	26
121	28
122	31
123	5
124	26
125	18
126	22
127	25
129	21
130	4
133	1
134	16
136	15
137	2
140	23

Các đặc tính vật lý-hóa học của kháng thể IL-23

Kháng thể I có độ tan, độ ổn định hóa học và độ ổn định vật lý là chấp nhận được về mặt dược phẩm.

A. Độ tan

Tính tan đủ cao được mong muốn để phân liều một cách thuận tiện. Ví dụ, liều 1 mg/kg được dùng bằng cách tiêm 1,0 mL vào bệnh nhân 100 kg yêu cầu độ tan là 100 mg/mL. Thêm vào đó, cũng có mong muốn đối với sự duy trì kháng thể trong trạng thái monome mà không với sự kết tụ khối lượng phân tử cao (High Molecular weight -HMW) ở nồng độ cao.

Kháng thể I được tạo thành ở xấp xỉ 1 mg/mL trong đệm giống sinh lý (PBS, pH 7,4) và trong điều kiện với hai chế phẩm thuốc (xitrat 10mM, pH 6, $\pm$ NaCl 150mM). Kháng thể được ly tâm ở 2000xG thông qua máy lọc khối lượng phân tử Amicon Ultra 30 kDa (Millipore, UFC803204) để cô đặc kháng thể trong khi duy trì cùng các điều kiện đệm. Sự ly tâm được tiếp tục đến khi giới hạn độ tan hoặc thể tích còn lại tối thiểu của thiết bị đạt được. Độ tan lớn hơn 100mg/mL thu được trong cả ba trường hợp.

Sắc ký loại trừ theo kích thước (Size-Exclusion Chromatography - SEC) được sử dụng để đánh giá liệu việc tăng của polyme khối lượng phân tử cao (HMW) có xảy ra sau khi nồng độ của các dạng bào chế kháng thể lớn hơn 100mg/mL. Dung dịch kháng thể khởi đầu và dung dịch kháng thể cô đặc được tiêm vào cột TSK3000 SWXL (TOSOH Bioscience) sử dụng pha động chứa phosphat 12mM, NaCl 500mM, độ pH 7,4. Không quan sát thấy sự tăng nhiều của polyme tan trong bất kì điều kiện của dạng bào chế nào được thử nghiệm (<polyme HMW 0,6% của SEC).

B. Tính ổn định hóa học

Kháng thể I được tạo dạng bào chế ở 1mg/mL trong đệm 10mM (xitrat 10mM cho độ pH 4, 5, 6, và 7; TRIS 10mM cho độ pH 8) và được ủ trong 4 tuần ở 4, 25, hoặc 40°C. Độ ổn định hóa học được theo dõi bởi SEC (xem phương pháp trên đây), sắc ký trao đổi cation [CEX; Dionex, sử dụng gradient giữa đệm A (natri phosphat 20mM, độ pH 5,8, CHAPS 0,36%) và đệm B (natri phosphat 20mM, độ pH 5,8, CHAPS 0,36%, natri clorua 200mM)], CE-SDS (Agilent Bioanalyzer với chip protein 230 trong các điều kiện khử) và bằng mô tả đặc điểm nhờ LC-MS của vật liệu được tiêu hóa nhờ enzym.

Kháng thể I là ổn định đối với sự tạo thành polyme (SEC) ở độ pH 5-8 ngay cả sau 4 tuần ở 40°C. Ở độ pH 4, polyme quan trọng được quan sát thấy ở 40°C nhưng không quan sát thấy ở 25°C (4 tuần). Sự thủy phân hay cắt liên kết peptit mong muốn là rõ ràng ở độ pH 4 (40°C) bằng CE-SDS. Mức thoái hóa ở độ pH 4,0 là đặc trưng của các kháng thể IgG4. Các mức độ pH lớn hơn 4 (độ pH 5-8) là thấp và không thay đổi một cách thống nhất với thời gian và do đó dường như đại diện cho độ ổn cơ sở.

Giả thuyết này là thống nhất với phân tích LC-MS mà phát hiện ra là không có sự cắt ở độ pH 6 trong khi đo mức đặc trưng của sự cắt liên kết kháng thể ở độ pH 4. Các thay đổi trong các biến thể mang điện được quan sát bởi CEX. Vật liệu khởi đầu bao gồm ba đỉnh quan trọng chính mà giảm đến mức tối thiểu sự phân giải năng lực của thử nghiệm này. Nói chung, các mẫu ở nhiệt độ 25°C và 40°C là lớn hơn mẫu đối chứng ở 4°C, nhưng các mức không tăng theo thời gian ủ (thực tế là giảm trong rất nhiều trường hợp). Phần trăm thay đổi ở độ pH 6,0 (4 tuần ở 25°C trừ đối chứng ở 4°C) là 2,5%. Sự phân tích LC-MS chỉ ra phần lớn các biến đổi là ở bên ngoài vùng CDR và ở các mức đặc trưng của các kháng thể IgG4 khác. Ba vị trí thoái biến trong các CDR là có thay đổi được xác định là nhỏ hơn 1% (pH 6; 4 tuần ở 25°C trừ đối chứng ở 4°C). Sự thiếu các vị trí thoái biến trong CDR là cũng phù hợp với việc không có thay đổi đáng kể trong ái lực của BIACore hoặc hóa học lượng pháp sau khi ủ trong 4 tuần ở 40°C ở độ pH 4, 6, hoặc 8.

C. Độ ổn định hóa học

i) Độ ổn định đông tan

Kháng thể I được tạo dạng bào chế trong các điều kiện sau đây:

- 1mg/mL trong xitrat 10 mM, độ pH 6,0;
- 1mg/mL trong xitrat 10 mM, độ pH 6,0, Tween-80 0,02%;
- 1 hoặc 50 mg/mL trong xitrat 10 mM, độ pH 6,0, NaCl 150 mM; và
- 1 hoặc 50 mg/mL trong xitrat 10 mM, độ pH 6,0, NaCl 150 mM, Tween-80 0,02%.

Các dạng bào chế này được đặt trong máy làm đông lạnh được điều khiển 1°C/phút (Nalgene, 5100-0001) và được làm đông trong máy làm đông ở -80°C trong ít nhất 8 giờ và sau đó được lấy ra và để tan ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 8 giờ. Chu trình làm đông/tan được lặp lại tới ba lần. Các mẫu được lấy ra sau một và ba chu trình làm đông rã đông và được phân tích polyme HMW bằng SEC (xem phương pháp SEC được mô tả trong phần A trên đây) và sự tạo thành hạt không tan bằng máy đếm hạt HIAC (mẫu Pacific Scientific 9703 với thể tích gắn thấp). Không có sự tăng đáng kể trong sự tạo thành polyme HMW được quan sát thấy sau ba chu trình làm đông rã

đồng trong bất kì điều kiện thử nghiệm nào. Đối với dạng bào chế 1 mg/ml có sự tăng đáng kể trong tổng các hạt được đếm HIAC chỉ trong các dạng bào chế không chứa Tween-80. Ở mức đếm hạt 50 mg/ml là đặc trưng của các kháng thể IgG4 thể hiện tốt với tổng số hạt (≥ 10 micron) là xấp xỉ 1500 hạt/mL không có Tween-80 và thấp tới xấp xỉ 280 với Tween-80.

ii) Giữ ở trạng thái tĩnh ở nồng độ cao

Kháng thể được tạo dạng bào chế ở 50mg/mL trong các điều kiện sau:

- a) xitrat 10 mM, độ pH 6,0, NaCl 150 mM; và
- b) xitrat 10 mM, độ pH 6,0, NaCl 150 mM, Tween-80 0,02%

Các dạng bào chế này được giữ ở trạng thái tĩnh trong 4 tuần ở 4 và 25°C. Sự thay đổi trong tổng số hạt HIAC (mẫu Pacific Scientific 9703 với thể tích gần thấp) được đo sau 4 tuần ở 25°C.

Tổng số các hạt HIAC (≥ 10 micron) đối với dạng bào chế chứa Tween trung bình là 290 hạt/mL (270 và 310) và cao hơn không nhiều, 804 hạt/mL (728 và 880) đối với các chế phẩm không chứa Tween. Các kết quả này là đặc trưng cho các kháng thể IgG4 khác mà thể hiện độ ổn định vật lý tốt. Hai dạng bào chế này là cũng được lưu ở trong thủy tinh thay vì các ống eppendorf nhựa tiêu chuẩn. Tổng số hạt cho các mẫu được lưu trong thủy tinh là thấp hơn từ 4 đến 8 lần (trung bình là 35 và 191 hạt/mL tương ứng với mẫu có và không có Tween).

DANH MỤC SEQ ID**CDR Chuỗi nặng**

SEQ ID NO: 1 GYKFTRYVMH

SEQ ID NO: 2 YINPYNDGTNYNEKFKG

SEQ ID NO: 3 ARNWDTGL

CDR Chuỗi nhẹ

SEQ ID NO: 4 KASDHILKFLT

SEQ ID NO: 5 GATSLET

SEQ ID NO: 6 QMYWSTPFT

Vùng biến đổi của chuỗi nặng

SEQ ID NO: 7 (Kháng thể I)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFTRYVMHWVRQAPGQGLEWMG
 YINPYNDGTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARNWD
 TGLWGQGTTVTVSS

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

SEQ ID NO: 8 (Kháng thể I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDHILKFLTWYQQKPGKAPKLLIYGATSL
 ETGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQMYWSTPFTFGGGTKVEIK

Chuỗi nặng hoàn chỉnh

SEQ ID NO: 9 (Kháng thể I)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFTRYVMHWRQAPGGGLEWMG
YINPYNDGTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARNWD
TGLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Chuỗi nhẹ hoàn chỉnh

SEQ ID NO: 10 (Kháng thể I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDHILKFLTWYQQKPGKAPKLLIYGATSL
ETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQMYWSTPFTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

Các trình tự nucleotit

Vùng biến đổi của chuỗi nặng

SEQ ID NO: 11 (Kháng thể I)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTC
GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATAAATTCCTCGTTATGTTAT
GCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATA
TTAATCCTTACAATGATGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGA

GTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAG
CAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAACTGGG
ACACAGGCCTCTGGGGCCAAGGCACCACTGTCACAGTCTCCTCA

Trình tự nucleotit

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

SEQ ID NO: 12 (Kháng thể I)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCAAGGCAAGTGACCACATTCTCAAATTTTTAACT
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGC
AACCAGTTTGGAAACTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA
CTTACTACTGTCAAATGTATTGGAGTACTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGA
CCAAGGTGGAAATAAAA

Trình tự nucleotit

Chuỗi nặng hoàn chỉnh

SEQ ID NO: 13 (Kháng thể I)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGTCCTC
GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATAAATTCACTCGTTATGTTAT
GCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATA
TTAATCCTTACAATGATGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGA
GTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAG
CAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAACTGGG
ACACAGGCCTCTGGGGCCAAGGCACCACTGTCACAGTCTCCTCAGCCTCC
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC

GGTGACGGTGTCTGTCGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
 TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
 CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGAT
 CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATG
 GTCCCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCA
 GTCTTCCTGTTCCCCCCTAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGT
 CCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
 AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTC
 ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
 CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
 AAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAG
 GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
 CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
 AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
 TACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCT
 TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAG
 AGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

Trình tự nucleotit

Chuỗi nhẹ hoàn chỉnh

SEQ ID NO: 14 (Kháng thể I)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
 AGAGTCACCATCACTTGCAAGGCAAGTGACCACATTCTCAAATTTTAACT
 TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGC
 AACCAGTTTGGAAACTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTG
 GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA
 CTTACTACTGTCAAATGTATTGGAGTACTCCGTTTCAGTTCGGAGGGGGGA
 CCAAGGTGGAAATAAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
 CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC

TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAA
GGAC

AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA
GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

Các trình tự protein

Trình tự axit amin của dưới đơn vị p19 của IL-23 của người trưởng thành

SEQ ID NO: 15

RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPH
IQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSSLPDSPVGQL
HASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAVAA
RVFAHGAATLSP

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa LCDR1 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:4, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:5, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:6; và vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa HCDR1 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:1, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:2, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:3.
2. Kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 8; và vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 7.
3. Kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 9.
4. Kháng thể liên kết với dưới đơn vị p19 của IL-23 của người bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, trong đó mỗi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 và mỗi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 9.
5. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 4 và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT VỚI INTERLEUKIN-23 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> X19760

<150> 61/774732

<151> 2013-03-08

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 1

Gly Tyr Lys Phe Thr Arg Tyr Val Met His
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Ala Arg Asn Trp Asp Thr Gly Leu
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Lys Ala Ser Asp His Ile Leu Lys Phe Leu Thr
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Gln Met Tyr Trp Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 7

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Trp Asp Thr Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 8

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 Lys Ala Ser Asp His Ile Leu Lys Phe
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr 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 Met Tyr Trp Ser Thr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 9
<211> 441
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 9

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

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

<210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 10

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 Lys Ala Ser Asp His Ile Leu Lys Phe
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr 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 Met Tyr Trp Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly 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> 11
<211> 345
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 11
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggctc

60

tcctgcaagg cttctggata taaattcact cgttatgta tgactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatat attaatcctt acaatgatgg tactaactac	180
aatgagaagt tcaaaggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaactgg	300
gacacaggcc tctggggcca aggcaccact gtcacagtct cctca	345

<210> 12
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 12	
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgca aggcaagtga ccacattctc aaatttttaa cttggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggg gcaaccagtt tggaaactgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaaag tattggagta ctccgttcac gtccggaggg	300
gggaccaagg tggaaataaa a	321

<210> 13
 <211> 1323
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 13	
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggata taaattcact cgttatgta tgactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatat attaatcctt acaatgatgg tactaactac	180
aatgagaagt tcaaaggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaactgg	300
gacacaggcc tctggggcca aggcaccact gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc	360
ccatcggtct tcccgtagc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agccgccctg	420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta	600
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tgggtcccca	660

tgccccacct	gcccagcacc	tgaggccgcc	gggggacccat	cagtcttcct	gttcccccca	720
aaacecaagg	acactctcat	gatctcccg	acccctgagg	tcacgtgcgt	ggtggtggac	780
gtgagccagg	aagaccccga	ggtccagttc	aactggtacg	tggatggcgt	ggaggtgcat	840
aatgccaaga	caaagcccg	ggaggagcag	ttcaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	900
ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaac	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	960
aaaggcctcc	cgtcctccat	cgagaaaacc	atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagag	1020
ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccag	gaggagatga	ccaagaacca	ggtcagcctg	1080
acctgcctgg	tcaaaggctt	ctaccccagc	gacatcgccg	tggagtggga	aagcaatggg	1140
cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	cccgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	1200
ctctacagca	ggctaaccgt	ggacaagagc	aggtggcagg	aggggaatgt	cttctcatgc	1260
tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	tacacacaga	agagcctctc	cctgtctctg	1320
ggt						1323

<210> 14
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 14	
gacatccaga	tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca	aggcaagtga ccacattctc aaatttttaa cttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc	ctaagctcct gatctatggt gcaaccagtt tggaaactgg ggtcccatca 180
aggttcagtg	gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg	caacttacta ctgtcaaagt tattggagta ctccgttcac gttcggaggg 300
gggaccaagg	tggaaataaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc	agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg	ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
gagagtgtca	cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag	cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 15
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

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