



(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)



1-0027341

(51)⁷ C07K 14/54; C07K 16/24; A61K 39/395 (13) B

(21) 1-2015-03053

(22) 07/02/2014

(86) PCT/IB2014/058854 07/02/2014

(87) WO 2014/122613 A1 14/08/2014

(30) 61,762,406 08/02/2013 US

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/12/2015 333A

(73) NOVARTIS AG (CH)

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland

(72) DI PADOVA, Franco, E. (IT); HUBER, Thomas (CH); RONDEAU, Jean Michel, Rene (FR).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC KHÁNG IL-17A, DƯỢC PHẨM CHỨA CHỨNG VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể và protein chứa phần gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết đặc hiệu với xytokin tiền viêm IL-17A. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể và protein đặc hiệu là chất đối kháng IL-17A (ức chế các hoạt động của IL-17A và IL-17AF) và có khả năng ức chế sản xuất xytokin do IL-17A gây ra trong các thử nghiệm in vitro, và có tác động ức chế trong mô hình viêm khớp do kháng nguyên in vivo. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và quy trình sản xuất kháng thể và protein đã nêu để điều trị các rối loạn bệnh lý mà có thể được điều trị bằng cách ức chế hoạt động do IL-17A hoặc IL-17AF, chẳng hạn như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm thận do luput, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh hen hoặc bệnh xơ nang hoặc các rối loạn tự miễn và rối loạn viêm nhiễm khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể để điều trị bệnh và phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với IL-17A và IL-17AF heterodime, nhưng không gắn kết đặc hiệu với IL-17F homodime. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu và phần gắn kết kháng nguyên của nó ức chế tác động của IL-17A và có khả năng ức chế hoạt động do IL-17A, cũng như chế phẩm và phương pháp sử dụng kháng thể và phần gắn kết kháng nguyên của nó đã nêu, ví dụ, để điều trị các rối loạn bệnh lý mà có thể được điều trị bằng cách ức chế sự truyền tín hiệu IL-17A, ví dụ, các rối loạn tự miễn và rối loạn viêm nhiễm như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm thận do luput, bệnh đa xơ cứng, hoặc bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh hen hoặc bệnh xơ nang.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin-17A (IL-17A đôi khi cũng được gọi là IL-17) là lymphokin trung tâm được tạo ra từ một tập hợp con mới được xác định của các tế bào T gây viêm, tế bào Th17. Trong một số mô hình động vật, các tế bào này giữ vai trò then chốt trong các quá trình tự miễn và viêm khác nhau. Nồng độ IL-17A gia tăng có liên quan đến bệnh viêm màng bồ đào (Ambadi-Obi, et al 2007, Nature Med; 13:711-718), bệnh viêm khớp dạng thấp (RA), bệnh vẩy nến, viêm đường hô hấp, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính (COPD), bệnh viêm ruột (bệnh Crohn và bệnh viêm loét đại tràng), thải loại đồng ghép, ung thư, áp-xe trong bụng hoặc dính trong bụng, và bệnh đa xơ cứng (Weaver, et al 2007, Annu Rev Immunol; 25:821-852; Witowski et al 2004, Cell Mol Life Sci; 61:567-579). Tế bào Th17 có thể nhanh chóng khởi phát đáp ứng viêm được chi phối bởi bạch cầu trung tính (Miossec, et al 2009, NEJM; 361:888-98).

IL-17A ban đầu được xác định là sản phẩm phiên mã từ tế bào lai của tế bào T của động vật gặm nhấm. IL-17A là thành viên nòng cốt của nhóm xytokin được gọi là họ IL-17. Được biết đến dưới dạng CTLA8 ở động vật gặm nhấm, IL-17A thể hiện tính tương đồng cao so với IL-17A của virus được mã hóa bởi khung đọc mở của T-

lymphotropic rhadinovirus herpesvirus saimiri (Rouvier E, et al 1993, J. Immunol. 150: 5445–56).

IL-17A là xytokin hoạt động dưới dạng chất trung gian tiềm năng trong phản ứng trễ bằng cách tăng cường sự sản xuất chemokin trong các mô khác nhau để bổ sung bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính đến vị trí viêm, tương tự interferon gama. Chức năng của họ IL-17 vai trò của các xytokin tiền viêm là sự đáp ứng với sự xâm nhập của hệ miễn dịch của mầm bệnh ngoại bào và cảm ứng sự phá hủy chất nền của tế bào mầm bệnh. IL-17A có tác động hiệp đồng với yếu tố hoại tử khối u và in-tơ-lơ-kin-1 (Miossec P, et al 2009, N. Engl. J. Med. 361:888–98).

Để bộc lộ chức năng của mình, IL-17A gắn kết với thụ thể bề mặt tế bào loại I được gọi là IL-17R mà có ít nhất hai biến thể, IL-17RA và IL-17RC (Pappu R, et al 2012, Trends Immunol.; 33:343-9). IL-17RA gắn kết IL-17A, IL-17AF và IL-17F và được biểu hiện ở nhiều mô: tế bào nội mô mạch máu, tế bào T ngoại vi, dòng tế bào B, nguyên bào sợi, phổi, tế bào bạch cầu đơn nhân, và tế bào mô đệm tủy xương (Kolls JK, Lindén A 2004, Immunity 21:467–76; Kawaguchi M, et al 2004, J. Allergy Clin. Immunol. 114:1265–73; Moseley TA, et al 2003, Cytokine Growth Factor Rev. 14:155–74).

Ngoài IL-17A, các thành viên của họ IL-17 bao gồm IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (cũng được gọi là IL-25), và IL-17F. Tất cả các thành viên của họ IL-17 có cấu trúc protein tương tự nhau, có bốn gốc xystein mang tính bảo toàn cao có tính quyết định đến cấu trúc 3 chiều của chúng. Phân tích sự phát sinh loài cho thấy rằng trong số các thành viên của họ IL-17, các dạng tương đồng 1 và 2 (ML-1) của IL-17F có tính tương đồng cao nhất với IL-17A (có độ tương đồng về axit amin lần lượt là 55 và 40% so với IL-17A), tiếp đến là IL-17B (29%), IL-17D (25%), IL-17C (23%), và IL-17E tương quan ít nhất với IL-17A (17%). Tất cả các xytokin này được bảo toàn cao trong động vật có vú, có tới 62–88% axit amin được bảo toàn trong các phản tương đồng giữa người và chuột nhắt (Kolls JK, Lindén A 2004, Immunity 21:467–76).

IL-17A là protein có 155 axit amin là glycoprotein tiết, homodime, được tạo liên kết bằng liên kết disulfua có trọng lượng phân tử 35 kDa (Kolls JK, Lindén A 2004, Immunity 21:467–76). Cấu trúc của IL-17A bao gồm peptit tín hiệu, tiếp đến là vùng

axit amin mang đặc tính của họ IL-17. Vị trí glycosyl hóa được liên kết qua N protein này được xác định lần đầu tiên sau khi tinh sạch protein này đã cho thấy hai băng khi phân tích SDS-PAGE tiêu chuẩn, một băng có kích thước 15kDa và một băng có kích thước 20kDa. Sự so sánh các thành viên khác nhau của họ IL-17 đã cho thấy bốn xystein được bảo toàn đã tạo ra hai liên kết disulfua (Yao Z, et al 1995, J. Immunol. 155:5483–6). IL-17 độc đáo ở chỗ nó không mang nét tương đồng với các in-to-ơ-kin đã biết khác. Ngoài ra, IL-17 không mang nét tương đồng với các protein và miền cấu trúc đã biết khác (Kolls JK, Linden A2004, Immunity 21:467–76). Nói chung, các thành viên khác của họ IL-17 như IL-17F tạo ra đồng dime (tương tự IL-17A).

IL-17A cũng đã được biết là tạo ra heterodime với IL-17F trong điều kiện cụ thể. Heterodime IL-17AF cũng được tạo ra bởi tế bào Th17 sau khi được kích thích bởi IL-23.

IL-17AF được cho là truyền tín hiệu qua các thụ thể IL-17RA và IL-17RC tương tự IL-17A và IL-17F. Chức năng sinh học của IL-17AF tương tự chức năng sinh học của IL-17A và IL-17F. Sự kích thích tế bào đích bởi IL-17AF cảm ứng sự sản xuất một loạt các chemokin, ngoài ra để tăng bạch cầu trung tính ở đường hô hấp trong hoàn cảnh thích hợp. IL-17AF được coi là ít hiệu lực trong các hoạt động này hơn so với đồng dime IL-17A, nhưng có hiệu lực nhiều hơn so với đồng dime IL-17F. Ví dụ, nếu hiệu lực của IL-17A là 1, thì hiệu lực tương đối của IL-17AF là khoảng 1/10 hiệu lực của IL-17A và hiệu lực tương đối của IL-17F là khoảng 1/100 hiệu lực của IL-17A. IL-17AF của người và chuột nhất đều thể hiện hoạt tính trên tế bào chuột nhất. IL-17AF gồm tổng cộng 271 axit amin và có trọng lượng phân tử xấp xỉ là 30,7kDa (dữ liệu từ bản mô tả sản phẩm Heterodime IL- 17AF của người của hãng Shenandoah Biotechnology).

Một số cấu trúc tinh thể có liên quan đã được công bố. Các cấu trúc này bao gồm cấu trúc tinh thể của đồng dime IL-17F (Hymowitz et al 2001, EMBO J, 19:5332-5341).

Cấu trúc tinh thể của IL-17F trong phức hợp với thụ thể IL-17RA cũng đã được công bố (Ely et al., 2009 Nature Immunology 10:1245–1251). Ngoài ra, ít nhất một cấu trúc tinh thể của IL-17A trong phức hợp với mảnh Fab của kháng thể đã được công bố (Gerhardt et al., 2009 Journal of Molecular Biology, 5:905-921).

Một số bệnh viêm và tự miễn bao gồm bệnh vẩy nến liên quan đến việc kích hoạt các đáp ứng Th1 và/ hoặc Th17 tăng. Nhiều bệnh trong số các bệnh này hiện được điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch thông thường hoặc các chất sinh học hoạt động rất đặc hiệu như kháng thể kháng TNF- α nhưng không có hiệu quả ở tất cả các bệnh nhân. Những chất này được phát hiện thấy là làm tăng nguy cơ nhiễm trùng và trở nên không hiệu quả sau khi được lặp lại sự điều trị này. Do đó, tồn tại nhu cầu y tế chưa được đáp ứng với các điều trị có tập hợp các đặc điểm về độ an toàn tăng và khả năng đồng thời cảm ứng sự thuyên giảm dài hạn hoặc chữa khỏi bệnh.

Rất nhiều chức năng điều hòa miễn dịch đã được báo cáo cho các xytokin thuộc họ IL-17, nó được cho là do sự cảm ứng đối với nhiều phân tử truyền tín hiệu miễn dịch của các xytokin này. Vai trò đáng lưu ý nhất của IL-17A là sự liên quan của nó trong sự cảm ứng và làm trung gian gây các đáp ứng tiền viêm. IL-17A cũng liên quan đến các đáp ứng dị ứng. IL-17 cảm ứng sự sản xuất nhiều xytokin khác (như IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α), các chemokin (bao gồm IL-8, GRO- α , và MCP-1), và các prostaglandin (ví dụ, PGE2) từ nhiều loại tế bào (nguyên bào sợi, tế bào nội mạc, tế bào biểu mô, tế bào sừng, và đại thực bào). Sự giải phóng xytokin dẫn đến nhiều hoạt động chức năng, như tái tạo đường hô hấp, một đặc tính của các đáp ứng IL-17A. Sự biểu hiện chemokin gia tăng thu hút các tế bào khác gồm bạch cầu trung tính nhưng không gồm bạch cầu ái toan. Chức năng của IL-17 cũng rất cần thiết đối với tập hợp con của các tế bào T CD4+ được gọi là tế bào T hỗ trợ 17 (Th17). Do có các vai trò này, họ IL-17 có liên quan đến nhiều bệnh liên quan đến miễn dịch/ tự miễn bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh hen, bệnh luput, chứng thái loại đồng ghép và miễn dịch kháng khối u (Aggarwal S, Gurney AL 2002, J. Leukoc. Biol. 71:1–8). Ngoài ra, các mối liên quan đã được nối với các tình trạng khác như tình trạng viêm xương khớp, tình trạng nhiễm trùng máu, tình trạng nhiễm trùng hoặc tình trạng sốc nội độc tố, tình trạng phản ứng dị ứng, tình trạng mất xương, bệnh vẩy nến, tình trạng thiếu máu, tình trạng xơ cứng toàn thân, tình trạng xơ hóa, và tình trạng đột quỵ.

Một số kháng thể kháng IL-17A đã được tạo ra và được đề nghị để sử dụng trong điều trị bệnh và rối loạn qua trung gian IL-17A bao gồm các kháng thể được liệt kê trong WO2011053763 (Centocor) và WO2012093254 (UCB Pharma). Ngoài ra, US20070218065 (Zymogenetics) mô tả kháng thể gắn kết với heterodime của cả hai

IL-17A và F, cũng như với IL-17F homodime. Các kháng thể kháng IL-17 có tính phản ứng chéo giữa các loài cũng đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật bao gồm công bố đơn quốc tế số WO2007149032 (AstraZeneca), tài liệu này mô tả kháng thể kháng IL-17A của người gắn kết với IL-17A của người, của khỉ cynomolgus (cyno) và của chó nhưng không gắn kết với IL-17A của loài gặm nhấm. Tương tự, công bố đơn quốc tế số WO2007070750 (Eli Lilly) mô tả kháng thể kháng IL-17 của người (mAb126), gắn kết với IL-17 của người và của khỉ, nhưng không gắn kết với IL-17 của chuột hoặc của chuột nhắt. Các kháng thể công cụ đối với IL-17A cũng sẵn có bao gồm kháng thể của loài gặm nhấm eBio64DEC17 mà nhận dạng cả hai IL-17A của người và của chuột, cũng như một vài loài khác.

Do đó, tồn tại nhu cầu đối với các kháng thể đặc hiệu đối kháng với tác động của IL-17A, có tính phản ứng chéo nhiều loài và có khả năng ức chế hoạt tính cảm ứng của IL-17A, và cụ thể là chế phẩm và phương pháp sử dụng các kháng thể đã nêu để điều trị rối loạn bệnh lý mà có thể được điều trị bằng sự ức chế sự truyền tín hiệu của IL-17A.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể của người để điều trị bệnh phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) theo SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) theo SEQ ID NO: 43, và trong đó kháng thể hoặc phân tử đã nêu gắn kết đặc hiệu với IL-17A homodime và IL-17AF heterodime, nhưng không gắn kết đặc hiệu với IL-17F homodime.

Theo một phương án, IL-17A, IL-17AF hoặc IL-17F được chọn từ một hoặc nhiều, như hai hoặc ba hoặc nhiều loài trong số, khỉ đuôi dài, khỉ vàng, khỉ đuôi sóc, chuột, chuột nhắt hoặc người. Theo một phương án cụ thể, IL-17A, IL-17AF hoặc IL-17F này từ người. Theo một phương án cụ thể, IL-17A, IL-17AF hoặc IL-17F này từ khỉ đuôi dài, khỉ vàng, khỉ đuôi sóc, chuột, chuột nhắt và người.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm các CDR của chuỗi nặng, gồm các trình tự, SEQ ID NO: 7, SEQ ID

NO: 8 và SEQ ID NO: 3 và các CDR của chuỗi nhẹ, gồm các trình tự, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng của globulin miễn dịch có SEQ ID NO: 14, và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có SEQ ID NO: 44.

Theo một khía cạnh của sáng chế, kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất, mà gắn kết với epitop tương tự như kháng thể phân lập được hoặc phân tử theo phương án cụ thể của sáng chế.

Theo một phương án, kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với epitop IL-17A, như epitop IL-17A của người, mà bao gồm Arg78, Glu80, và Trp90.

Epitop IL-17A có thể còn bao gồm Tyr85 hoặc Arg124.

Theo một phương án, epitop IL-17A, như epitop IL-17A của người, còn bao gồm một hoặc nhiều trong số Pro82, Ser87 hoặc Val88.

Theo một khía cạnh của sáng chế, kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất, mà bao gồm bề mặt nhận diện kháng nguyên có các đặc tính nhận diện epitop tương đương với kháng thể hoặc phân tử theo các phương án cụ thể.

Theo một khía cạnh của sáng chế, kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất mà bị chặn ngang khỏi sự gắn kết với IL-17A, như IL-17A của người, hoặc IL-17AF, như IL-17AF của người, bởi ít nhất một kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo các phương án cụ thể.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó không gắn kết đặc hiệu với a) một hoặc nhiều homodime bất kỳ trong số homodime IL-17F của người, homodime IL-17B của người, homodime IL-17C của người, IL-17D homodime của người, homodime IL-17E của người, và/hoặc b) một hoặc nhiều homodime bất kỳ trong số homodime IL-17F của khỉ đuôi dài, homodime IL-17F của chuột nhắt,

và/hoặc c) một hoặc nhiều xytokin bất kỳ trong số các xytokin khác của người được chọn từ nhóm bao gồm IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, gIFN, TNF alpha, EGF, GMCSF, TGF beta 2, và/hoặc d) một hoặc nhiều xytokin bất kỳ trong số các xytokin khác của chuột nhắt, được chọn từ nhóm bao gồm IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL18, IL23, IFN hoặc TNF.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với IL-17A, như IL-17A của người, sao cho kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó ức chế hoặc chặn gắn kết giữa IL-17A và thụ thể của nó, và làm giảm hoặc vô hiệu hóa hoạt động của IL-17A.

Theo một phương án, ái lực gắn kết kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó đối với IL-17A của người là 100nM hoặc thấp hơn, 10nM hoặc thấp hơn, 1nM hoặc thấp hơn, 100pM hoặc thấp hơn, hoặc 10pM hoặc thấp hơn khi được đo bằng Biacore™. Theo phương án cụ thể, ái lực gắn kết của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó đối với IL-17A của người là nhỏ hơn 200pM, hoặc nhỏ hơn 100pM, khi được đo bằng Biacore™.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có khả năng ức chế sự tiết IL-6, hoặc sự tiết GRO-alpha khi được đánh giá in vitro, tốt hơn là bằng cách sử dụng các tế bào sụn hoặc nguyên bào sợi được nuôi cấy.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có khả năng ức chế sự sưng đầu gối trong mô hình thử nghiệm viêm khớp do kháng nguyên in vivo, như mô hình AIA ở chuột.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được liên hợp với gốc có hoạt tính khác.

Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có thể là kháng thể đơn dòng hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, tốt hơn là kháng thể dạng khảm, kháng thể được làm giống như của người, hoặc kháng thể của người hoặc phần của nó.

Theo một khía cạnh của sáng chế, dược phẩm được đề xuất, bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án của sáng chế, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Theo một phương án, dược phẩm chứa một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung.

Theo một phương án cụ thể, dược phẩm đã nêu là chế phẩm dạng đông khô. Theo phương án cụ thể khác, dược phẩm là chế phẩm dạng lỏng chứa lượng dược dụng của kháng thể hoặc phân tử theo sáng chế, tốt hơn là được bào chế dưới dạng ống tiêm đóng sẵn thuốc.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng kháng thể đã nêu hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, ví dụ các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, trong việc sử dụng làm thuốc, tốt hơn nữa là, cho việc điều trị rối loạn bệnh lý trung gian bởi IL-17A hoặc mà có thể được điều trị bằng sự ức chế sự truyền tín hiệu của IL-17A, hoặc sự tiết IL-6 hoặc sự tiết GRO-alpha.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng cho việc điều trị các rối loạn tự miễn và rối loạn viêm nhiễm, như chứng viêm khớp, chứng viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm thận do luput, bệnh hen, bệnh đa xơ cứng, hoặc bệnh xơ nang.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó đã nêu theo sáng chế, ví dụ kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, trong bào chế thuốc để sử dụng trong điều trị rối loạn bệnh lý qua trung gian bởi IL-17A hoặc rối loạn bệnh lý có thể được điều trị bằng cách ức chế sự tiết IL-6 hoặc sự tiết GRO-alpha.

Theo một phương án cụ thể, rối loạn bệnh lý qua trung gian bởi IL-17A hoặc rối loạn bệnh lý có thể được điều trị bằng cách ức chế sự tiết IL-6 hoặc sự tiết GRO-alpha là rối loạn hoặc tình trạng viêm, như chứng viêm khớp, chứng viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm thận do luput, bệnh hen, bệnh đa xơ cứng hoặc bệnh xơ nang.

Theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp điều trị rối loạn bệnh lý trung gian bởi IL-17A, hoặc rối loạn bệnh lý có thể được điều trị bằng cách ức chế sự tiết IL-6 hoặc sự tiết GRO-alpha được đề xuất, phương pháp đã nêu bao gồm việc sử dụng lượng hiệu quả kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, ví dụ kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, sao cho tình trạng bệnh này được thuyên giảm.

Theo một phương án, tình trạng bệnh là rối loạn hoặc tình trạng viêm, như chứng viêm khớp, chứng viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm thận do luput, bệnh hen, bệnh đa xơ cứng hoặc bệnh xơ nang.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương tiện sản xuất kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Các phương tiện này bao gồm phân tử axit nucleic phân lập mã hóa ít nhất là vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế hoặc các vector tách dòng hoặc vector biểu hiện chứa các axit nucleic này, cụ thể là, cho việc sản xuất tái tổ hợp kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, ví dụ, XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, trong tế bào chủ. Theo phương án cụ thể, vector tách dòng hoặc vector biểu hiện này chứa ít nhất một trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18, 31, 51, 19, 28, 32, 38, 40, 46, 48, 52, 56, và 58. Theo phương án khác, vector tách dòng hoặc vector biểu hiện này chứa ít nhất một trong số các trình tự mã hóa các trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ sau được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 29, 49, 17, 27, 30, 37, 39, 45, 47, 50, 55, và 57, liên kết linh hoạt với các trình tự của promotor thích hợp, mà đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, phân tử axit nucleic này là ARN thông tin (mARN),

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa một hoặc nhiều vector tách dòng hoặc vector biểu hiện như được mô tả ở trên và đề cập đến quy trình tạo kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, ví dụ XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, quy trình đã nêu bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ, tinh sạch và thu kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó đã nêu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của Fab XAB1. Fig.1A là hình biểu diễn dạng lắp đầy không gian. Fig.1B là hình biểu diễn dạng hoạt họa.

Fig.2 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB1 và IL-17A của người. Fig.2A biểu diễn hai mảnh Fv XAB1 ở dạng lắp đầy không gian và Fig.2B biểu diễn hai mảnh Fv XAB1 ở dạng hoạt họa.

Fig.3 thể hiện biểu đồ kết quả ELISA theo ví dụ. Sự đánh số trong biểu đồ này tương ứng với sự đặt tên ứng viên thuốc như sau: 1 là MB440; 2 là MB464; 3 là MB468; 4 là MB444; 5 là MB435; 6 là MB463; 7 là XAB1. Fig.3A là biểu đồ biểu diễn tín hiệu được chuẩn hóa so với nồng độ Fab (M). Fig.3B là biểu đồ cho thấy tín hiệu còn lại được chuẩn hóa so với thời gian ủ rửa (giờ). Fig.3C là biểu đồ cho thấy tín hiệu được chuẩn hóa so với nồng độ chất cạnh tranh của Fab (M).

Fig.4 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB2 và IL-17A của người. Fig.4A biểu diễn hai mảnh Fv XAB2 ở dạng lắp đầy không gian và Fig.4B biểu diễn hai mảnh Fv XAB2 được trình bày ở dạng hoạt họa.

Fig.5 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB2 và IL-17A của người ở dạng quan sát cận cảnh.

Fig.6 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB5 và IL-17A của người. Fig.6A biểu diễn hai mảnh Fv XAB5 ở dạng lắp đầy không gian và Fig.6B biểu diễn hai mảnh Fv XAB5 ở dạng hoạt họa.

Fig.7 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB5 và IL-17A của người, dạng quan sát cận cảnh L-CDR1 của kháng thể này.

Fig.8 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB4 và IL-17A của người. Fig.8A biểu diễn hai mảnh Fv XAB4 ở dạng lắp đầy không gian. Fig.8B biểu diễn hai mảnh Fv XAB4 ở dạng hoạt họa.

Fig.9 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB4 và IL-17A của người là dạng quan sát cận cảnh L-CDR1 của kháng thể này.

Fig.10 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB4 và IL-17A của người là dạng quan sát cận cảnh L-CDR2 của kháng thể này.

Fig.11 là biểu đồ thể hiện điểm số đánh giá sự điều trị chữa bệnh bằng XAB4 trong mô hình viêm não tủy tự miễn thực nghiệm (Experimental autoimmune encephalomyelitis-EAE).

Fig.12 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi trọng lượng trong điều trị chữa bệnh (%) của các động vật thuộc mô hình EAE.

Fig.13 là biểu đồ thể hiện điểm số đánh giá tích lũy trong điều trị chữa bệnh trong mô hình EAE.

Các Fig.14 và Fig.15 là các biểu đồ thể hiện sự so sánh giữa điểm số điều trị trước và sau khi điều trị trong mô hình EAE.

Fig.16 là biểu đồ thể hiện điểm số đánh giá trong điều trị phòng bệnh bằng XAB4 trong mô hình EAE.

Fig.17 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi trọng lượng trong điều trị phòng bệnh (%) của các động vật thuộc mô hình EAE.

Fig.18 là biểu đồ thể hiện điểm số đánh giá tích lũy trong điều trị phòng bệnh trong mô hình EAE.

Fig.19 là biểu đồ thể hiện điểm số đánh giá tối đa trong điều trị phòng bệnh trong mô hình EAE.

Fig.20 là biểu đồ thể hiện sự khởi phát EAE trong mô hình EAE.

Fig.21 là biểu đồ thể hiện tác động đối kháng của XAB4 lên sự giải phóng IL-6 trong mô hình tế bào hình sao của người.

Fig.22 là biểu đồ thể hiện tác động đối kháng của XAB4 lên sự giải phóng CXCL1 trong mô hình tế bào hình sao của người.

Fig.23 là biểu đồ thể hiện tác động đối kháng của XAB4 lên sự giải phóng IL-8 trong mô hình tế bào hình sao của người.

Fig.24 là biểu đồ thể hiện tác động đối kháng của XAB4 lên sự giải phóng GM-CSF trong mô hình tế bào hình sao của người.

Fig.25 là biểu đồ thể hiện tác động đối kháng của XAB4 lên sự giải phóng CCL2 trong mô hình tế bào hình sao của người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Để sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn, một số thuật ngữ nhất định đã được xác định trước. Các định nghĩa bổ sung được nêu ra trong toàn bộ phần Mô tả chi tiết sáng chế.

Thuật ngữ “đáp ứng miễn dịch” dùng để chỉ hoạt động của, ví dụ, các tế bào lympho, tế bào trình diện kháng nguyên, tế bào thực bào, tế bào bạch cầu, và các đại phân tử hòa tan được tạo ra bởi các tế bào nêu trên hoặc được tạo ra bởi gan (bao gồm kháng thể, xytokin, và bổ thể) dẫn đến sự tằm tổn thương chọn lọc, sự phá hủy, hoặc sự loại bỏ khỏi cơ thể người sự xâm nhập của các tác nhân gây bệnh, tế bào hoặc mô bị nhiễm các tác nhân gây bệnh, các tế bào ung thư, hoặc, trong trường hợp tự miễn hoặc viêm bệnh lý, là tế bào hoặc mô của người bình thường.

Thuật ngữ “con đường tải nạp tín hiệu” hoặc “hoạt tính truyền tín hiệu” dùng để chỉ quan hệ nhân quả về hóa sinh thường được bắt đầu từ tương tác protein-protein như sự gắn kết của yếu tố tăng trưởng với thụ thể, dẫn đến sự truyền tín hiệu từ một phần của tế bào đến các phần khác của tế bào. Nhìn chung, sự truyền tín hiệu này bao gồm sự phosphoryl hóa đặc hiệu một hoặc nhiều gốc tyrosin, serin, hoặc threonin trên một hoặc nhiều protein trong các chuỗi của các phản ứng dẫn đến sự tải nạp tín hiệu. Các quá trình áp chót thường bao gồm các sự kiện diễn ra trong nhân, dẫn đến sự thay đổi biểu hiện gen.

“Kháng thể” xuất hiện trong tự nhiên là glycoprotein gồm ít nhất là hai chuỗi nặng (heavy-H) và hai chuỗi nhẹ (light-L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua.

Mỗi chuỗi nặng được cấu tạo từ vùng biến đổi của chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là V_H) và vùng cố định của chuỗi nặng. Vùng cố định của chuỗi nặng được cấu tạo từ ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ được cấu tạo từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là V_L) và vùng cố định của chuỗi nhẹ. Vùng cố định của chuỗi nhẹ được cấu tạo từ một miền, C_L . Vùng V_H và V_L có thể được chia nhỏ hơn thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng quyết định bổ trợ (CDR), nằm xen kẽ với các vùng được bảo tồn hơn, được gọi là vùng sườn (FR). Mỗi V_H và V_L được cấu tạo từ ba CDR và bốn FR được sắp xếp từ đầu amino tới đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết mà tương tác với kháng nguyên. Các vùng cố định của kháng thể có thể trung gian cho sự gắn kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố của vật chủ, bao gồm nhiều tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào thực hiện) và thành phần đầu tiên (C1q) của hệ thống bổ thể cổ điển.

Các thuật ngữ “vùng quyết định bổ trợ”, và “CDR”, như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các trình tự axit amin trong vùng biến đổi của kháng thể mà quyết định tính đặc hiệu kháng nguyên và ái lực gắn kết. Nhìn chung, có ba CDR trong mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2, HCDR3) và ba CDR trong mỗi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Các ranh giới trình tự axit amin chính xác của CDR cụ thể có thể được xác định bằng cách sử dụng sơ đồ bất kỳ trong số rất nhiều những sơ đồ đã được biết rõ, bao gồm những sơ đồ được mô tả bởi Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (sơ đồ đánh số “Kabat”), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (sơ đồ đánh số “Chothia”). Ví dụ, ở các định dạng cổ điển, theo Kabat, các gốc axit amin của CDR trong miền biến đổi của chuỗi nặng (V_H) được đánh số 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), và 95-102 (HCDR3); và các gốc axit amin của CDR trong miền biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) được đánh số 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), và 89-97 (LCDR3). Trong Chothia, axit amin của CDR trong V_H được đánh số 26-32 (HCDR1'), 52-56 (HCDR2'), và 95-102 (HCDR3'); và gốc axit amin trong V_L được đánh số 26-32 (LCDR1'), 50-52 (LCDR2'), và 91-96 (LCDR3'). Bằng cách kết hợp các định nghĩa CDR của cả Kabat và Chothia, các CDR này bao gồm các gốc axit

amin 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), và 95-102 (HCDR3) trong VH người và gốc axit amin 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), và 89-97 (LCDR3) trong VL người.

Thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể (hoặc đơn giản là “phần kháng nguyên”), như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ toàn bộ chiều dài hoặc một hoặc nhiều mảnh của kháng thể, như là protein, mà vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, phần của IL-17A). Đã được chứng minh rằng chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các mảnh của kháng thể hoàn chỉnh có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết được bao gồm trong thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể này bao gồm mảnh Fab, mảnh đơn trị bao gồm miền V_L , V_H , C_L và $CH1$; mảnh $F(ab)_2$, mảnh lưỡng trị gồm hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu disulfua ở vùng bản lề; mảnh F_d bao gồm miền V_H và $CH1$; mảnh F_v bao gồm miền V_L và V_H của một bên vai của kháng thể; mảnh dAb (Ward et al. 1989, Nature 341:544-546), bao gồm miền V_H ; và vùng quyết định bổ trợ (CDR) được phân lập, hoặc các protein dung hợp bất kỳ chứa phần gắn kết kháng nguyên này.

Theo đó, thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” đã nêu cũng có thể dùng để chỉ các phần tương ứng với kháng thể theo sáng chế mà có thể được bao gồm các vùng sườn hoặc các khung khác như các kháng thể của lạc đà hoặc các phân tử ‘không phải kháng thể’ như được mô tả dưới đây.

Ngoài ra, mặc dù hai miền mảnh của F_v này, V_L và V_H , được mã hóa bằng các gen riêng biệt, chúng có thể được kết hợp lại, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng phân tử nối tổng hợp nhân tạo cho phép chúng được tạo như protein chuỗi đơn trong đó các vùng V_L và V_H ghép cặp để tạo ra các phân tử đơn trị (được biết như F_v chuỗi đơn (scFv); xem, ví dụ, Bird et al. 1988, Science 242:423-426; và Huston et al. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được dự định để được bao gồm trong thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể. Các mảnh kháng thể có được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và các mảnh này được sàng lọc để sử dụng theo các phương thức giống như với các kháng thể nguyên vẹn.

"Kháng thể phân lập được", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ kháng thể gần như là không chứa các kháng thể khác mà có các vị trí đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể phân lập được gắn kết đặc hiệu với IL-17A, như IL-17A của người, gần như là không chứa các kháng thể gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác ngoài IL-17A). Kháng thể phân lập được gắn kết đặc hiệu với IL-17A, tuy nhiên, có thể là có phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như các phân tử IL-17A của các loài khác, hoặc các heterodime của IL-17, như IL-17AF. Hơn nữa, kháng thể phân lập được có thể gần như là không chứa các vật liệu hoặc chất hóa học khác của tế bào.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chế phẩm các phân tử kháng thể của hợp phần phân tử duy nhất. Chế phẩm kháng thể đơn dòng cho thấy tính đặc hiệu gắn kết đơn và ái lực đơn với epitop cụ thể.

Thuật ngữ IL-17A dùng để chỉ IL-17A của người như được xác định trong SEQ ID NO: 76 hoặc SEQ ID NO: 78 trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ IL-17F này dùng để chỉ IL-17F của người như được xác định trong SEQ ID NO: 77 trừ khi có quy định khác. IL-17AF là heterodime của tiểu phần IL-17A và tiểu phần của IL-17F, như sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các protein tái tổ hợp, được ký hiệu bằng tiền tố "r" (recombinant), từ các loài khác đã được sử dụng trong các thử nghiệm được mô tả dưới đây. Ví dụ, IL-17A của người tái tổ hợp được ký hiệu là rhuIL-17. Người có hiểu biết trong lĩnh vực này biết cách để biểu hiện các protein này bằng cách sử dụng các nguyên liệu ban đầu và các quy trình tiêu chuẩn như đã biết trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, để giúp đỡ cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trừ khi có quy định khác, các trình tự axit amin sau có thể được sử dụng: (cyno) IL-17A của khỉ đuôi dài, SEQ ID NO: 79; cynoIL-17F, SEQ ID NO: 80; (rhesus) IL-17A của khỉ vàng, SEQ ID NO: 81; (marmoset) IL-17A của khỉ đuôi sóc, SEQ ID NO: 82; (m) IL-17A của chuột nhắt, SEQ ID NO: 83; mIL-17F, SEQ ID NO: 84, (r) IL-17A của chuột, SEQ ID NO: 85; thụ thể A IL-17 của người (huIL-17RA), SEQ ID NO: 86. Như được biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này, các trình tự được đề cập ở trên có thể biến đổi một chút, có nghĩa là do chúng được tạo thành từ các nhóm quần thể khác nhau. Ví dụ, các kháng thể công cụ cũng được sử dụng, ví dụ,

cho mục đích sàng lọc. Các kháng thể này là các kháng thể tiêu chuẩn và có thể được tạo ra một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “epitop” dùng để chỉ quyết định protein có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng thể. Các epitop thường gồm các nhóm có bề mặt hoạt động hóa học của các phân tử như axit amin hoặc chuỗi bên chứa phân tử đường và thường có các đặc tính cấu trúc không gian ba chiều đặc hiệu, cũng như các đặc tính điện tích đặc hiệu. Các epitop biến đổi cấu dạng và các epitop không biến đổi cấu dạng được phân biệt ở chỗ sự gắn kết với epitop biến đổi cấu dạng, không phải với epitop không biến đổi cấu dạng bị mất khi có mặt các dung môi biến tính.

Thuật ngữ “isotyp” dùng để chỉ lớp kháng thể (ví dụ, IgM, IgE, IgG như IgG1 hoặc IgG4) chúng được tạo ra bởi gen mã hóa vùng cố định của chuỗi nặng. Isotyp cũng bao gồm các bản cải biến của một trong số các lớp kháng thể này, trong đó các cải biến được tạo ra để biến đổi chức năng của Fc, ví dụ, tăng cường hoặc làm giảm chức năng tác động hoặc gắn kết với thụ thể của Fc.

Thuật ngữ “kháng thể của người”, như được sử dụng ở đây, được dự định để bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi trong đó cả vùng sườn và vùng CDR có nguồn gốc từ các trình tự gốc của người. Ngoài ra, nếu kháng thể chứa vùng cố định, vùng cố định này cũng có nguồn gốc từ các trình tự của người này, ví dụ, các trình tự dòng mầm của người, hoặc các bản đột biến của trình tự dòng mầm của người hoặc kháng thể chứa trình tự vùng sườn liên ứng có nguồn gốc từ sự phân tích trình tự vùng sườn của người, ví dụ, như được mô tả trong Knappik, et al. 2000, J Mol Biol 296:57-86).

Kháng thể “được làm giống như của người” là kháng thể giữ được tính phản ứng của kháng thể không phải kháng thể của người trong khi ít gây ra đáp ứng miễn dịch ở người. Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách giữ vùng CDR không phải của người và thay thế các phần còn lại của kháng thể này bằng các phần tương ứng khác của người (có nghĩa là, vùng cố định cũng như các phần vùng sườn của vùng biến đổi). Xem, ví dụ, tài liệu của Morrison et al. 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855; tài liệu của Morrison và Oi, 1988, Adv. Immunol., 44:65-92; tài liệu của Verhoeven et al. 1988, Science, 239:1534-1536; tài liệu của Padlan 1991, Molec. Immun., 28:489-498; và tài liệu của Padlan 1994, Molec. Immun., 31:169-217. Các ví

dự khác cho quy trình thiết kế làm giống như của người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, công nghệ Xoma được bộc lộ trong US 5,766,886.

Kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách tạo đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến điểm đặc hiệu in vitro hoặc bằng cách tạo đột biến soma in vivo). Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể của người”, như được sử dụng ở đây, không được dự định để bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột nhắt, được ghép vào các trình tự vùng sườn của người.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng của người” dùng để chỉ kháng thể biểu hiện tính đặc hiệu gắn kết duy nhất có các vùng biến đổi trong đó cả vùng sườn và vùng CDR có nguồn gốc từ các trình tự của người.

Thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp của người”, như được sử dụng ở đây, bao gồm tất cả các kháng thể của người được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc được phân lập bằng các phương thức tái tổ hợp, như các kháng thể phân lập được từ động vật (ví dụ, chuột nhắt) là động vật chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể cho các gen globulin miễn dịch của người hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó, các kháng thể phân lập được từ tế bào chủ được biến nạp biểu hiện kháng thể của người, ví dụ, từ tế bào chuyển nhiễm, các kháng thể phân lập được từ thư viện tổ hợp kháng thể của người, tái tổ hợp, và kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương thức bất kỳ gồm ghép nối tất cả hoặc một phần trình tự gen globulin miễn dịch với các trình tự ADN khác. Các kháng thể tái tổ hợp của người này có vùng biến đổi trong đó vùng sườn và vùng CDR có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Theo các phương án cụ thể, tuy nhiên, các kháng thể tái tổ hợp của người này có thể là đối tượng cho kỹ thuật gây đột biến in vitro (hoặc, khi động vật chuyển gen cho các trình tự Ig của người được sử dụng, gây đột biến soma in vivo) và vì thế các trình tự axit amin của vùng V_H và V_L của các kháng thể tái tổ hợp này là các trình tự đó, trong khi có nguồn gốc từ và liên quan tới các trình tự V_H và V_L dòng mầm của người, có thể không tồn tại cách tự nhiên trong danh mục kháng thể dòng mầm của người in vivo.

Như được sử dụng ở đây, "isotyp" dùng để chỉ lớp kháng thể (ví dụ, IgM, IgE, IgG, như IgG1 hoặc IgG4) mà được tạo ra bởi gen của vùng cố định của chuỗi nặng.

Cụm từ "kháng thể nhận biết kháng nguyên" và "kháng thể đặc hiệu kháng nguyên" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả cùng với thuật ngữ "kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên".

Như được sử dụng ở đây, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó "gắn kết đặc hiệu với polypeptit IL-17A" được dự định dùng để chỉ kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với polypeptit IL-17A của người có K_D bằng 100nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn, 100pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 10pM hoặc nhỏ hơn. Kháng thể "phản ứng chéo với kháng nguyên khác không phải là IL-17A" được dự định dùng để chỉ kháng thể gắn kết kháng nguyên có K_D bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 100 pM hoặc nhỏ hơn. Kháng thể "không phản ứng chéo với kháng nguyên cụ thể" được dự định dùng để chỉ kháng thể gắn kết với kháng nguyên, có K_D bằng 100 nM hoặc lớn hơn, hoặc K_D bằng 1 μ M hoặc lớn hơn, hoặc K_D bằng 10 μ M hoặc lớn hơn. Theo phương án cụ thể, các kháng thể này không phản ứng chéo với kháng nguyên bậc lộ sự gắn kết về căn bản là không phát hiện được với các protein này trong các thử nghiệm gắn kết tiêu chuẩn.

Thuật ngữ " K_{assoc} " hoặc " K_a ", như được sử dụng ở đây, được dự định dùng để chỉ tốc độ hình thành các tương tác kháng nguyên-kháng thể cụ thể, trong khi thuật ngữ " K_{dis} " hoặc " K_d ", như được sử dụng ở đây, được dự định dùng để chỉ tốc độ phân ly các tương tác kháng nguyên-kháng thể cụ thể.

Thuật ngữ " K_D ", như được sử dụng ở đây, được dự định dùng để chỉ hằng số phân ly, có được từ tỷ lệ của K_d so với K_a (tức là K_d/K_a) và được biểu hiện là nồng độ mol (M). Các giá trị K_D của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được công bố cụ thể trong lĩnh vực này. Phương pháp xác định K_D của kháng thể là bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc sử dụng hệ thống cảm biến sinh học như hệ thống Biacore™, được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được thực hiện, ví dụ, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Sự ức chế gắn kết của IL-17 với thụ thể của nó có thể kiểm tra cách thích hợp trong nhiều thử nghiệm khác nhau bao gồm thử nghiệm được mô tả sau đây trong bản mô tả. Thuật ngữ “ở cùng mức độ” dùng để chỉ phân tử tham chiếu và phân tử đương lượng biểu hiện, trên cơ sở thống kê, hoạt tính ức chế IL-17 về cơ bản là giống hệt nhau trong một thử nghiệm trong số các thử nghiệm được đề cập ở đây (xem phần Ví dụ thực hiện sáng chế). Ví dụ, phân tử gắn kết IL-17 theo sáng chế thường là có một nửa nồng độ ức chế tối đa (IC_{50}), để ức chế IL-17 của người lên sự sản xuất IL-6 được cảm ứng bởi IL-17 của người từ nguyên bào sợi của biểu bì người, trong vòng $\pm 10^5$, tức là dưới 10nM, tốt hơn là 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 hoặc 2nM của phân tử theo sáng chế, tốt hơn là về cơ bản là giống như, IC_{50} của phân tử tham chiếu tương ứng khi được thử nghiệm, ví dụ, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Theo cách khác, thử nghiệm đã được sử dụng có thể là thử nghiệm ức chế cạnh tranh của sự gắn kết của IL-17 giữa các thụ thể hòa tan được của IL-17 và phân tử gắn kết IL-17 theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ái lực” dùng để chỉ độ mạnh tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên ở các vị trí trên kháng nguyên duy nhất. Với mỗi vị trí trên kháng nguyên, vùng biến đổi của “cánh tay” kháng thể tương tác qua các lực tương tác không phải liên kết cộng hóa trị yếu với kháng nguyên này ở nhiều vị trí; tương tác càng nhiều, ái lực càng mạnh. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ái lực cao” của kháng thể IgG hoặc mảnh của nó (ví dụ, mảnh Fab) dùng để chỉ kháng thể có K_D bằng $10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, $10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, hoặc $10^{-10}M$, hoặc $10^{-11}M$ hoặc nhỏ hơn, hoặc $10^{-12}M$ hoặc nhỏ hơn, hoặc $10^{-13}M$ hoặc nhỏ hơn với kháng nguyên đích. Tuy nhiên, gắn kết ái lực cao có thể có thể khác nhau 10 lần so với các isotyp kháng thể khác. Ví dụ, gắn kết ái lực cao của isotyp IgM dùng để chỉ kháng thể có K_D bằng $10^{-7}M$ hoặc nhỏ hơn, hoặc $10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ái tính” dùng để chỉ đại lượng cung cấp thông tin về độ bền hoặc độ mạnh toàn thể của phức kháng nguyên-kháng thể. Nó được kiểm soát bởi ba yếu tố chính: ái lực với epitop của kháng thể; hóa trị của cả kháng nguyên và kháng thể; và sự sắp xếp về cấu trúc của các phần tương tác. Sau cùng là các yếu tố này xác định tính đặc hiệu của kháng thể, đó là, có nhiều khả năng kháng thể cụ thể gắn kết với epitop chính xác của kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó ức chế IL-17A gắn kết với IL-17R được dự định dùng để chỉ kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó ức chế IL-17A gắn kết với IL-17R có IC_{50} bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là có IC_{50} bằng 1nM hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là có IC_{50} bằng 100pM, hoặc nhỏ hơn, khi được đo bằng thử nghiệm gắn kết cạnh tranh in vitro. Thử nghiệm này được mô tả chi tiết hơn trong phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất đối kháng IL-17A” hoặc “phân tử khóa IL-17A” được dự định dùng để chỉ kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó ức chế hoạt động truyền tín hiệu được cảm ứng bởi IL-17A qua IL-17R và do đó, làm giảm hoặc vô hiệu hóa hoạt tính của IL-17A. Điều này có thể được thể hiện trong thử nghiệm trên tế bào của người như thử nghiệm sản xuất IL-16 hoặc GRO-alpha phụ thuộc vào IL-17A trong tế bào của người. Thử nghiệm này được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Theo một số phương án, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế ức chế sự sản xuất IL-16 hoặc GRO-alpha phụ thuộc vào IL-17A như được đo trong thử nghiệm tế bào của người ở in vitro có IC_{50} bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 100pM hoặc nhỏ hơn. Thử nghiệm này được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Theo một số phương án kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế ức chế kháng nguyên gây chứng viêm khớp trong các thử nghiệm in vivo ở chuột nhắt và chuột. Các thử nghiệm này được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ADCC” hoặc hoạt tính “gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể” dùng để chỉ hoạt tính làm suy kiệt tế bào. Hoạt tính ADCC có thể được đo bằng thử nghiệm ADCC tiêu chuẩn, được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tính chọn lọc” của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế dùng để chỉ kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với polypeptit đích cụ thể, nhưng không gắn kết với các polypeptit gần giống với polypeptit đích. Cụm từ “kháng thể nhận biết kháng nguyên”

và “kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả với thuật ngữ “kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên”.

Thuật ngữ “axit nucleic” hoặc “polynucleotit” dùng để chỉ axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc axit ribonucleic (ARN) và các polyme của nó ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Trừ khi bị giới hạn cách cụ thể, thuật ngữ này bao gồm các axit nucleic chứa các phân tử tương tự đã biết của các nucleotit tự nhiên mà có các đặc tính gắn kết giống với axit nucleic tham chiếu và được chuyển hóa theo phương thức giống với phương thức của các nucleotit xuất hiện trong tự nhiên. (Xem, bằng sáng chế Mỹ số 8,278,036 của tác giả Kariko et al., sáng chế bộc lộ phân tử mRNA với uridin bị thay thế bằng uridin giả, các phương pháp tổng hợp các phân tử mRNA này, và phương pháp vận chuyển các protein điều trị bệnh in vivo.) Phương pháp đóng gói mRNA có thể được sử dụng, ví dụ, các phương pháp được bộc lộ trong bằng sáng chế Mỹ số 8,278,036 của tác giả Kariko et al; và đơn sáng chế số công bố WO2013/090186A1, của tác giả Moderna. Trừ khi có quy định khác, trình tự axit nucleic cụ thể cũng hiển nhiên là bao gồm các biến thể của nó được biến đổi theo phương thức bảo toàn (ví dụ, các sự thay thế codon thoái hóa), các alen, các gen tương đồng, các SNP, và các trình tự bổ sung cũng như trình tự được đề cập cụ thể. Cụ thể là, các thay thế codon thoái hóa có thể đạt được bằng cách tạo ra các trình tự trong đó vị trí thứ ba của một hoặc nhiều (hoặc tất cả) codon được chọn bị thay thế bằng các gốc bazơ và/hoặc các gốc deoxyinosin đã được trộn (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); và Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” bao gồm động vật bất kỳ là người hoặc động vật không phải là người. Thuật ngữ “động vật không phải là người” bao gồm tất cả động vật có xương sống, ví dụ, động vật có vú và động vật không phải động vật có vú, như động vật linh trưởng không phải là người, cừu, chó, mèo, ngựa, bò, gà, lưỡng cư, bò sát, v.v. Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “cyno” hoặc “cynomolgus” dùng để chỉ khỉ đuôi dài (*Macaca fascicularis*). Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “rhesus” hoặc “rhesus macaque” dùng để chỉ khỉ vàng (*Macaca mulatta*). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “marmoset” dùng để chỉ khỉ đuôi sóc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều trị” hoặc “sự điều trị” của bệnh hoặc rối loạn bất kỳ (có nghĩa là, chứng viêm khớp dạng thấp) dùng để chỉ theo một phương án, để cải thiện bệnh hoặc rối loạn (có nghĩa là, làm chậm hoặc kìm hãm hoặc làm giảm sự phát triển của bệnh hoặc ít nhất là của một trong số các triệu chứng lâm sàng của bệnh). Theo phương án khác “điều trị” hoặc “sự điều trị” dùng để chỉ làm giảm đau hoặc cải thiện ít nhất một tham số vật lý bao gồm các tham số có thể không được nhận thấy bởi bệnh nhân. Cũng theo phương án khác, “điều trị” hoặc “sự điều trị” dùng để chỉ sự điều biến bệnh hoặc rối loạn này, có thể về mặt vật lý, (ví dụ, làm ổn định triệu chứng có thể nhận thấy), hoặc về mặt sinh lý, (ví dụ, làm ổn định các tham số vật lý), hoặc cả hai. Phương pháp đánh giá sự điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh được biết phổ biến trong lĩnh vực này, trừ khi được mô tả cụ thể ở đây.

Như được sử dụng ở đây, “sự chọn lọc” và “được chọn lọc” trong sự tham chiếu đến bệnh nhân dùng để chỉ bệnh nhân cụ thể, đặc biệt được chọn từ nhóm bệnh nhân lớn hơn do bệnh nhân cụ thể này có dấu hiệu bệnh được xác định trước. Tương tự, “điều trị cho bệnh nhân cách có chọn lọc” dùng để chỉ việc cung cấp sự điều trị cho bệnh nhân đặc biệt được chọn từ nhóm bệnh nhân lớn hơn do bệnh nhân cụ thể này có dấu hiệu bệnh được xác định trước. Tương tự, “dùng có chọn lọc” dùng để chỉ việc dùng thuốc cho bệnh nhân đặc biệt được chọn từ nhóm bệnh nhân lớn hơn do bệnh nhân cụ thể này có dấu hiệu bệnh được xác định trước.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tối ưu hóa” dùng để chỉ trình tự nucleotit được biến đổi để mã hóa trình tự axit amin bằng cách sử dụng các codon được ưu tiên hơn trong tế bào hoặc sinh vật sản xuất, thường là tế bào nhân thực, ví dụ, tế bào của *Pichia*, tế bào của *Trichoderma*, tế bào trứng của chuột hamster Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào của người. Trình tự nucleotit được tối ưu hóa này được thiết kế để giữ toàn bộ hoặc nhiều nhất có thể trình tự axit amin ban đầu được mã hóa bởi trình tự nucleotit khởi đầu, trình tự này cũng được biết đến như trình tự “gốc ban đầu”. Các trình tự được tối ưu hóa trong bản mô tả được thiết kế để có các codon được ưu tiên trong các tế bào động vật có vú CHO, tuy nhiên sự biểu hiện được tối ưu hóa của các trình tự này trong các tế bào nhân thực khác cũng được bao gồm trong sáng chế. Các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự nucleotit được tối ưu hóa cũng được dùng để chỉ là đã được tối ưu hóa.

Như được sử dụng ở đây, phần trăm độ tương đồng giữa hai trình tự là hàm số của số lượng các vị trí giống nhau chung giữa các trình tự này (có nghĩa là, % độ tương đồng = $\frac{\text{số các vị trí giống nhau}}{\text{tổng số các vị trí}} \times 100$), chú ý đến số lượng khoảng cách giữa hai trình tự, và chiều dài của mỗi khoảng cách, điều này cần thiết để được đưa vào để so sánh tốt nhất hai trình tự này. Sự so sánh các trình tự và xác định phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán toán học, như được mô tả dưới đây.

Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller 1988, *Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, được kết hợp thành chương trình ALIGN (bản 2.0), sử dụng bảng trọng lượng các gốc axit amin PAM120, giá trị trừ đi cho mỗi khoảng cách trình tự là 12 và lượng trừ đi cho mỗi khoảng cách trình tự là 4. Ngoài ra, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của Needleman và Wunsch 1970, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 được kết hợp thành chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (có trên trang <http://www.gcg.com>), có thể sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, và trọng lượng khoảng cách trình tự là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng lượng độ dài 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự nucleotit cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, các thuật toán như chương trình BLASTN cho các trình tự axit nucleic sử dụng các giá trị mặc định độ dài của từ (W) bằng 11, giá trị mong đợi (E) bằng 10, M=5, N=4, và sự so sánh cả hai sợi.

Các thuật ngữ "chặn ngang", "bị chặn ngang", "việc chặn ngang" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả dùng để chỉ khả năng của kháng thể hoặc chất gắn kết khác để ngăn cản sự gắn kết của kháng thể hoặc chất gắn kết khác với IL-17A trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh tiêu chuẩn.

Khả năng hoặc phạm vi mà kháng thể hoặc chất gắn kết khác, như phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể, có khả năng gây cản trở sự gắn kết của kháng thể hoặc phân tử gắn kết khác với IL-17A, và do đó nếu nó có thể được đề cập để chặn ngang theo sáng chế, có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm gắn kết cạnh tranh tiêu chuẩn. Một thử nghiệm thích hợp bao gồm việc sử dụng công nghệ BiacoreTM (ví dụ,

bằng cách sử dụng thiết bị Biacore™ 3000 (Biacore™, Uppsala, Sweden)), công nghệ này có thể đo phạm vi của các tương tác bằng cách sử dụng công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt. Thử nghiệm khác để việc chặn ngang sử dụng phương pháp dựa trên kỹ thuật ELISA. Chi tiết hơn về các phương pháp này được đưa ra ở trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Ví dụ, các kháng thể được minh họa ở đây (có nghĩa là XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5) và phần gắn kết kháng nguyên của chúng, tất cả sẽ “chặn ngang” một kháng thể khác hoặc protein khác chứa phần gắn kết kháng nguyên của chúng. Tất cả các kháng thể này hướng đến cùng một epitop trên IL-17A. Các kháng thể chặn ngang kháng thể khác sẽ được dự đoán là gắn kết với epitop giống hoặc epitop tương tự.

Theo sáng chế, kháng thể hoặc chất gắn kết chặn ngang khác, như phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể, theo sáng chế sẽ gắn kết với IL-17A trong thử nghiệm chặn ngang Biacore™ đã được mô tả sao cho sự gắn kết được ghi lại của tổ hợp (hỗn hợp) kháng thể hoặc chất gắn kết là nằm trong khoảng 80% đến 0,1% (ví dụ, 80% đến 4%) của sự gắn kết tối đa theo lý thuyết, cụ thể là nằm trong khoảng 75% đến 0,1% (ví dụ, 75% đến 4%) của sự gắn kết tối đa theo lý thuyết và cụ thể hơn là nằm trong khoảng 70% đến 0,1% (ví dụ, 70% đến 4%), và cụ thể hơn là nằm trong khoảng 65% đến 0,1% (ví dụ 65% đến 4%) của sự gắn kết tối đa theo lý thuyết (như được xác định ở trên) của tổ hợp hai kháng thể hoặc chất gắn kết.

Kháng thể được xác định là chặn ngang trong thử nghiệm ELISA như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, nếu kháng thể kháng-IL-17A ở pha dung dịch có khả năng gây ra sự giảm trong khoảng 60% đến 100%, cụ thể là nằm trong khoảng 70% và 100%, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng 80% và 100%, của tín hiệu phát hiện IL-17A (có nghĩa là lượng IL-17A đã được gắn bởi kháng thể được bao phủ) như được so sánh với tín hiệu phát hiện IL-17A có được khi không có kháng thể kháng-IL-17A ở pha dung dịch (có nghĩa là giếng đối chứng dương).

Một phần sáng chế được dựa trên, sự tìm ra các phân tử kháng thể gắn kết đặc hiệu với homodime IL-17A và heterodime IL-17AF, nhưng không gắn kết đặc hiệu với homodime IL-17F. Sáng chế đề cập đến cả các kháng thể có định dạng toàn bộ IgG cũng như phần gắn kết kháng nguyên của nó, sau đây sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Theo đó, sáng chế đề xuất kháng thể cũng như phần gắn kết kháng nguyên của nó với khả năng gắn kết giống nhau cách đáng ngạc nhiên ở một số loài, như được chọn từ một hoặc nhiều khi đuôi dài, khi đuôi vàng, khi đuôi sóc, chuột, chuột nhắt hoặc người, cũng như được phẩm, phương pháp sản xuất, và phương pháp sử dụng kháng thể và chế phẩm này.

Kháng thể tái tổ hợp

Các kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể tái tổ hợp của người XAB1 và các biến thể kháng thể XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5, được biến đổi, phân lập và được xác định đặc tính về cấu trúc bởi các trình tự axit amin của toàn bộ chiều dài chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể này như được mô tả trong bảng 1 sau.

Bảng 1. Trình tự axit amin của toàn bộ chiều dài của chuỗi nặng và toàn bộ chiều dài chuỗi nhẹ của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5.

Kháng thể	Trình tự axit amin của toàn bộ chiều dài chuỗi nặng	Trình tự axit amin của toàn bộ chiều dài chuỗi nhẹ
XAB1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
XAB2	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 26
XAB3	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 36
XAB4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 44
XAB5	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 54
ĐỒNG NHẤT TRÌNH TỰ	100%	97%

Các vùng biến đổi, các trình tự axit amin của V_H và V_L tương ứng của các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 đã được phân lập theo sáng chế được biểu diễn trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5.

Kháng thể	Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng	Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ
-----------	---	--

XAB1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
XAB2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 25
XAB3	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 35
XAB4	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 43
XAB5	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 53
ĐỒNG NHẤT TRÌNH TỰ	100%	94%

Các kháng thể khác theo sáng chế bao gồm các kháng thể có các axit amin bị đột biến bằng cách xóa, chèn thêm hoặc thay thế axit amin, mà có ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 98%, 99% hoặc 100% độ tương đồng với các kháng thể được mô tả ở trên, cụ thể là trong các vùng CDR được mô tả trong trình tự được mô tả ở trên. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế là biến thể đột biến của kháng thể bất kỳ trong số XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5, trong đó kháng thể biến thể đột biến này bao gồm các trình tự axit amin đột biến trong đó không nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin bị đột biến bằng cách xóa, thêm hoặc thay thế axit amin trong các vùng CDR khi so sánh với các vùng CDR được mô tả trong trình tự được mô tả ở trên.

Các trình tự mã hóa nucleotit của toàn bộ chiều dài chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 được thể hiện trong bảng 3 sau.

Bảng 3. Trình tự mã hóa ADN của toàn bộ chiều dài chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Kháng thể	Trình tự mã hóa ADN của toàn bộ chiều dài chuỗi nặng	Trình tự mã hóa ADN của toàn bộ chiều dài chuỗi nhẹ
XAB1	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 19
XAB2	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32
XAB3	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31,	SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40

	SEQ ID NO: 51	
XAB4	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52
XAB5	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58

Trình tự mã hóa nucleotit vùng biến đổi của chuỗi nặng và của chuỗi nhẹ của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 được thể hiện trong bảng 4 sau.

Bảng 4. Trình tự mã hóa ADN của trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Kháng thể	Trình tự mã hóa ADN trên vùng biến đổi chuỗi nặng	Trình tự mã hóa ADN trên vùng biến đổi chuỗi nhẹ
XAB1	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 17
XAB2	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30
XAB3	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39
XAB4	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50
XAB5	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57

Các axit nucleic khác mã hóa kháng thể theo sáng chế bao gồm các axit nucleic bị đột biến bằng cách xóa, thêm hoặc thay thế nucleotit, mà có ít nhất là 60, 70, 80, 90, 95 hoặc 100% tương đồng với các vùng mã hóa CDR tương ứng được mô tả trong trình tự được mô tả ở trên hoặc trong bảng 5 hoặc Bảng 6 sau.

Theo một số phương án, bao gồm các axit nucleic biến thể trong đó không nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 nucleotit bị thay đổi bằng cách xóa, thêm hoặc thay thế nucleotit trong các vùng mã hóa CDR với các vùng mã hóa CDR được mô tả trong trình tự được mô tả ở trên hoặc trong bảng 5 hoặc Bảng 6 sau.

Với các kháng thể gắn kết với cùng một epitop, trình tự của V_H , V_L , toàn bộ chiều dài chuỗi nhẹ, và toàn bộ chiều dài chuỗi nặng (trình tự nucleotit và trình tự axit amin) "trộn và ghép nối" để tạo các phân tử gắn kết kháng-IL-17A khác theo sáng chế. Sự gắn kết IL-17A của các kháng thể "trộn và ghép nối" này có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng các thử nghiệm gắn kết được mô tả ở trên hoặc các thử nghiệm gắn kết thông thường khác (ví dụ, các thử nghiệm ELISA). Khi các chuỗi này được trộn và ghép nối, trình tự V_H từ cặp V_H/V_L cụ thể nên được thay thế bằng trình tự V_H tương tự về cấu trúc. Cũng như vậy với trình tự toàn bộ chiều dài chuỗi nặng từ cặp toàn bộ chiều dài của chuỗi nặng / toàn bộ chiều dài của chuỗi nhẹ nên được thay thế bằng trình tự toàn bộ chiều dài chuỗi nặng tương tự về cấu trúc. Cũng như vậy, trình tự V_L từ cặp V_H/V_L cụ thể nên được thay thế bằng trình tự V_L tương tự về cấu trúc. Cũng như vậy với trình tự toàn bộ chiều dài chuỗi nhẹ từ cặp toàn bộ chiều dài chuỗi nặng/toàn bộ chiều dài chuỗi nhẹ nên được thay thế bởi trình tự toàn bộ chiều dài chuỗi nhẹ tương tự về cấu trúc. Theo đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể tái tổ hợp được phân lập hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó mà có: vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 13, 25, 35, 43 và 53; trong đó vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã nêu được chọn lọc sao cho kháng thể này gắn kết đặc hiệu với IL-17A.

Các ví dụ về trình tự axit amin của các CDR1 của V_H (cũng được gọi là HCDR1 hoặc HCDR1' phụ thuộc vào định nghĩa CDR được sử dụng), các CDR2 của V_H (cũng được gọi là HCDR2 hoặc HCDR2' phụ thuộc vào định nghĩa CDR được sử dụng), các

CDR3 của V_H (cũng được gọi là HCDR3 hoặc HCDR3' phụ thuộc vào định nghĩa CDR được sử dụng), các CDR1 của V_L (cũng được gọi là LCDR1 hoặc LCDR1' phụ thuộc vào định nghĩa CDR được sử dụng), các CDR2 của V_L (cũng được gọi là LCDR2 hoặc LCDR2' phụ thuộc vào định nghĩa CDR được sử dụng), các CDR3 của V_L (cũng được gọi là HCDR3 hoặc HCDR3' phụ thuộc vào định nghĩa CDR được sử dụng) của một số kháng thể và phần gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế được thể hiện trong bảng 5 và Bảng 6.

Trong Bảng 5, các vùng CDR của kháng thể theo sáng chế được mô tả sử dụng hệ thống Kabat (Kabat, E. A., et al. 1991, Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, see also Zhao&Lu 2009, Molecular Immunology 47:694-700)

Để dễ dàng hơn cho việc đọc, khi các vùng CDR được mô tả theo định nghĩa Kabat, chúng được gọi như sau lần lượt là HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3.

Bảng 5. Vùng CDR của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 theo định nghĩa Kabat.

Kháng thể gốc	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
XAB1	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
XAB2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
XAB3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 11
XAB4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 11
XAB5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
LIÊN ÚNG	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID

	NO: 7	NO: 8	NO: 3	NO: 73	NO: 74	NO: 75
ĐỒNG NHẤT TRÌNH TỰ	100%	100%	100%	64 %	86%	89%

Các trình tự liên ứng SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 và SEQ ID NO: 75 chứa một số axit amin biến đổi, được chỉ định là X. Dựa trên sự so sánh trình tự của các trình tự XAB2 đến XAB5, bốn axit amin biến đổi trong SEQ ID NO: 73 có thể thuận lợi được lựa chọn theo các phương án sau: Axit amin biến đổi đầu tiên (X1) có thể được chọn từ nhóm bao gồm Gly (G) và Val (V); axit amin biến đổi thứ hai (X2) có thể được chọn từ nhóm bao gồm Tyr (Y), Asn (N) và Ile (I); axit amin biến đổi thứ ba (X3) có thể được chọn từ nhóm bao gồm Trp (W) và Ser (S); and axit amin biến đổi thứ tư (X4) có thể được chọn từ nhóm bao gồm Glu (E) và Ala (A). SEQ ID NO: 9 có đồng nhất trình tự là 91% so với SEQ ID NO: 22 và sự đồng nhất trình tự là 73% so với SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 42. SEQ ID NO: 22 có sự đồng nhất trình tự là 64% so với SEQ ID NO: 34 và SEQ ID NO: 42. SEQ ID NO: 34 có sự đồng nhất trình tự là 91% so với SEQ ID NO: 42.

Tương tự, một axit amin biến đổi trong SEQ ID NO: 74 có thể thuận lợi được lựa chọn theo phương án sau: X1 có thể được chọn từ nhóm bao gồm Asn (N) và Gln (Q). SEQ ID NO: 10 có sự đồng nhất trình tự là 86% so với SEQ ID NO: 23.

Một axit amin biến đổi trong SEQ ID NO: 75 có thể thuận lợi được lựa chọn theo phương án sau: X1 có thể được chọn từ nhóm bao gồm Asn (N) và Asp (D). SEQ ID NO: 11 có sự đồng nhất trình tự là 89% so với SEQ ID NO: 24.

Trong Bảng 6, các vùng CDR của một số kháng thể theo sáng chế được mô tả sử dụng hệ thống Chothia, Al-Lazikani et al. 1997, J. Mol. Biol. 273:927-948. Để dễ dàng hơn cho việc đọc, khi các vùng CDR được mô tả theo định nghĩa Chothia, chúng được gọi bằng các tên sau lần lượt là HCDR1', HCDR2', HCDR3', LCDR1', LCDR2', LCDR3'.

Bảng 6. Vùng CDR của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 theo định nghĩa Chothia.

Kháng thể gốc	HCDR1'	HCDR2'	HCDR3'	LCDR1'	LCDR2'	LCDR3'
XAB1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21
XAB3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
LIÊN ỨNG	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 72
SỰ ĐỒNG NHẤT TRÌNH TỰ	100%	100%	100%	43%	100%	83%

Các trình tự liên ứng SEQ ID NO: 71 và SEQ ID NO: 72 chứa một số axit amin biến đổi, được gọi là X. Dựa vào sự bất cặp trình tự của trình tự cho XAB2 tới XAB5, có bốn axit amin biến đổi trong SEQ ID NO: 71 có thể thuận lợi được lựa chọn theo các phương án sau: axit amin biến đổi đầu tiên (X1) có thể được chọn từ nhóm bao gồm Gly (G) và Val (V), axit amin biến đổi thứ hai (X2) có thể được chọn từ nhóm bao gồm Tyr (Y), Asn (N) và Ile (I); axit amin biến đổi thứ ba (X3) có thể được chọn từ nhóm bao gồm Trp (W) và Ser (S); và axit amin biến đổi thứ tư (X4) có thể được chọn từ nhóm bao gồm Glu (E) và Ala (A). SEQ ID NO: 4 có độ đồng nhất trình tự là 86% so với SEQ ID NO: 20 và có độ đồng nhất trình tự là 57% so với SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 41. SEQ ID NO: 20 có độ đồng nhất trình tự là 43% so với SEQ ID NO:

33 và SEQ ID NO: 41. SEQ ID NO: 33 có độ đồng nhất trình tự là 86% so với SEQ ID NO: 41.

Tương tự, một axit amin biến đổi trong SEQ ID NO: 72 có thể thuận lợi được lựa chọn theo phương án sau: X1 có thể được chọn từ nhóm bao gồm Asn (N) và Asp (D). SEQ ID NO: 6 có độ đồng nhất trình tự là 86% so với SEQ ID NO: 21.

Đã được biết rằng mỗi kháng thể trong số các kháng thể này có thể gắn kết với IL-17A và độ đặc hiệu gắn kết kháng nguyên chủ yếu được cung cấp bởi các vùng CDR1, 2 và 3, các trình tự CDR1, 2 và 3 của V_H và các trình tự CDR1, 2 và 3 của V_L có thể được "trộn và ghép nối" (có nghĩa là, các CDR từ các kháng thể khác nhau có thể được trộn và ghép nối, mỗi kháng thể chứa CDR1, 2 và 3 của V_H và CDR1, 2 và 3 của V_L tạo thành các phân tử gắn kết kháng-IL-17A khác theo sáng chế). Sự gắn kết IL-17A của các kháng thể "trộn và ghép nối" này có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng các thử nghiệm gắn kết được mô tả ở trên và trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế hoặc các thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, các thử nghiệm ELISA). Khi các trình tự CDR của V_H được trộn và ghép nối, trình tự CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 từ trình tự V_H cụ thể nên được thay thế bằng trình tự hoặc các trình tự CDR tương tự về cấu trúc. Cũng như vậy, khi các trình tự CRD của V_L được trộn và ghép nối, trình tự CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 từ trình tự V_L cụ thể nên được thay thế bằng một hoặc nhiều các trình tự CDR tương tự về cấu trúc. Được biểu lộ ngay lập tức với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng các trình tự V_H và V_L mới có thể được tạo ra bằng cách thay thế một hoặc nhiều trình tự vùng CRD của V_H và/ hoặc V_L bằng các trình tự tương tự về cấu trúc từ các trình tự CDR được thể hiện trong bản mô tả cho các kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Theo một phương án, kháng thể tái tổ hợp được phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, có: vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR1 có SEQ ID NO: 7; vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR2 có SEQ ID NO: 8; vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR3 có SEQ ID NO: 3; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9, 22, 34, 42, và 73, và tốt hơn được chọn từ SEQ ID NO: 42; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 10, 23, và 74, và tốt hơn được chọn từ SEQ ID NO: 23;

và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 11, 24, và 75 và tốt hơn được chọn từ SEQ ID NO: 11; trong đó các vùng CDR đã nêu được chọn để kháng thể hoặc protein theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với IL-17A.

Theo phương án khác, kháng thể tái tổ hợp được phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có: vùng biến đổi của chuỗi nặng HCDR1' có SEQ ID NO: 1; vùng biến đổi của chuỗi nặng HCDR2' có SEQ ID NO: 2; vùng biến đổi của chuỗi nặng HCDR3' có SEQ ID NO: 3; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ LCDR1' chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 20, 33, 41, và 71, và tốt hơn được chọn từ SEQ ID NO: 41; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ LCDR2' có SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ LCDR3' chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, 21, và 72, và tốt hơn được chọn từ SEQ ID NO: 6; trong đó các vùng CDR đã nêu được chọn để kháng thể hoặc protein theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với IL-17A.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó chứa có thể là SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 3; hoặc SEQ ID NO: 12; hoặc kháng thể chứa SEQ ID NO: 14.

Như được sử dụng ở đây, kháng thể của người chứa các vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng có toàn bộ chiều dài hoặc chuỗi nhẹ có toàn bộ chiều dài là "sản phẩm của" hoặc "có nguồn gốc từ" trình tự dòng mầm cụ thể nếu các vùng biến đổi hoặc các chuỗi có toàn bộ chiều dài này của kháng thể có được từ hệ thống sử dụng các gen globulin miễn dịch dòng mầm của người. Các hệ thống này bao gồm gây miễn dịch chuột chuyển gen mang các gen globulin miễn dịch của người với kháng nguyên quan tâm hoặc sàng lọc thư viện gen globulin miễn dịch của người được trình diện trên thực khuẩn thể với kháng nguyên quan tâm. Kháng thể của người là "sản phẩm của" hoặc "có nguồn gốc từ" trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người có thể được xác định bằng cách so sánh trình tự axit amin của kháng thể của người với trình tự axit amin của globulin miễn dịch dòng mầm của người và chọn ra trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người mà có trình tự gần nhất (có nghĩa là, % đồng nhất cao nhất) với trình tự của kháng thể của người. Kháng thể của người là

"sản phẩm của" hoặc "có nguồn gốc từ" trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người cụ thể có thể bao gồm những sự khác nhau về axit amin khi được so sánh với trình tự dòng mầm, do, ví dụ, các đột biến soma tự nhiên xảy ra hoặc sự đưa vào đột biến điểm có định hướng điểm có chủ ý. Tuy nhiên, kháng thể của người được chọn lựa thường có ít nhất là 90% độ đồng nhất về trình tự axit amin so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm của người và chứa các gốc axit amin xác định kháng thể của người này là của người khi được so sánh với trình tự axit amin globulin miễn dịch dòng mầm của các loài khác (ví dụ, trình tự dòng mầm của chuột). Trong các trường hợp cụ thể, kháng thể của người có thể ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc ít nhất 95%, hoặc thậm chí ít nhất 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất về trình tự axit amin so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm. Thường là, kháng thể của người có nguồn gốc từ trình tự dòng mầm của người cụ thể sẽ trình diện không nhiều hơn 10 sự khác nhau về axit amin từ trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm của người. Trong các trường hợp cụ thể, kháng thể của người có thể trình diện không nhiều hơn 5, hoặc thậm chí không nhiều hơn 4, 3, 2, hoặc 1 sự khác nhau về axit amin từ trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm.

Theo sáng chế, epitop trên IL-17A được xác định cụ thể là được ưu tiên làm đích cho sự gắn kết của các kháng thể điều trị bệnh có tiềm năng. Epitop này được gắn kết bởi XAB1, và các kháng thể biến thể XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 được phát triển bằng cái cải biến trình tự XAB1. Epitop này được tìm thấy trên trình tự IL-17A, giữa các gốc Arg 78 và Trp 90.

Epitop có thể được xem xét để chứa gốc axit amin sau được ưu tiên nhất từ trong IL-17A: Arg 78, Glu 80, Trp 90. Hơn nữa, các gốc axit amin sau cũng được ưu tiên: Tyr 85, Arg 124. Các gốc axit amin quan trọng khác là Pro 82, Ser 87, Val 88. Các gốc axit amin khác cũng có đóng góp là Val 45*, Leu 49, Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*, trong đó các axit amin được đánh dấu (*) chỉ định gốc đã được đóng góp bởi tiểu phần IL-17A thứ hai của homodime IL-17A.

Các kháng thể định hướng epitop này trên IL-17A được chứng minh là ngăn chặn sự gắn kết giữa IL-17A và thụ thể của nó để ức chế tác động do IL-17A in vitro, và giảm

độ nghiêm trọng của mô hình thực nghiệm in vivo của kháng nguyên gây chứng viêm khớp. Hơn nữa, các kháng thể gắn kết với epitop này ngoài mong đợi đã được chứng minh là ức chế tác động do heterodime IL-17AF in vitro, và cũng duy trì ái lực cao ngoài mong đợi với IL-17A và IL-17AF có nguồn gốc từ chuột và các biến thể của phân tử đích từ các loài khác.

Do đó, epitop này là đặc biệt thích hợp vì ngoài mong đợi là nó cũng được bảo toàn trong dạng thức có thể truy nhập được trong cấu trúc của heterodime IL-17AF. Theo đó, các kháng thể được ưu tiên theo sáng chế cũng sẽ gắn kết với các heterodime IL-17AF. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, đã được dự đoán trước rằng cấu trúc của heterodime IL-17AF tương tự, với IL-17A, hoặc sự tương tác các kháng thể theo sáng chế khiến cho heterodime này tương tự với IL-17A, ở mức gắn kết vẫn có thể xảy ra.

Tuy nhiên, mặc dù đã có những dự đoán này, các tác giả sáng chế đã xác định rằng sự gắn kết chéo với IL-17AF bởi các kháng thể theo sáng chế đã xảy ra. Trên thực tế, điều này là có lợi bởi nhiều lý do. Như được đề cập ở trên, IL-17AF cũng được đề cập đến như xytokin tiền gây viêm và có thể có liên quan tới nhiều tình trạng bệnh lý tương tự hoặc sự kiện về sinh học không mong muốn giống như đã được mô tả hoặc được dự đoán do IL-17A. Các kháng thể theo sáng chế do đó đặc biệt có giá trị trị để điều trị bệnh vì chúng có thể định hướng hoặc ngăn cản cả IL-17A và IL-17AF.

Hơn thế nữa, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng sự gắn kết giữa các kháng thể theo sáng chế và IL-17AF cũng liên quan đến sự ức chế hoạt tính sinh học của IL-17AF khi quan sát trong các thử nghiệm in vitro. Theo đó, các kháng thể theo sáng chế không chỉ định hướng có hiệu quả và ngăn cản/vô hiệu hóa có hiệu quả hoạt tính của IL-17A, mà còn cả hoạt tính của IL-17AF.

Hơn thế nữa, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng sự gắn kết giữa các kháng thể theo sáng chế và IL-17AF cũng liên quan đến sự ức chế hoạt tính sinh học của IL-17AF khi quan sát trong các thử nghiệm in vitro. Theo đó, các kháng thể theo sáng chế không chỉ định hướng có hiệu quả và ngăn cản/vô hiệu hóa có hiệu quả hoạt tính của IL-17A, mà còn cả hoạt tính của IL-17AF.

Hệ quả ngoài dự đoán khác nữa của công trình được thực hiện bởi các tác giả sáng chế là như sau. Sự trưởng thành ái lực của kháng thể XAB1 gốc “ban đầu” cũng tạo ra tập hợp các kháng thể giữ được ái lực cao, hoặc ái lực được cải thiện với các biến thể của IL-17A có nguồn gốc từ các loài khác như như khỉ đuôi dài, khỉ vàng, khỉ đuôi sóc, chuột, hoặc chuột nhắt.

Điều này là ngoài dự đoán vì trong sự nỗ lực cải thiện ái lực của các kháng thể theo sáng chế với IL-17A của người, đã không được mong đợi để cũng cải thiện ái lực của các kháng thể thu được với các biến thể của IL-17A của các loài khác. Thực tế là, kết quả ngược lại thường được dự đoán. Các nỗ lực để cải thiện ái lực kháng thể với các biến thể của các loài cụ thể (có nghĩa là người) của kháng nguyên đích thường sẽ được dự đoán là giảm ái lực với biến thể của kháng nguyên đó từ các loài khác. Khái niệm biến thể từ các loài khác (hoặc đồng đẳng qua quá trình hình thành loài/đồng đẳng trong quá trình sao chép) thừa nhận một tổ tiên chung của các loài cụ thể, nhưng chấp nhận rằng sự phân kỳ đã diễn ra qua quá trình của lịch sử tiến hóa. Do đó, thậm chí nếu có mức độ cao của sự bảo toàn trình tự giữa các biến thể của một phân tử cụ thể đã được xác nhận trong các loài khác nhau, thì cũng không thể giả thiết rằng ái lực được cải thiện với một biến thể của loài này sẽ tạo sự cải thiện về ái lực với biến thể của loài khác. Trên thực tế, sự phân kỳ giữa các trình tự của các loài khác nhau thường dẫn đến dự đoán rằng sự cải thiện về ái lực với một biến thể sẽ nhiều khả năng hơn là dẫn đến sự giảm (hoặc thậm chí là sự triệt tiêu) ái lực gắn kết với biến thể của loài khác. Độ đồng nhất trình tự giữa IL-17A của chuột nhắt và người IL-17A chỉ bằng 62% (Moseley et al. 2003, Cytokine & Growth Factor Reviews 14:155–174).

Tuy nhiên, trong trường hợp theo sáng chế, điều này đã không quan sát được và các biến thể kháng thể được tạo ra bởi các tác giả sáng chế đã giữ lại được ái lực cao với các biến thể của IL-17A từ các loài khác. Điều này là hữu ích vì trong suốt nghiên cứu này cần thiết để phát triển phân tử kháng thể đại diện làm phân tử có tác dụng điều trị bệnh hữu dụng, nhiều sự kiểm tra và thử nghiệm khác nhau có thể được đòi hỏi phải được thực hiện trong các loài khác hoặc trên các tế bào, phân tử hoặc hệ thống chứa các thành phần, hoặc có nguồn gốc từ các loài khác (như khỉ đuôi dài, khỉ vàng, khỉ đuôi sóc, chuột, hoặc chuột nhắt). Điều này khiến các kháng thể của sáng chế đặc biệt thích hợp để phát triển xa hơn nữa.

Theo đó, kháng thể và phần gắn kết kháng nguyên của chúng như được bộc lộ trong sáng chế có thể cùng sở hữu một loạt các đặc tính mong muốn bao gồm, ái lực cao với IL-17A, phản ứng chéo với IL-17A từ các loài khác như chuột nhắt, chuột, khỉ đuôi dài và khỉ đuôi sóc, không phản ứng chéo với các isotyp của IL-17 khác như IL-17F, không phản ứng chéo với xytokin khác (như xytokin của người hoặc chuột), phản ứng chéo với heterodime IL-17AF, khả năng ngăn chặn gắn kết của IL-17A với thụ thể của nó như IL-17RA, khả năng ức chế hoặc vô hiệu hóa tác động về mặt sinh học cảm ứng bởi IL-17A như sự kích thích tiết IL-6 hoặc GRO-alpha, và/hoặc khả năng ức chế các tác động trung gian bởi IL-17A (và/hoặc IL-17AF) in vivo như sự sưng lên được quan sát thấy trong các mô hình chứng viêm khớp do kháng nguyên.

Kháng thể và phần gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong sáng chế cũng được chứng minh là cung cấp sự khử phức giữa kháng thể và IL17A chậm, sự luân chuyển phối tử chậm và thời gian bắt giữ IL17A dài. Hơn nữa các đặc tính có lợi của các kháng thể và protein này được đề xuất trong các phương án chi tiết.

Kháng thể tương đồng

Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong sáng chế có các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ; các trình tự nucleotit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ, trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, hoặc trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, hoặc trình tự axit amin của tất cả 6 vùng CDR hoặc trình tự mã hóa nucleotit là tương đồng với trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin của các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 theo sáng chế, cụ thể là trong bảng 1, và trong đó kháng thể hoặc protein theo sáng chế giữ được các đặc điểm về chức năng được mong muốn của các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 ban đầu.

Các đặc điểm về chức năng được mong muốn của các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 ban đầu có thể được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) ái lực gắn kết với IL-17A (gắn kết đặc hiệu với IL-17A), ví dụ, K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn, 100pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 10pM hoặc nhỏ hơn, khi

được đo bằng thử nghiệm Biacore™, ví dụ như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế;

- (ii) ức chế cạnh tranh của sự gắn kết IL-17R với IL-17A, ví dụ, IC₅₀ bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 1nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 100pM hoặc nhỏ hơn, khi được đo bằng thử nghiệm gắn kết cạnh tranh in vitro, ví dụ, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế;
- (iii) ức chế hoạt động phụ thuộc IL-17A, ví dụ, sự sản xuất IL-6 hoặc GRO-alpha, ví dụ, IC₅₀ bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 1nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 100pM hoặc nhỏ hơn, khi được đo bằng thử nghiệm tế bào như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế;
- (iv) ức chế các tác động được quan sát, ví dụ, sưng đầu gối, khi được đo bằng thử nghiệm chứng viêm khớp do kháng nguyên in vivo như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế;
- (v) phản ứng chéo với polypeptit IL-17A của khỉ đuôi dài, khỉ vàng, chuột, hoặc chuột nhắt;
- (vi) phản ứng chéo với polypeptit IL-17AF của người hoặc chuột nhắt;
- (vii) ái lực gắn kết với IL-17AF (gắn kết đặc hiệu với IL-17AF), ví dụ, K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn, 100pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 10pM hoặc nhỏ hơn, khi được đo bằng thử nghiệm Biacore™, ví dụ như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế;
- (viii) ức chế IL-17AF, ví dụ, IC₅₀ bằng 200nM hoặc nhỏ hơn, 150nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 100nM hoặc nhỏ hơn, khi được đo bằng thử nghiệm gắn kết cạnh tranh in vitro như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế;
- (ix) các đặc tính thích hợp để phát triển làm dược phẩm, cụ thể là, tính ổn định và không kết cụm trong chế phẩm có nồng độ cao, có nghĩa là, trên 50mg/ml.

Ví dụ, sáng chế đề cập đến các kháng thể tương đồng của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 (hoặc phần gắn kết kháng nguyên của chúng), chứa trình tự biến đổi của chuỗi nặng (V_H) và trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) trong đó các trình tự CDR, có nghĩa là 6 vùng CDR; HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 hoặc HCDR1', HCDR2', HCDR3', LCDR1', LCDR2', LCDR3', cùng sở hữu ít nhất là 60,

70, 90, 95 hoặc 100% độ đồng nhất trình tự với các trình tự CDR tương ứng của ít nhất là một kháng thể trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5, trong đó kháng thể tương đồng đã nêu hoặc mảnh gắn kết-kháng nguyên của nó, như phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với IL-17A, và kháng thể hoặc protein này bộc lộ ít nhất một trong số các đặc tính về chức năng sau: ức chế sự gắn kết của IL-17A với thụ thể của nó, ức chế sự sản xuất IL-6 hoặc GRO-alpha phụ thuộc IL-17A trong thử nghiệm tế bào, hoặc ức chế các tác động được quan sát trong thử nghiệm chứng viêm khớp do kháng nguyên in vivo. Theo phương án cụ thể có liên quan, kháng thể tương đồng hoặc protein gắn kết với IL-17A có K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn và ức chế sự gắn kết của IL-17A với thụ thể của nó khi được đo trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh in vitro có IC_{50} bằng 1nM hoặc. Các CRD của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 được xác định trong bảng 5 và bảng 6 nêu trên.

Sáng chế còn đề cập đến các kháng thể tương đồng khác của các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như phần gắn kết kháng nguyên của nó) chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà ít nhất là 80%, 90%, hoặc ít nhất 95% hoặc 100% đồng nhất với vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5; kháng thể tương đồng hoặc protein này gắn kết đặc hiệu với IL-17A, và nó bộc lộ ít nhất một trong số các đặc tính về chức năng sau: ức chế sự gắn kết của IL-17A với thụ thể của nó, ức chế sự sản xuất IL-6 hoặc GRO-alpha phụ thuộc IL-17A trong thử nghiệm tế bào, hoặc ức chế các tác động được quan sát trong thử nghiệm chứng viêm khớp do kháng nguyên in vivo. Theo phương án cụ thể có liên quan, kháng thể tương đồng hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với IL-17A có K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn và ức chế sự gắn kết của IL-17A với thụ thể của nó, như được đo trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh in vitro có IC_{50} bằng 1nM hoặc nhỏ hơn. Trình tự axit amin của V_H và V_L của kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 được xác định trong bảng 2 đã nêu trên.

Theo ví dụ khác, sáng chế đề cập đến các kháng thể tương đồng của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như phần gắn kết kháng nguyên của nó) chứa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có chiều dài

đầy đủ, trong đó: vùng biến đổi của chuỗi nặng được mã hóa bởi trình tự nucleotit có ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc 100% đồng nhất với trình tự nucleotit mã hóa tương ứng của vùng biến đổi nặng và chuỗi nhẹ của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5, kháng thể tương đồng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với IL-17A, và bộc lộ ít nhất một trong số các đặc tính về chức năng sau: ức chế gắn kết của IL-17A thụ thể của nó, ức chế sự sản xuất IL-6 hoặc GRO-alpha phụ thuộc IL-17A trong thử nghiệm tế bào, hoặc ức chế các tác động được quan sát trong thử nghiệm chứng viêm khớp do kháng nguyên in vivo. Theo phương án cụ thể có liên quan, kháng thể tương đồng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với IL-17A có K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn và ức chế sự gắn kết với IL-17A như được đo trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh in vitro có IC_{50} bằng 1nM hoặc nhỏ hơn. Các trình tự mã hóa nucleotit của các vùng biến đổi của kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 có thể có được từ, bảng 3 cho thấy các trình tự nucleotit mã hóa toàn bộ chiều dài trình tự của kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 và bảng 2 cho thấy các trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể, có thể bộc lộ một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, ba hoặc nhiều, hoặc bốn hoặc nhiều đặc tính chức năng mong muốn như được đề cập ở trên. Kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể, ví dụ, kháng thể của người, kháng thể được làm giống như kháng thể của người hoặc kháng thể dạng khảm. Theo một phương án, kháng thể hoặc protein là kháng thể cam toàn bộ là của người, như kháng thể IgG1 cam toàn bộ là của người.

Các chức năng tác động bị cam có thể có được bằng đột biến trong phần cố định Fc của các kháng thể này và đã được mô tả trong lĩnh vực này: Strohl 2009 (LALA & N297A); Baudino 2008, D265A (Baudino et al. 2008, J. Immunol. 181:6664-69, Strohl, CO 2009, Biotechnology 20:685-91). Ví dụ về kháng thể IgG1 cam chứa đột biến được gọi là đột biến LALA bao gồm đột biến L234A và L235A trong trình tự axit

amin Fc IgG1. Ví dụ khác về kháng thể IgG1 cầm chứa đột biến D265A. Đột biến D265A cũng có thể tốt hơn là được kết hợp với đột biến P329A (DAPA). Kháng thể IgG1 cầm khác chứa đột biến N297A, mà có trong các kháng thể thiếu glycosyl hóa hoặc không được glycosyl hóa.

Các kháng thể có các trình tự đột biến axit amin có thể có được bằng cách gây đột biến (ví dụ, tạo đột biến điểm định hướng hoặc tạo đột biến trung gian bởi PCR) các phân tử axit nucleic mã hóa, sau đó là kiểm tra kháng thể đã được biến đổi được mã hóa về chức năng được giữ lại (có nghĩa là các chức năng đã nêu trên) bằng cách sử dụng các thử nghiệm về chức năng được mô tả ở đây.

Các kháng thể biến đổi theo kiểu bảo toàn

Theo các phương án cụ thể, kháng thể (hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó) theo sáng chế có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự HCDR1, HCDR2, và HCDR3 (hoặc HCDR1', HCDR2' và HCDR3') và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự LCDR1, LCDR2, và LCDR3 (hoặc LCDR1', LCDR2', và LCDR3'), trong đó một hoặc nhiều trình tự CDR trong số các trình tự CDR này có các trình tự axit amin đã được xác định dựa trên các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 được mô tả ở đây hoặc các biến đổi bảo toàn của chúng, và trong đó kháng thể hoặc protein này giữ được các đặc tính chức năng mong muốn của các kháng thể kháng-IL-17A theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "các biến đổi trình tự bảo toàn" được dự định dùng để chỉ các thay thế axit amin trong đó gốc axit amin này được thay thế bằng gốc axit amin có mạch bên tương tự. Các họ của các gốc axit amin có mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực này. Các họ này bao gồm axit amin với mạch bên bazo (ví dụ, lysin, arginin, histidin), mạch bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), mạch bên phân cực không mang điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein, tryptophan), mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalani, methionin), mạch bên có nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Do đó, một hoặc nhiều gốc axit amin trong vùng CDR của kháng thể theo sáng chế có thể thay thế bằng gốc axit amin khác từ họ có mạch bên tương tự, và kháng thể được

biến đổi này có thể được kiểm tra chức năng được giữ lại bằng cách sử dụng các thử nghiệm về chức năng được mô tả ở đây.

Sự cải biến có thể được đưa vào kháng thể như được bộc lộ ở đây bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, như kỹ thuật tạo đột biến điểm định hướng và kỹ thuật tạo đột biến trung gian bởi PCR.

Kháng thể được thiết kế và kháng thể được cải biến

Các kháng thể khác và các mảnh gắn kết kháng nguyên, như phần gắn kết kháng nguyên của nó có thể được điều chế bằng cách sử dụng kháng thể có một hoặc nhiều trình tự trong số các trình tự V_H và/hoặc V_L của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 được thể hiện ở trên làm nguyên liệu ban đầu để thiết kế kháng thể được cải biến, để kháng thể được cải biến có thể bị thay đổi các đặc tính so với kháng thể ban đầu. Kháng thể có thể được thiết kế bằng cách biến đổi một hoặc nhiều gốc trong một hoặc cả hai vùng biến đổi vùng (có nghĩa là V_H và/ hoặc V_L), ví dụ, trong một hoặc nhiều vùng CDR và/ hoặc trong một hoặc nhiều vùng sườn. Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể có thể được thiết kế bằng cách cải biến gốc trong vùng cố định, ví dụ, để biến đổi chức năng tác động của kháng thể.

Một kiểu thiết kế vùng biến đổi có thể được thực hiện là ghép CDR. Các kháng thể tương tác với các kháng nguyên đích chủ yếu thông qua các gốc axit amin được đặt trong sáu vùng quyết định hỗ trợ (CDR) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vì lý do này, các trình tự axit amin trong các CDR giữa các kháng thể riêng lẻ là đa dạng hơn so với các trình tự bên ngoài các CDR. Bởi vì các trình tự CDR chịu trách nhiệm cho hầu hết các tương tác kháng nguyên-kháng thể, nó có khả năng biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp mà bắt chước các đặc tính của kháng thể có trong tự nhiên cụ thể bằng cách xây dựng các vector biểu hiện bao gồm các trình tự CDR từ kháng thể có trong tự nhiên cụ thể được ghép vào các trình tự vùng sườn từ kháng thể khác có các đặc tính khác (xem, ví dụ, Riechmann, L. et al. 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. et al. 1986, Nature 321:522-525; Queen, C. et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; U.S. Patent No. 5,225,539 của Winter, và U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 của Queen et al.).

Theo đó, một phương án khác theo sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-17A được ghép với CDR tái tổ hợp được phân lập, chứa 6 vùng CDR của kháng thể bất kỳ trong số XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 như được xác định trong bảng 5 hoặc bảng 6, ngoài ra còn chứa các trình tự vùng sườn khác từ các kháng thể gốc ban đầu.

Các trình tự vùng sườn này có thể có được từ các cơ sở dữ liệu ADN đã công bố hoặc các trình tự tham chiếu đã được công bố mà bao gồm trình tự gen kháng thể dòng mầm. Ví dụ, trình tự ADN dòng mầm của các gen vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người "VBase" (có trên mạng máy tính liên kết toàn cầu trong trang www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), cũng như trong 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; Tomlinson, I. M., et al. 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al. 1994, Eur. J Immunol. 24:827-836.

Các ví dụ về các trình tự vùng sườn là các trình tự mà tương tự về cấu trúc với các trình tự vùng sườn đã được sử dụng trong kháng thể bất kỳ trong số XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5. Các trình tự CDR1, 2 và 3 của V_H , và các trình tự CDR1, 2 và 3 của V_L , có thể được ghép vào các vùng sườn có trình tự đồng nhất với trình tự được tìm thấy ở gen globulin miễn dịch dòng mầm mà từ đó tạo ra trình tự vùng sườn, hoặc các trình tự CDR có thể được ghép vào các vùng sườn chứa một hoặc nhiều đột biến khi được so sánh với trình tự dòng mầm. Ví dụ, đã phát hiện ra rằng trong các trường hợp cụ thể, sẽ đem lại lợi ích khi gây đột biến các gốc trong vùng sườn này để duy trì hoặc tăng cường khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể (xem ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 của tác giả Queen et al.).

Một dạng khác của các cải biến vùng biến đổi là gây đột biến các gốc axit amin trong các vùng CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 của V_H và/hoặc V_L để bằng cách ấy cải thiện một hoặc nhiều đặc tính gắn kết (ví dụ, ái lực) của kháng thể quan tâm, được biết như "sự trưởng thành ái lực". Phương pháp tạo đột biến điểm định hướng hoặc tạo đột biến trung gian bởi PCR có thể được thực hiện để đưa vào các đột biến và đưa sự tác động lên sự gắn kết kháng thể, hoặc tác động lên đặc điểm về chức năng quan tâm khác, có

thể được đánh giá trong các thử nghiệm in vitro hoặc in vivo như được mô tả ở đây và được đề xuất trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến các kháng thể được trưởng thành ái lực có nguồn gốc từ một trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5. Các cải biến bảo toàn (như được mô tả ở trên) có thể được đưa vào. Các đột biến này có thể là thay thế, thêm hoặc xóa axit amin. Hơn nữa, thông thường là không nhiều hơn một, hai, ba, bốn hoặc năm gốc trong vùng CDR bị biến đổi. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế là kháng thể được trưởng thành ái lực chứa 6 CDR của một trong số XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 và trong đó không nhiều hơn một, hai, ba, bốn hoặc năm gốc trong vùng CDR bị biến đổi.

Theo đó, theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-IL-17A được thiết kế được phân lập chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà đồng nhất với các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng của ít nhất là một trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 ngoại trừ các trình tự axit amin của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các kháng thể được thiết kế này chứa một, hai, ba, bốn hoặc năm đột biến thay thế, xóa hoặc thêm axit amin so với các trình tự gốc.

Ghép các miền gắn kết kháng nguyên vào các vùng sườn hoặc khung biến đổi

Rất nhiều các vùng sườn hoặc khung khác nhau của kháng thể/globulin miễn dịch có thể được sử dụng miễn là polypeptit thu được bao gồm ít nhất là một vùng gắn kết của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, mà gắn kết đặc hiệu với IL-17A. Các vùng sườn hoặc khung này bao gồm 5 idiotyp chính của globulin miễn dịch của người, hoặc các mảnh của chúng (như các mảnh được bộc lộ ở vị trí khác trong bản mô tả), và bao gồm các globulin miễn dịch của các loài động vật khác, tốt hơn là có các khía cạnh được làm giống như của người. Các kháng thể có duy nhất chuỗi nặng như các kháng thể được xác định trong lục địa là kháng thể được quan tâm cụ thể trong vấn đề này. Các vùng sườn, khung và mảnh mới này sẽ tiếp tục được khám phá và phát triển bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh, sáng chế dự định tạo ra các phân tử globulin không phải globulin miễn dịch dựa vào các kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó bằng cách sử

dụng các khung của phân tử globulin không phải globulin miễn dịch dựa vào các CDR mà theo sáng chế có thể được ghép nối. Các vùng sườn và khung của phân tử globulin không phải globulin miễn dịch đã biết hoặc tương lai có thể được sử dụng, miễn là chứa vùng gắn kết đặc hiệu với protein đích có SEQ ID NO: 76. Các hợp chất này được đề cập trong bản mô tả là “các polypeptit chứa vùng gắn kết đặc hiệu đích”. Các ví dụ về vùng sườn phân tử globulin không phải globulin miễn dịch được mô tả chi tiết hơn trong các phần dưới đây (các kháng thể lạc đà và khung của phân tử không phải kháng thể).

Các kháng thể của lạc đà

Các protein kháng thể có được từ thành viên thuộc họ lạc đà hai bướu và lạc đà một bướu (*Camelus bactrianus* và *Camelus dromaderius*) bao gồm các thành viên mới trên thế giới như các loài lạc đà không bướu (*Lama pacos*, *Lama glama* và *Lama vicugna*) đã được xác định đặc tính về kích thước, độ phức tạp về cấu trúc và tính kháng nguyên với các đối tượng là người. Các kháng thể IgG cụ thể từ họ động vật có vú này đã được phát hiện là trong tự nhiên không có các chuỗi nhẹ, và vì vậy, khác về cấu trúc với cấu trúc bậc bốn có bốn chuỗi thông thường gồm hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, của các kháng thể từ các loài động vật khác. Xem đơn sáng chế PCT có số công bố WO 94/04678.

Vùng của kháng thể của lạc đà này là miền duy nhất biến đổi nhỏ được xác định là V_{HH} có thể có được bằng cách thiết kế di truyền để tạo ra protein nhỏ có ái lực cao với phân tử đích, tạo ra protein có nguồn gốc từ kháng thể có khối lượng phân tử thấp được biết đến như là “kháng thể có kích thước nano của lạc đà”. Xem bằng sáng chế Mỹ số 5,759,808 ngày 02/01/1998; cũng xem trong tài liệu của Stijlemans, B. et al. 2004, *J Biol Chem* 279: 1256-1261; Dumoulin, M. et al. 2003, *Nature* 424: 783-788; Pleschberger, M. et al. 2003, *Bioconjugate Chem* 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002, *Int J Cancer* 89: 456-62; và Lauwereys, M. et al. 1998, *EMBO J* 17: 3512-3520. Các thư viện được thiết kế của các kháng thể và các mảnh của kháng thể của lạc đà có bán sẵn thương mại, ví dụ, từ hãng Ablynx, Ghent, Bỉ. Như với các kháng thể khác có nguồn gốc không phải là người, trình tự axit amin của kháng thể lạc đà có thể bị biến đổi theo cách tái tổ hợp để có được trình tự mà gần giống hơn với người trình

tự của người, có nghĩa là, kháng thể có kích thước nano này có thể “được làm giống như của người”. Do đó, tính kháng nguyên thấp vốn có của các kháng thể của lạc đà với người có thể được giảm hơn nữa.

Kháng thể có kích thước nano của lạc đà này có khối lượng phân tử xấp xỉ là bằng 1/10 khối lượng phân tử của IgG của người và protein này có đường kính vật lý chỉ vài nanomet. Một hệ quả của kích thước nhỏ là khả năng các kháng thể có kích thước nano của lạc đà gắn với các vị trí kháng nguyên mà là không nhìn thấy được về mặt chức năng đối với các protein kháng thể có kích thước lớn hơn, có nghĩa là, các kháng thể có kích thước nano của lạc đà là hữu ích làm các thuốc thử phát hiện các kháng nguyên mà theo cách khác là khó khăn khi sử dụng các kỹ thuật miễn dịch cổ điển, và làm chất có thể điều trị bệnh. Do đó, một hệ quả khác nữa của kích thước nhỏ là kháng thể có kích thước nano của lạc đà có thể ức chế là kết quả của sự gắn kết với vị trí đặc hiệu trong khe hoặc kẽ hở hẹp của protein đích, và vì thế có thể phục vụ theo khả năng mà gần giống với chức năng của dược phẩm có trọng lượng phân tử nhỏ cổ điển hơn là với chức năng của kháng thể cổ điển.

Trọng lượng phân tử thấp và kích thước nhỏ gọn này khiến các kháng thể có kích thước nano của lạc đà trở nên cực kỳ bền nhiệt, bền với pH cực trị và bền với sự thủy phân do protein phân giải, và có tính kháng nguyên thấp. Hệ quả khác là các kháng thể có kích thước nano của lạc đà này di chuyển từ hệ tuần hoàn vào các mô, và thậm chí vượt qua hàng rào máu-não và có thể điều trị các rối loạn gây ảnh hưởng đến có mô thần kinh. Hơn nữa, các kháng thể có kích thước nano có thể thúc đẩy vận chuyển dược phẩm qua hàng rào máu não. Xem bằng sáng chế Mỹ số công bố 20040161738 công bố ngày 19 tháng 8, 2004. Các đặc điểm này kết hợp với tính kháng nguyên thấp với người đã chỉ ra tiềm năng điều trị bệnh rất tốt. Hơn nữa, các phân tử này có thể được biểu hiện toàn bộ trong các tế bào động vật nhân sơ như E. coli và được biểu hiện như các protein dung hợp trong thể thực khuẩn và có chức năng.

Hơn nữa, các kháng thể có kích thước nano được thiết kế có thể được tùy chỉnh hóa bằng cách thiết kế về di truyền để có thời gian bán rã trong đối tượng tiếp nhận trong khoảng từ 45 phút đến hai tuần. Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc kháng thể có kích thước nano của lạc đà này có được bằng cách ghép các trình tự CDR của chuỗi

nặng hoặc chuỗi nhẹ của một kháng thể trong số các kháng thể của người theo sáng chế, XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, vào các trình tự vùng sườn của kháng thể có kích thước nano hoặc kháng thể miền duy nhất, như được mô tả, ví dụ, trong đơn sáng chế PCT có số công bố WO 94/04678.

Khung không phải của kháng thể

Các vùng sườn hoặc khung không phải của globulin miễn dịch đã biết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các Adnectin (fibronectin) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich, Thụy Sĩ), các kháng thể miền (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) và Ablynx nv (Zwijnaarde, Bỉ)), lipocalin (Anticalin) (Pieris Proteolab AG, Freising, Đức), các dược phẩm miễn dịch điều biến có kích thước nhỏ (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), các maxybody (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Protein A (Affibody AG, Thụy Điển) và affilin (gamma-crystallin hoặc ubiquitin) (Scil Proteins GmbH, Halle, Đức), các phân tử bắt chước protein epitop (Polyphor Ltd, Allschwil, Thụy Sĩ).

(a) Khung fibronectin

Khung fibronectin tốt hơn là được dựa trên miền fibronectin loại III (ví dụ, modun thứ mười của fibronectin loại III (miền Fn3 10)). Miền fibronectin loại III có 7 hoặc 8 mạch beta được phân bố giữa hai phiến beta, bản thân chúng sẽ cuộn lại với nhau để tạo thành lõi của protein, và còn chứa các vòng cuộn (tương tự với các CDR) nối các mạch beta với nhau và được tiếp xúc với dung môi. Có ít nhất là ba vòng cuộn như vậy ở mỗi góc của cấu trúc bánh mì kẹp của phiến beta, trong đó cạnh này là ranh giới của protein vuông góc với hướng của các mạch beta (Bằng sáng chế Mỹ số 6.818.418).

Các khung từ fibronectin này không phải là globulin miễn dịch, mặc dù toàn bộ sự cuộn gấp là tương đồng rất gần với sự cuộn gấp của mảnh kháng thể nhỏ nhất có chức năng, vùng biến đổi của chuỗi nặng, chứa toàn đơn vị nhận biết kháng nguyên của IgG của lạc đà hai bướu và lạc đà không bướu. Nhờ có cấu trúc này, kháng thể không phải globulin miễn dịch bắt chước các đặc tính gắn kết kháng nguyên tương tự với các kháng thể trong tự nhiên và có ái lực với các kháng nguyên của các kháng thể này. Các

khung này có thể được sử dụng trong chiến lược chuyển dịch và ngẫu nhiên hóa vòng cuộn in vitro tương tự với quá trình trưởng thành ái lực của các kháng thể in vivo. Các phân tử từ fibronectin này có thể được sử dụng làm các khung trong đó xác vùng vòng cuộn của phân tử này có thể được thay thế bằng các CDR của một trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 bằng cách sử dụng các kỹ thuật tách dòng tiêu chuẩn.

(b) Ankyrin- Cặp phân tử

Công nghệ này dựa vào việc sử dụng các protein với các modun lặp lại có nguồn gốc từ ankyrin làm các khung để mang các vùng biến đổi có thể được sử dụng để gắn kết với các đích khác. Modun lặp lại ankyrin này là polypeptit có 33 axit amin gồm hai chuỗi xoắn α đối song song và một vòng lặp β . Sự gắn kết của các vùng biến đổi hầu hết là được tối ưu hóa bằng cách sử dụng kỹ thuật trình diện trên ribosom.

(c) Maxybody/Avime - Avidia

Các avime được biến đổi từ miền A có trong tự nhiên chứa protein như LRP-1. Các miền này được sử dụng trong tự nhiên cho các tương tác giữa protein-protein và ở người, có hơn 250 protein về cấu trúc là được dựa trên miền A. Các avime bao gồm nhiều monome “miền-A” khác nhau (2-10) được liên kết qua các phân tử nối axit amin. Các avime có thể được tạo ra để có thể gắn kết với kháng nguyên đích sử dụng hệ phương pháp được mô tả trong, ví dụ, các công bố Paten Mỹ số 20040175756; 20050053973; 20050048512; và 20060008844.

(d) Protein A – Affibody

Các phối tử ái lực Affibody® là các protein nhỏ, đơn giản được cấu tạo từ bó sợi gồm ba chuỗi xoắn α dựa trên khung của một trong số các miền gắn kết IgG của Protein A. Protein A là protein bề mặt từ vi khuẩn tụ cầu khuẩn vàng. Khung giá này gồm 58 axit amin, 13 axit amin trong số chúng được ngẫu nhiên hóa để tạo ra các thư viện Affibody® với số lượng lớn các biến thể phối tử (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,831,012). Các phân tử Affibody® bắt chước các kháng thể; chúng có khối lượng phân tử bằng 6kDa, so sánh với khối lượng phân tử của các kháng thể, là 150 kDa.

Mặc dù chúng có kích thước nhỏ, vị trí gắn kết của phân tử Affibody® giống với vị trí gắn kết của kháng thể.

(e)Anticalins – Pieris

Anticalins® là các sản phẩm được phát triển bởi công ty Pieris ProteoLab AG. Chúng được biến đổi từ các lipocalin, nhóm mở rộng của các protein nhỏ và mạnh thường được bao gồm trong sự vận chuyển sinh lý hoặc sự dự trữ các hợp chất không tan hoặc nhạy cảm hóa học. Một vài lipocalin tự nhiên tìm thấy ở mô hoặc dịch thể của người.

Kiểu cấu trúc protein này làm liên tưởng đến các globulin miễn dịch, với các vòng cuộn ở đầu của vùng sườn cố định. Tuy nhiên, trái ngược với các kháng thể hoặc mảnh tái tổ hợp của chúng, các lipocalin gồm chuỗi polypeptit đơn có 160 đến 180 gốc axit amin, chỉ lớn hơn chút ít so với miền globulin miễn dịch đơn.

Tập hợp bốn vòng cuộn này, tạo nên túi gắn kết, cho thấy tính linh động về cấu trúc rõ rệt và chịu được nhiều chuỗi bên khác nhau. Do đó, vị trí gắn kết theo đó có thể được tái tạo hình dạng theo quy trình được bảo hộ để nhận biết các phân tử đích được quy định trước có hình dạng khác với ái lực và tính đặc hiệu cao.

Một protein thuộc họ lipocalin, protein gắn kết bilin (bilin binding protein-BBP) của *Pieris Brassicae* đã được sử dụng để phát triển các anticalin bằng cách gây đột biến tập hợp gồm bốn vòng cuộn nêu trên. Một ví dụ về đơn sáng chế mô tả về "anticalin" là công bố đơn patent quốc tế số WO199916873.

(f) Affilin – Protein Sci

Các phân tử Affilin™ là các protein không phải là globulin miễn dịch nhỏ được thiết kế với các ái lực đặc hiệu về phía các protein và phân tử nhỏ. Các phân tử Affilin™ mới có thể được chọn lọc rất nhanh chóng từ hai thư viện, mỗi thư viện trong số chúng được dựa trên một protein khung khác nhau có nguồn gốc của người.

Các phân tử Affilin™ không thể hiện bất kỳ tính tương đồng về cấu trúc nào với các protein globulin miễn dịch. Các protein Scil sử dụng hai khung Affilin™, một trong số chúng là tinh thể gamma, protein giống các thấu kính của mắt về cấu trúc của người và khung còn lại là các protein liên họ của "ubiquitin". Cả hai khung của người này đều

rất nhỏ, cho thấy độ bền nhiệt cao và hầu hết có độ bền với các thay đổi độ pH và với các chất biến tính. Độ bền cao này chủ yếu là do cấu trúc phiên beta của các protein này được mở rộng. Ví dụ về các protein có nguồn gốc từ tinh thể gamma được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO200104144 và ví dụ của protein "giống như ubiquitin" được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2004106368.

(g) Protein Epitope Mimetics (PEM)

PEM là các phân tử giống như peptit, dạng vòng, có kích thước trung bình (MW 1-2kDa) bắt chước các cấu trúc bậc hai dạng kẹp tóc beta của các protein, cấu trúc bậc hai chính này được bao gồm trong các tương tác protein-protein.

Thiết kế vùng sườn hoặc Fc

Các kháng thể được thiết kế và các phần gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế bao gồm các kháng thể và protein trong đó các cải biến được tạo ra với các gốc của vùng sườn trong V_H và/ hoặc V_L , ví dụ, để thúc đẩy các đặc điểm của kháng thể. Thông thường là các cải biến trong vùng sườn này được tạo ra để giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể. Ví dụ, một phương án là "đột biến ngược" một hoặc nhiều gốc trong vùng sườn thành trình tự dòng mầm tương ứng. Cụ thể hơn là, kháng thể trải qua đột biến soma có thể chứa các gốc của vùng sườn mà khác so với trình tự dòng mầm mà từ đó kháng thể này được biến đổi. Các gốc này có thể đồng nhất bằng cách so sánh trình tự khung kháng thể với trình tự dòng mầm có nguồn gốc từ kháng thể. Để quay ngược lại các trình tự của vùng sườn thành cấu hình dòng mầm của chúng, các đột biến soma có thể được "đột biến ngược" thành trình tự trình tự dòng mầm bằng cách, ví dụ, tạo đột biến điểm định hướng hoặc tạo đột biến qua trung gian PCR. Các kháng thể đã được "đột biến ngược" này cũng được dự định để được bao gồm bởi sáng chế.

Một loại khác của các cải biến vùng sườn bao gồm gây đột biến một hoặc nhiều gốc trong vùng sườn, hoặc thậm chí trong một hoặc nhiều vùng CDR, để loại bỏ các epitop-tế bào T để từ đó giảm tính sinh miễn dịch tiềm năng của kháng thể. Phương pháp này cũng được dùng để chỉ là "sự khử miễn dịch hóa" và được mô tả chi tiết hơn trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 20030153043 bởi Carr et al.

Các cải biến bổ sung hoặc cải biến khác được tạo ra trong vùng khung hoặc vùng CDR, các kháng thể theo sáng chế có thể được thiết kế để bao gồm các cải biến trong vùng Fc, thường là để biến đổi một hoặc nhiều đặc điểm chức năng của kháng thể, như thời gian bán rã trong huyết thanh, sự cố định kết bổ thể, gắn kết thụ thể Fc, và/hoặc sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể được biến đổi hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn với kháng thể) hoặc được cải biến để biến đổi sự glycosyl hóa của chúng, một lần nữa để biến đổi một hoặc nhiều đặc điểm chức năng của kháng thể. Mỗi phương án trong số các phương án này được mô tả chi tiết hơn bên dưới.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng Fc” được dùng để xác định vùng đầu C của chuỗi nặng của globulin miễn dịch, bao gồm vùng Fc có trình tự nguyên bản và các vùng Fc biến thể. Vùng Fc của chuỗi nặng của IgG của người này thường được xác định là chứa các gốc axit amin từ vị trí C226 hoặc từ P230 đến đầu carboxyl của kháng thể IgG. Sự đánh số các gốc trong vùng Fc này là sự đánh số các gốc của chỉ số EU theo Kabat. Lysin đầu C (gốc K447) của vùng Fc này có thể được loại bỏ, ví dụ, trong quá trình sản xuất hoặc tinh sạch kháng thể. Theo đó, chế phẩm của các kháng thể theo sáng chế có thể gồm các tập hợp kháng thể có tất cả gốc K447 đã được loại bỏ, các tập hợp kháng thể không có gốc K447 nào được loại bỏ, và các tập hợp kháng thể có hỗn hợp kháng thể có và không có gốc K447.

Theo một phương án, vùng bản lề của CH1 được cải biến sao cho số gốc xystein trong vùng bản lề này được thay đổi, ví dụ, được tăng hoặc được giảm. Phương án này được mô tả chi tiết hơn trong bằng sáng chế Mỹ số 5.677.425 bởi Bodmer et al. Số gốc xystein trong vùng bản lề của CH1 được thay đổi để, ví dụ, thúc đẩy sự lắp ráp các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc để tăng hoặc giảm độ bền của kháng thể.

Theo một phương án khác, vùng bản lề Fc của kháng thể được đột biến để giảm thời gian bán rã sinh học của kháng thể. Cụ thể hơn là, một hoặc nhiều đột biến axit amin được đưa vào vùng mặt phân cách của miền CH2-CH3 của mảnh bản lề Fc sao cho kháng thể này suy giảm sự gắn kết với protein Staphylococcal A (SpA) so sánh tỷ lệ với sự gắn kết SpA của miền bản lề Fc nguyên bản. Phương án này được mô tả chi tiết hơn trong bằng sáng chế Mỹ số 6,165,745 bởi Ward et al.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được cải biến để tăng thời gian bán rã sinh học của nó. Nhiều phương án khác nhau đều có thể. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến sau được đưa vào: T252L, T254S, T256F, như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6.277.375 theo Ward. Theo cách khác, để tăng thời gian bán rã sinh học, kháng thể có thể được biến đổi trong vùng CH1 hoặc CL để chứa epitop gắn kết thụ thể thu hồi được lấy từ hai vòng cuộn của miền CH2 của vùng Fc của IgG, như được mô tả trong các bằng sáng chế Mỹ số 5,869,046 và 6,121,022 bởi Presta et al.

Theo phương án khác nữa, vùng Fc được biến đổi bằng cách thay thế ít nhất là một gốc axit amin bằng gốc axit amin khác để biến đổi chức năng tác động của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể này có ái lực với phối tử tác động được biến đổi nhưng vẫn giữ được khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể ban đầu. Phối tử tác động với kháng thể mà có ái lực được biến đổi có thể là, ví dụ, thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của bổ thể. Phương án này được mô tả chi tiết hơn trong các bằng sáng chế Mỹ số 5.624.821 và 5.648.260, đều bởi Winter et al.

Theo phương án khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ gốc axit amin có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể này có sự gắn kết C1q được biến đổi và/hoặc sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (CDC) được giảm xuống hoặc triệt tiêu. Phương án này được mô tả chi tiết hơn trong bằng sáng chế Mỹ số 6.194.551 bởi Idusogie et al.

Theo phương án khác, một hoặc nhiều gốc axit amin được biến đổi để theo đó biến đổi khả năng của kháng thể cố định bổ thể. Phương án này được mô tả chi tiết hơn trong công bố đơn quốc tế số WO 94/29351 bởi Bodmer et al.

Vẫn theo phương án khác, vùng Fc được cải biến để tăng khả năng của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó để tạo ra sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/ hoặc để tăng ái lực của kháng thể này với thụ thể Fcγ bằng cách biến đổi một hoặc nhiều axit amin. Phương án này được mô tả chi tiết hơn trong công bố đơn quốc tế số WO 00/42072 bởi Presta. Hơn nữa, các vị trí gắn kết FcγRI, FcγRII, FcγRIII và FcRn trên IgG1 của người được xác định vị trí và các biến thể với sự gắn

kết được cải thiện đã được mô tả (xem Shields, R.L. et al. 2001, J. Biol. Chem 276:6591-6604).

Theo phương án cụ thể, miền Fc của isotyp IgG1 được sử dụng. Theo một số phương án cụ thể, biến thể đột biến của mảnh Fc của IgG1 được sử dụng, ví dụ, Fc IgG1 cầm mà mảnh Fc này giảm hoặc loại bỏ khả năng của polypeptit dung hợp để tạo ra sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/ hoặc để gắn kết với thụ thể Fcγ. Ví dụ về đột biến cầm của isotyp IgG1 là IgG1 trong đó Leuxin được thay thế bằng Alanin tại các vị trí axit amin 234 và 235 như đã được mô tả bởi Hezareh et al. 2001, J. Virol 75:12161-8. Ví dụ khác về đột biến cầm của isotyp IgG1 là IgG1 chứa đột biến D265A (aspartat được thay thế bằng alanin tại vị trí 265). Theo phương án cụ thể, miền Fc này là miền đột biến Fc cầm ngăn cản sự glycosyl hóa ở vị trí 297 của miền Fc này. Ví dụ, miền Fc chứa sự thay thế axit amin asparagin ở vị trí 297. Ví dụ về sự thay thế axit amin này là sự thay thế N297 bằng glyxin hoặc alanin.

Vẫn theo phương án khác, sự glycosyl hóa của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được cải biến. Ví dụ, kháng thể không được glycosyl hóa có thể được tạo ra (có nghĩa là, kháng thể không có sự glycosyl hóa). Sự glycosyl hóa có thể được biến đổi để, ví dụ, tăng ái lực của kháng thể với kháng nguyên. Các cải biến cacbohydrat này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, biến đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong trình tự kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều sự thay thế axit amin có thể được tạo ra mà dẫn đến sự khử một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa của vùng sườn vùng biến đổi để theo đó khử sự glycosyl hóa tại vị trí đó. Sự glycosyl hóa này có thể tăng ái lực của kháng thể với kháng nguyên. Phương án này được mô tả chi tiết hơn trong các bằng sáng chế Mỹ số 5,714,350 và 6,350,861 bởi Co et al.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có thể được tạo ra mà có kiểu glycosyl hóa được biến đổi, như kháng thể thiếu fucosyl hóa có lượng các gốc fucosyl giảm hoặc kháng thể có cấu trúc GlcNac phân đôi tăng. Các kiểu dạng glycosyl hóa được biến đổi có thể được chứng minh là làm tăng khả năng ADCC của các kháng thể. Các cải biến cacbohydrat này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ với bộ máy glycosyl hóa biến đổi. Các tế bào mang bộ máy glycosyl hóa biến đổi đã được mô tả trong lĩnh vực này

và có thể được sử dụng làm tế bào chủ mà trong đó để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế để theo đó sản xuất kháng thể với sự glycosyl hóa biến đổi. Ví dụ, EP 1 176 195 bởi Hang et al. mô tả dòng tế bào với gen FUT8 bị gián đoạn chức năng, mã hóa fucosyl transferaza, sao cho các kháng thể được biểu hiện trong dòng tế bào này biểu hiện sự thiếu fucosyl hóa giảm. Do đó, theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng cách biểu hiện tái tổ hợp trong dòng tế bào mà biểu hiện kiểu dạng sự thiếu fucosyl hóa giảm, ví dụ, dòng tế bào động vật có vú với sự biểu hiện suy giảm của gen FUT8 mã hóa fucosyltransferaza. Công bố đơn quốc tế số WO 03/035835 bởi Presta mô tả dòng tế bào CHO biến thể, tế bào Lecl3, với khả năng gắn fucoza với các carbohydrat được nối với Asn (297) giảm, cũng dẫn đến sự thiếu fucosyl hóa của các kháng thể được biểu hiện trong tế bào chủ này (cũng xem Shields, R.L. et al. 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Công bố đơn quốc tế số WO 99/54342 bởi Umana et al. mô tả các dòng tế bào được thiết kế để biểu hiện các glycosyl transferaza cải biến glycoprotein (ví dụ, beta(1,4)-N axetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) sao cho các kháng thể được biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế này biểu hiện cấu trúc GlcNac phân đôi tăng mà dẫn đến hoạt tính ADCC của các kháng thể tăng (cũng xem tài liệu của Umana et al. 1999, Nat. Biotech. 17:176-180). Theo cách khác, kháng thể và phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được tạo ra trong nấm men hoặc nấm dạng sợi được thiết kế cho kiểu dạng glycosyl hóa như của động vật có vú, và có khả năng tạo ra các kháng thể thiếu fucoza làm kiểu dạng glycosyl hóa (xem, ví dụ, EP 1 297 172).

Sự cải biến khác của các kháng thể và các phần gắn kết kháng nguyên của chúng như được bộc lộ ở đây mà được bảo gồm bởi sáng chế là sự peg hóa. Các phân tử này có thể được peg hóa để, ví dụ, tăng thời gian bán rã sinh học của chúng (ví dụ, trong huyết thanh). Ví dụ, để peg hóa kháng thể, kháng thể này, hoặc mảnh của nó, thường được phản ứng với polyetylen glycol (PEG), như este phản ứng hoặc dẫn xuất aldehyt của PEG, trong các điều kiện mà trong đó một hoặc nhiều nhóm PEG được gắn vào kháng thể hoặc mảnh kháng thể này. Sự peg hóa có thể được thực hiện bằng phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với phân tử PEG phản ứng (hoặc polyme tan trong nước phản ứng tương tự). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polyetylen glycol" được dự định để bao gồm các dạng bất kỳ của PEG mà đã được sử dụng để dẫn xuất các protein khác, như mono (C1-C10) alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol hoặc

polyetylen glycol-maleimit. Theo phương án nhất định, kháng thể được peg hóa là kháng thể được không được glycosyl hóa. Các phương pháp để peg hóa protein được biết trong lĩnh vực này và có thể được áp dụng với các kháng thể theo sáng chế. Xem, ví dụ, EP 0 154 316 bởi Nishimura et al. và EP 0 401 384 bởi Ishikawa et al.

Một sự cải biến khác của kháng thể và phần gắn kết kháng nguyên của nó được bao gồm bởi sáng chế là sự tiếp hợp hoặc sự dung hợp protein của ít nhất là vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế với protein huyết thanh, như albumin huyết thanh của người hoặc mảnh của nó để gia tăng thời gian bán rã của phân tử thu được. Phương pháp này được mô tả trong tài liệu của Ballance et al. EP 0 322 094.

Khả năng khác là sự dung hợp của ít nhất là vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế với các protein có khả năng gắn kết với protein huyết thanh, albumin huyết thanh của người này để tăng thời gian bán rã của phân tử thu được. Phương pháp này, ví dụ, được mô tả bởi Nygren et al., EP 0 486 525.

Phương pháp thiết kế kháng thể biến đổi

Như được mô tả trước đó, kháng thể kháng-IL-17A có trình tự V_H và V_L hoặc các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ được thể hiện ở đây có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể kháng-IL-17A mới bằng cách biến đổi các trình tự chuỗi nặng và/ hoặc chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ, các trình tự V_H và/ hoặc V_L , hoặc vùng cố định được gắn vào các trình tự này. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, các đặc điểm cấu trúc của kháng thể kháng-IL-17A theo sáng chế được sử dụng để tạo ra các kháng thể kháng-IL-17A tương tự về cấu trúc hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó mà giữ lại được ít nhất là một đặc điểm chức năng của các kháng thể theo sáng chế, như gắn kết với IL-17A của người và cũng ức chế một hoặc nhiều đặc điểm chức năng của IL-17A (ví dụ, ức chế sự gắn kết của IL-17A hoặc IL-17AF với thụ thể của nó, ức chế IL-17A hoặc IL-17AF cảm ứng sự sản xuất, GRO-alpha, v.v, hoạt tính ức chế trong các thử nghiệm in vivo).

Các kháng thể khác giữ lại về cơ bản là giống về các đặc điểm gắn kết với IL-17A bao gồm các kháng thể dạng khảm hoặc các kháng thể được ghép CDR của một kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 mà giữ lại

được các vùng VH và VL, hoặc vùng CDR, giống với các vùng của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 và có các vùng cố định hoặc vùng sườn khác (ví dụ, vùng Fc khác được chọn từ isotyp khác, ví dụ, IgG4 hoặc IgG2).

Ví dụ, một hoặc nhiều vùng CDR của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, hoặc các dạng đột biến của nó, có thể được kết hợp theo cách tái tổ hợp lại cùng với các vùng sườn và/hoặc các CDR khác đã biết để tạo ra các kháng thể kháng-IL-17A được thiết kế theo cách tái tổ hợp khác theo sáng chế, như được mô tả trước đó. Các loại cải biến khác bao gồm các loại được mô tả trong các mục trước. Nguyên liệu ban đầu cho phương pháp thiết kế này là một hoặc nhiều trình tự V_H và/ hoặc V_L của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 được trình bày trong các bảng trên, hoặc một hoặc nhiều vùng CDR của nó. Để tạo ra kháng thể được thiết kế, không cần thiết phải tạo ra cách thực sự (có nghĩa là, biểu hiện thành protein) kháng thể có một hoặc nhiều trình tự V_H và/ hoặc V_L của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, hoặc một hoặc nhiều vùng CDR của nó. Đúng hơn là, thông tin được chứa trong các trình tự này đã được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu để tạo ra các trình tự “thế hệ thứ hai” có nguồn gốc từ trình tự gốc và sau đó các trình tự “thế hệ thứ hai” này được tạo ra và biểu hiện thành protein.

Trình tự thế hệ thứ hai được biến đổi, ví dụ, bằng cách biến đổi trình tự mã hóa ADN của ít nhất là một gốc axit amin trong trình tự kháng thể của vùng biến đổi của chuỗi nặng và/ hoặc trình tự kháng thể của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể bất kỳ trong số XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, để tạo ra ít nhất là một trình tự của kháng thể được biến đổi; và biểu hiện trình tự của kháng thể được biến đổi này thành protein.

Theo đó, theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất kháng thể kháng-IL-17A được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào của động vật có vú bao gồm: trình tự kháng thể của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ, trình tự kháng thể của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể bất kỳ trong số XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5; biến đổi ít nhất là một codon trong trình tự mã hóa nucleotit, codon này mã hóa gốc axit amin trong trình tự kháng thể của chuỗi nặng có chiều dài

đầy đủ và/ hoặc trình tự kháng thể của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể để tạo ra ít nhất là một trình tự kháng thể bị biến đổi; và biểu hiện trình tự của kháng thể bị biến đổi thành protein.

Trình tự của kháng thể bị biến đổi cũng có thể được tạo ra bằng cách sàng lọc các thư viện kháng thể có trình tự CDR3 trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ duy nhất của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể lần lượt là XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, hoặc các yếu tố quyết định gắn kết cần thiết tối thiểu như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 20050255552, và các trình tự khác cho các trình tự CDR1 và CDR2. Việc sàng lọc này có thể được thực hiện theo kỹ thuật sàng lọc bất kỳ thích hợp cho việc sàng lọc các kháng thể từ các thư viện kháng thể, như kỹ thuật trình diện trên thực khuẩn thể.

Các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn có thể được sử dụng để điều chế và biểu hiện trình tự của kháng thể được biến đổi. Kháng thể được mã hóa bởi trình tự của kháng thể được biến đổi là kháng thể mà giữ lại một, một vài hoặc tất cả các đặc tính chức năng mong muốn của các kháng thể kháng-IL-17A được mô tả ở đây, các đặc tính chức năng này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người; và/hoặc ức chế gắn kết của IL-17A với thụ thể của nó; và/ hoặc ức chế sự sản xuất được cảm ứng bởi IL-17A, ví dụ, IL-6 hoặc GRO-alpha, v.v.

Kháng thể được biến đổi có thể biểu hiện một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, hoặc ba hoặc nhiều đặc tính chức năng nêu trên.

Theo các phương án cụ thể cho các phương pháp thiết kế các kháng thể theo sáng chế, các đột biến có thể được đưa vào một cách ngẫu nhiên hoặc có chọn lọc cho tất cả hoặc từng phần của trình tự mã hóa của kháng thể kháng-IL-17A và các kháng thể kháng IL-17A được biến đổi thu được có thể được sàng lọc hoạt tính gắn kết và/hoặc các đặc tính chức năng khác như được mô tả ở đây. Các phương pháp gây đột biến được mô tả trong lĩnh vực này. Ví dụ, công bố đơn quốc tế WO 02/092780 bởi Short mô tả phương pháp tạo và sàng lọc các đột biến kháng thể bằng cách sử dụng kỹ thuật gây đột biến bão hòa, kỹ thuật lắp ráp ghép nối tổng hợp nhân tạo, hoặc sự kết hợp của chúng. Theo cách khác, công bố đơn quốc tế WO 03/074679 bởi Lazar et al. mô tả

phương pháp sử dụng phương pháp sàng lọc bằng máy tính điện toán để tối ưu hóa các đặc tính hóa lý của các kháng thể.

Phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế

Theo khía cạnh khác của sáng chế liên quan đến phân tử axit nucleic mà mã hóa kháng thể hoặc protein theo sáng chế. Ví dụ về trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là trình tự mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5, trình tự sau này có nguồn gốc từ trình tự trong bảng 3 (thể hiện toàn bộ các trình tự mã hóa nucleotit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5) và Bảng 2 (thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5).

Sáng chế cũng liên quan đến các phân tử axit nucleic mà có nguồn gốc từ các trình tự sau này được tối ưu hóa cho sự biểu hiện protein trong tế bào động vật có vú, ví dụ, các dòng tế bào CHO.

Axit nucleic có thể có mặt trong tế bào nguyên vẹn, trong dịch ly giải tế bào, hoặc có thể là axit nucleic ở dạng được tinh sạch một phần hoặc gần như là tinh sạch. Axit nucleic được "phân lập" hoặc "được lọc đến gần như là tinh sạch" khi được tinh sạch khỏi các thành phần tế bào khác hoặc tạp chất khác, ví dụ, protein hoặc axit nucleic khác của tế bào, bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, bao gồm xử lý alkalin/SDS, tạo băng bằng CsCl, sắc ký cột, điện di trên gel aga và các kỹ thuật khác được biết rộng rãi trong lĩnh vực này. Xem, 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, ví dụ, ADN hoặc ARN và có thể chứa hoặc không chứa các trình tự intron. Theo một phương án, axit nucleic là phân tử cADN. Axit nucleic này có thể có mặt trong vector như vector trình diện trên thực khuẩn thể, hoặc vector plasmid tái tổ hợp.

Axit nucleic theo sáng chế có thể có được bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Khi các mảnh ADN mã hóa, ví dụ, các mảnh V_H và V_L được thu được, các mảnh ADN này có thể được thao tác tiếp nữa bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn, ví dụ, để chuyển đổi các gen của vùng biến đổi thành gen của chuỗi kháng

thể có toàn bộ chiều dài, thành các gen mảnh Fab hoặc thành các gen scFv. Trong các thao tác này, mảnh ADN mã hóa V_L hoặc V_H được gắn kết cách linh hoạt với phân tử ADN khác, hoặc mảnh mã hóa protein khác, như vùng cố định của kháng thể hoặc phân tử nối linh hoạt. Thuật ngữ “được gắn kết cách linh hoạt”, như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định dùng để chỉ hai mảnh ADN được ghép với nhau theo phương thức có chức năng, ví dụ, sao cho các trình tự axit amin được mã hóa bởi hai mảnh ADN này duy trì đúng khung đọc, hoặc sao cho protein được biểu hiện dưới sự kiểm soát của promoter mong muốn.

ADN được phân lập mã hóa vùng V_H có thể được chuyển đổi thành gen của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bằng cách liên kết cách linh hoạt ADN mã hóa V_H với phân tử ADN khác mã hóa vùng cố định của chuỗi nặng (CH1, CH2 và CH3). Trình tự gen của vùng cố định của chuỗi nặng của người đã được biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, 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 mảnh ADN bao gồm các vùng này có thể có được bằng kỹ thuật khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Vùng cố định của chuỗi nặng có thể là vùng cố định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM hoặc IgD. Theo một số phương án, vùng cố định của chuỗi nặng được chọn trong số các isotyp IgG1. Đối với gen của mảnh Fab của chuỗi nặng, ADN mã hóa V_H có thể được liên kết cách linh hoạt với phân tử ADN khác chỉ mã hóa vùng cố định của chuỗi nặng CH1.

ADN được phân lập mã hóa vùng V_L có thể được chuyển đổi thành gen của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ (cũng như thành gen Fab của chuỗi nhẹ) bằng liên kết cách linh hoạt ADN mã hóa V_L với các phân tử ADN khác mã hóa vùng cố định của chuỗi nhẹ, CL. Trình tự của gen vùng cố định của chuỗi nhẹ của người đã được biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, 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 mảnh ADN bao gồm các vùng này có thể có được bằng kỹ thuật khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Vùng cố định của chuỗi nhẹ có thể là vùng cố định kappa hoặc lamda.

Để tạo ra gen scFv, mảnh ADN mã hóa cho V_H và V_L được liên kết cách linh hoạt với một mảnh khác mã hóa phân tử nối linh hoạt₂, ví dụ, mã hóa trình tự axit amin (Gly4 - Ser)₃, sao cho các trình tự V_H và V_L có thể được biểu hiện thành protein chuỗi đơn tiếp giáp, với các vùng V_L và V_H đã được nối lại bằng phân tử cầu nối linh hoạt (xem, ví dụ, 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).

Phân lập kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế

Nhiều phương pháp sàng lọc kháng thể và phần gắn kết kháng nguyên của nó đã được mô tả trong lĩnh vực này. Các phương pháp này có thể được chia thành các hệ thống in vivo, như chuột chuyển gen có khả năng sản xuất các kháng thể hoàn thiện của người nhờ vào sự miễn dịch hóa kháng nguyên và các hệ thống in vitro, bao gồm việc tạo ra các thư viện mã hóa ADN của kháng thể, biểu hiện thư viện ADN này trong hệ thống thích hợp cho sự sản xuất kháng thể, lựa chọn dòng biểu hiện kháng thể đại diện mà gắn kết với đích với tiêu chí lựa chọn ái lực và sự tái sinh trình tự mã hóa tương ứng của dòng đã được chọn này. Các kỹ thuật in vitro này đã được biết đến các kỹ thuật trình diện, và bao gồm không có giới hạn, trình diện trên thực khuẩn thể, trình diện trên ARN hoặc ADN, trình diện trên riboxom, trình diện trên nấm men hoặc tế bào của động vật có vú. Các kỹ thuật này được mô tả chi tiết trong lĩnh vực này (xem xét tổng quát trong, xem ví dụ: Nelson et al. 2010, Nature Reviews Drug discovery, “Development trends for human monoclonal antibody therapeutics” (Advance Online Publication) và Hoogenboom et al. 2001, Method in Molecular Biology 178:1-37, O’Brien et al., ed., người Press, Totowa, N.J.). Theo một phương án cụ thể, kháng thể tái tổ hợp của người theo sáng chế được phân lập bằng cách sử dụng các phương pháp trình diện trên thực khuẩn thể để sàng lọc các thư viện của thư viện kháng thể tái tổ hợp của người, như các thư viện HuCAL®.

Danh mục của các gen của V_H và V_L hoặc các vùng CDR có liên quan có thể được tách dòng cách riêng biệt bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc được tổng hợp bằng các yếu tố tổng hợp ADN và được tái kết hợp cách ngẫu nhiên trong các thư viện thực khuẩn thể, mà sau đó, có thể được sàng lọc cho các dòng gắn kết kháng nguyên. Các phương pháp trình diện trên thực khuẩn thể này để phân lập các kháng thể của

người đã được thiết lập trong lĩnh vực này như được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Xem ví dụ: bằng sáng chế Mỹ số 5,223,409; 5,403,484; và 5,571,698 bởi Ladner et al.; bằng sáng chế Mỹ số 5,427,908 và 5,580,717 bởi Dower et al.; bằng sáng chế Mỹ số 5,969,108 và 6,172,197 bởi McCafferty et al.; và bằng sáng chế Mỹ số 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 và 6,593,081 bởi Griffiths et al.

Theo phương án nhất định, các kháng thể của người được định hướng chống lại IL-17A có thể được xác định bằng cách sử dụng chuột chuyển gen hoặc chuột chuyển nhiễm sắc thể mang các phần của hệ thống miễn dịch của người thay vì hệ thống miễn dịch của chuột. Chuột chuyển gen và chuyển nhiễm sắc thể này bao gồm chuột được đề cập đến trong bản mô tả tương ứng là chuột HuMAb và chuột KM và được đề cập chung trong bản mô tả là “chuột mang Ig của người”.

HuMAb mouse[®] (Medarex, Inc.) chứa các locut nhỏ của gen globulin miễn dịch của người mã hóa các trình tự globulin miễn dịch chuỗi nặng (μ và γ) và chuỗi nhẹ κ của người không được sắp xếp lại, cùng với các đột biến được định hướng mà làm bất hoạt các locut của chuỗi μ và κ nội sinh (xem, ví dụ, Lonberg, et al. 1994, *Nature* 368:856-859). Theo đó, chuột này cho thấy sự biểu hiện IgM hoặc κ của chuột giảm, và để đáp ứng với sự sinh miễn dịch, các gen chuyển của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được đưa vào trải qua sự chuyển đổi lớp và đột biến xoma để tạo ra đơn dòng IgG κ của người với ái lực cao (Lonberg, N. et al. 1994, đã nêu; đã được xem xét trong tài liệu của Lonberg, N., 1994 *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. và Huszar, D. 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, và Harding, F. và Lonberg, N. 1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Sự sản xuất và sử dụng chuột HuMAb, và các cải biến hệ gen được mang trong các chuột này, được mô tả tiếp nữa trong tài liệu của Taylor, L. et al. 1992, *Axix nucleic Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuailon et al. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724; Choi et al. 1993, *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. 1993, *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. 1994, *International Immunology* 579-591; và Fishwild, D. et al. 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Tham khảo tiếp nữa trong, các bằng sáng chế Mỹ số 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; và 5,770,429; tất cả đều của Lonberg và Kay; bằng sáng chế Mỹ

số 5,545,807 của Surani et al.; các công bố đơn patent số WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 và WO 99/45962, tất cả đều của Lonberg và Kay; và công bố đơn patent số WO 01/14424 của Korman et al.

Theo phương án khác, các kháng thể của người theo sáng chế có thể được gia tăng bằng cách sử dụng chuột chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể mang gen chuyển của chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nhẹ của người. Chuột này, được đề cập đến trong bản mô tả là "chuột KM", được mô tả chi tiết trong công bố đơn số WO 02/43478 bởi Ishida et al.

Vẫn theo phương án khác nữa, các hệ thống động vật chuyển gen khác biểu hiện các gen globulin miễn dịch của người hiện đã có trong lĩnh vực và có thể được sử dụng để gia tăng các kháng thể kháng-IL-17A theo sáng chế. Ví dụ, hệ thống chuyển gen khác được đề cập đến là Xenomouse từ Abgenix, Inc. có thể được sử dụng. Chuột này được mô tả trong, ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 và 6,162,963 của Kucherlapati et al. Như sẽ được đánh giá cao bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, một số mẫu chuột khác có thể được sử dụng, như chuột nhắt TrianniTM từ Trianni, Inc., chuột nhắt VelocImmuneTM từ Regeneron Pharmaceuticals, Inc., hoặc chuột nhắt KymouseTM từ Kymab Limited.

Hơn thế nữa, các hệ thống động vật chuyển gen khác biểu hiện các gen globulin miễn dịch của người hiện có trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để gia tăng các kháng thể-IL-17A theo sáng chế. Ví dụ, chuột nhắt mang cả nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nhẹ của người, được đề cập đến là "chuột TC" có thể được sử dụng; chuột này được mô tả trong tài liệu của Tomizuka et al. 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727.

Các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột SCID trong đó các tế bào miễn dịch của người được hoàn nguyên sao cho đáp ứng kháng thể của người có thể được tạo ra nhờ vào sự tạo miễn dịch. Chuột này được mô tả trong, ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 5,476,996 và 5,698,767 của Wilson et al.

Sự sản xuất kháng thể đơn dòng theo sáng chế từ hệ thống phân họ chuột

Các kháng thể đơn dòng (mAb) có thể được sản xuất bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm hệ phương pháp kháng thể đơn dòng thông thường, ví dụ, kỹ thuật lai tế bào soma tiêu chuẩn của Kohler và Milstein 1975, *Nature* 256:495. Nhiều kỹ thuật để sản xuất kháng thể đơn dòng của thể được sử dụng, ví dụ, sự biến nạp các tế bào lympho B do virus hoặc gen gây ung thư.

Hệ thống động vật để điều chế dòng tế bào lai là hệ thống của phân họ chuột. Sự sản xuất tế bào lai ở chuột là các quy trình đã được thiết lập cụ thể. Các quy trình gây miễn dịch và kỹ thuật phân lập của tế bào lách được miễn dịch hóa để dung hợp đã được biết trong lĩnh vực này. Các chất tương tác cùng dung hợp (ví dụ, tế bào u tủy của chuột) và các quy trình dung hợp cũng đã được biết.

Các kháng thể dạng khảm hoặc được làm giống như của người theo sáng chế có thể được sản xuất dựa trên trình tự kháng thể đơn dòng của chuột được điều chế như đã mô tả ở trên. ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể có được từ tế bào lai của chuột quan tâm và được thiết kế để chứa các trình tự globulin miễn dịch không phải của chuột (ví dụ, của người) bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Ví dụ, để tạo ra kháng thể dạng khảm, các vùng biến đổi của chuột có thể được nối với các vùng cố định của người bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 4,816,567 của Cabilly et al.). Để tạo ra kháng thể được làm giống như của người, các vùng CDR của chuột murine có thể được chèn vào vùng sườn của người. Xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 5,225,539 của Winter, và các bằng sáng chế Mỹ số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 của Queen et al.

Sự sản xuất các tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng của người

Để tạo ra các tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế, tế bào hạch lách và/ hoặc các tế bào hạch lympho từ chuột được tạo miễn dịch có thể được phân lập và dung hợp với dòng tế bào bất tử thích hợp, như dòng tế bào u tủy của chuột. Các tế bào lai thu được có thể được sàng lọc cho sự sản xuất các thể đặc hiệu kháng nguyên hoặc đặc hiệu epitop. Ví dụ, dịch huyền phù của tế bào duy nhất của các

tế bào lympho ở lách từ chuột được gây miễn dịch có thể được dung hợp với 1/6 số tế bào u tủy của chuột không tiết ra P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) với 50% PEG. Các tế bào được trải xấp xỉ là 2x145 trong các đĩa microtiter đáy phẳng, sau đó ủ trong thời gian hai tuần trong môi trường chọn lọc chứa Clone Serum của phôi nồng độ 20%, môi trường điều kiện "653" nồng độ 18%, origen (IGEN) nồng độ 5%, L-glutamin nồng độ 4mM, natri pyruvat nồng độ 1mM, HEPES nồng độ 5mM, 2-mercaptoetanol nồng độ 0:055mM, penicillin 50 đơn vị/ml, streptomycin nồng độ 50mg/ml, gentamycin nồng độ 50mg/ml và HAT nồng độ 1X (hãng Sigma; HAT được bổ sung ở thời điểm 24 giờ sau dung hợp) Sau khoảng hai tuần, tế bào có thể được nuôi trong môi trường mà trong đó HAT được thay thế bằng HT. Từng giếng riêng lẻ sau đó có thể được sàng lọc bằng kỹ thuật ELISA cho các kháng thể IgM và IgG đơn dòng của người. Khi sự phát triển rộng rãi của các tế bào lai xảy ra, môi trường có thể được nghiên cứu thường là sau 10-14 ngày. Kháng thể tiết các tế bào lai này có thể được tái trải rộng, sàng lọc lại, và nếu vẫn dương tính với IgG của người, các kháng thể đơn dòng này có thể tách dòng phụ tiếp một hoặc hai lần nữa bằng cách pha loãng giới hạn. Sau đó, các dòng phụ bên này có thể được nuôi cấy in vitro để tạo ra lượng nhỏ kháng thể trong môi trường nuôi cấy mô để xác định đặc tính.

Để tinh sạch các kháng thể đơn dòng của người, các tế bào lai được chọn có thể được phát triển trong các bình quay hai lít để tinh chế kháng thể đơn dòng. Dịch nổi có thể được lọc và cô đặc trước khi thực hiện sắc ký ái lực với protein A-sepharosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG được chiết ra có thể được kiểm tra bằng cách điện di trên gel và sắc ký lỏng hiệu năng cao để đảm bảo độ tinh sạch. Dung dịch đậm có thể được trao đổi thành PBS, và nồng độ này có thể được xác định bằng OD₂₈₀ sử dụng hệ số tắt tín hiệu bằng 1,43. Các kháng thể đơn dòng có thể được phân ước và lưu trữ ở nhiệt độ -80°C.

Sự tạo ra tế bào chuyển nhiễm sản xuất kháng thể đơn dòng

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất trong tế bào chủ là tế bào chuyển nhiễm bằng cách sử dụng, ví dụ, sự kết hợp của các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và phương pháp chuyển nhiễm gen được biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, Morrison, S. 1985, Science 229:1202).

Ví dụ, để biểu hiện các kháng thể này, hoặc mảnh kháng thể của nó, các ADN mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có một phần hoặc đầy đủ chiều dài có thể thu được bằng các kỹ thuật sinh học phân tử hoặc hóa sinh tiêu chuẩn (ví dụ, tổng hợp hóa học ADN, sự khuếch đại PCR hoặc tách dòng ADN bằng cách sử dụng tế bào lai biểu hiện kháng thể quan tâm) và các ADN này có thể được chèn vào các vector biểu hiện sao cho các gen này được liên kết cách linh hoạt với các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “liên kết cách linh hoạt” được dự định để chỉ rằng gen của kháng thể được nối với vector sao cho các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã trong vector này cung cấp chức năng điều hòa phiên mã và dịch mã của gen kháng thể đã được dự định của chúng. Vector biểu hiện và các trình tự kiểm soát biểu hiện này được chọn để tương thích với sự biểu hiện của tế bào chủ được sử dụng. Gen chuỗi nhẹ của kháng thể và gen chuỗi nặng của kháng thể có thể được chèn vào các vector riêng biệt hoặc, thông thường là, cả hai gen được chèn vào cùng một vector biểu hiện. Gen kháng thể được chèn vào vector biểu hiện bằng các phương pháp tiêu chuẩn (ví dụ, phương pháp nối bổ sung của các vị trí giới hạn trên mảnh gen kháng thể và vector, hoặc phương pháp nối đầu bằng nếu không có vị trí giới hạn). Vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể được mô tả trong đây có thể được sử dụng để tạo ra các gen kháng thể có toàn bộ chiều dài của isotyp kháng thể bất kỳ bằng cách chèn chúng vào các vector biểu hiện mã hóa vùng cố định của chuỗi nặng và vùng cố định của chuỗi nhẹ của isotyp mong muốn sao cho phân mảnh V_H này được liên kết cách linh hoạt với phân mảnh C_H trong vector này và mảnh V_L này liên kết cách linh hoạt với mảnh C_L trong vector. Ngoài ra hoặc theo cách khác, vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mã hóa peptit tín hiệu, cũng được gọi là trình tự dẫn đầu, mà thúc đẩy sự tiết chuỗi kháng thể từ tế bào chủ. Gen của chuỗi kháng thể này có thể được tách dòng vào vector để sao cho peptit tín hiệu này được liên kết trong đúng khung đọc với đầu amino của gen của chuỗi kháng thể. Peptit tín hiệu có thể là peptit tín hiệu globulin miễn dịch hoặc peptit tín hiệu khác loại (có nghĩa là, peptit tín hiệu từ protein không phải là globulin miễn dịch). Các ví dụ về các peptit tín hiệu này được tìm thấy trong bảng 7, và các ví dụ về các trình tự polynucleotit mã hóa các peptit tín hiệu được tìm thấy trong bảng 8.

Bảng 7. Peptit tín hiệu cho chuỗi peptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Peptit tín hiệu	ID trình tự số	Được sử dụng cho chuỗi peptit chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ
1	SEQ ID NO: 59	Chuỗi nặng
2	SEQ ID NO: 60	Chuỗi nhẹ
3	SEQ ID NO: 63	Chuỗi nặng
4	SEQ ID NO: 64	Chuỗi nhẹ
5	SEQ ID NO: 67	Chuỗi nặng
6	SEQ ID NO: 68	Chuỗi nhẹ

Bảng 8. Trình tự polynucleotit mã hóa peptit tín hiệu

Mã hóa peptit tín hiệu số	ID trình tự số	Mã hóa trình tự peptit tín hiệu cho chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ
1	SEQ ID NO: 61	Chuỗi nặng
2	SEQ ID NO: 62	Chuỗi nhẹ
3	SEQ ID NO: 65	Chuỗi nặng
4	SEQ ID NO: 66	Chuỗi nhẹ
5	SEQ ID NO: 69	Chuỗi nặng
6	SEQ ID NO: 70	Chuỗi nhẹ

Ngoài các gen của chuỗi kháng thể, các vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế mang trình tự điều hòa mà kiểm soát sự biểu hiện của gen của chuỗi kháng thể này trong tế bào chủ. Thuật ngữ “trình tự điều hòa” được dự định để bao gồm các promoter, yếu tố tăng cường và các yếu tố kiểm soát biểu hiện khác (ví dụ, các tín hiệu cho sự gắn đuôi polyadenyl) mà kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã của gen của chuỗi kháng thể. Các trình tự điều hòa này được mô tả, ví dụ, trong Goeddel 1990, Gene Expression Technology. Các phương pháp trong Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA). Sẽ được đánh giá cao bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng sự thiết kế vector biểu hiện, bao gồm sự lựa chọn các trình tự điều hòa, có thể phụ

thuộc vào các yếu tố này gồm sự lựa chọn tế bào chủ được dùng để để biến nạp, mức độ biểu hiện của protein được mong muốn, v.v. Trình tự điều hòa cho sự biểu hiện ở tế bào chủ là của động vật có vú bao gồm các yếu tố của virus mà hướng đến mức độ cao tuyệt đối của sự biểu hiện protein trong tế bào động vật có vú, như các promotor và/hoặc yếu tố tăng cường có nguồn gốc từ cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus (ví dụ, promotor hoạt động chủ yếu trong pha muộn của adenovirus (AdMLP)), và polyoma. Ngoài ra, trình tự điều hòa không có nguồn gốc từ virus cũng có thể được sử dụng, như promotor ubiquitin hoặc vùng promotor P-globin. Vẫn theo phương án khác, các yếu tố điều hòa được cấu tạo từ trình tự từ các nguồn khác nhau, như hệ thống promotor SRA, mà chứa trình tự từ promotor sớm của SV40 và trình tự lặp lại dài đầu tận cùng của virus gây bệnh bạch cầu tế bào T của người typ 1 (Takebe, Y. et al. 1988, Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Ngoài các gen của chuỗi kháng thể và các trình tự điều hòa, vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế có thể mang các trình tự khác, như trình tự điều hòa sự tái bản của vector này trong tế bào chủ (ví dụ, tâm tái bản) và các gen đánh dấu chọn lọc được. Gen đánh dấu chọn lọc được tạo điều kiện chọn lọc các tế bào chủ mà trong đó vector này đã được đưa vào (xem, ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 4.399.216, 4.634.665 và 5.179.017, đều bởi Axel et al.). Ví dụ, thông thường là gen đánh dấu chọn lọc được cung cấp sự chống chịu với các loại thuốc, như G418, hygromycin hoặc metotrexat, trên tế bào chủ mà trong đó vector này đã được đưa vào. Gen đánh dấu chọn lọc được bao gồm gen dihydrofolat reductase (DHFR) (để sử dụng trong tế bào chủ DHFR với sự chọn lọc/khuếch đại metotrexat) và gen neo (để chọn lọc G418).

Đối với sự biểu hiện của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, các kỹ thuật tiêu chuẩn được áp dụng để chuyển nhiễm tế bào chủ với vector biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các dạng khác nhau của thuật ngữ "chuyển nhiễm" được dự định để bao gồm rất nhiều kỹ thuật thường được dùng để đưa ADN bên ngoài vào trong tế bào chủ từ động vật nhân sơ hoặc động vật nhân thực, ví dụ, điện biến nạp, biến nạp kết tủa canxi-phosphat, chuyển nhiễm DEAE-dextran và các kỹ thuật tương tự. Điều này về mặt lý thuyết là có thể biểu hiện các kháng thể theo sáng chế trong tế bào chủ từ động vật nhân thực hoặc nhân sơ. Sự biểu hiện của các kháng thể trong tế bào động vật nhân thực, ví dụ, tế bào chủ là các tế bào của động vật có vú, nấm men hoặc nấm sợi, được

mô tả bởi vì các tế bào nhân thực này, và cụ thể là tế bào của động vật có vú, tương tự hơn tế bào động vật nhân sơ để ghép nối và tiết kháng thể có hoạt tính miễn dịch và được cuộn gấp chính xác.

Theo một phương án cụ thể, vector tách dòng hoặc vector biểu hiện theo sáng chế chứa ít nhất là một trình tự mã hóa trong bảng 3, liên kết linh hoạt với trình tự promotor thích hợp. Theo một phương án cụ thể khác, vector tách dòng hoặc vector biểu hiện theo sáng chế chứa ít nhất là một trình tự mã hóa từ Bảng 4, liên kết linh hoạt với trình tự promotor thích hợp.

Tế bào chủ là tế bào của động vật có vú để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm tế bào buồng trứng của chuột hamster Trung Quốc (tế bào CHO) (bao gồm tế bào dhfr- CHO, được mô tả bởi Urlaub và Chasin 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 được sử dụng cùng với gen đánh dấu chọn lọc được DH FR, ví dụ, như được mô tả bởi R.J. Kaufman và P.A. Sharp 1982, Mol. Biol. 159:601-621), dòng tế bào CHOK1 dhfr+, tế bào u tủy NSO, tế bào COS và tế bào SP2. Cụ thể là, để sử dụng với tế bào u tủy NSO, một hệ thống biểu hiện khác là hệ thống biểu hiện gen GS được thể hiện trong các công bố đơn quốc tế số WO 87/04462, WO 89/01036 và EP 0 338 841. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào của động vật có vú để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm dòng tế bào động vật có vú không biểu hiện gen FUT8, ví dụ, như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,946,292.

Khi vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa các gen kháng thể được đưa vào trong các tế bào chủ là tế bào của động vật có vú, các kháng thể này được sản xuất bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong một khoảng thời gian thích hợp đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ hoặc sự tiết của kháng thể vào trong môi trường nuôi cấy mà trong môi trường đó tế bào chủ sinh trưởng. Các kháng thể có thể được thu lại từ môi trường nuôi cấy sử dụng các phương pháp tinh sạch tiêu chuẩn (Xem, ví dụ, Abhinav et al. 2007, Journal of Chromatography 848:28-37).

Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ theo sáng chế là tế bào chủ được chuyển nhiễm với vector biểu hiện có trình tự mã hóa được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18, 31, 51, 19, 28, 32, 38, 40, 46, 48, 52, 56, và 58, thích hợp cho sự biểu hiện của các

kháng thể tương ứng là XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, được liên kết linh hoạt với trình tự promotor thích hợp.

Sau đó, tế bào chủ lúc sau này có thể được nuôi cấy tiếp trong các điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện và sản xuất kháng thể theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm các kháng thể tương ứng là XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5.

Thế tiếp hợp miễn dịch

Theo khía cạnh khác, sáng chế xác định đặc điểm của kháng thể kháng-IL-17A theo sáng chế, hoặc mảnh của nó, được tiếp hợp với gốc có hoạt tính hoặc có tác dụng trị bệnh, như xytotoxin, thuốc (ví dụ, thuốc ức chế miễn dịch) hoặc chất độc phóng xạ. Các thế tiếp hợp này được đề cập trong đây như "thế tiếp hợp miễn dịch". Điều này có thể được ưu tiên đặc biệt nếu IL-17A được biểu hiện trên bề mặt của tế bào Th17 (Brucklacher-Waldert et al. 2009, J Immunol. 183:5494-501).

Các thế tiếp hợp miễn dịch chứa một hoặc nhiều xytotoxin được đề cập đến như là "chất độc miễn dịch." Xytotoxin hoặc chất gây độc tế bào bao gồm chất bất kỳ mà có hại với tế bào (ví dụ, làm chết). Ví dụ bao gồm taxon, xytochalsin B, gramixidin D, ethidi bromua, emetin, mitomyxin, etopozit, tenopozit, vincristin, vinblastin, t. colchixin, doxorubixin, daunorubixin, dihydroxy anthraxin dion, mitoxantron, mithramyxin, actinomyxin D, 1 -dehydrotestosteron, các glucocorticoit, procain, tetracain, lidocain, propranolol, và puromyxin và các chất tương tự hoặc tương đồng của chúng. Các chất có tác dụng trị bệnh cũng bao gồm, ví dụ, chất chống chuyển hóa (ví dụ, metotrexat, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, xytarabin, 5-flororaxin decarbazin), chất ăn mòn (ví dụ, meclorothamin, thioepa cloraxnbuxin, meiphalan, carmustin (BSNU) và lomustin (CCNU), xyclothosphamit, busulfan, dibromomanitol, streptozotixin, mitomyxin C, và cis-diclorodiamin platin (II) (DDP) cisplatin, các thuốc chống u bướu (ví dụ, daunorubixin (trước đây là daunomyxin) và doxorubixin), kháng sinh (ví dụ, dactinomyxin (trước đây là actinomyxin), bleomyxin, mithramyxin, và anthramyxin (AMC)), và chất chống nguyên phân (ví dụ, vincristin và vinblastin).

Ví dụ khác của xytotoxin có tác dụng trị bệnh mà có thể được tiếp hợp với kháng thể theo sáng chế bao gồm duocarmyxin, calicheamixin, maytansin và auristatin, và các

dẫn xuất của nó. Ví dụ của thể tiếp hợp kháng thể calicheamixin có bán ngoài thị trường (MylotargTM; Wyeth-Ayerst).

Các xytotoxin có thể được tiếp hợp được với các kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tử nổi hiện có trong lĩnh vực này. Ví dụ của các loại phân tử nổi được sử dụng để tiếp hợp xytotoxin với kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử nổi chứa các hydrazon, các thioete, các este, các disulfua và phân tử nổi chứa peptit. Phân tử nổi có thể được chọn sao cho, ví dụ, dễ bị phân cắt bởi độ pH thấp trong khoang tiêu thể hoặc dễ bị phân cắt bởi các proteaza, như các proteaza tốt hơn là được biểu hiện trong mô khối u như catheosin (ví dụ, catheosin B, C, D).

Sự mô tả nhiều hơn về các dạng của xytotoxin, phân tử nổi và phương pháp để tiếp hợp chất có tác dụng trị bệnh với kháng thể, xem tài liệu của 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. và 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.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tiếp hợp với isotop phóng xạ để tạo ra các dược phẩm phóng xạ gây độc tế bào, cũng đề cập đến như là các thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ. Ví dụ về các isotop phóng xạ mà có thể tiếp hợp được với kháng thể trong sử dụng để chuẩn đoán hoặc điều trị bệnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, iot¹³¹, indi¹¹¹, yttri⁹⁰, và luteti¹⁷⁷. Phương pháp điều chế thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ đã được thiết lập trong lĩnh vực này. Ví dụ của thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ có bán trên thị trường, bao gồm ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals) và BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), và các phương pháp tương tự có thể được sử dụng để điều chế thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ sử dụng kháng thể theo sáng chế.

Các thể tiếp hợp kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để cải biến đáp ứng sinh học đã biết, và gốc dược phẩm này không được hiểu là bị giới hạn với các chất điều trị bệnh hóa học cổ điển. Ví dụ, gốc thuốc có thể là protein hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học mong muốn. Các protein này có thể bao gồm, ví dụ, chất độc hoạt động như enzym, hoặc mảnh hoạt động của nó, như abrin, rixin A, ngoại độc tố từ trực khuẩn mủ

xanh, hoặc độc tố từ vi khuẩn gây bệnh bạch cầu; protein như yếu tố hoại tử khối u hoặc in-toferon- γ ; hoặc, các yếu tố cải biến đáp ứng sinh học như, ví dụ, lymphokin, in-tơ-lơ-kin-1 ("IL1"), in-tơ-lơ-kin-2 ("IL2"), in-tơ-lơ-kin-6 ("IL6"), yếu tố kích thích tập hợp đại thực bào bạch cầu hạt ("GM-CSF"), yếu tố kích thích tập hợp bạch cầu hạt ("G-CSF"), hoặc các yếu tố tăng trưởng khác.

Kỹ thuật để tiếp hợp gốc có tác dụng điều trị bệnh này tới các kháng thể đã được biết rõ, xem, ví dụ, tài liệu của Amon et al. 1985, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", trong tài liệu Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56; tài liệu của Hellstrom et al. 1987, "Antibodies For Drug Delivery", trong tài liệu Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), tài liệu của Robinson et al. (eds.), pp. 623-53; tài liệu của Thorpe 1985, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", trong Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506; tài liệu của Thorpe et al. 1982, Immunol. Rev., 62:119-58.

Phân tử hai đặc hiệu

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả đặc điểm của các phân tử hai đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu chứa kháng thể kháng IL-17A/AF hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được biến đổi hoặc liên kết với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác (ví dụ, kháng thể hoặc phối tử của thụ thể) để tạo ra phân tử hai đặc hiệu gắn với ít nhất là hai thành phần gắn kết khác nhau hoặc hai phân tử đích. Kháng thể hoặc protein theo sáng chế trên thực tế có thể là được biến đổi hoặc liên kết với nhiều hơn một phân tử chức năng khác để tạo ra phân tử đa đặc hiệu gắn kết với nhiều hơn hai thành phần gắn kết khác nhau và/hoặc phân tử đích; các phân tử đa đặc hiệu này cũng được dự định để được bao gồm bởi thuật ngữ "phân tử hai đặc hiệu" như được sử dụng trong bản mô tả. Để tạo ra phân tử hai đặc hiệu theo sáng chế, kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng cách ghép nối hóa học, dung hợp di truyền, kết hợp không cộng hóa trị hoặc các kỹ thuật khác) với một hoặc nhiều phân tử gắn kết khác, như kháng thể, mảnh kháng thể, phân tử giả peptit hoặc giả gắn kết khác, sao cho thu được phân tử hai đặc hiệu.

Theo đó, sáng chế bao gồm các phân tử hai đặc hiệu chứa ít nhất là một thành phần đặc hiệu gắn kết thứ nhất với IL-17A, ví dụ, một phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 và thành phần đặc hiệu gắn kết thứ hai với epitop đích thứ hai. Ví dụ, epitop đích thứ hai này là epitop khác của IL-17A với epitop đích thứ nhất. Ví dụ khác là phân tử hai đặc hiệu chứa ít nhất là một thành phần đặc hiệu gắn kết thứ nhất với IL-17A, ví dụ, một phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 và thành phần đặc hiệu gắn kết thứ hai với epitop khác của IL-17A hoặc của kháng nguyên đích khác.

Ngoài ra, phân tử hai đặc hiệu theo sáng chế là phân tử đa đặc hiệu, phân tử này có thể gồm thành phần đặc hiệu gắn kết thứ ba khác, bên cạnh epitop đích thứ nhất và thứ hai.

Theo một phương án, phân tử hai đặc hiệu theo sáng chế chứa thành phần đặc hiệu gắn kết của ít nhất là một kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó, bao gồm, ví dụ, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, hoặc Fv chuỗi đơn. Kháng thể cũng có thể là dime chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, hoặc mảnh rất nhỏ bất kỳ của nó như Fv hoặc cấu trúc chuỗi đơn như được mô tả trong tài liệu của Ladner et al bằng sáng chế Mỹ số 4,946,778.

Các kháng thể khác mà có thể được dùng trong phân tử hai đặc hiệu theo sáng chế là các phân tử của phân họ chuột, dạng khảm và kháng thể đơn dòng được làm giống như của người.

Phân tử hai đặc hiệu theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách tiếp hợp các thành phần đặc hiệu gắn kết hợp thành, sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, mỗi thành phần đặc hiệu gắn kết của phân tử hai đặc hiệu có thể được tạo ra riêng rẽ và sau đó được tiếp hợp với một thành phần đặc hiệu gắn kết khác. Khi các thành phần đặc hiệu gắn kết này là protein hoặc peptit, nhiều chất ghép nối hoặc chất liên kết ngang có thể được sử dụng cho sự tiếp hợp cộng hóa trị. Ví dụ chất liên kết ngang bao gồm protein A, carbodiimide, N-succinimidyl-S-axetyl-thioaxetat (SATA), 5,5'-dithiobis(axit 2-nitrobenzoic) (DTNB), o-phenylendimaleimide (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), và sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) xyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) (xem, ví dụ, tài liệu của

Karpovsky et al. 1984, J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả bởi Paulus 1985, Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan et al. 1985, Science 229:81-83), và Glennie et al. 1987, J. Immunol. 139: 2367-2375). Các chất tiếp hợp là SATA và sulfo-SMCC, cả hai đều sẵn có từ Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Khi các thành phần đặc hiệu gắn kết là kháng thể, chúng có thể được tiếp hợp bằng cách tạo liên kết sunhydryl vùng bản lề đầu C của hai chuỗi nặng. Theo phương án cụ thể, vùng bản lề này được cải biến để chứa số lượng lẻ các gốc sulfhydryl, ví dụ, một, trước khi tiếp hợp.

Theo cách khác, cả hai thành phần đặc hiệu gắn kết có thể được mã hóa trong cùng một vectơ và biểu hiện và lắp ghép trong cùng một tế bào chủ. Phương pháp này đặc biệt là hữu dụng nếu phân tử hai đặc hiệu là mAbxmAb, mAbxFab, FabxF(ab')₂ hoặc phối tửxprotein dung hợp Fab. Phân tử hai đặc hiệu theo sáng chế có thể là phân tử chuỗi đơn chứa một kháng thể chuỗi đơn và yếu tố quyết định gắn kết, hoặc phân tử hai đặc hiệu chuỗi đơn chứa hai yếu tố quyết định gắn kết. Phân tử hai đặc hiệu có thể chứa ít nhất là hai phân tử chuỗi đơn. Các phương pháp tạo ra phân tử hai đặc hiệu được mô tả, ví dụ, trong bằng sáng chế Mỹ số 5,260,203; bằng sáng chế Mỹ số 5,455,030; bằng sáng chế Mỹ số 4,881,175; bằng sáng chế Mỹ số 5.132.405; bằng sáng chế Mỹ số 5.091.513; bằng sáng chế Mỹ số 5.476.786; bằng sáng chế Mỹ số 5.013.653; bằng sáng chế Mỹ số 5.258.498; và bằng sáng chế Mỹ số 5.482.858.

Sự gắn kết của các phân tử hai đặc hiệu với các đích của chúng có thể được khẳng định bằng, ví dụ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (REA), phân tích FACS, thử nghiệm sinh học (ví dụ, ức chế tăng trưởng), hoặc thí nghiệm thẩm tách Tây. Mỗi thử nghiệm trong các thử nghiệm này, thường là phát hiện sự có mặt của phức hợp protein-kháng thể quan tâm cụ thể bằng cách sử dụng thuốc thử được đánh dấu (ví dụ, kháng thể) đặc hiệu cho phức hợp quan tâm.

Kháng thể đa trị

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể đa trị chứa ít nhất là hai phần gắn kết kháng nguyên giống nhau hoặc khác nhau của kháng thể theo sáng chế gắn kết với IL-17A, ví dụ, được chọn từ các phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5. Theo một phương án, kháng thể đa trị cung cấp ít nhất là hai, ba hoặc bốn phần gắn kết kháng nguyên của các kháng thể này. Các phần gắn kết kháng nguyên này có thể được nối với nhau qua sự dung hợp protein hoặc tạo liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không phải liên kết cộng hóa trị. Mặt khác, các phương pháp tạo liên kết đã được mô tả trong phân tử hai đặc hiệu. Hợp chất tứ trị có thể có được, ví dụ, bằng cách liên kết ngang các kháng thể theo sáng chế với kháng thể mà gắn kết với của các vùng cố định của kháng thể theo sáng chế, ví dụ, Fc hoặc vùng bản lề.

Dược phẩm

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa một hoặc một tổ hợp kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, ví dụ, một kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5, được sản xuất cùng với chất mang dược dụng. Chế phẩm này có thể bao gồm một hoặc một tổ hợp (ví dụ, hai hoặc nhiều) kháng thể, hoặc thể miễn dịch tiếp hợp hoặc phân tử hai đặc hiệu theo sáng chế. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một tổ hợp kháng thể hoặc protein gắn kết với các epitop khác nhau trên kháng nguyên đích hoặc một tổ hợp kháng thể hoặc protein có hoạt tính bổ trợ.

Dược phẩm theo sáng chế còn có thể được dùng trong điều trị kết hợp, có nghĩa là, kết hợp với chất khác. Ví dụ, điều trị kết hợp này có thể bao gồm kháng thể kháng-IL-17A hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, một kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5, kết hợp với ít nhất một chất chống viêm khác hoặc chất hóa trị liệu khác, ví dụ, chất ức chế miễn dịch. Ví dụ về chất có tác dụng điều trị mà có thể được sử dụng trong điều trị kết hợp được mô tả chi tiết hơn trong phần dưới đây về sử dụng kháng thể hoặc protein theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, "chất mang dược dụng" bao gồm bất kỳ và mọi dung môi, môi trường phân tán, lớp phủ, chất chống vi khuẩn và chống nấm, chất đẳng trương và chất kìm hãm hấp thụ, và các chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. Chất mang này cần phải thích hợp để dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, tùy sống hoặc da (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền). Theo một phương án, chất mang dược dụng cần phải thích hợp với đường dùng dưới da. Tùy thuộc vào đường sử dụng, hợp chất có hoạt tính, có nghĩa là, kháng thể, thể tiếp hợp miễn dịch, hoặc phân hai đặc hiệu, có thể được bao phủ trong vật chất để bảo vệ hợp chất này khỏi sự tác động của axit và các điều kiện tự nhiên khác có thể làm bất hoạt hợp chất này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều muối dược dụng. "Muối dược dụng" dùng để chỉ muối mà giữ được hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất ban đầu và không mang đến hiệu ứng độc tính sinh học không mong muốn bất kỳ (xem ví dụ, Berge, S.M., et al. 1977, J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ví dụ về các muối này bao gồm muối cộng axit và muối cộng bazơ. Muối cộng axit bao gồm muối có nguồn gốc từ axit vô cơ không độc hại như axit clohydric, axit nitric, axit phosphoric, axit sulfuric, axit bromhydric, axit hydroiodic, axit phosphorơ và tương tự, cũng như các muối có nguồn gốc từ axit hữu cơ không độc như các axit béo đơn và axit dicarboxylic, axit alkanoic được thế phenyl, axit hydroxy alkanoic, axit thơm, axit béo và axit thơm sulfonic và tương tự. Muối cộng bazơ bao gồm các muối có nguồn gốc từ các kim loại kiềm thổ, như natri, kali, magie, canxi và tương tự, cũng như có nguồn gốc từ amin hữu cơ không độc, như N,N'-dibenzylethylenediamin, N-metylglucamin, cloroprocain, cholin, dietanolamin, etylenediamin, procain và tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm chất chống oxi hóa dược dụng. Ví dụ về chất chống oxi hóa dược dụng bao gồm: chất chống oxi hóa tan trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorit, natri bisulfat, natri metabisulfit, natri sulfit và tương tự; chất chống oxi hóa tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxyanisol được butylat hóa (BHA), hydroxytoluen được butylat hóa (BHT), lexithin, propyl galat, alpha-tocopherol, và tương tự; chất chelat hóa kim loại, như axit citric, axit etylenediamin tetraaxetic (EDTA), sorbitol, axit tartaric, axit phosphoric, và tương tự.

Ví dụ về chất mang được dụng chứa nước và không chứa nước thích hợp được dùng trong chế phẩm được theo sáng chế bao gồm nước, etanol, các polyol (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng, dầu thực vật, như dầu oliu, và este hữu cơ có thể dùng để tiêm, như etyl oleat. Trạng thái lỏng ban đầu có thể được giữ lại, ví dụ, bằng cách sử dụng vật liệu bao phủ, như lexithin, bằng sự duy trì thước hạt được yêu cầu trong trường hợp thể phân tán, và bằng việc sử dụng chất hoạt động bề mặt.

Các chế phẩm này cũng chứa các tá dược như chất bảo quản, chất gây thẩm, chất tạo nhũ tương và chất phân tán. Phòng ngừa sự có mặt của vi sinh vật có thể được đảm bảo bởi cả các quy trình khử trùng và bởi sự tạo thành thể vùi của nhiều loại chất diệt nấm và diệt sinh vật, ví dụ, paraben, clorobutanol, axit phenol sorbic, và tương tự. Cũng có thể được mong muốn bao gồm chất đẳng trương, như đường, natri clorua, và tương tự vào chế phẩm. Hơn nữa, sự hấp thu được kéo dài của dạng được phẩm có thể dùng cho tiêm có thể có được nhờ sự tạo thành thể vùi của các chất trì hoãn hấp thu như, nhôm monostearat và gelatin.

Chất mang được dụng bao gồm dung dịch chứa nước hoặc thể phân tán bão hòa tiệt trùng hoặc bột tiệt trùng để cho sự điều chế tức thì dung dịch hoặc thể phân tán có thể dùng cho tiêm tiệt trùng. Việc sử dụng chất và môi trường này cho chất có hoạt tính điều trị bệnh đã được biết trong lĩnh vực này. Ngoại trừ mức độ mà môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ không thích hợp với hợp chất có hoạt tính, việc sử dụng các chất mang được dụng thích hợp này trong được phẩm theo sáng chế được dự tính. Hợp chất có hoạt tính bổ sung cũng có thể được kết hợp vào trong được phẩm này.

Dược phẩm thường là phải là vô trùng và bền trong điều kiện sản xuất và lưu trữ. Dược phẩm này có thể được bào chế ở dạng dung dịch, vi nhũ tương, hạt mỡ, hoặc các cấu trúc được chỉ dẫn khác thích hợp với nồng độ thuốc cao. Chất mang được dụng có thể là môi trường dung môi hoặc môi trường thể phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, các polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và dung dịch polyetylen glycol, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Trạng thái lỏng trước đó có thể được duy trì, ví dụ, bằng việc sử dụng chất phủ như lexithin, bằng sự duy trì kích thước hạt được yêu cầu trong trường hợp thể phân tán và bằng việc sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong

nhiều trường hợp, chất hoạt động bề mặt này có thể bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, các rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong dược phẩm. Sự hấp thu được kéo dài của dược phẩm có thể dùng cho tiêm có thể có được bằng cách bao gồm trong dược phẩm này chất trì hoãn hấp thu, ví dụ, các muối monostearat và gelatin.

Tổng quan về sự phát triển của các chế phẩm protein ổn định (ví dụ, kháng thể) có thể được tìm thấy trong tài liệu của Cleland et al. 1993, Crit. Reviews. Ther. Drug Carrier Systems 10(4):307-377 và của Wei Wang 1999, Int. J. Pharmaceutics 185:129-88. Các bài thảo luận khác về các chế phẩm kháng thể có thể được tìm thấy, ví dụ, trong Daugherty và Mersny 2006, Advanced Drug Delivery Reviews 58: 686-706; Bằng sáng chế số US 6,171,586, 4,618,486, các bằng sáng chế Mỹ số 20060286103, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 06/044908, WO 07/095337, WO 04/016286, tài liệu của Colandene et al. 2007, J. Pharm. Sci 96: 1598-1608; Schulman 2001, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:S6-S11 và các tài liệu tham khảo đã biết khác.

Dung dịch hoặc huyền phù được sử dụng cho sự áp dụng trong da hoặc dưới da thường bao gồm một hoặc nhiều thành phần sau: chất pha loãng tiệt trùng như nước dùng cho tiêm, dung dịch nước muối, dầu cố định, polyetylen glycol, glyxerin, propylen glycol hoặc dung môi tổng hợp khác, chất kháng khuẩn như benzyl alcohol hoặc methyl paraben, chất chống oxy hóa như axit ascorbic hoặc natri bisulfit, chất tạo chelat như axit etylenđiaminetetraaxetic, chất đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat, và chất điều chỉnh tính đẳng trương như natri clorit hoặc dextroza. Độ pH có thể được điều chỉnh bằng axit hoặc bazơ, như axit clohydric hoặc natri hydroxit. Các sản phẩm này có thể nạp vào trong ống chứa thuốc tiêm, bơm tiêm dùng một lần hoặc các ống đa liều dùng được làm bằng thủy tinh hoặc nhựa.

Dung dịch dùng cho tiêm tiệt trùng có thể được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất mang hoạt tính theo sáng chế ở lượng được yêu cầu trong dung môi thích hợp với một hoặc tổ hợp các thành phần được liệt kê ở trên, nếu được yêu cầu, sau đó là bước vi lọc khử trùng. Nhìn chung, thể phân tán được điều chế bằng cách kết hợp kháng thể hoặc protein theo sáng chế với chất dẫn thuốc tiệt trùng chứa môi trường phân tán bazơ và các thành phần được yêu cầu khác được liệt kê ở trên. Trong trường hợp bột khử trùng

để điều chế dung dịch dùng cho tiêm khử trùng, phương pháp điều chế là làm khô trong áp suất chân không và sự làm khô đông lạnh (quá trình đông khô) để tạo ra bột của thành phần hoạt tính cộng với thành phần được mong muốn khác từ dung dịch đã được lọc vô trùng trước đó của nó.

Theo một phương án cụ thể, các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 được dùng ở dạng sản phẩm dạng dung dịch trong ống. Lượng thuốc trong mỗi ống là 150mg. Dung dịch này chứa kháng thể nồng độ 150mg/ml, L-Histidin nồng độ 4,8mM, L-Histidin-HCl nồng độ 15,2mM, Sucroza nồng độ 220 mM và Polysorbat 20 nồng độ 0,04%, ở độ pH là $6,0 \pm 0,5$. 20% lượng dung dịch này được thêm vào để cho phép sự đẩy ra hoàn toàn liều lượng được dự định.

Lượng thành phần hoạt tính có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều dùng duy nhất sẽ thay đổi phụ thuộc vào đối tượng được điều trị, và chế độ cụ thể của việc áp dụng. Lượng thành phần hoạt tính có thể kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều dùng duy nhất thường là lượng chế phẩm mà tạo ra tác động điều trị bệnh. Thường là, không phải 100%, lượng này nằm trong khoảng từ 0,01% đến 99% thành phần hoạt tính, từ khoảng 0,1% đến khoảng 70%, hoặc từ khoảng 1% đến khoảng 30% thành phần hoạt tính kết hợp với chất mang được dùng.

Chế độ liều dùng được điều chỉnh để cung cấp đáp ứng được mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng có tác dụng điều trị bệnh). Ví dụ, liều dùng lượng lớn duy nhất có thể được sử dụng, các liều lượng được phân chia riêng có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều lượng này có thể giảm hoặc tăng theo tỷ lệ như được chỉ định bởi tính cấp thiết của các trường hợp điều trị. Đặc biệt hữu ích khi bào chế các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng đơn vị liều để dễ dàng sử dụng và tính đồng nhất liều lượng. Dạng đơn vị liều như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ các đơn vị tách riêng về vật chất thích hợp làm các liều dùng dạng đơn vị cho đối tượng được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng được xác định trước của hợp chất có hoạt tính đã được tính toán để tạo ra tác động điều trị bệnh được mong muốn kết hợp với chất mang được dùng được yêu cầu. Đặc điểm kỹ thuật của các dạng đơn vị liều dùng theo sáng chế được quyết định và phụ thuộc trực tiếp vào các đặc tính đặc biệt nhất của hợp chất có hoạt tính và tác động

điều trị bệnh cụ thể đạt được, và các giới hạn này vốn có trong lĩnh vực trộn hợp chất có hoạt tính cho việc điều trị có độ nhạy trong mỗi cá nhân.

Đối với việc sử dụng kháng thể hoặc protein, liều lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 150mg/kg, như 5, 15, và 50mg/kg dùng dưới da, và phổ biến hơn là 0,01 đến 5mg/kg, trọng lượng cơ thể vật chủ. Ví dụ, liều lượng có thể là 0,3mg/kg trọng lượng cơ thể, 1mg/kg trọng lượng cơ thể, 3mg/kg trọng lượng cơ thể, 5mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 10mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc trong khoảng 1-10mg/kg. Ví dụ về chế độ điều trị bệnh yêu cầu dùng một tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, bốn tuần một lần, một tháng một lần, ba tháng một lần hoặc ba đến sáu tháng một lần. Chế độ liều lượng cho kháng thể hoặc protein kháng-IL-17A theo sáng chế bao gồm 1mg/kg trọng lượng cơ thể, 3mg/kg trọng lượng cơ thể, 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg hoặc 30mg/kg bằng cách dùng trong tĩnh mạch, với kháng thể nêu trên sử dụng một trong số các lịch trình liều lượng sau: bốn tuần/sáu liều dùng, sau đó là ba tháng/sáu liều dùng; ba tuần/sáu liều dùng; 3mg/kg trọng lượng cơ thể/lần, sau đó là 1mg/kg trọng lượng cơ thể/ba tuần.

Theo một số phương pháp, hai hoặc nhiều kháng thể với đặc điểm kỹ thuật gắn kết khác nhau được dùng cùng lúc, trong trường hợp này liều lượng mỗi kháng thể được dùng giảm xuống trong khoảng được chỉ định. Kháng thể hoặc protein theo sáng chế thường được dùng trong nhiều đợt điều trị. Khoảng thời gian giữa các liều dùng duy nhất có thể là, ví dụ, hằng tuần, hằng tháng, ba tháng/lần hoặc hằng năm. Khoảng thời gian cũng có thể không thường xuyên do được chỉ định bởi việc đo mức độ kháng thể với kháng nguyên đích trong máu của bệnh nhân. Theo một số phương pháp, liều lượng được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể trong huyết tương là khoảng 1-1000µg/ml và trong một số phương pháp là khoảng 25-300µg/ml.

Theo cách khác, kháng thể hoặc protein có thể được dùng như chế phẩm giải phóng chậm, trong trường hợp này sự sử dụng ít thường xuyên hơn được yêu cầu. Liều lượng và tần suất thay đổi phụ thuộc vào thời gian bán rã của kháng thể trong bệnh nhân. Nhìn chung, kháng thể của người cho thấy thời gian bán rã lâu nhất, tiếp sau đó là kháng thể được làm giống như của người, kháng thể dạng khảm, và kháng thể không phải của người. Liều lượng và tần suất sử dụng có thể thay đổi phụ thuộc vào việc điều

trị này là điều trị phòng bệnh hay điều trị chữa bệnh. Trong ứng dụng để phòng bệnh, liều lượng tương đối thấp được dùng trong khoảng thời gian tương đối không thường xuyên trong một khoảng thời gian dài. Một số bệnh nhân tiếp tục nhận sự điều trị đến cuối đời. Trong ứng dụng điều trị bệnh, liều lượng tương đối cao trong khoảng thời gian tương đối ngắn đôi khi được yêu cầu cho tới khi sự tiến triển của bệnh chậm lại hoặc kết thúc hoặc cho tới khi bệnh nhân cho thấy sự giảm một phần hoặc toàn bộ triệu chứng bệnh. Sau đó, bệnh nhân này có thể được sử dụng chế độ phòng bệnh.

Mức độ liều lượng thực tế của thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế có thể được thay đổi để có được lượng thành phần hoạt tính có hiệu quả để thu được phản hồi mong muốn cho bệnh nhân cụ thể, chế phẩm, và chế độ sử dụng, không gây độc cho bệnh nhân. Mức độ liều lượng được chọn sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố được động học bao gồm hoạt tính của chế phẩm cụ thể theo sáng chế được dùng, este, muối hoặc amit của nó, đường dùng, thời gian sử dụng, tốc độ bài tiết hợp chất cụ thể được sử dụng, thời gian của đợt điều trị, thuốc, hợp chất và/ hoặc nguyên liệu khác được sử dụng trong sự kết hợp chế phẩm cụ thể được dùng, tuổi, giới tính, trọng lượng, tình trạng, sức khỏe tổng thể và bệnh sử trước đây của bệnh nhân được điều trị, và các nhân tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y học.

"Liều lượng có tác dụng điều trị bệnh" của kháng thể hoặc protein kháng-IL-17A theo sáng chế có thể dẫn đến sự giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng bệnh, tăng tần số và thời lượng của các thời kỳ không có triệu chứng bệnh, hoặc ngăn ngừa sự suy giảm hoặc mất khả năng do tác hại của bệnh.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng bằng một hoặc nhiều con đường sử dụng bằng cách sử dụng một hoặc nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Như sẽ được kỳ vọng bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này, con đường và/ hoặc chế độ sử dụng sẽ thay đổi phụ thuộc vào kết quả mong muốn. Con đường sử dụng kháng thể theo sáng chế bao gồm các con đường sử dụng trong tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong khoang bụng, dưới da, trong tủy hoặc các con đường ngoài đường tiêu hóa khác, ví dụ, tiêm hoặc truyền. Cụm từ "sử dụng ngoài đường tiêu hóa" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chế độ sử dụng ngoài chế độ dùng theo đường ruột và dùng trên bề mặt, thường là bằng cách tiêm, và bao gồm, không có giới hạn, tiêm và truyền trong

tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong tủy sống, trong bao màng cứng, trong ổ mắt, trong tim, trong da, trong bụng, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới vỏ, dưới màng nhện, trong xương sống, ngoài màng cứng và trong óc.

Ngoài ra, kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể được dùng qua đường không phải đường ngoài tiêu hóa, như sử dụng qua đường trên bề mặt, biểu bì hoặc niêm mạc, ví dụ, qua đường mũi, qua đường tiêu hóa, qua âm đạo, qua trực tràng, qua lưỡi hoặc trên bề mặt.

Kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể được điều chế với các chất mang mà sẽ bảo vệ kháng thể khỏi sự giải phóng nhanh, như chế phẩm được kiểm soát giải phóng, bao gồm thiết bị cấy, miếng cao dán qua da, và hệ thống vận chuyển được bao nang siêu nhỏ. Polyme có thể bị phân hủy sinh học, tương thích sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Có nhiều phương pháp để sản xuất các chế phẩm này đã được cấp bằng sáng chế hoặc thường là đã được biết với người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Dược phẩm có thể được dùng với dụng cụ y tế đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng với dụng cụ tiêm dưới da không có mũi tiêm, như dụng cụ được thể hiện trong bằng sáng chế số 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 hoặc 4.596.556. Ví dụ về thiết bị cấy và môđun đã được biết rõ hữu dụng theo sáng chế bao gồm: bằng sáng chế Mỹ số 4.487.603, bơm vi truyền có thể cấy để phân tán dược phẩm ở tốc độ được kiểm soát; bằng sáng chế Mỹ số 4.486.194, bơm vi truyền để sử dụng thuốc qua da; bằng sáng chế Mỹ số 4.447.233, bơm vi truyền thuốc để vận chuyển thuốc ở tốc độ truyền chính xác; bằng sáng chế Mỹ số 4.447.224, bơm vi truyền có thể cấy có dòng chảy có thể biến đổi để vận chuyển thuốc liên tục; bằng sáng chế Mỹ số 4.439.196, bơm vi truyền hệ thống vận chuyển thuốc bằng cách thẩm thấu có các khoang đa ngăn; và bằng sáng chế Mỹ số 4.475.196, bơm vi truyền hệ thống vận chuyển thuốc bằng cách thẩm thấu. Nhiều thiết bị cấy, hệ thống vận chuyển, và môđun khác được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể được bào chế thành chế phẩm để đảm bảo sự phân bố chính xác in vivo. Ví dụ, hàng rào máu não (BBB) ngăn chặn nhiều hợp chất rất ưa nước. Để đảm bảo rằng các hợp chất có tác dụng điều trị bệnh theo sáng chế vượt qua được BBB (nếu được mong muốn), chúng có thể được bào chế thành chế phẩm, ví dụ, trong các hạt mỡ. Đối với phương pháp sản xuất hạt mỡ, xem, ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 4.522.811; 5.374.548; và 5.399.331. Các hạt mỡ này có thể chứa một hoặc nhiều gốc được vận chuyển có chọn lọc vào tế bào hoặc cơ quan cụ thể, do đó tăng cường sự vận chuyển thuốc được định hướng (xem, ví dụ, V.V. Ranade 1989, *J. Cline Pharmacol.* 29:685). Ví dụ cho các gốc định hướng bao gồm folat hoặc biotin (see, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 5,416,016 của Low et al.); các manosit (Umezawa et al. 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); kháng thể (P.G. Bloeman et al. 1995, *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. 1995, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); thụ thể protein A có hoạt tính bề mặt (Briscoe et al. 1995, *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. 1994, *J. Biol. Chem.* 269:9090); còn xem trong tài liệu của Keinanen và Laukkanen 1994, *FEBS Lett.* 346:123; Killion và Fidler 1994, *Immunomethods* 4:273.

Việc sử dụng và phương pháp theo sáng chế

Kháng thể hoặc protein theo sáng chế có các ứng dụng chẩn đoán và điều trị bệnh in vitro và in vivo. Ví dụ, các phân tử này có thể được dùng với các tế bào trong nuôi cấy, ví dụ, in vitro hoặc in vivo, hoặc với đối tượng, ví dụ, in vivo, để điều trị, phòng ngừa hoặc chẩn đoán nhiều rối loạn khác nhau.

Các phương pháp này cụ thể là thích hợp để điều trị, phòng ngừa hoặc chẩn đoán các rối loạn liên quan đến IL-17A và/ hoặc các rối loạn tự miễn và rối loạn gây viêm, ví dụ, chứng viêm khớp dạng thấp, hoặc bệnh vẩy nến.

Đặc biệt là, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị các rối loạn liên quan đến IL-17A và/hoặc các rối loạn tự miễn và rối loạn gây viêm. Theo phương án nhất định, phương pháp bao gồm bước sử dụng kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, cho đối tượng cần được điều trị bệnh.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm giảm hoặc ức chế đáp ứng truyền tín hiệu được cảm ứng bởi IL-17A hoặc IL-17AF trong tế bào hoặc mô đích bằng cách kết nối tế bào với dược phẩm chứa lượng có tác dụng điều trị bệnh của kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm giảm nồng độ IL6, CXCL1, IL-8, GM-CSF và/ hoặc CCL2 trong tế bào bao gồm bước kết nối tế bào với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, như phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế.

Trong bản mô tả, cụm từ "bệnh trung gian bởi IL-17A/AF" hoặc "rối loạn liên quan đến IL-17A/AF" bao gồm tất cả bệnh và tình trạng sức khỏe trong đó IL-17A hoặc IL-17AF gây ra, có thể là trực tiếp hoặc không trực tiếp, trong bệnh hoặc tình trạng sức khỏe, bao gồm nguyên nhân kết quả, tiến triển, quá trình, kéo dài hoặc bệnh lý của bệnh hoặc tình trạng. Theo đó các thuật ngữ này bao gồm tình trạng liên quan đến hoặc được xác định đặc điểm bởi nồng độ IL-17A/AF khác thường và/ hoặc bệnh hoặc tình trạng có thể được điều trị bằng cách giảm hoặc ức chế các hoạt tính gây ra bởi IL-17A/AF trong tế bào hoặc mô đích, ví dụ, sự sản xuất IL-6 hoặc GRO-alpha. Các bệnh và tình trạng này bao gồm tình trạng viêm và bệnh tự miễn, như chứng viêm khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp, hoặc bệnh vẩy nến. Các bệnh và tình trạng này cũng bao gồm bệnh dị ứng và tình trạng dị ứng, phản ứng quá mẫn, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh xơ nang và đào thải cơ quan hoặc mô ghép.

Ví dụ, kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể được sử dụng cho việc điều trị tiếp nhận tim, phổi, tim phổi kết hợp, gan, thận, tụy, ghép da hoặc giác mạc, bao gồm đào thải đồng ghép hoặc đào thải dị ghép, và để phòng ngừa bệnh vật chủ chống lại cơ quan ghép, như ghép tủy xương, và ghép cơ quan kết hợp chứng xơ cứng động mạch.

Kháng thể hoặc protein theo sáng chế, không chỉ giới hạn ở, là hữu dụng để điều trị, phòng ngừa, hoặc cải thiện tình trạng tự miễn, cụ thể là tình trạng viêm từ nguyên nhân bao gồm thành phần tự miễn như chứng viêm khớp (ví dụ, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp mạn tính và các biến thể của chứng viêm khớp) và bệnh thấp khớp, bao gồm tình trạng viêm và bệnh thấp khớp bao gồm bệnh loãng xương, chứng đau do viêm, bệnh đốt sống bao gồm bệnh viêm cột sống cứng khớp, hội chứng Reiter, chứng viêm khớp phản ứng, chứng viêm khớp vẩy nến, chứng viêm khớp thiếu niên tự phát

và chứng viêm đường ruột, viêm điểm bám gân, bệnh quá mẫn (bao gồm cả quá mẫn đường hô hấp và quá mẫn trên da) và dị ứng. Các bệnh tự miễn cụ thể mà kháng thể theo sáng chế có thể được dùng bao gồm rối loạn huyết học tự miễn (bao gồm, ví dụ, bệnh thiếu máu do tan máu, thiếu máu bất sản, bệnh thiếu máu hồng cầu và bệnh tán huyết vô căn), luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm thận do luput, bệnh viêm cơ (viêm da cơ), chứng viêm nha chu, viêm đa sụn, bệnh xơ cứng bì, bệnh u hạt Wegener, viêm da cơ, bệnh viêm gan mãn tính hoạt động, bệnh nhược cơ, bệnh vẩy nến, hội chứng Steven-Johnson, bệnh tiêu chảy không rõ nguyên nhân, bệnh viêm ruột tự miễn (bao gồm, ví dụ, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Crohn và bệnh đại tràng co thắt), bệnh mắt nội tiết, bệnh Grave, bệnh sản sinh sarcoit, bệnh đa xơ cứng, đa xơ cứng hệ thống, bệnh xơ hóa, bệnh xơ ống mật nguyên phát, bệnh đái tháo đường ở người trẻ (đái tháo đường loại I), chứng viêm màng mạch nhỏ, chứng viêm giác kết mạc khô và viêm giác kết mạc mùa xuân, chứng xơ hóa rãnh phổi, chứng loãng xương vùng quanh khớp, viêm cầu thận (có hoặc không có hội chứng thận hư, ví dụ, bao gồm hội chứng thận hư tự phát hoặc bệnh thận thương tổn tối thiểu), bệnh đa u tủy xương các loại khác của khối u, bệnh viêm da và giác mạc, cơ, chứng lỏng lẻo các xương cấy ghép, rối loạn trao đổi chất, (như béo phì, xơ vữa động mạch và các bệnh tim mạch bao gồm giãn cơ tim, viêm cơ tim, đái tháo đường loại II, và rối loạn mỡ máu), và bệnh viêm tuyến giáp tự miễn (bao gồm viêm tuyến giáp Hashimoto), bệnh viêm mạch của bó mạch cỡ trung và cỡ nhỏ, viêm mạch các cỡ mạch lớn bao gồm viêm động mạch tế bào khổng lồ, mưng mủ do viêm tuyến mô hôi, viêm tủy-thị thần kinh, hội chứng Sjögren, bệnh Behcet, viêm da do dị ứng và tiếp xúc, viêm tiểu phế quản, bệnh viêm cơ, bệnh thần kinh ngoại biên tự miễn, bệnh, viêm và atherothrombosis thận, gan và tuyến giáp do miễn dịch, hội chứng sốt cho tự miễn, rối loạn miễn dịch huyết học, và bệnh bong nước trên da và màng nhầy. Về mặt giải phẫu, viêm màng mạch nhỏ có thể là viêm màng mạch nhỏ trước, giữa, sau hoặc toàn bộ. Có thể mạn tính hoặc cấp tính. Bệnh căn học của viêm màng mạch nhỏ có thể là tự miễn hoặc không nhiễm khuẩn, nhiễm khuẩn, kết hợp với các bệnh hệ thống, hoặc hội chứng đốm trắng.

Kháng thể hoặc protein theo sáng chế cũng có thể hữu dụng để điều trị, ngăn ngừa, hoặc cải thiện bệnh hen, viêm phế quản, viêm tiểu phế quản, viêm phổi mô kẽ tự phát, bệnh đen phổi, bệnh tràn khí phổi, và các bệnh phổi khác do tắc hoặc viêm đường hô hấp.

Kháng thể hoặc protein theo sáng chế cũng có thể hữu dụng để điều trị các bệnh về chuyển hóa xương bao gồm bệnh viêm xương khớp loãng xương, chứng loãng xương và các dạng viêm khớp khác, và chứng mất xương thông thường, bao gồm chứng mất xương do tuổi tác, và cụ thể là bệnh nha chu.

Hơn nữa, kháng thể hoặc protein theo sáng chế cũng có thể hữu dụng để điều trị bệnh nấm Candida mạn tính hoặc các bệnh do nấm mạn tính khác, cũng như các biến chứng do nhiễm ký sinh, và các biến chứng của việc hút thuốc được xem xét là những trường hợp tiềm năng để điều trị bệnh, cũng như nhiễm virus và các biến chứng do nhiễm virus.

Sự ức chế của IL-17 và các thụ thể của nó nằm trong số các chế độ tác động (MOA) mới có triển vọng nhất cho việc điều trị bệnh viêm mạn tính, với bệnh vẩy nến là sự biểu thị cao nhất trong số các bệnh hiện đang được nghiên cứu sự phát triển của thuốc điều biến IL-17 (Miossec P và Kolls JK. 2012, Nat Rev Drug Discov.10:763-76). Nhiều nghiên cứu minh chứng rõ ràng rằng việc ngăn chặn IL-17A ở bệnh nhân mắc bệnh vẩy nến có thể mang ở mức độ trung bình đến nghiêm trọng là an toàn trong thời gian ngắn và cảm ứng các cải thiện đáng chú ý (ví dụ, Hueber W, Patel DD, Dryja T, et al 2010, Sci Transl Med. ;2:52ra72). Các phát hiện này vượt quá sự mong đợi và đã xác nhận các giả thuyết cho rằng IL-17A là phân tử truyền tín hiệu chính trong sự phát sinh bệnh vẩy nến (Garber K. 2012, Nat Biotechnology 30:475–477).

Ngoài ra, trong một số mô hình động vật bao gồm mô hình bệnh đa xơ cứng (multiple sclerosis-MS) phổ biến nhất chứng viêm não tủy tự miễn thực nghiệm, IL-17 là nguyên nhân chính trong quá trình gây viêm (Bettelli E, et al 2008, Nature; 453:1051-57, Wang HH, et al 2011, J Clin Neurosci; 18(10):1313-7, Matsushita T, et al 2013, PLoS One; 8(4):e64835). Tác động của IL-17 là yếu tố tiền gây viêm chính, và hiệp đồng với các cytokin khác. Tác động của IL-17 như sự cảm ứng sản xuất chemokine bởi tế bào biểu mô, sự điều hòa tăng in-tơ-lơ-kin (IL)-1b, yếu tố hoại tử khối u alpha (TNFα) và metalloproteinase của chất nền (MMP)-9 trong đại thực bào, và sự cảm ứng tiết IL 6, IL-8 và prostaglandin E2, phù hợp với nhiều khía cạnh của bệnh lý MS. Đây cũng là dữ liệu chống lại vai trò then chốt của IL-17 trong gây viêm thần kinh, bao

gồm các mô hình biểu hiện quá mức gen chuyển ở chuột nhắt (Haak S et al 2009, JCI; 119:61-69).

Bệnh hen là bệnh viêm dị thể của đường hô hấp mà được chứng minh lâm sàng qua các dấu hiệu tắc nghẽn hô hấp mà có độ nghiêm trọng biến đổi có thể là tự phát hoặc trong đáp ứng với sự điều trị. Trong khi bệnh hen được coi như là được điều khiển bởi tế bào trợ giúp T loại 2 (Th2) và các sản phẩm của chúng, dữ liệu gần đây gợi ý rằng tín hiệu gen Th2 cao có mặt ở đường hô hấp chỉ trong ~50% đối tượng mắc bệnh hen (Woodruff PG et al 2009, Am J Respir Crit Care Med 180:388–95). Chúng viêm bạch cầu trung tính chiếm ưu thế trong hen cấp tính nặng; một số cá thể mắc bệnh hen có lượng bạch cầu trung tính trong đờm cao và đáp ứng lâm sàng yếu với các steroid hít vào; và lượng bạch cầu trung tính trong đờm cao trong các cá nhân mắc bệnh hen nhận lượng lớn steroid qua đường hít hoặc qua đường miệng (Wenzel 2012, Nature Med 18:716-25).

Mức độ tăng của IL-17A có liên quan đến mức độ nghiêm trọng của bệnh hen được báo cáo trong hệ tuần hoàn và đường hô hấp của cá thể mắc bệnh hen khi so sánh với các cá thể đối chứng khỏe mạnh. Các nghiên cứu cận lâm sàng trên mô hình chuột viêm phổi dị ứng đã chỉ ra sự đòi hỏi IL-17A và thụ thể của nó (IL-17RA) trong chứng viêm đường hô hấp bạch cầu trung tính và sự đáp ứng quá mức của đường hô hấp chống chịu steroid. Do đó, các đặc tính của IL-17A in vitro, sự có mặt của nó trong lượng được tăng trong bệnh hen, và mô hình cận lâm sàng của bệnh hỗ trợ vai trò cho IL-17A trong bạch cầu trung tính và/ hoặc các dạng Th2 thấp của bệnh này mà đáp ứng yếu với steroid (Cosmi L et al 2009, Am J Respir Crit Care Med 180:388–95).

Do đó, danh sách tình trạng sau chứa các đích được ưu tiên cụ thể để điều trị bằng kháng thể hoặc phân gán kết kháng nguyên của nó theo sáng chế: Bệnh đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, bệnh hen, bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE), và bệnh viêm thận do luput.

Kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể được dùng làm thành phần hoạt tính duy nhất hoặc trong sự kết hợp với, ví dụ, như là tá dược hoặc trong sự kết hợp với, các thuốc khác, ví dụ, chất ức chế miễn dịch hoặc chất điều biến miễn dịch hoặc chất chống viêm khác hoặc chất gây độc tế bào hoặc chống ung thư khác, ví dụ, để điều trị

hoặc ngăn ngừa các bệnh được đề cập ở trên. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với DMARD, ví dụ, muối Gold, sulphasalazin, antimalarias, methotrexat, D-penicillamin, azathioprin, axit mycophenolic, tacrolimus, sirolimus, minoxycilin, leflunomide, glucocorticoid; chất ức chế calcineurin, ví dụ, cyclosporin A hoặc FK 506; tác nhân điều biến tái tuần hoàn tế bào lympho, ví dụ, chất tương tự FTY720 và FTY720; chất ức chế mTOR, ví dụ, rapamycin, 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin, CCI779, ABT578, AP23573 hoặc TAF-93; ascomycin có đặc tính ức chế miễn dịch, ví dụ, ABT-281, ASM981, v.v.; corticosteroid; cyclophosphamid; azathioprin; leflunomide; mizoribin; mycophenolate mofetil; 15-deoxyspergualin hoặc chất đồng đẳng, chất tương tự hoặc chất dẫn xuất của nó có tác dụng ức chế miễn dịch; kháng thể đơn dòng có hoạt tính ức chế miễn dịch, ví dụ, kháng thể đơn dòng kháng các thụ thể của bạch cầu, ví dụ, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 hoặc phối tử của chúng; các hợp chất điều biến miễn dịch khác, ví dụ, phân tử gắn kết tái tổ hợp có ít nhất là một phần miễn ngoại bào của CTLA4 hoặc dạng đột biến của nó, ví dụ, có ít nhất một phần ngoại bào của CTLA4 hoặc dạng đột biến của nó được gắn với trình tự protein không phải của CTLA4, ví dụ, CTLA4Ig (ví dụ, ATCC 68629 được chỉ định) hoặc dạng đột biến của nó, ví dụ, LEA29Y; chất ức chế phân tử bám dính, ví dụ, chất đối kháng LFA-1, chất đối kháng ICAM-1 hoặc -3, chất đối kháng VCAM-1 hoặc chất đối kháng VLA-4; hoặc chất hóa trị liệu, ví dụ, paclitaxel, gemcitabin, cisplatin, doxorubicin hoặc 5-fluorouracil; chất kháng TNF, ví dụ, kháng thể đơn dòng kháng TNF, ví dụ, infliximab, adalimumab, CDP870, hoặc các cấu trúc thụ thể kháng TNF-RI hoặc TNF-RII, ví dụ, Etanercept, PEG-TNF-RI; chất ngăn chặn cytokin tiền viêm, chất ngăn chặn IL1, ví dụ, Anakinra hoặc bất kỳ IL1, canakinumab, chất ngăn chặn IL13, chất ngăn chặn IL4, chất ngăn chặn IL6, chất ngăn chặn IL17 (như secukinumab, brodalumab, ixekizumab); chất ngăn chặn các chemokin, ví dụ, chất ức chế hoặc chất hoạt hóa proteaza, ví dụ, metalloprotease, kháng thể kháng-IL15, kháng thể kháng-IL6, kháng thể kháng-IL4, kháng thể kháng-IL13, kháng thể kháng-CD20, NSAID, như aspirin hoặc chất chống lây nhiễm (danh sách không bị giới hạn bởi chất đã được đề cập).

Để phù hợp với các vấn đề nói trên sáng chế đề xuất một khía cạnh khác nữa:

Phương pháp như được xác định ở trên bao gồm sự kết hợp sử dụng, ví dụ, đồng thời hoặc theo trình tự, lượng hiệu quả có tác dụng trị bệnh của kháng thể kháng-IL-17A hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong đây, và ít nhất một dược chất thứ hai, dược chất thứ hai này là thuốc ức chế miễn dịch/điều biến miễn dịch, thuốc hóa trị liệu chống viêm hoặc chống xâm nhiễm, ví dụ, như được trình bày ở trên.

Hoặc, sản phẩm tổ hợp có tác dụng trị bệnh, ví dụ, bộ kit, chứa lượng hiệu quả có tác dụng trị bệnh của a) kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong đây, và b) ít nhất một dược chất thứ hai được chọn từ thuốc ức chế miễn dịch/điều biến miễn dịch, thuốc hóa trị liệu chống viêm hoặc chống nhiễm, ví dụ như được trình bày ở trên. Bộ kit này có thể có các hướng dẫn cho việc sử dụng nó.

Nếu kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong đây được dùng kết hợp với liệu pháp ức chế miễn dịch/điều biến miễn dịch, liệu pháp hóa trị liệu chống viêm hoặc chống xâm nhiễm, liều lượng của hợp chất tổ hợp được kết hợp sử dụng phụ thuộc vào loại thuốc kết hợp được dùng, ví dụ, nếu là DMARD, chất kháng-TNF, chất ngăn chặn IL1 hoặc các chất khác, dựa vào thuốc cụ thể được sử dụng, dựa vào tình trạng điều trị v.v.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng để phát hiện nồng độ của IL-17A, hoặc lượng tế bào chứa IL-17A. Điều này có thể có được, ví dụ, bằng cách cho mẫu kiểm tra (như mẫu thử nghiệm in vitro) và mẫu đối chứng tiếp xúc với kháng thể kháng-IL-17A (hoặc protein) trong điều kiện cho phép tạo thành phức giữa kháng thể và IL-17A. Phức bất kỳ được tạo thành giữa kháng thể (hoặc protein) và IL-17A được phát hiện và so sánh trong mẫu thử nghiệm và mẫu đối chứng. Ví dụ, phương pháp phát hiện tiêu chuẩn, được biết rõ trong lĩnh vực này, như kỹ thuật ELISA và thử nghiệm tế bào chảy, có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của IL-17A (ví dụ, kháng nguyên IL-17A của người) trong mẫu kiểm tra, hoặc đo lượng tế bào chứa IL-17A, hoặc đo lượng IL-17A, bao gồm bước cho tiếp xúc mẫu kiểm tra này, và mẫu đối chứng, với kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn

kết đặc hiệu với IL-17A, trong điều kiện cho phép sự tạo thành của phức hệ giữ kháng thể hoặc phần của nó và IL-17A. Chế phẩm của phức hệ sau đó được tìm ra, trong đó điểm khác biệt trong phức hệ giữa mẫu vật và mẫu vật kiểm soát là minh chứng cho sự có mặt của IL-17A trong mẫu vật.

Cũng trong phạm vi của sáng chế là các kit bao gồm được phẩm (ví dụ, kháng thể, protein, kháng thể của người và phân tử hai đặc hiệu) theo sáng chế và hướng dẫn sử dụng. Kit này có thể chứa nhiều hơn ít nhất là một chất khác, hoặc một hoặc nhiều kháng thể hoặc protein khác theo sáng chế (ví dụ, kháng thể có hoạt tính bổ sung mà gắn kết với epitop trên kháng nguyên đích khác với vị trí gắn kết epitop của kháng thể ban đầu). Các kit thường chứa nhãn thể hiện việc sử dụng được dự định các thành phần của bộ kit. Thuật ngữ nhãn bao gồm vật liệu viết ra hoặc được ghi lại bất kỳ được cung cấp bên trên hoặc cùng với bộ kit, hoặc vật liệu khác kèm theo bộ kit này. Bộ kit này còn có thể chứa dụng cụ chẩn đoán nếu bệnh nhân thuộc nhóm sẽ đáp ứng với sự điều trị bằng kháng thể kháng-IL-17A, như được định nghĩa ở trên.

Sáng chế đã được mô tả toàn bộ và giờ được làm rõ tiếp nữa bằng phần Ví dụ thực hiện sáng chế và Yêu cầu bảo hộ sau, mà các phần có tính minh họa và không được dự định để giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

XAB1 là kháng thể đơn dòng IgG1/ κ của người. Kháng thể này được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Tóm lại là, sử dụng hệ thống Medarex. Miễn dịch hóa chuột bạch bằng IL-17A của người tái tổ hợp. Làm chết chuột bạch bằng cách cho hít CO₂ và thu các tế bào lá lách và dung hợp vào dòng tế bào ung thư tủy bằng cách sử dụng PEG 4000. Trại các tế bào đã dung hợp vào các giếng với một lớp các tế bào màng bụng để cung cấp dinh dưỡng. Lấy dịch nổi từ các tế bào được nuôi cấy và thử nghiệm cho IL-17A phản ứng với các mAb bằng thử nghiệm ELISA. Chọn các dòng dương tính với sự sản xuất mAb IL-17A và nhân các dòng này lên.

Xác định dòng tế bào lai chịu trách nhiệm cho sự tiết XAB1 để xác định đặc tính tiếp theo trên cơ sở của các đặc tính gắn kết kháng nguyên/kháng thể tiềm năng ban đầu

như là ái lực gắn kết với IL-17A, khả năng ngăn chặn IL-17A gắn kết với thụ thể của nó, và khả năng ngăn chặn IL-17A trung gian các tác động sinh học trong các thử nghiệm in vitro.

Trình tự axit amin của XAB1 là SEQ ID NO: 14 (chuỗi nặng) và SEQ ID NO: 15 (chuỗi nhẹ). XAB1 được chọn cho sự trưởng thành ái lực tiếp sau đó.

Bước đầu tiên về phía sự trưởng thành ái lực được hướng dẫn cấu trúc, cấu trúc tinh thể của Fab XAB1 ở trạng thái tự do cũng như Fv XAB1 tương ứng phức hợp với IL-17A của người đã được xác định như được mô tả dưới đây. Sự phân tích cấu trúc không gian ba chiều của phức của Fv XAB1 với IL-17A của người cho phép thực hiện quá trình trưởng thành ái lực hợp lý kèm theo, và là một sự biến đổi so với, quy trình ngẫu nhiên hóa nhiều hơn. Các chi tiết khác được cung cấp sau đây.

Ngoài ra, sử dụng tinh thể học tia X để mô tả đặc điểm của một số kháng thể biến thể đã được trưởng thành ái lực được tạo ra. Sự phân tích dữ liệu tinh thể từ các biến thể được trưởng thành ái lực này cho phép hiểu rõ hơn về đặc tính gắn kết của các kháng thể biến thể và một số tính chất không dự đoán được đã được khám phá sẽ được miêu tả tiếp sau đây.

Ví dụ 1. Cấu trúc tinh thể của FAB XAB1 ở trạng thái tự do

(i) Nguyên liệu và Phương pháp

Sử dụng các quy trình sinh học phân tử tiêu chuẩn để thu được mảnh kháng thể Fab XAB1. Tóm lại là, tách dòng và biểu hiện Fab với đuôi tag sáu gốc histidin ở đầu C của chuỗi nặng này trong E. coli W3110. Tinh sạch protein tái tổ hợp này bằng kỹ thuật sắc ký Ni-chelat, sau đó tinh sạch bằng kỹ thuật sắc ký loại trừ kích thước trên cột SPX-75 trong dung dịch TRIS nồng độ 10mM có độ pH là 7,4 chứa NaCl nồng độ 25mM. Sau đó, cô đặc Fab XAB1 bằng kỹ thuật siêu lọc đến đến nồng độ 10,4mg/ml và kết tinh hóa.

Sau đó, thực hiện tiếp các quy trình kết tinh hóa tiêu chuẩn. Tóm lại là, các tinh thể được phát triển ở nhiệt độ 19°C trong các đĩa SD2 96 giếng, bằng cách sử dụng

phương pháp khuếch tán hơi nước trong các giọt đặt tại chỗ. Trộn dung dịch protein gốc theo tỷ lệ 1:1 với dung dịch đệm cho phản ứng kết tinh chứa 40% PEG 300, natri phosphat-natri xitrat nồng độ 0,1M, độ pH là 4,2. Kích thước giọt tổng cộng là 0,4 μ l. Trước khi lấy dữ liệu tia X, một tinh thể đã được đặt vào trong thiết bị vòng-cryo nylon và làm lạnh nhanh trực tiếp cho vào trong nitơ lỏng.

Thực hiện lấy và xử lý dữ liệu tia X sử dụng các quy trình tiêu chuẩn. Tóm lại là, thu kết quả tia X ở độ phân giải là 2,1 $\text{\AA}$ bằng hệ thống Swiss Light Source, hệ thống phát chùm tia X10SA, hệ thống phát hiện CCD MAR225, sử dụng nguồn phát xạ tia X có bước sóng 1,0000 $\text{\AA}$. Tổng cộng là, 180 hình của mỗi dao động 1,0 $^\circ$ đã được ghi lại ở khoảng cách giữa tinh thể và máy phát hiện là 190mm và được xử lý bằng gói phần mềm HKL2000. Tinh thể thuộc về nhóm không gian C2 với các tham số của khối tinh thể là $a=51,63\text{\AA}$, $b=132,09\text{\AA}$, $c=77,25\text{\AA}$, $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 98,88^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$ và một phân tử Fab XAB1 trong đơn vị không đối xứng này. R-sym là 10,4% với độ phân giải là 2,1 $\text{\AA}$ và độ hoàn thiện dữ liệu là 99,0%.

Xác định cấu trúc này bằng sự thay thế phân tử bằng chương trình PHASER. Các mô hình tìm kiếm cho miền V_H/V_L và miền C_{HI}/C_L từ mục tra cứu PDB là 1 giờEZ. Việc xây dựng mô hình và tinh chỉnh liên tục được thực hiện bằng các chương trình Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) và CNX (Crystallography & nMR eXplorer) bản 2002, cho đến khi không còn sự cải tiến đáng kể nào khác có thể được tạo ra cho mô hình này. R cuối và R tự do cuối cho tất cả các dữ liệu lần lượt là 0,188 và 0,231. Mô hình được tinh chỉnh cuối cùng cho thấy giá trị căn bậc hai của sai số bình phương trung bình (root-mean-square deviation -RMSD) từ độ dài liên kết lý tưởng và góc liên kết lý tưởng lần lượt là 0,004Å và 0,9°.

(ii) Kết quả

Các kết quả của sự tinh chỉnh tia X Fab XAB1 được trình bày trong bảng 9 và cấu trúc không gian ba chiều của Fab XAB1 được trình bày trong Fig.1.

Bảng 9. Tinh chỉnh tia X Fab XAB1 bằng chương trình CNX

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 SỰ TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 CHƯƠNG TRÌNH: CNX 2002

CHÚ Ý 3 CÁC TÁC GIẢ: Brunger, Adams, Clore, Delano,

CHÚ Ý 3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,

CHÚ Ý 3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,

CHÚ Ý 3 Rice, Simonson, Warren

CHÚ Ý 3 và

CHÚ Ý 3 Accelrys Inc.,

CHÚ Ý 3 Yip, Dzakula).

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 DỮ LIỆU ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI CAO (ANGSTROM) : 2,10

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI THẤP (ANGSTROM) : 33,33

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU (SIGMA(F)) : 0,0

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU CAO (ABS(F)) : 19645630,62

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU THẤP (ABS(F)) : 0,000000

CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 98,2

CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ : 29298

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 KHỚP VỚI DỮ LIỆU ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP KIỂM CHỨNG CHÉO: THÔNG QUA

CHÚ Ý 3 SỰ CHỌN LỌC TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO:

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R NGẪU NHIÊN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,188

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO: 0,231

CHÚ Ý 3 KÍCH THƯỚC TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO (%) : 4,9

CHÚ Ý 3 ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 1436

CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 0,006

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 KHỚP TRONG ĐỘ PHÂN GIẢI BIN CAO NHẤT.

CHÚ Ý 3 TỔNG SỐ CÁC BIN ĐÃ SỬ DỤNG: 6

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN CAO (A) : 2,10

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN THẤP (A) : 2,23

CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN BIN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 94,7

CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ TRONG BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 4478
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,201
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN : 0.241
 CHÚ Ý 3 CỖ CỦA TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN (%) : 4,5
 CHÚ Ý 3 ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 213
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 0,016
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG PHẢI HYDRO ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ PROTEIN: 3311
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ AXIT NUCLEIC: 0
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG ĐỒNG NHẤT : 5
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ DUNG MÔI: 313
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC GIÁ TRỊ B.
 CHÚ Ý 3 TỪ ĐỒ THỊ WILSON (A**2) : 21,1
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ B TRUNG BÌNH (TOÀN BỘ, A**2) : 27,4
 CHÚ Ý 3 TOÀN BỘ GIÁ TRỊ B KHÔNG ĐẲNG HƯỚNG.
 CHÚ Ý 3 B11 (A**2) : -6,02
 CHÚ Ý 3 B22 (A**2) : 3,30
 CHÚ Ý 3 B33 (A**2) : 2,73
 CHÚ Ý 3 B12 (A**2) : 0,00
 CHÚ Ý 3 B13 (A**2) : 3,82
 CHÚ Ý 3 B23 (A**2) : 0,00
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH HÓA DUNG MÔI HỖN Độn.
 CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP ĐÃ SỬ DỤNG: MÔ HÌNH PHẪNG
 CHÚ Ý 3 KSOL : 0,399279
 CHÚ Ý 3 BSOL : 54,4727 (A**2)
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG.
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI (A) : 0,21
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ SIGMAA (A) : 0,12
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ NGUỖNG ĐỘ PHÂN GIẢI THẤP (A) : 5,00
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG ĐÁNH GIÁ CHÉO.
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI C-V (A) : 0,29
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ SIGMAA C-V (A) : 0,14
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 ĐỘ LỆCH RMS TỪ CÁC GIÁ TRỊ LÝ TƯỞNG.
 CHÚ Ý 3 ĐỘ DÀI LIÊN KẾT (A) : 0,004
 CHÚ Ý 3 GÓC LIÊN KẾT (ĐỘ) : 0,9
 CHÚ Ý 3 GÓC NHỊ DIỆN (ĐỘ) : 21,4
 CHÚ Ý 3 GÓC PHI CHÍNH (ĐỘ) : 0,58
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG : GIỚI HẠN
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC HỆ SỐ GIỚI HẠN NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG. RMS SIGMA

CHÚ Ý 3 LIÊN KẾT MẠCH CHÍNH (A**2) : 1,41 ; 1,50
 CHÚ Ý 3 GÓC MẠCH CHÍNH (A**2) : 2,21 ; 2,00
 CHÚ Ý 3 LIÊN KẾT MẠCH BÊN (A**2) : 2,31 ; 2,00
 CHÚ Ý 3 GÓC MẠCH BÊN (A**2) : 3,44 ; 2,50
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH NCS: KHÔNG CÓ
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC GIỚI HẠN NCS. RMS SIGMA/KHỐI LƯỢNG
 CHÚ Ý 3 NHÓM 1 VỀ VỊ TRÍ (A) : KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 NHÓM 1 HỆ SỐ B (A**2) : KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 TẬP THAM SỐ 1: protein_rep.param
 CHÚ Ý 3 TẬP THAM SỐ 2: water_rep.param
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 1 : protein_no_cter.top
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 2 : water.top
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC CHÚ Ý VỀ TINH CHỈNH KHÁC: KHÔNG
 LIÊN KẾTSS 1 CYS L 23 CYS L 88
 LIÊN KẾTSS 2 CYS L 134 CYS L 194
 LIÊN KẾTSS 3 CYS H 22 CYS H 96
 LIÊN KẾTSS 4 CYS H 143 CYS H 199
 CRYST1 51,627 132,089 77,247 90,00 98,88 90,00 C 1 2 1 8
 ORIGX1 1,000000 0,000000 0,000000 0,000000
 ORIGX2 0,000000 1,000000 0,000000 0,000000
 ORIGX3 0,000000 0,000000 1,000000 0,000000
 SCALE1 0,019370 0,000000 0,003027 0,000000
 SCALE2 0,000000 0,007571 0,000000 0,000000
 SCALE3 0,000000 0,000000 0,013103 0,000000

Fig.1 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của Fab XAB1 đã thu được trong Ví dụ 1. Fig.1A là hình biểu diễn dạng lấp đầy không gian. Fig.1B là hình biểu diễn dạng hoạt hóa. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fab XAB1 này xuất hiện tương ứng trong màu xám đậm và xám nhạt.

Ví dụ 2. Cấu trúc tinh thể của phức Fv XAB1 với IL-17A của người: phân tích paratop (phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể) cho sự trưởng thành ái lực được hướng dẫn cấu trúc

(i) Nguyên liệu và Phương pháp

Sử dụng các quy trình sinh học phân tử tiêu chuẩn để thu mảnh kháng thể Fv XAB1. Tóm lại là, Fv với đuôi tag có sáu gốc histidin ở đầu C của chuỗi nặng và đuôi Strep-

tag ở đầu C của chuỗi nhẹ đã được tách dòng và biểu hiện trong E. coli W3110. Tinh sạch protein tái tổ hợp này bằng kỹ thuật sắc ký Ni-chelat.

Sau đó, điều chế phức của mảnh Fv XAB1 với IL-17A của người bằng cách sử dụng hệ thống phương pháp tiêu chuẩn. Tóm lại là, trộn IL-17A của người (1,1mg) với lượng dư của Fv (2,7mg) và cho phức này chạy trên sắc ký loại trừ kích thước S100, trong dung dịch đệm TRIS nồng độ 10mM, độ pH là 7,4, NaCl nồng độ 25mM. Sau đó, cô đặc protein thu được bằng kỹ thuật siêu lọc đến nồng độ 21,2mg/ml và kết tinh hóa.

Sau đó, thực hiện tiếp các quy trình kết tinh hóa tiêu chuẩn. Tóm lại là, các tinh thể được phát triển ở 19°C trong các đĩa SD2 96 giếng, bằng cách sử dụng phương pháp sự khuếch tán hơi nước trong các giọt đặt tại chỗ. Trộn dung dịch protein gốc theo tỷ lệ 1:1 với dung dịch đệm kết tinh chứa 10% PEG 20.000, dung dịch Bixin nồng độ 0,1M độ pH là 9,0, 2,0% (thể tích/thể tích) dioxan. Kích thước giọt tổng cộng là 0,4μl. Trước khi thu kết quả tia X, một tinh thể đã được chuyển nhanh vào hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 của dung dịch đệm kết tinh chứa 20% PEG 20.000, 30% glyxerol, và sau đó làm mát nhanh bằng nitơ lỏng.

Thực hiện thu và xử lý dữ liệu tia X bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn. Tóm lại là, Thu kết quả tia X với độ phân giải là 3,0Å ở hệ thống Swiss Light Source, hệ thống Chùm tia X10SA, với thiết bị phát hiện CCD MAR225, bằng cách sử dụng nguồn phát xạ tia X có bước sóng 1,0000Å. Tổng cộng là, 110 hình của mỗi dao động 1,0° đã được ghi lại ở khoảng cách giữa tinh thể và máy phát hiện là 300mm và được xử lý bằng gói phần mềm HKL2000. Tinh thể thuộc về nhóm không gian P₂₁2₁2 với các tham số của khối tinh thể là a=184,31Å, b=55,81Å, c=70,99Å, α = β = γ = 90°. R-sym là 11,2% với độ phân giải là 3,0Å và độ hoàn thiện dữ liệu là 99,9%.

Xác định cấu trúc này bằng sự thay thế phân tử bằng chương trình PHASER. Mô hình tìm kiếm Fv XAB1 được tạo ra từ cấu trúc tinh thể của Fab XAB1 được xác định trước đó (xem Ví dụ 1). Mô hình tìm kiếm IL-17A được tạo ra từ cấu trúc tinh thể IL-17F của người đã được công bố (mục tra cứu trên PDB 1jpy). Việc xây dựng mô hình và tinh chỉnh liên tục đã được thực hiện bằng Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) và CNX (Crystallography & nMR eXplorer) bản 2002, cho đến khi không còn

sự cải tiến đáng kể nào khác có thể được tạo ra cho mô hình này. R cuối và R tự do cuối cho toàn bộ dữ liệu lần lượt là 0,215 và 0,269. Mô hình tinh chỉnh cuối cùng cho thấy căn bậc hai của sai số bình phương trung bình (RMSD) từ độ dài liên kết lý tưởng và góc liên kết lý tưởng lần lượt là 0,007Å and 1,0°.

(ii) Kết quả

Các phép tính thay thế phân tử cho kết quả là phức dime gồm một IL-17A homodime với hai mảnh Fv XAB1 đã gắn kết. Kết quả của sự tinh chỉnh tia X phức của Fv XAB1 với IL-17A của người được trình bày trong bảng 10 và cấu trúc không gian ba chiều của phức này được biểu diễn trong Fig. 2. Mỗi Fv XAB hình thành các tương tác với cả hai tiểu phần IL-17A, nhưng đại đa số là các tương tác nội phân tử (khoảng 96% bề mặt được che phủ) được cung cấp bởi chỉ một IL-17A.

Bảng 10. Tinh chỉnh tia X phức Fv XAB1 với IL-17A thu được bằng chương trình CNX.

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 SỰ TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 CHƯƠNG TRÌNH : CNX 2002

CHÚ Ý 3 TÁC GIẢ : Brunger, Adams, Clore, Delano,

CHÚ Ý 3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,

CHÚ Ý 3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,

CHÚ Ý 3 Rice, Simonson, Warren

CHÚ Ý 3 và

CHÚ Ý 3 Accelrys Inc.,

CHÚ Ý 3 (Badger, Berard, Kumar, Szalma,

CHÚ Ý 3 Yip, Dzakula).

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 DỮ LIỆU ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI CAO (ANGSTROM) : 3,01

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI THẤP (ANGSTROM) : 47,74

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU (SIGMA(F)) : 0,0

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU CAO (ABS(F)) : 15276175,80

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU THẤP (ABS(F)) : 0,000000

CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 99,5

CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ : 15190

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 KHỚP VỚI DỮ LIỆU ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP KIỂM CHỨNG CHÉO: THÔNG QUA

CHÚ Ý 3 SỰ CHỌN LỌC TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO:

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R NGẪU NHIÊN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,215

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO: 0,269

CHÚ Ý 3 CỖ TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO (%): 4,9
 CHÚ Ý 3 ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 748
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 0,010
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 KHỚP TRONG ĐỘ PHÂN GIẢI BIN CAO NHẤT.
 CHÚ Ý 3 TỔNG SỐ BIN ĐÃ SỬ DỤNG : 6
 CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN CAO (A) : 3,00
 CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN THẤP (A) : 3,19
 CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN BIN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 94,6
 CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ TRONG BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 2234
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,301
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN : 0,350
 CHÚ Ý 3 CỖ CỦA TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN (%): 5.3
 CHÚ Ý 3 ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 124
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 0,031
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG PHẢI HYDRO ĐÃ SỬ DỤNG TRONG
 TINH CHỈNH.
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ PROTEIN: 5007
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ AXIT NUCLEIC: 0
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG ĐỒNG NHẤT : 0
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ DUNG MÔI: 33
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC GIÁ TRỊ B.
 CHÚ Ý 3 TỪ ĐỒ THỊ WILSON (A**2) : 54,9
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ B TRUNG BÌNH (TOÀN BỘ, A**2) : 44,8
 CHÚ Ý 3 TOÀN BỘ GIÁ TRỊ B KHÔNG ĐẲNG HƯỚNG.
 CHÚ Ý 3 B11 (A**2) : 5,66
 CHÚ Ý 3 B22 (A**2) : 0,97
 CHÚ Ý 3 B33 (A**2) : -6,63
 CHÚ Ý 3 B12 (A**2) : 0,00
 CHÚ Ý 3 B13 (A**2) : 0,00
 CHÚ Ý 3 B23 (A**2) : 0,00
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH HÓA DUNG MÔI HỖN ĐỘN.
 CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP ĐÃ SỬ DỤNG: MÔ HÌNH PHẪNG
 CHÚ Ý 3 KSOL : 0,313124
 CHÚ Ý 3 BSOL : 20,608 (A**2)
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG.
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI (A) : 0,33
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ SIGMAA (A) : 0,39
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ CHẶN TÁI HÒA TAN THẤP (A) : 5,00
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG ĐÁNH GIÁ CHÉO.
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI C-V(A) : 0,44
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ SIGMAA C-V (A) : 0,51
 CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 ĐỘ LỆCH RMS TỪ CÁC GIÁ TRỊ LÝ TƯỞNG.
 CHÚ Ý 3 ĐỘ DÀI LIÊN KẾT (Å) : 0,007
 CHÚ Ý 3 GÓC LIÊN KẾT (ĐỘ) : 1,0
 CHÚ Ý 3 GÓC NHỊ DIỆN (ĐỘ) : 22,1
 CHÚ Ý 3 GÓC PHI CHÍNH (ĐỘ) : 0,78
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG : ĐÃ GIỚI HẠN
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 HỆ SỐ GIỚI HẠN NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG. RMS SIGMA
 CHÚ Ý 3 LIÊN KẾT MẠCH CHÍNH (A**2) : 1,46 ; 1,50
 CHÚ Ý 3 GÓC MẠCH CHÍNH (A**2) : 2,62 ; 2,00
 CHÚ Ý 3 LIÊN KẾT MẠCH BÊN (A**2) : 1,63 ; 2,00
 CHÚ Ý 3 GÓC MẠCH BÊN (A**2) : 2,62 ; 2,50
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH NCS: KHÔNG CÓ
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC GIỚI HẠN NCS. RMS SIGMA/KHỐI LƯỢNG
 CHÚ Ý 3 NHÓM 1 VỀ VỊ TRÍ (Å) : KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 NHÓM 1 HỆ SỐ B (A**2) : KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 TẬP THAM SỐ 1: protein_rep.param
 CHÚ Ý 3 TẬP THAM SỐ 2: water_rep.param
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 1 : protein_no_cter.top
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 2 : water.top
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC CHÚ Ý VỀ TINH CHỈNH KHÁC: KHÔNG
 LIÊN KẾTSS 1 CYS L 23 CYS L 88
 LIÊN KẾTSS 2 CYS H 22 CYS H 96
 LIÊN KẾTSS 3 CYS A 23 CYS A 88
 LIÊN KẾTSS 4 CYS B 22 CYS B 96
 LIÊN KẾTSS 5 CYS C 94 CYS C 144
 LIÊN KẾTSS 6 CYS C 99 CYS C 146
 LIÊN KẾTSS 7 CYS D 94 CYS D 144
 LIÊN KẾTSS 8 CYS D 99 CYS D 146
 CRYST1 184,306 55,813 70,991 90,00 90,00 90,00 P 21 21 2 24
 ORIGX1 1,000000 0,000000 0,000000 0,00000
 ORIGX2 0,000000 1,000000 0,000000 0,00000
 ORIGX3 0,000000 0,000000 1,000000 0,00000
 SCALE1 0,005426 0,000000 0,000000 0,00000
 SCALE2 0,000000 0,017917 0,000000 0,00000
 SCALE3 0,000000 0,000000 0,014086 0,00000

Fig. 2 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức của Fv XAB1 với IL-17A của người, đã thu được trong Ví dụ 2. Fig. 2A biểu diễn hai mảnh Fv XAB1 ở dạng lắp đầy không gian; homodime IL-17A được biểu diễn ở dạng hoạt hóa. Fig. 2B biểu diễn hai mảnh Fv XAB1 ở dạng hoạt hóa; homodime IL-17A được biểu diễn ở dạng lắp

đầy không gian. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fv XAB được biểu diễn tương ứng bằng màu xám đậm và xám nhạt. Một chuỗi của homodime IL-17A được biểu diễn bằng màu xám nhạt, chuỗi còn lại được biểu diễn bằng màu xám đậm.

Thực hiện sự phân tích chi tiết phức nêu trên. Thực hiện kiểm tra trực quan cẩn thận cấu trúc tinh thể này bằng các chương trình Coot và Pymol, và tính toán lượng protein được che phủ bề mặt ở mặt phân cách kháng nguyên với kháng thể bằng chương trình AREAIMOL của chương trình CCP4 thích hợp. Xác định các tương tác nội phân tử bằng cách sử dụng khoảng cách ngưỡng giữa các nguyên tử kháng thể và kháng nguyên là 3,9Å. Tổng quan gắn kết có thể được tóm tắt như sau. Gắn kết của XAB1 là đối xứng; mỗi mảnh Fv gắn kết với epitop tương đương trên homodime IL-17A.

Sự gắn kết của mỗi mảnh Fv đã che phủ lên trung bình mỗi $1732\text{\AA}^2$ của bề mặt đã kết hợp, và bao gồm 30 gốc axit amin của kháng thể và 25 gốc axit amin của IL-17A. Sự đóng góp đến bề mặt được che phủ của chuỗi nhẹ XAB1 (khoảng $560\text{\AA}^2$) lớn hơn sự đóng góp đến bề mặt được che phủ của chuỗi nặng (khoảng $275\text{\AA}^2$). Ngoài ra, CDRH2 đã không tạo ra tiếp xúc trực tiếp bất kỳ với IL-17A và xuất hiện quá xa so với protein kháng nguyên để cung cấp các cơ hội cho sự trưởng thành ái lực. Sự góp phần của CDRH1 xuất hiện bị giới hạn với chỉ một axit amin chuỗi bên (Tyr32); CDR này cũng quá xa so với IL-17A để cung cấp các cơ hội cho sự trưởng thành ái lực qua những sự thay thế axit amin. CDRH3 XAB1 tạo ra nhiều tiếp xúc chặt chẽ với IL-17A. Tuy nhiên, sự kiểm tra cẩn thận cấu trúc đã nêu trong vùng này đã không khám phá cơ hội bất kỳ cho sự tăng cường tiếp nữa các tiếp xúc này bằng các đột biến điểm; do đó, CDRH3 được coi là không thích hợp làm vùng đích tác động cho sự tăng cường ái lực. Ngược lại, sự kiểm tra các CDR chuỗi nhẹ cho thấy nhiều cơ hội cho sự trưởng thành ái lực. Trong số ba CDR của chuỗi nhẹ, CDRL1 được xem là có tiềm năng nhất, và dựa trên quan sát này, các tác giả sáng chế đã dự đoán để ngẫu nhiên hóa các vị trí 30 đến 32 của chuỗi nhẹ trong sự cố gắng để tăng cường các tiếp xúc với các gốc Arg124, Phe133 và Tyr85 của IL-17A.

Sự trưởng thành ái lực bằng thiết kế hợp lý

Dựa vào các kết quả nêu trên, có thể nhận thấy rằng bề mặt chung giữa XAB1 và homodime IL-17A là tương đối nhỏ và được xác định đặc điểm bằng sự đóng góp chủ

yếu từ chuỗi nhẹ của XAB1, không có sự liên quan đến CDRH2, và sự đóng góp gián tiếp là chủ yếu của CDRH1 (tức là qua sự ổn định của CDRH3). Theo đó, chuỗi nặng của XAB1 đã không xuất hiện để tạo ra các cơ hội tiềm năng cho sự trưởng thành ái lực.

Ngược lại, chuỗi nhẹ của XAB1 đã tạo ra các cơ hội ở các gốc axit amin 30 đến 32, với sự chèn vào tùy ý lên tới 4 gốc axit amin (CDRL1), các gốc axit amin 51 đến 53 và 56 (CDRL2) và các gốc axit amin 92 và 93, với sự chèn vào tùy ý lên tới 4 gốc axit amin.

Độ sẵn có của cấu trúc tinh thể đã được công bố cho homodime IL-17F của người, và cấu trúc của homodime IL-17F trong phức hợp với thụ thể IL-17RA của người cho phép các dự đoán được tạo ra dựa trên các cấu trúc quan sát được của IL-17A được tạo tinh thể và IL-17A trong phức hợp với XAB1 được tạo tinh thể (và các biến thể của chúng).

Các điểm tương tự về cấu trúc được dự đoán giữa IL-17F và IL-17A (trên cơ sở của độ giống và đồng nhất trình tự) đã được điều tra. IL-17F và IL-17A mang sự tương đồng về cấu trúc. Các tác giả sáng chế giả thiết rằng IL-17A sẽ gắn kết với miền đầu N của thụ thể của nó theo phương thức giống như đã được trình bày cho phức IL-17F/IL-17RA đã được công bố (Ely LK et al 2009, Nat Immunol. 10:1245-51).

Trên cơ sở của cấu trúc quan sát được và sự so sánh các trình tự đã biết với IL-17A của người và IL-17F của người, cùng với trình tự của IL-17A có nguồn gốc của các loài khác, nhiều dự đoán bổ sung đã được đưa ra bởi các tác giả sáng chế gồm:

Họ đã dự đoán rằng XAB1 (và các biến thể của các kháng thể có nguồn gốc từ các kháng thể này có ái lực được cải thiện với epitop được nhắm đích bởi XAB1) sẽ đặc hiệu cao với IL-17A của người. Họ đã giả thiết rằng các kháng thể này sẽ giữ lại một số khả năng phản ứng chéo với IL-17A của các loài khác (trên cơ sở mức độ cao của độ đồng nhất hoặc tính đồng dần của trình tự bảo toàn giữa các loài). Tuy nhiên, trên cơ sở của dữ liệu trình tự và các dự đoán về cấu trúc hiện có, không chắc chắn có thể được dự đoán về khả năng phản ứng chéo với các biến thể của IL-17A của các loài ở mức độ nào. Do thiếu sự tương tự về cấu trúc với các In-tơ-lơ-kin khác, khả năng phản

ứng chéo giữa các phân tử này (của người hoặc của các loài khác) đã được dự đoán là rất khó xảy ra.

Ngoài ra, các điểm khác nhau giữa trình tự của IL-17A và IL-17F (cụ thể là vùng đầu N) đã dẫn tới những dự đoán rằng các kháng thể kháng IL-17A sẽ không gắn kết với IL-17F. Ví dụ, các lớp che phủ của hai cấu trúc tinh thể đã chỉ ra rằng trở ngại lập thể sẽ ngăn cản sự gắn kết giữa các kháng thể này với IL-17F. Ngoài ra, phép ngoại suy với cấu trúc của các heterodime IL-17AF cũng đề xuất rằng sự cản trở này, cụ thể là với vùng đầu N, sẽ cản trở sự gắn kết của các heterodime IL-17AF và do đó dẫn đến mất gắn kết với IL-17AF, tức là mất khả năng phản ứng chéo của các kháng thể này với các heterodime IL-17AF.

Ví dụ 3. Sự tạo ra các biến thể của kháng thể được trưởng thành ái lực

Sự trưởng thành ái lực thực sự của kháng thể XAB1 gốc ban đầu được tập trung vào chuỗi nhẹ, bởi các lý do nêu trên. Nghiên cứu này được thực hiện theo ba bước: (i) tạo thư viện, (ii) sàng lọc thư viện, và (iii) xác định đặc điểm của các đại diện đã chọn.

Nghiên cứu thiết kế protein (tức là sự trưởng thành ái lực) được thực hiện ở định dạng mảnh Fab để dễ dàng thao tác. Các đại diện đã được định dạng ngược về IgG đầy đủ sau thiết kế.

(i) Tạo thư viện

Trình tự ADN mã hóa miền biến đổi của chuỗi nhẹ đã được gây đột biến để tạo ra thư viện các biến thể của gen. Hai phương án khác nhau (A và B) đã được sử dụng cho sự tạo thư viện, đưa ra hai thư viện khác nhau.

1) Phương pháp A – Gây đột biến ngẫu nhiên bằng kỹ thuật PCR ưu tiên sai:

Vùng ADN mã hóa miền biến đổi của chuỗi nhẹ của XAB1 đã được gây đột biến cách ngẫu nhiên bằng cách sử dụng PCR ưu tiên sai. Chi tiết hơn, vùng này được khuếch đại bằng cách sử dụng polymeraza Mutazym II, enzym này đưa vào các đột biến ở tần số cao (thông tin cụ thể hơn, xem trong bản hướng dẫn được cung cấp kèm theo kit tạo đột biến ngẫu nhiên GeneMorph II, được cung cấp bởi hãng Stratagene #200550). Tuy

nhiên, có thể sử dụng kỹ thuật hoặc chiến lược gây đột biến ngẫu nhiên thích hợp bất kỳ.

Sau đó, tách dòng tập hợp của các biến thể của mảnh PCR bằng cách cắt và chèn vào vector biểu hiện của XAB1. Về cơ bản là, trình tự gốc ban đầu, trình tự không bị đột biến đã được cắt khỏi vector biểu hiện này và được thay thế bằng trình tự được đột biến hóa cách ngẫu nhiên mà trình tự này được chèn vào chỗ của nó. Các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn đã được sử dụng để hoàn thành bước này.

Phương pháp này tạo ra thư viện các biến thể của vector biểu hiện chứa biến thể của các trình tự miền biến đổi được đột biến hóa cách ngẫu nhiên.

2) Phương pháp B – gây đột biến bằng thiết kế hợp lý:

Theo phương án này, việc tạo thư viện được hướng dẫn bởi sự phân tích về cấu trúc đã thực hiện làm phân tử tiền thân cho sự trưởng thành ái lực. Các gốc axit amin đặc biệt (cụ thể là trong CDR1 của chuỗi nhẹ của XAB1) đã được nhắm đến dựa trên thông tin epitop và paratop xuất phát từ cấu trúc tinh thể nêu trên.

Ba gốc axit amin, được chọn trên cơ sở thông tin cấu trúc tinh thể, được ngẫu nhiên hóa hoàn toàn. Các phương án sinh học phân tử tiêu chuẩn đã được sử dụng cho sự xây dựng này.

Đầu tiên, khuếch đại mảnh của vùng biến đổi mã hóa CDR tương ứng và phần đầu tiên của vùng sườn của chuỗi nhẹ bằng PCR, bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa. Các oligonucleotit, mã hóa CDR đã được tổng hợp theo cách này để cung cấp nhiều bazơ khác nhau ở một hoặc nhiều vị trí xác định. Sự thiết kế oligonucleotit này cho phép sự ngẫu nhiên hóa các vị trí axit amin được nhắm đích cách đặc biệt trong CDR này bằng các condon thoái hóa NNK (trong đó N dùng để chỉ cả 4 bazơ là A, T, X và G còn K dùng để chỉ G và T) và cho phép tất cả 20 axit amin có trong tự nhiên ở các vị trí axit amin được nhắm đích cách đặc biệt này.

Sau bước đầu tiên này, mảnh thứ hai xen phủ với mảnh thứ nhất nêu trên và mã hóa phần còn lại của chuỗi nhẹ, cũng được khuếch đại bằng PCR. Sau đó, cả hai mảnh được lắp ráp lại với nhau bằng PCR “ghép nối” để tạo ra chuỗi nhẹ biến đổi hoàn

chỉnh và được tách dòng ngược trở lại vào vector biểu hiện theo phương thức “cắt và chèn”. Theo đó, trình tự gốc ban đầu được thay thế bằng một dãy trình tự đột biến cách hợp lý, nhờ đó ở các vị trí axit amin được nhắm đích cách đặc biệt này, tất cả 20 axit amin có trong tự nhiên được biểu hiện.

(ii) Sàng lọc thư viện

Khi các thư viện chứa trình tự mã hóa các biến thể của XAB1 được tạo ra, cần phải sàng lọc các thư viện này để chọn ra các biến thể có các đặc tính vượt trội so sánh với trình tự XAB1 gốc ban đầu, ví dụ, ái lực với IL-17A cao hơn.

Hai kỹ thuật sàng lọc đã được sử dụng. Đầu tiên, thử nghiệm sàng lọc thông lượng cao đã được thực hiện bằng kỹ thuật “sàng lọc lọc khuẩn lạc” (colony filtration screening-CFS). Thử nghiệm này cho phép sàng lọc dễ dàng một lượng lớn các dòng. Thử nghiệm này cho phép giảm thiểu các dòng dương tính trước khi sàng lọc bằng thử nghiệm ELISA, là kỹ thuật hữu ích cụ thể là với phương án ngẫu nhiên “phương pháp A” với kích thước thư viện lớn hơn nhiều ($>10^5$ dòng) so với kích thước thư viện trong “phương pháp B” (chỉ 8000 dòng). Sàng lọc bằng thử nghiệm ELISA là thích hợp với số lượng dòng nhỏ hơn hoặc bằng 10^4 và cho kết quả mang tính định lượng nhiều hơn.

1) Sàng lọc lọc khuẩn lạc (CFS):

Quy trình cho CFS dựa trên bài báo của tác giả Skerra et al. năm 1991, tạp chí Anal Biochem 196: trang 151–155. Một số biến đổi đã được thực hiện.

Các khuẩn lạc E. coli biểu hiện các thư viện chứa các biến thể của Fab được sinh trưởng trên màng lọc đặt trên đĩa Petri chứa LB aga và glucoza. Đồng thời, màng PVDF được phủ bằng protein đích (IL-17A). Đặt màng được phủ này lên đĩa aga nêu trên. Màng lọc mang các khuẩn lạc của E. coli biểu hiện mảnh Fab nêu trên được đặt lên trên cùng của đĩa aga. Các mảnh Fab được biểu hiện bằng các tế bào này khuếch tán từ các khuẩn lạc này và gắn với IL-17A đích. Vì thế, mảnh Fab này được giữ lại trên màng PVDF và sau đó, được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp tiếp hợp với alkaline phosphatase để nhuộm Western. Các điều kiện để chỉ chọn lọc các biến thể có các tính chất gắn kết được cải thiện đã được thiết lập trước đó sử dụng XAB1 làm đối chứng.

Cụ thể hơn là, sau khi biến nạp thư viện này vào các tế bào E. coli, các tế bào này được trải lên màng lọc Durapore™ (0,22µm GV, Millipore®, cat #GVWP09050) được đặt trên đĩa Petri chứa LB aga + glucoza 1% + kháng sinh quan tâm. Các đĩa này được ủ qua đêm ở nhiệt độ 30°C

Làm ướt trước màng PVDF nêu trên (Immobilon-P, Millipore®, cat #IPVH08100) bằng metanol, rửa trong dung dịch PBS và phủ màng này bằng dung dịch huIL-17A ở nồng độ 1µg/ml trong PBS. Ủ màng này qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau khi phủ, rửa màng nêu trên hai lần trong dung dịch muối chứa đệm Tris (Tris buffered saline -TBS) + 0,05% Tween (TBST) và cố định trong thời gian hai giờ ở nhiệt độ phòng trong TBST chứa 5% sữa. Sau đó, rửa màng này 4 lần trong TBST và ngâm trong môi trường 2xYT với IPTG nồng độ 1mM. Đặt màng này, được gọi là màng bắt giữ lên trên đĩa LB aga chứa IPTG nồng độ 1mM + kháng sinh quan tâm, và đập bằng màng Durapore mang các khuẩn lạc thử nghiệm. Ủ mô hình kẹp kháng thể kiểu bánh mỳ cặp chĩa thu được trong thời gian bốn giờ ở nhiệt độ 30°C.

Sau bước ủ này, rửa màng bắt giữ nêu trên bốn lần bằng dung dịch TBST và cố định trong dung dịch TBST chứa 5% sữa trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa màng này một lần bằng dung dịch TBST và ủ trong kháng thể thứ cấp (kháng thể kháng hu_chuỗi nhẹ kapa, tiếp hợp alkaline-phosphatase (AP), hãng Sigma # A3813, pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 trong dung dịch TBST chứa 2% sữa), trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa màng này bốn lần trong dung dịch TBST, một lần trong dung dịch TBS và ủ trong dung dịch cơ chất (viên NBT/BCIP SigmaFast, 1 viên hòa tan trong 10ml H₂O). Khi tín hiệu đạt đến cường độ mong đợi, rửa màng này bằng nước và làm khô.

Sau khi sự phát triển của tín hiệu trên màng bắt giữ, các khuẩn lạc cho tín hiệu mạnh hơn XAB gốc ban đầu được chọn và mang đi thực hiện sàng lọc thứ cấp ELISA.

2) Sàng lọc ELISA:

Sau thử nghiệm CFS, ELISA được sử dụng để sàng lọc các đại diện được chọn từ CFS. Tóm lại là, với trường hợp số lượng tương đối ít của các biến thể đã được xác định bằng phương pháp tạo đột biến bằng PCR ưu tiên sai (tức là thư viện A), phản

ứng ELISA được thực hiện bằng tay trong định dạng đĩa 96 giếng. Ngược lại, với các thư viện được xây dựng bằng thiết kế hợp lý (phương pháp B), số lượng lớn hơn các dòng đã được cải thiện yêu cầu phải sàng lọc bằng thử nghiệm ELISA tự động để có khả năng phân biệt các ái lực gắn kết với IL-17A khác nhau giữa các dòng này và xác định các dòng có ái lực cao nhất. Robot ELISA được sử dụng cho mục đích này ở định dạng đĩa 384 giếng. Tuy nhiên, các bước tiến hành ELISA trong mỗi trường hợp nêu trên là giống nhau, sự khác nhau duy nhất là thể tích của các chất phản ứng.

a) Nuôi tế bào:

Đầu tiên, nuôi các dòng qua đêm ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 900 vòng/phút, trong môi trường 2xYT + glucoza 1% + kháng sinh quan tâm. Các đĩa chứa dịch nuôi cấy nêu trên được gọi là các đĩa tế bào mẹ (master). Ngày kế tiếp, chuyển các phần phân ước của dịch nuôi cấy từ đĩa tế bào mẹ sang các đĩa biểu hiện chứa môi trường 2xYT + glucoza 0,1% + kháng sinh quan tâm. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 900 vòng/phút trong thời gian khoảng 3 giờ. Sau đó, bổ sung dung dịch β -D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) đến nồng độ cuối là 0,5mM. Các đĩa này được ủ qua đêm ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 900 vòng/phút.

Ngày kế tiếp, bổ sung dung dịch đệm ly giải chứa (2x) dung dịch muối chứa đệm Borat (Borate buffered saline -BBS) (Teknova #B0205) + lysosym nồng độ 2,5mg/ml + Benzonaza nồng độ 10u/ml) vào các dịch nuôi cấy thu được. Ủ các đĩa trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó, bổ sung dung dịch TBST chứa 12,5% sữa để cố định. Sau khi ủ 30 phút, pha loãng dịch ly giải của tế bào theo tỷ lệ 1:10 trong dung dịch TBST chứa 2% sữa và chuyển dịch thu được sang các đĩa ELISA.

b) ELISA:

Phủ các đĩa ELISA (Nunc Maxisorp) bằng dung dịch huIL-17A nồng độ 1 μ g/ml trong thời gian 1 giờ. Rửa các đĩa này một lần bằng dung dịch TBST và cố định trong thời gian 1 giờ bằng dung dịch TBST chứa 5% sữa. Sau khi cố định, rửa các đĩa này 3 lần bằng dung dịch TBST và sau đó, nạp các dịch ly giải tế bào đã pha loãng lên các đĩa này và ủ trong thời gian 1 giờ. Sau đó, rửa các đĩa này 3 lần bằng dung dịch TBST và ủ trong thời gian 1 giờ với kháng thể thứ cấp AP tiếp hợp.

Cuối cùng, các đĩa này được rửa 3 lần bằng dung dịch TBST và sau đó, ủ với dung dịch cơ chất (bộ cơ chất AttoPhos, hãng Roche #11 681 982 001). Toàn bộ quá trình nêu trên được thực hiện ở nhiệt độ phòng.

Ngoài thí nghiệm ELISA “cổ điển” đã nêu trên, thí nghiệm ELISA biến đổi cũng được thực hiện để đảm bảo sự phân biệt tốt hơn giữa các dòng có ái lực rất cao (trong khoảng pico-mol) với protein đích. Thí nghiệm ELISA “tốc độ phân ly” và thí nghiệm ELISA “cạnh tranh” đã được pháp triển cho mục tiêu này, được mô tả chi tiết dưới đây.

c) ELISA “Tốc độ phân ly”:

Trong thử nghiệm này, điểm biến đổi so với quy trình của ELISA “cổ điển” là bước rửa sau bước gắn kết (ủ dịch ly giải tế bào trong các đĩa ELISA). Trong quy trình “cổ điển”, các đĩa này được rửa 3 lần bằng dung dịch TBST. Dung dịch rửa này được cho vào và được hút ra ngay lập tức, không có thời gian ủ. Với ELISA “tốc độ phân ly”, đĩa này được rửa 6 lần trong thời gian ít nhất là 3 giờ. Bước rửa kéo dài này làm tăng tính chính xác của thử nghiệm ELISA này, và cho phép xác định các dòng có tốc độ phân ly chậm.

d) ELISA “Cạnh tranh”:

Quy trình của thử nghiệm ELISA biến đổi này bao gồm thêm một bước sau bước gắn kết. Sau khi ủ dịch ly giải tế bào, các đĩa này được rửa 3 lần bằng TBST và sau đó, dung dịch XAB1 gốc ban đầu (200nM trong dung dịch TBST chứa 2% sữa) được ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Bước ủ kéo dài với lượng dư Fab gốc ban đầu, như trong trường hợp ELISA “tốc độ phân ly”, là để xác định các dòng có tốc độ phân ly chậm, để dẫn đến sự phân biệt tốt hơn giữa các dòng có ái lực trong khoảng picomol. Các bước còn lại của quy trình này tương tự quy trình ELISA “cổ điển”. Kháng thể thứ cấp được sử dụng trong trường hợp này là kháng thể AP được tiếp hợp với đuôi tag kháng Flag, do các biến thể của các Fab từ thư viện có đuôi Flag tag ở đầu C của chuỗi nặng mà các Fab XAB1 gốc ban đầu không có, nên được sử dụng cho thử nghiệm cạnh tranh.

(iii) Sự xác định đặc điểm của các đại diện

Các dòng đích được đã xác định được qua sự sàng lọc này đã được sản xuất trên phạm vi lớn hơn cho sự xác định đặc điểm sinh hóa tiếp theo và để khẳng định ái lực gắn kết cao với IL-17A, và/hoặc các tính chất có lợi khác trong các thử nghiệm bổ sung. Các thử nghiệm bổ sung này sau đây được mô tả chi tiết hơn.

(iv) Kết quả: Sàng lọc và sự xác định đặc điểm ban đầu của các đại diện sau sự trưởng thành ái lực của XAB1

1) Phương án tạo đột biến ngẫu nhiên (phương pháp A):

Tỷ lệ đột biến sau bước tạo thư viện bằng PCR ưu tiên sai đã được thống kê với tỷ lệ tối đa là 2 đến 3 đột biến/gen. Gần 3×10^4 dòng đã được sàng lọc bằng sàng lọc lọc khuẩn lạc và 94 dòng đã được xác định là dòng được cải thiện và được đưa vào các thử nghiệm ELISA gắn kết, ELISA tốc độ phân ly và ELISA cạnh tranh. Kết quả ELISA kết hợp với kết quả giải trình tự dẫn tới sự xác định 6 đại diện tập trung vào 3 điểm nóng có tiềm năng cho sự cải thiện, Gly ở vị trí 28 thành Val (G28V) trong LCDR1; Gly ở vị trí 66 thành Val (G66V) hoặc Ser (G66S) trong vùng sườn 3; Asn92 thành Asp (N92D) trong LCDR3 (dữ liệu không được biểu diễn, nhưng khi xác định vị trí là giống hệt với vị trí của XAB2, VL, tức là SEQ ID NO: 25).

Codon kết thúc đã được quan sát thấy ở một trong số các dòng này, nhưng không ảnh hưởng do chủng E. coli được sử dụng là chủng mang yếu tố ức chế amber cho phép đọc qua codon kết thúc. Dựa trên các kết quả thu được, đột biến G28V và G66V xuất hiện đã dẫn đến sự cải thiện tốt nhất. Một biến thể của XAB1 đã được tạo ra bằng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn mang hai đột biến điểm này đã được đề cập. Một biến thể khác đã được tách dòng ngoài ra còn mang đột biến thay thế N92D, để kiểm tra có hay không có sự loại bỏ vị trí loại amin sau dịch mã (N92, S93) sẽ là có ích. Việc xác định đặc điểm chi tiết hơn đã được thực hiện cho hai biến thể này, cụ thể là biến thể mang ba đột biến được đề cập là XAB_A2 mà cuối cùng dẫn đến XAB2. Trong XAB2, các axit amin số 1 đến 23 theo sự xác định của Kabat tạo nên vùng sườn 1, các axit amin số 24 đến 34 (Kabat) tạo nên LCDR1, các axit amin số 35 đến 49 (Kabat) tạo nên vùng sườn 2, các axit amin 50 đến 56 (Kabat) tạo nên LCDR2, các axit amin 57 đến 88 (Kabat) tạo nên vùng sườn 3, các axit amin 89 đến 97 (Kabat) tạo

nên LCDR3 và các axit amin 98 đến 107 (Kabat) tạo nên vùng sườn 4. Cũng áp dụng sự phân chia nhỏ tương tự các trình tự VL khác theo các phương án của sáng chế.

Do đó, đột biến thay thế G66V nêu trên là nằm trong vùng sườn, mà được gọi là vòng ngoài (outer loop). Vùng sườn này có khả năng đóng góp vào sự gắn kết trong một số trường hợp. Dựa vào thông tin về cấu trúc hiện có, vùng sườn này đã được dự đoán ban đầu rằng đột biến này thực sự là có thể có khả năng tương tác với vùng IL-17A mà không thể bị tách ra khỏi cấu trúc tinh thể nhưng có thể nằm gần với vòng ngoài đã nêu.

2) Phương án gây đột biến hợp lý (phương pháp B):

Hình ảnh tổng thể về sự phân bố axit amin ở các vị trí được ngẫu nhiên hóa đã được tạo ra bằng việc giải trình tự 32 thành viên được chọn cách ngẫu nhiên. Không có sự chênh lệch đáng kể, mặc dù các thống kê với số lượng trình tự ít như vậy không thể thực hiện được. Gần 4×10^4 dòng đã được sàng lọc mà đã xử lý tín hiệu kích cỡ của thư viện theo lý thuyết là 8000. Số lượng lớn của các dòng đích đã được xác định và 2630 dòng được sử dụng để tiến hành sàng lọc bằng thử nghiệm ELISA. Thực hiện các thử nghiệm ELISA gắn kết, ELISA tốc độ phân ly và ELISA cạnh tranh, 60 dòng có sự cải thiện lớn nhất đã được giải trình tự. Trong số 60 dòng này, 22 trình tự đặc biệt nhất đã được tìm ra, và kết quả này được tóm tắt trong bảng 11.

Bảng 11. Kết quả ELISA của tất cả 22 đại diện đặc biệt nhất đã được chọn. Các giá trị được chuẩn hóa với Fab XAB1 gốc ban đầu. Cột sự hiển thị chỉ ra độ thường xuyên của một trình tự nhất định được tìm thấy trong 60 dòng đích. Sự khác nhau trong trình tự axit amin này được đưa ra trong ba cột cuối cùng. XAB1 có các axit amin I S A ở các vị trí này. Các tín hiệu ELISA được xác định từ dịch chiết thô của dịch nuôi cấy E. coli biểu hiện Fab.

Tên đại diện	ELISA cổ điển	ELISA tốc độ phân ly	ELISA cạnh tranh	% Hiển thị	30	31	32
MB491	2,1	43,0	44,2	5	F	F	W

MB483	3,1	47,1	45,2	2	F	W	T
MB447	3,0	45,5	57,0	5	F	W	W
MB457	2,7	34,7	41,0	5	I	W	S
MB464	2,7	34,9	36,9	7	I	Y	Q
MB432	2,3	44,2	37,3	12	L	F	A
MB454	2,9	34,2	36,6	2	L	W	A
MB444	3,2	48,9	52,4	2	L	W	E
MB456	2,4	45,1	46,7	2	L	W	H
MB440	2,8	52,5	54,0	5	L	W	Q
MB450	2,9	41,5	53,3	5	M	W	W
MB435	2,7	44,7	44,6	2	N	W	E
MB438	2,7	41,5	41,1	7	P	Y	A
MB453	2,7	43,3	46,4	9	V	F	W
MB448	2,9	40,4	51,5	5	V	W	M
MB486	1,9	58,5	64,9	2	W	W	M
MB434	2,4	44,4	39,5	7	W	W	Y
MB458	2,7	33,0	42,1	5	W	Y	Q
MB463	2,7	34,2	31,6	2	Y	F	E
MB468	2,8	43,9	60,0	5	Y	W	E
MB433	2,3	39,7	29,3	2	Y	W	G
MB461	2,9	49,8	62,8	2	Y	W	T

Trong số 22 dòng đặc biệt nhất này, chọn 6 dòng để biểu hiện trong *E. coli* ở quy mô 0,5L và sử dụng hai bước tinh sạch bằng IMAC (Ni-NTA) và SEC. Sau đó các Fab đã tinh sạch được sử dụng để khẳng định sự cải thiện trong gắn kết bằng thử nghiệm ELISA.

Kết quả ELISA của các đại diện Fab đã được chọn và tinh sạch so với XAB1 được biểu diễn trong Fig. 3, trong đó sự đánh số biểu đồ này tương ứng với sự đặt tên các ứng viên thuốc như sau: 1 là MB440; 2 là MB464; 3 là MB468; 4 là MB444; 5 là MB435; 6 là MB463; 7 là XAB1.

Fig. 3A là biểu đồ thể hiện tín hiệu với nồng độ của Fab (M) được chuẩn hóa. Có thể nhận thấy rằng tất cả các dòng được chọn cho kết quả là tín hiệu cao hơn XAB1. Fig.

3B là biểu đồ thể hiện tín hiệu còn lại so với thời gian ủ rửa (giờ) được chuẩn hóa. Tất cả các dòng được chọn cho kết quả là tín hiệu cao hơn XAB1. Fig. 3C là biểu đồ thể hiện tín hiệu với nồng độ chất cạnh tranh với Fab được chuẩn hóa (M). lần nữa có thể nhận thấy rằng tất cả các dòng được chọn cho kết quả là tín hiệu cao hơn XAB1.

Ví dụ 4. Xác định vị trí loại amin sau dịch mã tiềm năng.

Các tác giả của sáng chế giả thiết về môtip axit amin asparagin theo sau bởi glyxin (NG) hoặc, cũng được giả thiết là theo sau bởi serin (NS) ở mức độ thấp hơn, có thể là nhạy cảm với sự loại amin sau dịch mã. Các môtip này có mặt trong L-CDR2 (vị trí 56/57) và L-CDR3 (92/93) của kháng thể XAB1. Bốn biến thể IgG đã được tạo ra để kiểm tra vị trí NG nào có thể được loại bỏ mà không ảnh hưởng đến các tính chất về gắn kết và về hoạt tính. Bốn biến thể mang đột biến điểm này được tách dòng bằng các quy trình sinh học phân tử tiêu chuẩn và được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật xâm nhiễm chuyển tiếp tiêu chuẩn của các tế bào HEK và tinh sạch qua cột protein A.

Các biến thể IgG đã tinh sạch được phân tích trong thử nghiệm vô hiệu hóa in vitro (ví dụ, như được mô tả trong các ví dụ 12 và 13) để so sánh hoạt tính của chúng với IgG XAB1 gốc ban đầu. Kết quả đã cho thấy rằng trong số bốn biến thể này, ba biến thể có hoạt tính giảm. Nhưng đại diện XAB_B12 (đột biến N56Q) giữ lại được hoạt tính khi so với XAB1 gốc ban đầu.

Bảng 12. Tổng quan về những sự biến đổi trình tự với XAB1, và tác động tương ứng lên sự vô hiệu hóa in vitro.

Kabat CDR			L-CDR2									IC50(nM)		
Gốc#	Kabat#											Hu	Hu	
												IL-6	IL-8	
												sec	sec	
Các biến thể		Tên gốc												
IgG														
XAB1	XAB1		Y	D	A	S	S	L	E	N		G	4	3
XAB_G57T	XAB_A6		Y	D	A	S	S	L	E	N		T	22	23
XAB_N56Q	XAB_B12	Y	D	A	S	S	L	E	Q	G	2	3		

XAB_N56T	XAB_B13	Y	D	A	S	S	L	E	T	G		11	15
XAB_N56S	XAB_B14	Y	D	A	S	S	L	E	S	G		13	17

Do đó đã xác định được sự thay thế thích hợp nhất, sự thay thế này đã được đưa vào các dòng đích có tiềm năng nhất được xác định trong suốt quá trình trưởng thành ái lực, thu được XAB2 (XAB_A2 N56Q), XAB3 (MB468 N56Q), XAB4 (MB435 N56Q). Chúng đã được tạo ra bằng sự xâm nhiễm chuyển tiếp tiêu chuẩn của các tế bào HEK và được tinh sạch qua cột protein A cùng với XAB5 (MB435), mà vẫn mang vị trí NG đã nêu.

Môtip NG này đã được loại bỏ (N56Q) trong XAB2, XAB3, XAB4, nhưng vẫn có mặt trong XAB5. Môtip NG trong L-CDR3 này đã được loại bỏ (N92D) trong XAB2, như đã được tìm thấy trong phương án trưởng thành ái lực ngẫu nhiên. Do đó, tập hợp tốt nhất của các biến thể là có để kiểm tra khả năng nhạy cảm với các vị trí tiềm năng.

Pha loãng bốn đại diện đã tinh sạch trong dung dịch đệm có pH là 8 và ủ ở nhiệt độ 40°C để thúc đẩy phản ứng loại amin. Thu các phần phân ước ở một số thời điểm để xác định mức độ loại amin bằng xác ký trao đổi cation (cation exchange chromatography -CEX), theo các nguyên lý đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và hoạt tính vô hiệu hóa in vitro bằng thử nghiệm dựa trên tế bào đã được xác định (ví dụ, như được mô tả trong các ví dụ 12 và 13).

Kết quả CEX đã cho thấy sự tăng phần trăm các biến thể có tính axit theo thời gian, như đã được dự đoán cho IgG bất kỳ, có thể là do các vị trí cải biến sau dịch mã trong vùng sườn của kháng thể này, nhưng mức độ tăng của XAB5 cao hơn các đại diện khác, tức là 72% so với 46% sau một tuần và 94% so với 83% sau 4 tuần. Cuối cùng, kết quả thử nghiệm hoạt tính vô hiệu hóa in vitro được liên hệ với kết quả CEX, cho thấy rằng XAB5 mất hoạt tính sau 4 tuần ủ trung điều kiện thúc đẩy sự loại amin. Hệ thống phương pháp sắc ký loại trừ kích thước- tán xạ ánh sáng đa góc (SEC-MALS), được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, đã được sử dụng để giám sát mức độ kết cụm trong các mẫu thử nghiệm.

Kết quả được tóm tắt trong bảng 13.

Bảng 13. Sự phân tích bằng SEC-MALS, hoạt tính vô hiệu hóa in vitro và CEX.

Kháng thể	M ^{a)} [%]	EC ₅₀ ^{b)} [ng/ml]	CEX ^{c)} [%]	M ^{a)} [%]	EC ₅₀ ^{b)} [ng/ml]	CEX ^{c)} [%]
T= 0 tuần				T= 1 tuần		
XAB2	99	45	15	98	n.d.	45
XAB3	99	40	14	98	n.d.	44
XAB5	99	45	18	98	n.d.	72
XAB4	99	48	15	98	n.d.	48
Kháng thể	M ^{a)} [%]	EC ₅₀ ^{b)} [ng/ml]	CEX ^{c)} [%]	Các vị trí NG ^{d)}	Các vị trí NS ^{d)}	
T= 4 tuần						
XAB2	95	47	85	0	0	
XAB3	97	40	81	0	1	
XAB5	94	61	94	1	1	
XAB4	94	47	84	0	1	

^{a)}monome bằng SEC-MALS, ^{b)} sự ức chế tiết IL-6 sau sự kích thích tế bào bằng IL-17 có nồng độ 80ng/ml, ^{c)}các biến thể mang tính axit bằng sắc ký trao đổi, ^{d)} số lượng các vị trí trong các CDR (không bao gồm vùng sườn)

Các số liệu này đã chỉ ra sự loại bỏ thành công của vị trí loại amin hóa sau dịch mã tiềm năng, mà có thể có tác động lên hoạt tính của kháng thể. Điều này là có lợi, do XAB2, XAB3 và XAB4 từ đó có thể là để đạt được sản phẩm đồng nhất hơn XAB1 khi không có sự loại amin sau dịch mã có thể xuất hiện trong suốt quá trình sản xuất hoặc lưu giữ ảnh hưởng đến hoạt tính của kháng thể này.

Ví dụ 5. Sự phân tích tia X các biến thể của kháng thể được biến đổi bằng sự trưởng thành ái lực: XAB2

Tóm lại là, tách dòng và biểu hiện Fv XAB2 với đuôi tag có sáu gốc histidin ở đầu C của chuỗi nặng và đuôi Strep-tag ở đầu C của chuỗi nhẹ trong E. coli TGf1-, theo các nguyên tắc đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tình

sạch protein tái tổ hợp này bằng kỹ thuật sắc ký Ni-chelat và sắc ký loại trừ kích thước (SPX-75).

Sau đó, phức của mảnh Fv XAB2 và IL-17A của người được tạo ra bằng cách sử dụng hệ thống phương pháp tiêu chuẩn. Tóm lại là, trộn IL-17A của người (1,5mg) với lượng dư Fv XAB2 (3,7mg) và cho phức này chạy trên sắc ký loại trừ kích thước S100, trong dung dịch đệm TRIS nồng độ 10mM, độ pH là 7,4, NaCl nồng độ 25mM. Sau đó, cô đặc protein thu được bằng kỹ thuật siêu lọc đến nồng độ 26,3mg/ml và kết tinh hóa.

Sau đó, thực hiện tiếp các quy trình kết tinh hóa tiêu chuẩn. Tóm lại là, các tinh thể được phát triển ở nhiệt độ 19°C trong các đĩa SD2 96 giếng, bằng cách sử dụng phương pháp sự khuếch tán hơi nước trong các giọt đặt tại chỗ. Trộn dung dịch protein gốc theo tỷ lệ 1:1 với dung dịch đệm kết tinh chứa canxi axetat nồng độ 0,2M, PEG 3,350 nồng độ 20%. Kích thước giọt tổng cộng là 0,4μl. Trước khi thu kết quả tia X, một tinh thể đã được chuyển nhanh vào hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 của dung dịch đệm kết tinh chứa PEG 3,350 nồng độ 30%, glyxerol nồng độ 30%, và sau đó làm mát nhanh bằng nitơ lỏng.

Thu và xử lý dữ liệu tia X đã được thực hiện bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn. Tóm lại là, dữ liệu tia X với độ phân giải là 2,0Å đã được thu bằng hệ thống Swiss Light Source, hệ thống chùm tia X06DA, với thiết bị phát hiện CCD MAR225, bằng cách sử dụng nguồn phát xạ tia X. Tổng cộng là, 360 ảnh cho mỗi dao động 0,5° được ghi lại ở khoảng cách giữa tinh thể và máy phát hiện là 190mm và được xử lý bằng gói phần mềm XDS. Tinh thể thuộc về nhóm không gian P2₁2₁2 với các tham số của khối tinh thể là a=184,72Å, b=55,56Å, c=71,11Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. R-sym là 5,2% với độ phân giải là 2,0Å và độ hoàn thiện dữ liệu là 100,0%.

Khi tinh thể của phức Fv XAB2 đã nêu đồng hình ở mức độ cao với tinh thể của phức Fv XAB (Ví dụ 2), cấu trúc của tinh thể sau cùng này được sử dụng làm mô hình đầu vào cho lần chạy ban đầu của sự tinh chỉnh tinh thể học bằng chương trình CNX. Thực hiện lặp lại sự làm đúng mô hình và tinh chỉnh mô hình với Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) và CNX (Crystallography & nMR eXplorer) bản 2002, cho đến khi không có sự cải thiện lớn nào khác có thể được tạo ra cho mô hình tinh thể học

này. R và R tự do cuối cho toàn bộ dữ liệu lần lượt là 0,214 và 0,259. Mô hình tinh chỉnh cuối cùng cho thấy căn bậc hai của sai số bình phương trung bình (RMSD) có độ dài liên kết lý tưởng và góc liên kết lý tưởng lần lượt là 0,005Å và 0,9°.

Kết quả

Kết quả của sự tinh chỉnh tia X phức Fv XAB2 với IL-17A của người được trình bày trong bảng 14 và cấu trúc không gian ba chiều của phức này được biểu diễn trong Fig. 4. Sự phân tích tinh thể học tia X khẳng định rằng biến thể kháng thể XAB2 này đã giữ được độ đặc hiệu đích và đã gắn kết với ái lực cao với về cơ bản là giống như kháng thể XAB1 gốc ban đầu. Tuy nhiên, trong cấu trúc phức XAB1, thùy chuỗi nhẹ chứa Gly66 chấp nhận một cấu hình riêng mà cấu hình riêng này là không thể nếu gốc này bị đột biến thành valin. Như một hệ quả, trong phức XAB2, đột biến Gly66 thành valin (G66V) khiến thùy này chấp nhận một cấu hình riêng mới, và mạch bên valin tạo ra các tương tác kỵ nước với Ile51 của IL-17A (Fig. 5). Hai gốc nữa của IL-17A, Pro42 và Arg43, trở nên có thể nhìn thấy được (được sắp xếp) trong cấu trúc tinh thể này. Các gốc kháng nguyên này tạo ra các tương tác liên kết bổ sung với kháng thể XAB2, cụ thể là tương tác kỵ nước với Val28 (Fig. 5).

Bảng 14. Tinh chỉnh tia X phức Fv XAB2 với IL-17A thu được bằng chương trình CNX.

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 SỰ TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 CHƯƠNG TRÌNH : CNX 2002

CHÚ Ý 3 TÁC GIẢ : Brunger, Adams, Clore, Delano,

CHÚ Ý 3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,

CHÚ Ý 3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,

CHÚ Ý 3 Rice, Simonson, Warren

CHÚ Ý 3 và

CHÚ Ý 3 Accelrys Inc.,

CHÚ Ý 3 (Badger, Berard, Kumar, Szalma,

CHÚ Ý 3 Yip, Dzakula).

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 DỮ LIỆU ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI CAO (ANGSTROM) : 2,00

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI THẤP (ANGSTROM) : 71,11

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU (SIGMA(F)) : 0,0

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU CAO (ABS(F)) : 2329350,20

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU THẤP (ABS(F)) : 0,000000

CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 99,8

CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ : 50409

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 KHỚP VỚI DỮ LIỆU ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP KIỂM CHỨNG CHÉO: THÔNG QUA

CHÚ Ý 3 CHỌN LỌC TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO:

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R NGẪU NHIÊN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,214

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO: 0,259

CHÚ Ý 3 CỖ TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO (%) : 5,0

CHÚ Ý 3 ĐẾM ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 2521

CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 0,005

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 KHỚP TRONG ĐỘ PHÂN GIẢI BIN CAO NHẤT.

CHÚ Ý 3 TỔNG SỐ CÁC BIN ĐÃ SỬ DỤNG : 6

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN CAO (A) : 2,00

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN THẤP (A) : 2,13

CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN BIN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 100,0

CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ TRONG BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 7858

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,262

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 0,304

CHÚ Ý 3 CỖ CỦA TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN (%) : 5,0

CHÚ Ý 3 ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 414

CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 0,015

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG PHẢI HYDRO ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ PROTEIN: 5055

CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ AXIT NUCLEIC: 0

CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG ĐỒNG NHẤT: 0

CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ DUNG MÔI: 376

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 CÁC GIÁ TRỊ B.

CHÚ Ý 3 TỪ ĐỒ THỊ WILSON (A**2) : 27,8

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ B TRUNG BÌNH(TOÀN BỘ, A**2) : 37,3

CHÚ Ý 3 TOÀN BỘ GIÁ TRỊ B KHÔNG ĐẲNG HƯỚNG.

CHÚ Ý 3 B11 (A**2) : -0,85

CHÚ Ý 3 B22 (A**2) : 3,93

CHÚ Ý 3 B33 (A**2) : -3,08

CHÚ Ý 3 B12 (A**2) : 0,00

CHÚ Ý 3 B13 (A**2) : 0,00

CHÚ Ý 3 B23 (A**2) : 0,00

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH HÓA DUNG MÔI HỖN Độn.

CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP ĐÃ SỬ DỤNG: MÔ HÌNH PHẪNG

CHÚ Ý 3 KSOL : 0,338594

CHÚ Ý 3 BSOL : 46,0594 (A**2)

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG.

CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI (A): 0,25
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ SIGMAA (A): 0,19
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ CHẶN TÁI HÒA TAN THẤP (A): 5,00
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG ĐÁNH GIÁ CHÉO.
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI C-V(A) : 0,31
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ SIGMAA C-V (A) : 0.22
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 ĐỘ LỆCH RMS TỪ CÁC GIÁ TRỊ LÝ TƯỞNG.
 CHÚ Ý 3 ĐỘ DÀI LIÊN KẾT (A) : 0,005
 CHÚ Ý 3 GÓC LIÊN KẾT (ĐỘ) : 0,9
 CHÚ Ý 3 GÓC NHỊ DIỆN (ĐỘ) : 21,0
 CHÚ Ý 3 GÓC PHI CHÍNH (ĐỘ) : 0,70
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG : ĐÃ GIỚI HẠN
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 HỆ SỐ GIỚI HẠN NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG. RMS SIGMA
 CHÚ Ý 3 LIÊN KẾT MẠCH CHÍNH (A**2) : 1,49 ; 1,50
 CHÚ Ý 3 GÓC MẠCH CHÍNH (A**2) : 2,44 ; 2,00
 CHÚ Ý 3 LIÊN KẾT MẠCH BÊN (A**2) : 1,95 ; 2,00
 CHÚ Ý 3 GÓC MẠCH BÊN (A**2) : 2,93 ; 2,50
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH NCS: KHÔNG CÓ
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC GIỚI HẠN NCS. RMS SIGMA/KHỐI LƯỢNG
 CHÚ Ý 3 NHÓM 1 VỀ VỊ TRÍ (A) : KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 NHÓM 1 HỆ SỐ B (A**2) : KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 TẬP THAM SỐ 1: protein_rep.param
 CHÚ Ý 3 TẬP THAM SỐ 2: water_rep.param
 CHÚ Ý 3 PARAMETER FILE 3 : ion.param
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 1 : protein.top
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 2 : water.top
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 4 : ion.top
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC CHÚ Ý VỀ TINH CHỈNH KHÁC: KHÔNG
 LIÊN KẾTSS 1 CYS L 23 CYS L 88
 LIÊN KẾTSS 2 CYS H 22 CYS H 96
 LIÊN KẾTSS 3 CYS A 23 CYS A 88
 LIÊN KẾTSS 4 CYS B 22 CYS B 96
 LIÊN KẾTSS 5 CYS C 94 CYS C 144
 LIÊN KẾTSS 6 CYS C 99 CYS C 146
 LIÊN KẾTSS 7 CYS D 94 CYS D 144
 LIÊN KẾTSS 8 CYS D 99 CYS D 146
 CRYST1 184.719 55.558 71.109 90,00 90,00 90,00 P 21 21 2 24
 ORIGX1 1,000000 0,000000 0,000000 0,000000
 ORIGX2 0,000000 1,000000 0,000000 0,000000
 ORIGX3 0,000000 0,000000 1,000000 0,000000

SCALE1 0,005414 0,000000 0,000000 0,000000
 SCALE2 0,000000 0,017999 0,000000 0,000000
 SCALE3 0,000000 0,000000 0,014063 0,000000

Fig. 4 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB2 với IL-17A của người. Fig. 4A biểu diễn hai mảnh Fv XAB2 ở dạng lắp đầy không gian, và homodime IL-17A được biểu diễn ở dạng hoạt hóa. Fig. 4B biểu diễn hai mảnh Fv XAB2 ở dạng hoạt hóa, và homodime IL-17A được biểu diễn ở dạng lắp đầy không gian. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fv XAB2 này được biểu diễn tương ứng bằng màu xám đậm và xám nhạt. Một mạch của homodime IL-17A được biểu diễn bằng màu xám nhạt, mạch còn lại được biểu diễn bằng màu xám đậm.

Fig. 5 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB2 với IL-17A của người ở dạng quan sát cận cảnh kháng thể L-CDR1 và vùng thùy bên ngoài, mang các đột biến glyxin thành valin (lần lượt là G28V và G66V). Đột biến G66V dẫn đến sự thay đổi cấu hình riêng của thùy bên ngoài, cũng như thay đổi các tương tác kháng nguyên kháng thể bổ sung với các gốc Pro42, Arg43 của IL-17A và Ile51. Fv XAB2 được biểu diễn bằng mô hình hoạt hóa xám nhạt, và homodime IL-17A của người trong các sắc thái xám đậm hơn. Ile51 không cùng thuộc một tiểu phần IL-17A giống như Pro42 và Arg43.

Ví dụ 6. Sự phân tích tia X của biến thể của kháng thể được biến đổi bằng sự trưởng thành ái lực: XAB5

Tách dòng và biểu hiện Fv XAB5 với đuôi tag có sáu gốc histidin ở đầu C của chuỗi nặng và đuôi Strep-tag ở đầu C của chuỗi nhẹ trong E. coli TGf1-. Tinh sạch protein tái tổ hợp này bằng kỹ thuật sắc ký Ni-chelat sau đó được tinh sạch bằng sắc ký loại trừ kích thước trên cột SPX-75, trong dung dịch đệm PBS. Sự phân tích LC-MS đã cho thấy khối lượng dự đoán của chuỗi nặng (13703,4Da), và sự có mặt của hai dạng của chuỗi nhẹ gồm: dạng có chiều dài đầy đủ (115aa; 12627,3Da; khoảng 27%) và dạng với Strep-tag bị cắt ngắn (A1 đến Q112; 12222,8Da; khoảng 73%).

Sau đó, tạo ra phức của mảnh Fv XAB5 với IL-17A của người bằng cách sử dụng hệ thống phương pháp tiêu chuẩn. Tóm lại là, IL-17A của người (1,4mg) được trộn với lượng dư của Fv XAB5 (3,4mg) và cho phức này chạy trên sắc ký loại trừ kích thước

S100, trong dung dịch đệm TRIS nồng độ 10mM, độ pH là 7,4, NaCl nồng độ 25mM. Sau đó, cô đặc protein thu được bằng kỹ thuật siêu lọc đến nồng độ là 16,5mg/ml và kết tinh hóa.

Sau đó, thực hiện tiếp các quy trình kết tinh hóa tiêu chuẩn. Tóm lại là, các tinh thể được phát triển ở 19°C trong các đĩa SD2 96 giếng, bằng cách sử dụng phương pháp sự khuếch tán hơi nước trong các giọt đặt tại chỗ. Trộn dung dịch protein gốc theo tỷ lệ 1:1 với dung dịch đệm kết tinh chứa PEG MME 5,000 nồng độ 15%, MES có nồng độ 0,1M và độ pH là 6,5, amoni sulfat 0,2M. Kích thước giọt tổng cộng là 0,4 μ l. Trước khi thu kết quả tia X, một tinh thể đã được chuyển nhanh vào hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 của dung dịch đệm kết tinh chứa PEG MME 5,000 nồng độ 20%, glyxerol nồng độ 40%, và sau đó làm mát nhanh bằng nitơ lỏng.

Thực hiện thu và xử lý dữ liệu tia X bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn. Tóm lại là, thu dữ liệu tia X với độ phân giải là 3,1Å bằng hệ thống Swiss Light Source, hệ thống chùm tia X10SA, với thiết bị phát hiện Pilatus, sử dụng sự phát xạ tia X 1,00000Å. Tổng cộng là, 720 ảnh của mỗi dao động 0,25° đã được ghi lại ở khoảng cách giữa tinh thể và máy phát hiện là 520mm và được xử lý bằng gói phần mềm XDS. Tinh thể thuộc về nhóm không gian C222₁ với các tham số của khối tinh thể là a=55,37Å, b=84,08Å, c=156,35Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. R-sym là 8,9% với độ phân giải là 3,1Å và độ hoàn thiện dữ liệu là 99,7%.

Xác định cấu trúc này bằng sự thay thế phân tử bằng chương trình PHASER, sử dụng các mô hình tìm kiếm có nguồn gốc từ phức Fv XAB2 đã được xác định trước đó. Thực hiện lặp lại sự làm đúng mô hình và tinh chỉnh mô hình với Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) và CNX (Crystallography & nMR eXplorer) bản 2002, cho đến khi không có sự cải thiện đáng kể khác có thể được tạo ra với mô hình tinh thể học này. R và R tự do cuối cho toàn bộ dữ liệu lần lượt là 0,222 và 0,305. Mô hình tinh chỉnh cuối cùng cho thấy căn bậc hai của sai số bình phương trung bình (RMSD) từ độ dài liên kết lý tưởng và góc liên kết lý tưởng lần lượt là 0,008Å và 1,2°.

Kết quả

Kết quả sự tinh chỉnh tia X phức Fv XAB5 với IL-17A của người được mô tả trong bảng 15 và cấu trúc không gian ba chiều của phức này được biểu diễn trong Fig. 6. Trong cấu trúc tinh thể này, phức Fv XAB5 có chính xác 2 lần đối xứng về tinh thể học: đơn vị không đối xứng của tinh thể chỉ chứa một nửa của toàn bộ phức dimer. Fv XAB5 hình thành sự tương tác với cả hai tiểu phần IL-17A, nhưng đại đa số các tương tác nội phân tử chỉ với một tiểu phần (khoảng 90% bề mặt của IL-17A được che phủ bởi Fv XAB5 này được góp phần bởi một tiểu phần IL-17A). Sự phân tích tinh thể bằng tia X đã xác nhận rằng biến thể kháng thể XAB5 đã giữ được tính đặc hiệu đích và liên kết với ái lực cao với về cơ bản là cùng epitop với kháng thể XAB1 gốc ban đầu. Tuy nhiên, trong cấu trúc của phức XAB5 này, chuỗi nhẹ CDRL1 mang ba đột biến điểm mà cung cấp sự gắn kết với IL-17A của người được tăng cường. Trp 31 của chuỗi nhẹ của XAB5 bị gài chặt trong các tương tác vòng thơm/kỵ nước với Tyr 85 của IL-17A và, ở mức độ thấp hơn, với Phe 133 của IL-17A. Asn 30 của chuỗi nhẹ của XAB5 cho mạch chính của Pro 130 của IL-17A liên kết H và trong tương tác van der Waals với Leu 49 (cùng tiểu phần IL-17A) và Val 45 (khác tiểu phần IL-17A). Glu 32 của chuỗi nhẹ của XAB5 làm bền thùy CDRL1 này qua các tương tác liên kết với H nội phân tử. Ngoài ra, Glu 32 tạo ra các tương tác tĩnh điện thuận lợi với Arg 124 của IL-17A, nhưng không bị gài chặt thành tương tác cầu muối “đầu-đầu” (Fig. 7).

Bảng 15. Tinh chỉnh tia X phức Fv XAB5 với IL-17A thu được bằng chương trình CNX.

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 SỰ TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 CHƯƠNG TRÌNH : CNX 2002

CHÚ Ý 3 TÁC GIẢ : Brunger, Adams, Clore, Delano,

CHÚ Ý 3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,

CHÚ Ý 3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,

CHÚ Ý 3 Rice, Simonson, Warren

CHÚ Ý 3 và

CHÚ Ý 3 Accelrys Inc.,

CHÚ Ý 3 (Badger, Berard, Kumar, Szalma,

CHÚ Ý 3 Yip, Dzakula).

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 DỮ LIỆU ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI CAO (ANGSTROM) : 3,11

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI THẤP (ANGSTROM) : 46,25

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU (SIGMA(F)) : 0,0
 CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU CAO (ABS(F)) : 3778977,84
 CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU THẤP (ABS(F)) : 0,000000
 CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 99,0
 CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ : 6801
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 KHỚP VỚI DỮ LIỆU ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHÍNH.
 CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP KIỂM CHỨNG CHÉO: THÔNG QUA
 CHÚ Ý 3 CHỌN LỌC TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO:
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R NGẪU NHIÊN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,222
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO : 0,305
 CHÚ Ý 3 CỖ TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO (%) : 5,0
 CHÚ Ý 3 ĐẾM ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 340
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 0,017
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 KHỚP TRONG ĐỘ PHÂN GIẢI BIN CAO NHẤT.
 CHÚ Ý 3 TỔNG SỐ CÁC BIN ĐÃ SỬ DỤNG : 6
 CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN CAO (A) : 3,10
 CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN THẤP(A) : 3,29
 CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN BIN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 89,9
 CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ TRONG BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 961
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,293
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN : 0,403
 CHÚ Ý 3 CỖ CỦA TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN (%) : 4,9
 CHÚ Ý 3 ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 50
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 0,057
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG PHẢI HYDRO ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHÍNH.
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ PROTEIN: 2492
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ AXIT NUCLEIC: 0
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG ĐỒNG NHẤT : 5
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ DUNG MÔI: 4
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC GIÁ TRỊ B.
 CHÚ Ý 3 TỪ ĐỒ THỊ WILSON (A**2) : 85,2
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ B TRUNG BÌNH(TOÀN BỘ, A**2) : 71,0
 CHÚ Ý 3 TOÀN BỘ GIÁ TRỊ B KHÔNG ĐẲNG HƯỚNG.
 CHÚ Ý 3 B11 (A**2) : 23,21
 CHÚ Ý 3 B22 (A**2) : 7,23
 CHÚ Ý 3 B33 (A**2) : -30,44
 CHÚ Ý 3 B12 (A**2) : 0,00
 CHÚ Ý 3 B13 (A**2) : 0,00
 CHÚ Ý 3 B23 (A**2) : 0,00
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH HÓA DUNG MÔI HỖN ĐỘN.
 CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP ĐÃ SỬ DỤNG: MÔ HÌNH PHẪNG
 CHÚ Ý 3 KSOL : 0,389339

CHÚ Ý 3 BSOL : 59,5295 (A**2)
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG.
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI (A) : 0,35
 CHÚ Ý 3 ESD FROM SIGMAA (A) : 0,42
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ CHẶN TÁI HÒA TÀN THẤP (A) : 5,00
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG ĐÁNH GIÁ CHÉO.
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI C-V(A) : 0,51
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ SIGMAA C-V (A) : 0,45
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 ĐỘ LỆCH RMS TỪ CÁC GIÁ TRỊ LÝ TƯỞNG.
 CHÚ Ý 3 ĐỘ DÀI LIÊN KẾT (A) : 0,008
 CHÚ Ý 3 GÓC LIÊN KẾT (ĐỘ) : 1,2
 CHÚ Ý 3 GÓC NHỊ DIỆN (ĐỘ) : 23,1
 CHÚ Ý 3 GÓC PHI CHÍNH (ĐỘ) : 0,73
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG : ĐÃ GIỚI HẠN
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 HỆ SỐ GIỚI HẠN NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG. RMS SIGMA
 CHÚ Ý 3 LIÊN KẾT MẠCH CHÍNH (A**2) : 1,40 ; 1,50
 CHÚ Ý 3 GÓC MẠCH CHÍNH (A**2) : 2,49 ; 2,00
 CHÚ Ý 3 LIÊN KẾT MẠCH BÊN (A**2) : 1,82 ; 2,00
 CHÚ Ý 3 GÓC MẠCH BÊN (A**2) : 2,93 ; 2,50
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 MÔ HÌNH NCS: KHÔNG CÓ
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC GIỚI HẠN NCS. RMS SIGMA/KHỐI LƯỢNG
 CHÚ Ý 3 NHÓM 1 VỀ VỊ TRÍ (A) : KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 NHÓM 1 HỆ SỐ B (A**2) : KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 TẬP THAM SỐ 1: protein_rep.param
 CHÚ Ý 3 TẬP THAM SỐ 2: water_rep.param
 CHÚ Ý 3 PARAMETER FILE 3 : ion.param
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 1 : protein_no_cter.top
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 2 : water.top
 CHÚ Ý 3 TẬP TOPO 4 : ion.top
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC CHÚ Ý VỀ TINH CHỈNH KHÁC: KHÔNG
 LIÊN KẾTSS 1 CYS S 23 CYS S 88
 LIÊN KẾTSS 2 CYS S 22 CYS S 96
 LIÊN KẾTSS 3 CYS S 94 CYS S 144
 LIÊN KẾTSS 4 CYS S 99 CYS S 146
 CRYST1 55,372 84,082 156,350 90,00 90,00 90,00 C 2 2 21 24
 ORIGX1 1,000000 0,000000 0,000000 0,00000
 ORIGX2 0,000000 1,000000 0,000000 0,00000
 ORIGX3 0,000000 0,000000 1,000000 0,00000
 SCALE1 0,018060 0,000000 0,000000 0,00000

SCALE2 0,000000 0,011893 0,000000 0,000000
 SCALE3 0,000000 0,000000 0,006396 0,000000

Fig. 6 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB5 với IL-17A của người. Phức homodime đầy đủ với chính xác hai lần đối xứng về tinh thể học được biểu diễn trong Fig.6 này. Fig. 6A biểu diễn hai mảnh Fv XAB5 ở dạng lắp đầy không gian, và homodime IL-17A được biểu diễn ở dạng hoạt họa. Fig. 6B biểu diễn hai mảnh Fv XAB5 ở dạng hoạt họa, và homodime IL-17A được biểu diễn ở dạng lắp đầy không gian. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fv XAB5 được biểu diễn lần lượt là bằng màu xám đậm và xám nhạt. Một mạch của homodime IL-17A được biểu diễn bằng màu xám nhạt, mạch còn lại được biểu diễn bằng màu xám đậm.

Fig. 7 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB5 với IL-17A của người. Cận cảnh kháng thể này, L-CDR1 mang ba đột biến đã tìm được bằng phương án thư viện thiên về hướng được hướng dẫn cấu trúc: Asn 30, Trp 31 và Glu 32. Các mạch bên của XAB5 này đóng góp các tương tác gắn kết mới với kháng nguyên IL-17A của người, cụ thể là với các gốc Tyr85, Phe133, Arg124, Pro 130, Leu 49 của IL-17A (tất cả từ cùng một tiểu phần IL-17A) và Val 45 (từ tiểu phần IL-17A khác).

Ví dụ 7. Sự phân tích tia X các biến thể của kháng thể biến đổi bằng sự trưởng thành ái lực: XAB4

Tách dòng và biểu hiện Fv XAB4 với đuôi tag có sáu gốc histidin ở đầu C của chuỗi nặng và đuôi Strep-tag ở đầu C của chuỗi nhẹ trong các tế bào E. coli TG1. Tinh sạch protein tái tổ hợp này bằng kỹ thuật sắc ký Ni-chelat.

Sau đó, tạo phức của mảnh Fv XAB4 với IL-17A của người bằng cách sử dụng hệ thống phương pháp tiêu chuẩn. Tóm lại là, trộn IL-17A của người (0,5mg) với lượng dư của Fv XAB4 (1,2mg) và phức hệ này đã được chạy trên sắc ký loại trừ kích thước SPX-75, trong dung dịch đệm TRIS nồng độ 10mM, độ pH là 7,4, NaCl nồng độ 25mM. Sau đó, cô đặc protein thu được bằng kỹ thuật siêu lọc đến nồng độ 6,9mg/ml và kết tinh hóa.

Sau đó, thực hiện tiếp các quy trình kết tinh hóa tiêu chuẩn. Tóm lại là, các tinh thể được phát triển ở 19°C trong các đĩa 24 giếng VDX, bằng cách sử dụng phương pháp

khuếch tán hơi nước trong các giọt treo. Dung dịch protein gốc đã được trộn theo tỷ lệ 2:1 với dung dịch đệm cho kết tinh hóa chứa PEG MME 5,000 nồng độ 15%, HES nồng độ là 0,1M có độ pH là 6,5, amoni sulfat nồng độ 0,2M. Kích thước giọt tổng cộng là 3,0 μ l. Trước khi thu kết quả tia X, một tinh thể đã được chuyển nhanh vào hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 của dung dịch đệm cho kết tinh chứa PEG MME 5,000 nồng độ 25%, glyxerol nồng độ 20%, và sau đó làm mát nhanh bằng nitơ lỏng.

Thu và xử lý dữ liệu tia X đã được thực hiện bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn. Tóm lại là, dữ liệu tia X với độ phân giải là 3,15Å đã được thu bằng hệ thống Swiss Light Source, hệ thống chùm tia X10SA, với thiết bị phát hiện Pilatus, sử dụng bước sóng phát xạ tia X là 0,99984Å. Tổng cộng là, đã ghi lại được 720 ảnh của mỗi dao động 0,25° ở khoảng cách giữa tinh thể và máy phát hiện là 500mm và được xử lý bằng gói phần mềm XDS. Tinh thể thuộc về nhóm không gian C222₁ với các tham số của khối tinh thể là a=55,76Å, b=87,11Å, c=156,31Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. R-sym là 5,5% với độ phân giải là 3,15Å và độ hoàn thiện dữ liệu là 99,9%.

Khi tinh thể của phức Fv XAB4 gần như đồng hình với tinh thể của phức Fv XAB5 (Ví dụ 6), cấu trúc của sau cùng này được sử dụng làm mô hình đầu vào để xác định cấu trúc bằng chương trình Phaser. Thực hiện lặp lại sự làm đúng mô hình và tinh chỉnh mô hình bằng Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) và Autobuster bản 1.11,2 (Buster bản 2.11,2), cho đến khi không có sự cải thiện đáng kể khác có thể được tạo ra với mô hình tinh thể học này. R và R tự do cuối cho toàn bộ dữ liệu lần lượt là 0,197 và 0,253. Mô hình tinh chỉnh cuối cùng cho thấy căn bậc hai của sai số bình phương trung bình (RMSD) của độ dài liên kết lý tưởng và góc liên kết lý tưởng lần lượt là 0,009Å và 1,0°.

(i) Kết quả

Kết quả của sự tinh chỉnh tia X phức Fv XAB4 với IL-17A của người được trình bày trong bảng 16 và cấu trúc không gian ba chiều của phức này được biểu diễn trong Fig. 8. Trong cấu trúc tinh thể này, giống như phức XAB5 (Ví dụ 6), phức Fv XAB4 có chính xác 2 lần đối xứng tinh thể học: đơn vị không đối xứng của tinh thể này chứa chỉ một nửa của toàn bộ, phức dimer. Fv XAB4 hình thành sự tương tác với cả hai tiểu phần IL-17A, nhưng đại đa số các tương tác nội phân tử chỉ với một tiểu phần (93% bề

mặt của IL-17A được che phủ bởi một Fv XAB4 được đóng góp bởi một tiểu phần). Sự phân tích tinh thể bằng tia X đã xác nhận rằng kháng thể biến thể XAB4 đã giữ được tính đặc hiệu đích và liên kết với ái lực cao với về cơ bản là cùng epitop với kháng thể XAB1 gốc ban đầu. Tuy nhiên, trong cấu trúc phức XAB4 này, như trong cấu trúc của phức XAB5, chuỗi nhẹ CDRL1 mang ba đột biến điểm cung cấp sự gắn kết với IL-17A của người được tăng cường. Như đã được mô tả trước đó với phức XAB5 (Ví dụ 6), Trp 31 của chuỗi nhẹ của XAB4 bị gài chặt trong các tương tác kỵ nước/vòng thơm mạnh với Tyr 85 của IL-17A và, ở mức độ thấp hơn, với Phe 133 của IL-17A. Asn 30 của chuỗi nhẹ của XAB4 cho liên kết H cho carbonyl mạch chính của Pro 130 của IL-17A và trong tương tác van der Waals với Leu 49 (trên cùng một tiểu phần IL-17A) và Val 45 (trên tiểu phần IL-17A khác). Glu 32 của chuỗi nhẹ của XAB4 làm ổn định thùy CDRL1 thông qua các tương tác được liên kết với H nội phân tử. Ngoài ra, Glu 32 tạo ra các tương tác tĩnh điện với Arg 124 của IL-17A, nhưng không bị gài chặt thành tương tác cầu muối “đầu-đầu” (Fig. 9). XAB4 cũng khác với XAB1 ở vị trí 56 của chuỗi nhẹ, là kết quả của đột biến Asn thành Gln đã được thiết kế để loại bỏ vị trí loại amin tiềm năng. Sự phân tích tia X này cho thấy rằng Gln 56 của XAB4 tạo ra các tương tác với các gốc Leu 76 và Trp 90 của protein kháng nguyên, và giảm khả năng tiếp xúc với dung môi của Tyr 67 và Ser 64 (Fig. 10).

Bảng 16. Tinh chỉnh tia X phức Fv XAB4 với IL-17A thu được bằng chương trình Autobuster.

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 SỰ TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 CHƯƠNG TRÌNH : BUSTER 2.11.2

CHÚ Ý 3 TÁC GIẢ : BRICOGNE,BLANC,BRANDL,FLensburg,KELLER,

CHÚ Ý 3 : PACIOREK,ROVERSI,SHARFF,SMART,VONRHEIN,WOMACK;

CHÚ Ý 3 : MATTHEWS,TEN EYCK,TRONRUD

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 DỮ LIỆU ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI CAO (ANGSTROM) : 3,15

CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI THẤP (ANGSTROM) : 78,15

CHÚ Ý 3 NGUỒN DỮ LIỆU (SIGMA(F)) : 0,0

CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN TRONG KHOẢNG (%) : 99,85

CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ : 6881

CHÚ Ý 3

CHÚ Ý 3 KHỚP VỚI DỮ LIỆU ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.

CHÚ Ý 3 PHƯƠNG PHÁP KIỂM CHỨNG CHÉO: THÔNG QUA

CHÚ Ý 3 CHỌN LỌC TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: NGẪU

NHIÊN

CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) : 0,998
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,1972
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO: 0,2531
 CHÚ Ý 3 CỖ TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO (%) : 5,01
 CHÚ Ý 3 ĐẾM ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: 345
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO: KHÔNG
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 KHỚP TRONG ĐỘ PHÂN GIẢI BIN CAO NHẤT.
 CHÚ Ý 3 TỔNG SỐ CÁC BIN ĐÃ SỬ DỤNG : 5
 CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN CAO (ANGSTROM) : 3,15
 CHÚ Ý 3 KHOẢNG PHÂN GIẢI BIN THẤP (ANGSTROM) : 3,52
 CHÚ Ý 3 ĐỘ HOÀN THIỆN BIN (THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) (%) : 99,85
 CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ TRONG BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) : 1916
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM + KIỂM TRA) : 0,2376
 CHÚ Ý 3 SỐ LẦN PHẢN XẠ TRONG BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 1820
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R BIN (TẬP HỢP THỰC NGHIỆM) : 0,2326
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN: 0,3295
 CHÚ Ý 3 CỖ TẬP HỢP KIỂM TRA CUAT GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN (%) : 5,01
 CHÚ Ý 3 ĐẾM TẬP HỢP KIỂM TRA CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN : 96
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ ƯỚC LƯỢNG CỦA GIÁ TRỊ R TỰ DO BIN : KHÔNG
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG PHẢI HYDRO ĐÃ SỬ DỤNG TRONG TINH CHỈNH.
 CHÚ Ý 3 CÁC NGUYÊN TỬ PROTEIN : 2499
 CHÚ Ý 3 CÁC NGUYÊN TỬ AXIT NUCLEIC : 0
 CHÚ Ý 3 SỐ NGUYÊN TỬ KHÔNG ĐỒNG NHẤT : 5
 CHÚ Ý 3 CÁC NGUYÊN TỬ DUNG MÔI: 0
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC GIÁ TRỊ B.
 CHÚ Ý 3 TỪ ĐỒ THỊ WILSON (A**2) : 102,42
 CHÚ Ý 3 GIÁ TRỊ B TRUNG BÌNH (TOÀN BỘ, A**2) : 124,95
 CHÚ Ý 3 TOÀN BỘ GIÁ TRỊ B KHÔNG ĐẲNG HƯỚNG.
 CHÚ Ý 3 B11 (A**2) : -11,5511
 CHÚ Ý 3 B22 (A**2) : -28,0012
 CHÚ Ý 3 B33 (A**2) : 39,5523
 CHÚ Ý 3 B12 (A**2) : 0,0000
 CHÚ Ý 3 B13 (A**2) : 0,0000
 CHÚ Ý 3 B23 (A**2) : 0,0000
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SAI SỐ TRỤC TỌA ĐỘ ƯỚC LƯỢNG.
 CHÚ Ý 3 ESD TỪ ĐỒ THỊ LUZZATI (A) : 0,787
 CHÚ Ý 3 DPI (BLOW EQ-9) DỰA TRÊN GIÁ TRỊ R TỰ DO (A) : 0,474
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 THAM CHIẾU: BLOW, D. (2002) ACTA CRYST D58, 792-797
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 HỆ SỐ TƯƠNG QUAN.

CHÚ Ý 3 HỆ SỐ TƯƠNG QUAN FO-FC : 0,9113
 CHÚ Ý 3 HỆ SỐ TƯƠNG QUAN FO-FC TỰ DO : 0,8848
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 TRỌNG LƯỢNG THEO TIA X: 20,89
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 HÀM HÌNH HỌC.
 CHÚ Ý 3 SỰ HẠN CHẾ CÁC THƯ VIỆN.
 CHÚ Ý 3 SỐ THƯ VIỆN SỬ DỤNG: 8
 CHÚ Ý 3 THƯ VIỆN 1 : protgeo_eh99.dat (V1.8) 20110121
 CHÚ Ý 3 TỪ ĐIỂN AXIT AMIN TIÊU CHUẨN. LIÊN KẾT VÀ GÓC TỪ
 CHÚ Ý 3 ENGH VÀ HUBER EH99. CÁC GIÁ TRỊ KHÁC DỰA TRÊN
 CHÚ Ý 3 TNT TRƯỚC ĐÓ HOẶC LẤY TỪ CCP4. BAO GỒM
 CHÚ Ý 3 CÁC NGUYÊN TỬ HYDRO.
 CHÚ Ý 3 THƯ VIỆN 2 : exoticaa.dat (V1.8) 20100430 TẬP HỢP
 CHÚ Ý 3 CÁC AXIT AMIN KHÔNG TIÊU CHUẨN, CHỦ YẾU LÀ EH91
 CHÚ Ý 3 KHÔNG CÓ INFO KHOẢNG CÁCH LÝ TƯỢNG
 CHÚ Ý 3 THƯ VIỆN 3 : nuclgeo.dat (V1.14) 20091104
 CHÚ Ý 3 THƯ VIỆN 4 : bcorrel.dat (V1.15) 20080423
 CHÚ Ý 3 THƯ VIỆN 5 : contact.dat (V1,20.2.1) 20110510
 CHÚ Ý 3 THƯ VIỆN 6 : idealdist_contact.dat (V1,7) 20110119
 CHÚ Ý 3 DỮ LIỆU SỐ HẠNG TƯƠNG TÁC KHOẢNG CÁCH LÝ TƯỢNG
 CHÚ Ý 3 NHƯ ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG PROLSQ. CÁC GIÁ TRỊ ĐƯỢC SỬ
 CHÚ Ý 3 DỤNG Ở ĐÂY DỰA TRÊN HỆ THỐNG XỬ LÝ REFMAC 5.5.
 CHÚ Ý 3 THƯ VIỆN 7 : giới hạn cho SO4 (ION SULFAT) từ từ điển cif
 CHÚ Ý 3 SO4.cif sử dụng refmacdict2tnt bản
 CHÚ Ý 3 1.23.2.7; các hợp chất chung buster v 1.0 (ngày 05 tháng 5
 CHÚ Ý 3 2011)
 CHÚ Ý 3 THƯ VIỆN 8 : assume.dat (V1.10) 20110113
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SỐ CÁC SỐ HẠNG HÀM HÌNH HỌC ĐÃ XÁC ĐỊNH: 15
 CHÚ Ý 3 SỐ HẠNG TÍNH HÀM KHỐI LƯỢNG.
 CHÚ Ý 3 ĐỘ DÀI LIÊN KẾT : 2566 ; 2,00 ;
 CHÚ Ý 3 GÓC LIÊN KẾT ĐIỀU HÒA: 3486 ; 2,00 ;
 CHÚ Ý 3 GÓC XOẴN ĐIỀU HÒA: 860 ; 2,00 ;
 CHÚ Ý 3 MẶT PHẶNG CACBON TAM GIÁC HÌNH SIN: 61 ; 2,00 ;
 CHÚ Ý 3 MẶT PHẶNG CHUNG ĐIỀU HÒA: 369 ; 5,00 ;
 CHÚ Ý 3 HỆ SỐ NHIỆT ĐẲNG HƯỚNG ĐIỀU HÒA: 2566 ; 20,00 ;
 CHÚ Ý 3 CÁC TƯƠNG TÁC KHÔNG GẮN KẾT KÉM ĐIỀU HÒA: KHÔNG ;
 KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 XOẴN PHI CHÍNH: KHÔNG ; KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 GÓC GIẢ QUAY : KHÔNG ; KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 XOẴN PHI CHÍNH KHÔNG ĐỐI XỨNG: 323 ; 5,00 ;
 CHÚ Ý 3 TỔNG CỦA SỰ CHIẾM CHỖ BÁN ĐIỀU HÒA: KHÔNG ; KHÔNG ;
 KHÔNG
 CHÚ Ý 3 KHOẢNG CÁCH HỮU ÍCH: KHÔNG ; KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 GÓC HỮU ÍCH : KHÔNG ; KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 XOẴN HỮU ÍCH : KHÔNG ; KHÔNG ; KHÔNG
 CHÚ Ý 3 SỐ HẠNG TƯƠNG TÁC DIST- LÝ TƯỢNG: 2984 ; 4.00 ;

CHÚ Ý 3 BẢN ĐIỀU HÒA
 CHÚ Ý 3 ĐỘ LỆCH RMS TỪ CÁC GIÁ TRỊ LÝ TƯỞNG.
 CHÚ Ý 3 ĐỘ DÀI LIÊN KẾT (Å) : 0,009
 CHÚ Ý 3 GÓC LIÊN KẾT (ĐỘ) : 1,00
 CHÚ Ý 3 GÓC XOẴN OMEGA PEPTIT (ĐỘ) : 4,39
 CHÚ Ý 3 GÓC XOẴN KHÁC (ĐỘ) : 18,96
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 SỰ ĐỒNG DẠNG.
 CHÚ Ý 3 NCS.
 CHÚ Ý 3 SỰ HIỆN THỊ NCS : KHÔNG CÓ
 CHÚ Ý 3 HẠN CHẾ ĐÍCH.
 CHÚ Ý 3 SỰ HIỆN THỊ ĐÍCH: LSSR
 CHÚ Ý 3 CẤU TRÚC ĐÍCH: xab5_il17a_complex_final_buster.pdb
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CHI TIẾT TLS.
 CHÚ Ý 3 SỐ NHÓM TLS: 3
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 NHÓM TLS: 1
 CHÚ Ý 3 TẬP HỢP : { $H|*$ }
 CHÚ Ý 3 ĐIỂM GỐC CỦA NHÓM NÀY (Å): 10,9676 -8,7396 -10,1379
 CHÚ Ý 3 TEN-XO T
 CHÚ Ý 3 T11: -0,1266 T22: 0,0257
 CHÚ Ý 3 T33: -0,2829 T12: -0,3040
 CHÚ Ý 3 T13: -0,0312 T23: 0,1050
 CHÚ Ý 3 TEN-XO L
 CHÚ Ý 3 L11: 7,4496 L22: 4,4770
 CHÚ Ý 3 L33: 4,2880 L12: 1,1123
 CHÚ Ý 3 L13: -1,8044 L23: 3,0307
 CHÚ Ý 3 TEN-XO S
 CHÚ Ý 3 S11: 0,2013 S12: 0,3070 S13: -0,5774
 CHÚ Ý 3 S21: 0,4752 S22: -0,5377 S23: 0,7096
 CHÚ Ý 3 S31: 1,0885 S32: -1,0885 S33: 0,3364
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 NHÓM TLS: 2
 CHÚ Ý 3 SET : { $I|*$ }
 CHÚ Ý 3 ĐIỂM GỐC CỦA NHÓM NÀY (Å): 22,7365 0,7101 -35,1243
 CHÚ Ý 3 TEN-XO T
 CHÚ Ý 3 T11: -0,1883 T22: 0,1529
 CHÚ Ý 3 T33: -0,3560 T12: 0,0318
 CHÚ Ý 3 T13: -0,1985 T23: 0,0144
 CHÚ Ý 3 TEN-XO L
 CHÚ Ý 3 L11: 2,7494 L22: 9,3427
 CHÚ Ý 3 L33: 3,8648 L12: 0,8073
 CHÚ Ý 3 L13: -0,6650 L23: -2,0544
 CHÚ Ý 3 TEN-XO S
 CHÚ Ý 3 S11: 0,0485 S12: 0,3188 S13: 0,0579
 CHÚ Ý 3 S21: 0,0595 S22: 0,1433 S23: 0,7000
 CHÚ Ý 3 S31: 0,0050 S32: -0,6066 S33: -0,1917

CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 NHÓM TLS: 3
 CHÚ Ý 3 TẬP HỢP : { L|* }
 CHÚ Ý 3 ĐIỂM GỐC CỦA NHÓM NÀY (A): 33,2517 -11,1794 -14,2151
 CHÚ Ý 3 TEN-XO T
 CHÚ Ý 3 T11: 0,0667 T22: -0,1645
 CHÚ Ý 3 T33: -0,2360 T12: 0,1870
 CHÚ Ý 3 T13: -0,2270 T23: -0,1209
 CHÚ Ý 3 TEN-XO L
 CHÚ Ý 3 L11: 3,3694 L22: 3,7848
 CHÚ Ý 3 L33: 8,8916 L12: -0,6497
 CHÚ Ý 3 L13: -2,6132 L23: 0,8234
 CHÚ Ý 3 TEN-XO S
 CHÚ Ý 3 S11: -0,0839 S12: -0,2629 S13: -0,1560
 CHÚ Ý 3 S21: 0,3804 S22: 0,7574 S23: -0,5378
 CHÚ Ý 3 S31: 1,0885 S32: 1,0885 S33: -0,6736
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC LƯU Ý VỀ SỰ TÍNH CHÍNH.
 CHÚ Ý 3 SỐ LƯU Ý VỀ SỰ TÍNH CHÍNH: 1
 CHÚ Ý 3 LƯU Ý 1: CÀI ĐẶT SỐ HẠNG TƯƠNG TÁC DIST LÝ TƯỞNG.
 CHÚ Ý 3 TẤT CẢ CÁC NGUYÊN TỬ CÓ TYP NGUYÊN TỬ CCP4 TƯ THƯ VIỆN
 CHÚ Ý 3
 CHÚ Ý 3 CÁC CHÚ Ý VỀ TÍNH CHÍNH KHÁC: KHÔNG
 CHÚ Ý 3
 LIÊN KẾTSS 1 CYS H 22 CYS H 96 1555 1555 2,03
 LIÊN KẾTSS 2 CYS I 94 CYS I 144 1555 1555 2,05
 LIÊN KẾTSS 3 CYS I 99 CYS I 146 1555 1555 2,04
 LIÊN KẾTSS 4 CYS L 23 CYS L 88 1555 1555 2,07
 CISPEP 1 TYR I 85 PRO I 86 0 3,67
 CISPEP 2 GLU I 125 PRO I 126 0 -9,25
 CISPEP 3 PRO I 126 PRO I 127 0 5,92
 CISPEP 4 SER L 7 PRO L 8 0 -6,50
 CISPEP 5 TYR L 94 PRO L 95 0 -6,52
 CRYST1 55,760 87,109 156,306 90,00 90,00 90,00 C 2 2 21

Fig. 8 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB4 với IL-17A của người. Fig. 8A biểu diễn hai mảnh Fv XAB4 ở dạng lấp đầy không gian, và homodime IL-17A được biểu diễn ở dạng hoạt hóa. Fig. 8B thể hiện hai mảnh Fv XAB4 ở dạng hoạt hóa, và homodime IL-17A được biểu diễn ở dạng lấp đầy không gian. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fv XAB4 được biểu diễn lần lượt là bằng màu xám đậm và xám nhạt. Một mạch của homodime IL-17A được biểu diễn bằng màu xám nhạt, mạch còn lại được biểu diễn bằng màu xám đậm.

Fig. 9 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB4 với IL-17A của người ở dạng quan sát cận cảnh của kháng thể này, L-CDR1 mang ba đột biến đã được tìm ra bằng phương án thư viện thiên về cấu trúc được hướng dẫn: Asn 30, Trp 31 và Glu 32. Mạch bên của XAB4 này đóng góp các tương tác mới với kháng nguyên IL-17A của người, cụ thể là với các gốc Tyr85, Phe133, Arg124, Pro 130, Leu 49 của IL-17A (tất cả đều từ cùng một tiểu phần IL-17A) và Val 45 (từ tiểu phần IL-17A khác).

Fig. 10 biểu diễn cấu trúc không gian ba chiều của phức Fv XAB4 với IL-17A của người ở dạng quan sát cận cảnh của kháng thể L-CDR2 cho thấy đột biến Asn 56 thành Gln. Mạch bên của XAB4 này đóng góp các tương tác gắn kết với các gốc Trp 90 và Leu 76 của IL-17A, và giảm khả năng tiếp xúc với dung môi của Tyr 67 và Ser 64 (tất cả đều từ cùng một tiểu phần IL-17A).

Tóm lại là, sự phân tích tinh thể học tia X đã khẳng định rằng các kháng thể biến thể được chọn cho phân tích tiếp theo đã giữ được tính đặc hiệu đích và đã gắn kết với ái lực cao với về cơ bản là giống epitop với kháng thể XAB1 gốc ban đầu. Sự gắn kết chặt hơn giữa mỗi kháng thể biến thể của các kháng thể biến thể này với IL-17A đã được quan sát thấy, là kết quả của sự bổ sung hoặc cải thiện các tương tác gắn kết (xem Bảng 17 sau).

Thực hiện sự xác định đặc điểm tiếp theo cho các kháng thể biến thể này được mô tả như sau.

Bảng 17. Các phân tích tia X của epitop IL-17A gắn với XAB1, XAB2, XAB4 và XAB5: tóm tắt và sự phân loại định tính, dựa trên cấu trúc của các gốc epitop. (*): gốc được đóng góp bởi tiểu phần IL-17A thứ hai.

Loại gốc epitop	XAB1	XAB2	XAB4	XAB5
Các gốc epitop rất quan trọng	Arg 78, Glu 80, Trp 90	Arg 78, Glu 80, Trp 90	Arg 78, Glu 80, Tyr 85, Trp 90, Arg 124	Arg 78, Glu 80, Tyr 85, Trp 90, Arg 124
Các gốc epitop	Pro 82, Ser 87,	Arg 43*, Pro	Pro 82, Ser 87,	Pro 82, Ser 87,

quan trọng khác	Val 88, Arg 124	82, Ser 87, Val 88, Arg 124	Val 88	Val 88
Các gốc đóng góp bổ sung	Val 45*, Leu 49, Ile 51, Asp 81, Glu 83, Tyr 85, Asn 131, Lys 137*	Pro 42*, Val 45*, Leu 49, Ile 51, Asp 81, Glu 83, Tyr 85, Asn 131, Lys 137*	Val 45*, Leu 49, Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*	Val 45*, Leu 49, Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*
Các gốc ít hoặc không đóng góp trực tiếp	Thr 44*, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Pro 86, Lys 93, Glu 118*, Pro 130, Phe 133	Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Pro 86, Lys 93, Glu 118*, Pro 130, Phe 133	Arg 43*, Asn 50, Ser 64, Tyr 67, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Glu 118*, Leu 122, Asn 131, Leu 135*	Arg 43*, Asn 50, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Glu 118*, Leu 122, Asn 131, Leu 135*

Ví dụ 8. Phép đo ái lực và đo khả năng phản ứng chéo bằng Biacore™

Sự xác định các tham số gắn kết động học đã thu được bằng các phép đo cộng hưởng từ Plasmon bề mặt bằng cách sử dụng hệ thống cảm biến sinh học quang học Biacore™ T200 hoặc T100 (<http://www.biacore.com>). Công nghệ này cho phép sự xác định không đánh dấu của các hằng số tốc độ rất nhỏ của tốc độ gắn kết (k_a) và phân ly (k_d) của phối tử với thụ thể. Do đó, đặc biệt là thích hợp để xác định đặc điểm các tương tác kháng nguyên-kháng thể.

Sự gắn kết gián tiếp của kháng thể với bề mặt chip của hệ thống Biacore™ đã được thực hiện qua kháng thể kháng Ig của người (hãng GE Healthcare Bio-Sciences AB; Cat.No. BR-1008-39) nồng độ là 25µg/ml trong dung dịch đệm cố định (dung dịch natri axetat nồng độ 10mM độ pH là 5,0) hoặc qua protein A (RepliGen: rPA-50) 20µg/ml trong dung dịch đệm cố định (dung dịch natri axetat nồng độ 10mM độ pH là 5,0 hoặc độ pH là 4,0).

Kháng thể được pha loãng thành dung dịch đệm mẫu trắng (blank) đến nồng độ cuối là 1,00µg/ml hoặc 1,25µg/ml.

Các phép đo ái lực cho sự xác định các hằng số phân ly của XAB4 hoặc XAB1 đã được thực hiện cho huIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 78, ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 0,14nM đến 8,8nM), heterodime huIL-17A/F tái tổ hợp (ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 0,13nM đến 8nM), huIL-17F tái tổ hợp (SEQ ID NO: 77; ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 7,8nM đến 500nM), IL-17A của khí đuôi dài (SEQ ID NO: 79; ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 0,63nM đến 40nM), IL-17A của khí vàng (SEQ ID NO: 82; ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 1,6nM đến 100nM), IL-17A của khí đuôi sóc (SEQ ID NO: 82; ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 0,63nM đến 40nM), mIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 83; ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 0,78nM đến 50nM), mIL-17A/F tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 5390-IL; ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 1,25nM đến 40nM) IL-17A của chuột (SEQ ID NO: 85; ví dụ, tăng gấp hai lần với các nồng độ từ 0,78nM đến 50nM), bằng cách sử dụng phương pháp ghép cặp/gắn kết gián tiếp (xem trên đây) và bề mặt được tái tạo bằng glyxin nồng độ 10mM có độ pH là 1,75 hoặc dung dịch MgCl₂ (nồng độ 3M). Một bề mặt chip đã được phủ và tái sử dụng mà không bị mất nhiều khả năng gắn kết. Chọn các nồng độ phối tử để bắt đầu nhỏ hơn K_D và để kết thúc là nồng độ lớn hơn K_D gấp 10 lần.

Các điều kiện tương tự nhưng không giống hệt đã được sử dụng để đo ái lực của XAB2 và XAB3.

Các đường chạy động năng được đánh giá bằng Phần mềm Điều khiển Biacore™ T200 bản 1.0. Tập hợp đầy đủ của các đường chạy động năng này với các nồng độ tăng lên được đưa vào cùng nhau và được gọi là một lần chạy. Hai mẫu có nồng độ bằng không (các lần chạy mẫu trắng) được bao gồm trong mỗi dãy nồng độ chất phân tích để tham chiếu kép trong suốt quá trình đánh giá dữ liệu.

Kết quả

Sự gắn kết của các kháng thể XAB4, XAB1, XAB2 và XAB3 kháng IL-17 với IL-17A của người, khí đuôi dài, khí đuôi sóc, khí vàng, chuột bạch và chuột, với heterodime

IL-17A/F của người và chuột bạch và với IL-17F của người đã được xác định bằng cộng hưởng từ Plasmon bề mặt sử dụng công nghệ Biacore™.

Các hằng số tốc độ động học của sự liên kết (k_a) và sự phân ly (k_d), cũng như hằng số cân bằng phân ly (K_D) đã được tính toán.

Dữ liệu về ái lực của XAB4 được trình bày trong bảng 18, dữ liệu về ái lực được trình bày trong bảng 19, dữ liệu về ái lực của XAB2 được trình bày trong bảng 20 và dữ liệu về ái lực của XAB3 được trình bày trong bảng 21. Sự trưởng thành ái lực của XAB1, XAB2 và XAB3 làm tăng ái lực về phía IL-17A của người, khỉ đuôi dài, chuột bạch và chuột.

Bảng 18. Hằng số ái lực và các hằng số tốc độ động học về sự gắn kết của XAB4.

Kháng nguyên	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
huIL-17A	$4,1 \pm 0,1 \text{ E}+06$	$2,3 \pm 0,1 \text{ E}-05$	$5,7 \pm 0,0 \text{ E}-12$
huIL-17A/F	$8,9 \pm 0,2 \text{ E}+5$	$< 1,0 \pm 0,0 \text{ E}-05^*$	$< 1,1 \pm 0,0 \text{ E}-11^*$
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynoIL-17A	$4.1 \pm 0,5 \text{ E}+05$	$1,3 \pm 0,0 \text{ E}-05$	$3,1 \pm 0,4 \text{ E}-11$
marmIL-17A	$1,2 \pm 0,0 \text{ E}+06$	$2,2 \pm 0,0 \text{ E}-05$	$1,8 \pm 0,0 \text{ E}-11$
rhesIL-17A	$3,0 \pm 0,1 \text{ E}+05$	$1,2 \pm 0,1 \text{ E}-05$	$4,0 \pm 0,1 \text{ E}-11$
mIL-17A	$3,8 \pm 0,1 \text{ E}+05$	$6,2 \pm 0,3 \text{ E}-05$	$1,6 \pm 0,1 \text{ E}-10$
mIL-17A/F	$2,421\text{E}+05$	$6,305\text{E}-05$	$2,604 \text{ E}-10$
ratIL-17A	$5,5 \pm 0,4 \text{ E}+05$	$4,6 \pm 0.9 \text{ E}-05$	$8,4 \pm 1,0 \text{ E}-11$

n.d. = không xác định được, sử dụng nồng độ kháng nguyên quá thấp và sự gắn kết không đặc hiệu của kháng nguyên với tế bào chảy tham chiếu được quan sát thấy ở các nồng độ kháng nguyên cao nhất (500-50pM).

*tốc độ phân ly nằm ngoài các giới hạn có thể đo được bằng thiết bị này ($k_d < 1 \times 10^{-5}$ 1/s)

Bảng 19. Hằng số ái lực và các hằng số tốc độ động học về sự gắn kết của XAB1.

Kháng nguyên	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
huIL-17A	2,33E+06	9,39E-05	4,03E-11
huIL-17A/F	9,097E+05	0,001342	1,475E-09
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynoIL-17A	2,14E+05	1,13E-04	5,26E-10
rhesIL-17A	8,87E+05	9,97E-05	1,12E-09
mIL-17A	4,05E+05	1,43E-04	3,53E-10
mIL-17A/F	1,8757E+05	9,547E-04	5,093E-09
ratIL-17A	5,44E+05	1,64E-04	3,01E-10

n.d. = không xác định được, sử dụng khoảng nồng độ kháng nguyên quá thấp và sự gắn kết không đặc hiệu của kháng nguyên với tế bào chảy tham chiếu được quan sát thấy ở ba nồng độ kháng nguyên cao nhất (500-50pM).

Bảng 20. Hằng số ái lực và các hằng số tốc độ động học về sự gắn kết của XAB2.

Kháng nguyên	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
huIL-17A	4,09E+06	7,12E-05	1,76E-11

Bảng 21. Hằng số ái lực và các hằng số tốc độ động học về sự gắn kết của XAB3.

Kháng nguyên	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
huIL-17A	5,48E+06	5,01E-05	9,58E-12
huIL-17A/F	3,37E+06	1,03E-04	3,29E-11
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynoIL-17A	1,21E+06	4,23E-05	3,49E-11
mIL-17A	5,87E+05	1,01E-04	1,74E-10
ratIL-17A	9,05E+05	7,59E-05	8,26E-11

n.d. = không xác định được

Các hằng số ái lực và các hằng số tốc độ động học của XAB2, XAB3 và XAB5 là có thể so sánh được với ái lực và hằng số tốc độ động học của XAB4.

Ví dụ 9. Gắn kết trong thử nghiệm ELISA với IL-17A và các thành viên khác cùng họ với IL-17A

Thực hiện sự chuẩn độ các kháng thể quan tâm trên các kháng nguyên khác nhau. Tóm lại là, phủ lên các giếng của đĩa ELISA vi giếng microtiter (đĩa Nunc Immuno MaxiSorp: hãng Invitrogen, Cat# 4-39454A) bằng huIL-17A tái tổ hợp nồng độ 1µg/ml (SEQ ID NO: 76; 1,8mg/ml), huIL-17A/F tái tổ hợp (0,59mg/ml), huIL-17F tái tổ hợp (SEQ ID NO: 77; 1,8mg/ml), huIL-17B tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 1248IB/CF), huIL-17C tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 1234IL/CF), tái tổ hợp huIL-17D (hãng R&D Systems® Cat# 1504IL/CF), huIL-17E tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 1258-IL/CF), cynoIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 79; 0,21mg/ml), cynoIL-17F tái tổ hợp (SEQ ID NO: 80; 1,525mg/ml), mIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 83; 2,8mg/ml), mIL-17A/F tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 5390-IL), mIL-17F tái tổ hợp (SEQ ID NO: 84; 0,2mg/ml) và ratIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 85; 3,8mg/ml) (100µl/giếng) trong dung dịch nước muối chứa đệm phosphat (PBS) không chứa Ca và Mg (nồng độ 10x; hãng Invitrogen Cat# 14200-083) NaN₃ nồng độ 0,02% (hãng Sigma Cat# S-8032) và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C.

Ngày kế tiếp, cố định các đĩa vi giếng microtiter này bằng 300µl PBS/BSA nồng độ 2% (phân đoạn V; hãng Roche Cat# 10 735 094 001)/NaN₃ nồng độ 0,02% trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, rửa các đĩa này 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05% (hãng Sigma Cat# P7949) /NaN₃ nồng độ 0,02%. Bổ sung XAB4 hoặc XAB1 ở nồng độ 1µg/ml vào các giếng lặp lại ba lần (100µl/giếng) trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng.

Sử dụng các kháng thể đối chứng để kiểm tra sự phủ kháng nguyên lên các đĩa này, và cụ thể là mAb của chuột bạch kháng huIL-17F, (hãng Novartis, nồng độ 5µg/ml), kháng thể của dê kháng hu-IL-17B (hãng R&D Systems® Cat# AF1248; nồng độ 10µg/ml), mAb của chuột bạch kháng huIL-17C (hãng R&D Systems® Cat# MAB1234; nồng độ 10µg/ml), kháng thể của dê kháng huIL-17D (hãng R&D

Systems® Cat# AF1504; nồng độ 10µg/ml), mAb của chuột bạch kháng hu-IL-17E (hãng R&D Systems® Cat# MAB1258; nồng độ 10µg/ml), kháng thể của chuột bạch kháng mIL-17A hoặc kháng thể của chuột bạch kháng mIL-17A/F (hãng Novartis; nồng độ 1µg/ml), và kháng thể kháng của chuột kháng mIL-17F (hãng R&D Systems® Cat# MAB2057; nồng độ 1µg/ml) (100µl/giếng trong PBS, NaN₃ nồng độ 0,02% trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng).

Sau đó, rửa các đĩa này 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%. Sau đó, bổ sung kháng thể của dê kháng IgG của người tiếp hợp với alkaline phosphatase (hãng Sigma Cat# A9544) ở tỷ lệ pha loãng là 1/20000 (100µl/giếng) vào các giếng đã nhận kháng thể thử nghiệm trong thời gian 2 giờ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Bổ sung kháng thể của dê kháng IgG của chuột bạch tiếp hợp với alkaline phosphatase (hãng Sigma Cat# A7434) ở tỷ lệ pha loãng là 1/10000 (100µl/giếng) vào các giếng đã nhận mAb của chuột bạch trong thời gian 2 giờ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Bổ sung kháng thể của chuột bạch kháng IgG của dê tiếp hợp với alkaline phosphatase (hãng Sigma Cat# A8062) ở tỷ lệ pha loãng là 1/50000 (100µl/giếng) vào các giếng nhận các kháng thể của dê trong thời gian 2 giờ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa các đĩa này 4 lần và bổ sung thêm 100µl cơ chất (viên p-nitrophenyl phosphat; hãng Sigma; loại 5mg Cat# N9389; loại 20mg Cat# N2765) đã được hòa tan trong dung dịch đệm diethanolamine có độ pH là 9,8, để thu nồng độ cuối là 1mg/ml, vào mỗi giếng.

Sau 30 phút, đọc các đĩa này trong hệ thống đọc vi đĩa Spectra Max M5 (hãng Molecular Devices) sử dụng các nồng độ lọc là 405nm và 490nm. Các giá trị được tính là giá trị trung bình ± SEM của các giá trị lặp lại ba lần.

Kết quả

Các nghiên cứu này cho thấy XAB4 và XAB1 có khả năng gắn kết với IL-17A của người và chuột bạch, và IL-17A/F của người và chuột bạch. Ngoài ra, kết quả này còn cho thấy rằng XAB4 có khả năng gắn kết IL-17A của khỉ đuôi dài và chuột. Không phát hiện thấy sự gắn kết với IL-17A của người, khỉ đuôi dài và chuột bạch trong các điều kiện thí nghiệm này cũng như không phát hiện thấy sự gắn kết với các thành viên khác thuộc họ IL-17 của người (IL-17B, IL-17C, IL-17D và IL-17E).

Bảng 22. Khả năng phản ứng chéo của XAB4 và XAB1 với các thành viên thuộc họ IL-17 của người, khỉ đuôi dài, chuột bạch và chuột cống trắng, từ thử nghiệm ELISA.

	XAB4 (1µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	Kháng thể đối chứng (1µg/ml hoặc 10µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	XAB1 (1µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	Kháng thể đối chứng (1µg/ml hoặc 10µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)
hu IL-17A	2,471 ± 0,0448		1,302 ±0,0554	
hu IL- 17A/F	2,137 ± 0,0429		1,222 ±0,0202	
hu IL-17F	0,049 ± 0,0056		0,032 ±0,0005	1,913 ± 0,0483
hu IL-17B	0,034 ± 0,0007	0,283 ± 0,0066	0,049 ±0,0013	1,441 ± 0,0283
hu IL-17C	0,036 ± 0,0002	0,290 ± 0,0027	0,032 ±0,0002	0,558 ± 0,0169
hu IL-17D	0,034 ± 0,0005	0,292 ± 0,0048	0,031 ±0,0010	0,867 ± 0,0372
hu IL-17E	0,035 ± 0,0014	0,833 ± 0,0239	0,033 ±0,0003	2,054 ± 0,0378
cyno IL- 17A	1,926 ± 0,0355			
cyno IL- 17F	0,085 ± 0,0336			
IL-17A của chuột bạch	1,585 ± 0,0428	1,086 ± 0,0119	1,439 ±0,0354	3,697 ± 0,0602
IL-17A/F của chuột bạch	2,263 ± 0,0243	1,142 ± 0,0315	1,762 ±0,0097	2,084 ± 0,0223

IL-17F của chuột bạch	0,098 ± 0,0060	1,294 ± 0,0134	0,044 ± 0,0008	1,770 ± 0,0302
IL-17A của chuột	1,772 ± 0,1668			

Ví dụ 10. Phản ứng chéo với các interleukin khác của người, chuột bạch và chuột cống trắng bằng thử nghiệm ELISA

Trong một tập hợp các thí nghiệm khác, khả năng phản ứng chéo của kháng thể theo sáng chế với cytokin chọn lọc của người, chuột bạch hoặc chuột đã được đánh giá.

Ba giếng lặp lại của các đĩa ELISA vi giếng microtiter (đĩa Nunc Immuno MaxiSorp: hãng Invitrogen Cat# 4-39454A) đã được phủ với các cytokin sau ở thể tích 100µl/giếng: huIL1β tái tổ hợp (hãng Novartis), huIL-3 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 203-IL/CF), huIL-4 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 204-IL/CF), huIL-6 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 206-IL-1010/CF), huIL-8 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 208-IL-010/CF), huIL-12 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 219-IL-005/CF), huIL-13 tái tổ hợp (hãng Novartis), huIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 76), huIL-17A/F tái tổ hợp, huIL-17F tái tổ hợp (SEQ ID NO: 77), huIL-18 tái tổ hợp (hãng MBL Cat# B003-5), huIL-20 tái tổ hợp (hãng Novartis), huIL-23 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 1290-IL-010/CF), huIFNγ tái tổ hợp (hãng Roche), huTNFα tái tổ hợp (hãng Novartis), huEGF tái tổ hợp (hãng Sigma Cat#E9644.), huTGFβ2 tái tổ hợp (hãng Novartis), mIL-1β tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 401-ML), mIL-2 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® 402-ML-020/CF), mIL-6 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 406-ML-010/CF), mIL-12 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 419-ML-010/CF), mIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 83), mIL-17A/F tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 5390-IL), mIL-17F tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 2057—IL/CF), mIL-18 tái tổ hợp (MBL Cat#B004-5), mIL-23 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 1887-ML), mIFN-γ tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 485-MT mTNFα tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 410-MT), IL-4 của chuột tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 504-RL/CF), IL-6 của chuột tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 506-RL-010), ratIL-12 tái tổ hợp (hãng R&D

Systems® Cat# 1760-RL/CF), ratIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 85), ratIL-23 tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 3136-RL-010/CF), ratTNF α tái tổ hợp (hãng R&D Systems® Cat# 510-RT/CF), ở nồng độ 1 μ g/ml, ngoại trừ mL-6 tái tổ hợp, mL-12 tái tổ hợp và mTNF α tái tổ hợp được phủ ở nồng độ 0,5 μ g/ml trong dung dịch nước muối chứa đệm phosphate (PBS) không chứa Ca và Mg (nồng độ 10x; hãng Invitrogen Cat# 14200-083) NaN₃ nồng độ 0,02% (hãng Sigma Cat# S-8032) và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C.

Ngày kế tiếp, cố định các đĩa vi giếng microtiter bằng 300 μ l dung dịch PBS/BSA nồng độ 2% (phân đoạn V; hãng Roche Cat# 10 735 094 001)/NaN₃ nồng độ 0,02% trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, rửa các đĩa ELISA 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05% (hãng Sigma Cat# P7949) /NaN₃ nồng độ 0,02%.

Bổ sung các kháng thể theo sáng chế ở nồng độ 10 μ g/ml (100 μ l/giếng) trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Để xác định sự phủ kháng nguyên lên các đĩa ELISA này, sử dụng 100 μ l/giếng của các kháng thể đối chứng sau: kháng thể của chuột bạch kháng huIL1 β (hãng R&D Systems® Cat# MAB601), kháng thể của chuột bạch kháng huIL-3 (hãng R&D Systems® Cat# MAB603), kháng thể của chuột bạch kháng huIL4 (hãng R&D Systems® Cat# MAB604), kháng thể của chuột bạch kháng huIL-6 (hãng R&D Systems® Cat# MAB206), kháng thể của chuột bạch kháng hu-IL8 (hãng R&D Systems® Cat# MAB208), kháng thể của chuột bạch kháng huIL-12 (hãng R&D Systems® Cat# MAB219), kháng thể của chuột bạch kháng huIL-13 (hãng Novartis), kháng thể của chuột bạch kháng huIL-17A (hãng Novartis), kháng thể của chuột bạch kháng huIL-17F (hãng Novartis), kháng thể của chuột bạch kháng huIL-18 (MBL Cat# D043-3), kháng thể của chuột bạch kháng huIL-20 (Abcam Cat# ab57227), kháng thể của dê kháng huIL-23 (hãng R&D Systems® Cat# AF1716), kháng thể của chuột bạch kháng huIFN- γ (hãng R&D Systems® Cat# MAB285), kháng thể của chuột bạch kháng huTNF- α (hãng R&D Systems® Cat# MAB610), kháng thể của chuột bạch kháng hu-EGF (hãng R&D Systems® Cat# MAB236), kháng thể của người kháng huTGF β 2 (hãng Novartis), kháng thể của chuột kháng mL-1 β (hãng R&D Systems® Cat# MAB401), kháng thể của chuột kháng mL-2 (hãng R&D Systems® Cat# MAB402), kháng thể của chuột kháng mL-6 (hãng R&D Systems® Cat# MAB406), kháng thể của chuột kháng mL-12 (hãng R&D Systems® Cat# MAB419), kháng thể

của chuột bạch kháng m/ratIL-17A (hãng Novartis), kháng thể của chuột kháng mIL-17F (hãng R&D Systems® Cat# MAB2057), kháng thể của chuột kháng mIL-18 (MBL Cat# D047-3), kháng thể của chuột kháng mIFN- γ (hãng R&D Systems® Cat# MAB485), kháng thể của dê kháng mTNF α (hãng R&D Systems® Cat# AF-410-NA), kháng thể của chuột bạch kháng IL-4 của chuột (hãng R&D Systems® Cat# MAB504), kháng thể của dê kháng IL-6 của chuột (hãng R&D Systems® Cat# AF506), kháng thể của dê kháng IL-12 của chuột (hãng R&D Systems® Cat# AF1760), kháng thể của chuột bạch kháng IL-23 của chuột cống trắng (hãng R&D Systems® Cat# MAB3510), kháng thể của chuột bạch kháng TNF α của chuột (hãng R&D Systems® Cat# MAB510). Các kháng thể đối chứng này được bổ sung vào ở nồng độ 1 μ g/ml hoặc 5 μ g/ml, trong PBS, NaN₃ nồng độ 0,02% trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng.

Sau đó, rửa các đĩa ELISA 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%. Sau đó, bổ sung kháng thể của dê kháng IgG của người tiếp hợp với alkanlin phosphataza (hãng Sigma Cat# A9544) ở tỷ lệ pha loãng là 1/20000 vào các giếng chứa kháng thể của người (100 μ l/giếng). Bổ sung kháng thể của dê kháng IgG của chuột bạch tiếp hợp với alkanlin phosphataza (hãng Sigma Cat# A1047) ở tỷ lệ pha loãng là 1/10000 vào các giếng chứa kháng thể của chuột bạch (100 μ l/giếng). Bổ sung kháng thể của thỏ kháng IgG của dê tiếp hợp với alkanlin phosphataza (hãng Sigma Cat# A7650) ở tỷ lệ pha loãng là 1/1000 vào các giếng chứa kháng thể của dê (100 μ l/giếng) và bổ sung kháng thể của thỏ kháng IgG của chuột tiếp hợp với alkanlin phosphataza (hãng Sigma Cat# A6066) ở tỷ lệ pha loãng là 1/20000 vào các giếng chứa kháng thể của chuột (100 μ l/giếng). Ủ với các kháng thể thứ cấp này trong thời gian 2 giờ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa các đĩa ELISA 4 lần và bổ sung vào mỗi giếng 100 μ l cơ chất (p-nitrophenyl phosphat dạng viên; Sigma; loại 5mg Cat# N9389 hoặc loại 20mg Cat# N2765) được hòa tan trong dung dịch đệm dietanolamin có độ pH là 9,8, đến nồng độ cuối là 1mg/ml.

Sau 30 phút, đọc các đĩa ELISA ở nhiệt độ phòng hoặc ở nhiệt độ 4°C trong hệ thống đọc Microplate Spectra Max M5 (hãng Molecular Devices) sử dụng các bước sóng lọc là 405nm và 490nm. Giá trị cuối được tính bằng giá trị trung bình $\pm$ SEM của giá trị lặp lại ba lần.

Kết quả

Dữ liệu thu được cho thấy rằng cả XAB4 và XAB1 có tính chọn lọc cao với IL-17A có nguồn gốc của người, chuột bạch và chuột và với IL-17A/F có nguồn gốc của người, chuột bạch. Ngoài ra, trong các điều kiện đã được thử nghiệm, khả năng phản ứng của XAB1 ở nồng độ 10µg/ml với IL-17F của người (không thấy ở nồng độ 1µg/ml, đã nêu trên) không được quan sát thấy trong trường hợp của XAB4. Không phát hiện được khả năng phản ứng với các xytokin khác.

Bảng 23. Khả năng phản ứng chéo của XAB4 và XAB1 với các xytokin của người bằng thử nghiệm ELISA.

	XAB4 (10µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	Kháng thể đối chứng (5µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	XAB1 (10µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	Kháng thể đối chứng (1µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)
IL1β	0,015 ± 0,0075	0,867 ± 0,0107	-0,110 ± 0,0901	3,071 ± 0,0486
IL3	0,167 ± 0,1288	0,732 ± 0,0194	-0,049 ± 0,0738	2,931 ± 0,0779
IL4	0,047 ± 0,0089	0,806 ± 0,0617	0,057 ± 0,0458	2,555 ± 0,1499
IL6	-0,015 ± 0,0103	1,452 ± 0,2020	-0,044 ± 0,0838	2,976 ± 0,1025
IL8	0,018 ± 0,0078	3,130 ± 0,0109	0,058 ± 0,0431	3,153 ± 0,1228
IL12	0,009 ± 0,0058	0,853 ± 0,0496	-0,097 ± 0,1600	2,964 ± 0,1370
IL13	0,019 ± 0,0085	2,639 ± 0,0309	0,125 ± 0,0706	2,639 ± 0,0309
IL17A	3,178 ± 0,0697	3,136 ± 0,0644	2,745 ± 0,0879	2,731 ± 0,0850
IL17A/F	3,100 ± 0,0458	3,024 ± 0,0816	2,644 ± 0,2517	3,024 ± 0,0816
IL17F	0,035 ± 0,0138	3,114 ± 0,0672	0,613 ± 0,4162	3,185 ± 0,0110
IL18	-0,001 ± 0,0234	3,313 ± 0,2080	-0,086 ± 0,0170	3,313 ± 0,2080
IL20	0,039 ± 0,0117	3,039 ± 0,0671	0,335 ± 0,2442	3,118 ± 0,0252
IL23	-0,022 ± 0,0450	3,435 ± 0,0878	0,085 ± 0,0678	3,350 ± 0,0886
IFN-γ	0,048 ± 0,0676	3,419 ± 0,0404	0,059 ± 0,0511	3,236 ± 0,0312
TNF-α	0,009 ± 0,0197	3,373 ± 0,0550	0,289 ± 0,0318	3,275 ± 0,0440

EGF	$0,126 \pm 0,0858$	$3,432 \pm 0,1050$	$0,062 \pm 0,0427$	$3,233 \pm 0,1126$
TGF β 2	$0,018 \pm 0,0190$	$3,397 \pm 0,0358$	$0,146 \pm 0,0653$	$3,246 \pm 0,0303$
BSA	$0,009 \pm 0,0194$	$0,010 \pm 0,0192$	$0,043 \pm 0,0033$	$0,149 \pm 0,0558$

N.B. các giá trị âm là do thực tế là đã trừ đi giá trị mẫu trắng (giá trị O.D. của các giếng không chứa kháng thể đặc hiệu).

Bảng 24. Khả năng phản ứng chéo của XAB4 và XAB1 với các xytokin của chuột bạch bằng thử nghiệm ELISA.

	XAB4 (10 μ g/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình $\pm$ SEM)	Kháng thể đối chứng (5 μ g/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình $\pm$ SEM)	XAB1 (10 μ g/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình $\pm$ SEM)	Kháng thể đối chứng (5 μ g/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình $\pm$ SEM)
IL-1 β	$0,022 \pm 0,0057$	$0,611 \pm 0,0665$	$0,007 \pm 0,0123$	$0,624 \pm 0,0455$
IL2	$0,024 \pm 0,0227$	$3,548 \pm 0,1283$	$0,022 \pm 0,0125$	$3,295 \pm 0,0557$
IL6	$0,031 \pm 0,0063$	$3,291 \pm 0,0174$	$0,038 \pm 0,0091$	$3,340 \pm 0,1115$
IL12	$0,035 \pm 0,0110$	$3,359 \pm 0,0094$	$-0,005 \pm 0,0121$	$3,295 \pm 0,0331$
IL17A	$3,285 \pm 0,0445$	$3,180 \pm 0,0702$	$2,974 \pm 0,0281$	$3,186 \pm 0,0505$
IL17A/F	$3,342 \pm 0,1047$	$3,407 \pm 0,1102$	$3,169 \pm 0,0340$	$3,214 \pm 0,0145$
IL17F	$0,034 \pm 0,0122$	$3,359 \pm 0,0247$	$-0,058 \pm 0,0326$	$3,264 \pm 0,0309$
IL18	$0,054 \pm 0,0149$	$2,650 \pm 0,0227$	$0,022 \pm 0,0123$	$2,572 \pm 0,0145$
IL23	$0,058 \pm 0,0139$	$0,601 \pm 0,0314$	$0,009 \pm 0,0007$	$0,590 \pm 0,0378$
IFN- γ	$0,038 \pm 0,0114$	$2,751 \pm 0,0515$	$0,048 \pm 0,0063$	$2,388 \pm 0,2351$
TNF- α	$0,065 \pm 0,0154$	$3,258 \pm 0,1097$	$0,025 \pm 0,0081$	$3,476 \pm 0,0714$
BSA	$0,015 \pm 0,0078$	$0,035 \pm 0,0047$	$0,015 \pm 0,0078$	$0,035 \pm 0,0047$

N.B. các giá trị âm là do thực tế là đã trừ đi giá trị mẫu trắng (giá trị O.D. của các giếng không chứa kháng thể đặc hiệu).

Bảng 25. Khả năng phản ứng chéo của XAB4 và XAB1 với xytokin của chuột bạch bằng thử nghiệm ELISA.

	XAB4	Kháng thể đối	XAB1	Kháng thể đối
--	------	---------------	------	---------------

	(10µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	chứng (5µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	(10µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)	chứng (5µg/ml) Giá trị O.D (giá trị trung bình ± SEM)
IL4	0,026 ± 0,0082	3,168 ± 0,0297	0,017 ± 0,0092	3,324 ± 0,1092
IL6	0,021 ± 0,0028	3,116 ± 0,0318	0,000 ± 0,0141	3,253 ± 0,1078
IL12	0,009 ± 0,0113	3,185 ± 0,0921	-0,007 ± 0,0082	3,310 ± 0,0692
IL17A	3,483 ± 0,0910	3,156 ± 0,0890	1,202 ± 0,0136	3,359 ± 0,0670
IL23	0,023 ± 0,0050	3,380 ± 0,2127	0,011 ± 0,0010	3,199 ± 0,1078
TNF-α	0,020 ± 0,0104	3,346 ± 0,1376	0,003 ± 0,0029	3,159 ± 0,0854
BSA	0,015 ± 0,0078	0,035 ± 0,0047	0,015 ± 0,0078	0,035 ± 0,0047

N.B. các giá trị âm là do thực tế là đã trừ đi giá trị mẫu trắng (giá trị O.D. của các giếng không chứa kháng thể đặc hiệu).

Ví dụ 11. Thử nghiệm ức chế gắn kết cạnh tranh in vitro của IL-17A – IL-17RA và IL-17A/F-IL-17RA

IL-17RA của người đã được sử dụng từ dung dịch gốc (BTP22599: 1,68mg/ml = 46,2 µM). Phủ các đĩa ELISA vi giếng microtiter với IL-17RA của người (100µl/giếng, 1µg/ml, ~27,5nM) trong PBS/NaN₃ nồng độ 0,02% và ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Ngày kế tiếp, cố định các đĩa này bằng 300µl dung dịch PBS/BSA nồng độ 2%/NaN₃ nồng độ 0,02% trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, rửa các đĩa này 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%.

Sau bước chuẩn bị này, chuẩn độ các biến thể của kháng thể (50µl, các nồng độ từ 12nM đến 0,12nM với IL-17A và 1200nM đến 40nM với IL-17A/F, lặp lại các bước này 3 lần) được ủ trước với IL-17A của người gắn biotin (50µl ở nồng độ 0,94nM) hoặc IL-17A/F (50µl ở nồng độ 31nM) trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ phòng.

Bổ sung 100µl hỗn hợp nêu trên vào giếng ELISA trong thời gian 3 giờ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa bằng PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%, bổ sung bốn lần streptavidin tiếp hợp với alkanlin phosphataza ở tỷ lệ pha loãng cuối cùng là 1/10000 (100µl/giếng). Sau 45 phút ở nhiệt độ phòng, rửa lại các

đĩa này 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02% và bổ sung cơ chất p-nitrophenylphosphat trong dung dịch đệm dietanolamin có độ pH là 9,8 (nồng độ 1mg/ml).

Sau 30 phút, đọc các đĩa thử nghiệm trong hệ thống đọc vi đĩa Max M5 Microplate, bước sóng lọc là 405nm và 490nm (lặp lại ba lần). Sự tính toán phần trăm ức chế và IC₅₀ của các biến thể khác nhau được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình đường logistic bốn tham số (Excel Xlfit; FIT model 205).

Kết quả

Các dữ liệu cho thấy rằng cả XAB4 và XAB1 đều có khả năng ngăn không cho huIL-17A và huIL-17A/F gắn kết với huIL-17RA. Ái lực cao hơn của XAB4 với IL-17A và IL-17A/F được phản ánh bằng khả năng ức chế lớn hơn. Các giá trị IC₅₀ được trình bày trong bảng sau. Các nồng độ cao hơn cần để ngăn sự tương tác của IL-17A/F-IL-17RA phần lớn được giải thích bằng thực tế là các nồng độ IL-17A/F được sử dụng trong thử nghiệm này cao hơn gấp khoảng 30 lần. Kháng thể gắn kết với tiểu phần A của A/F và do đó không thể ngăn cản sự gắn kết của tiểu phần F với IL-17RA là tiểu phần khá yếu, trong khoảng nồng độ 300nM.

Bảng 26. XAB4 và XAB1 ức chế sự gắn kết của huIL-17A và huIL-17A/F với huIL-17RA.

Sự tương tác Phối tử\Thụ thể	XAB4 IC ₅₀ (nM) (giá trị trung bình ± SEM)	XAB1 IC ₅₀ (nM) (giá trị trung bình ± SEM)	Kháng thể đối chứng (nM)
huIL-17A\huIL-17RA	0,321 ± 0,037	0,830 ± 0,112	>60
huIL-17A/F\huIL-17RA	153,9 ± 18,9	301,3 ± 51,9	

Ví dụ 12. Sự vô hiệu hóa in vitro hoạt tính của IL-17A và IL-17A/F của người bằng các biến thể kháng thể theo sáng chế

(i) Thử nghiệm trên các tế bào C20A4Cl6 (đòng tế bào sụn của người)

Nuôi cấy các tế bào C20A4Cl6, hoặc C-20/A4, dòng 6, (Goldring MB, et al 1994, J Clin Invest; 94:2307-16) trong RPMI (hãng Gibco Cat# 61870-010) bổ sung huyết thanh nhau thai bê nồng độ 10% chứa rất ít IgG (hãng Gibco Cat# 16250-078; lot 1074403), β -mercapto etanol (nồng độ cuối là $5 \times 10^{-5} \text{M}$), và Normoxin (nồng độ 0,1mg/ml; hãng InvivoGen Cat# ant-nr-2).

Tách các tế bào bám dính vào đĩa nuôi cấy bằng dung dịch Accutase (PAA Cat# L11-007). Phân bố các tế bào vào các đĩa vi giếng microtiter 96 giếng ở mật độ 5×10^3 trong 100 μl /giếng trong RPMI 1640 (hãng Gibco Cat# 61870-010) không chứa huyết thanh nhau thai bê, β -mercaptoetanol (nồng độ cuối là $5 \times 10^{-5} \text{M}$) và Normoxin (nồng độ 0,1mg/ml).

Để các tế bào C20A4Cl6 bám dính vào đĩa thử nghiệm qua đêm. Sáng ngày kế tiếp, bổ sung các nồng độ khác nhau của huIL-17A tái tổ hợp (SEQ ID NO: 76; MW 32000), huIL-17A/F tái tổ hợp (MW 32800), huIL-17F tái tổ hợp (SEQ ID NO: 77; MW 30000), hoặc môi trường đối chứng có chứa TNF α của người (hãng Novartis; MW 17500) ở thể tích 50 μl vào 3 giếng lặp lại trong sự có mặt của 50 μl của các kháng thể thử nghiệm với các nồng độ khác nhau (XAB4; XAB1), kháng thể đối chứng (dung dịch Simulect® nồng độ 1,1%, Batch C0011; 831179) hoặc môi trường đối chứng đến khi đạt thể tích cuối là 200 μl /giếng và nồng độ cuối của huyết thanh nhau thai bê là 0,5%.

HuIL-17A (30pM), huIL-17A/F (300pM) và huIL-17F (10nM) được bổ sung cùng với huTNF α (6pM). Bổ sung huIL-17A vô hiệu hóa hóa ở nồng độ từ 1nM đến 0,003nM, huIL-17A/F vô hiệu hóa hóa ở nồng độ từ 10nM đến 0,03nM và huIL-17F ở nồng độ từ 3 μM đến 30nM vào XAB4 (MW 150000). Bổ sung huIL-17A vô hiệu hóa hóa ở nồng độ từ 3nM đến 0,01nM, huIL-17A/F vô hiệu hóa hóa ở nồng độ từ 10 đến 0,03nM đến huIL-17F ở nồng độ từ 3 μM đến 30nM vào XAB1 (MW 150000). Bổ sung Simulect® ở nồng độ từ 3 μM đến 100nM. Sau khi ủ trong thời gian 24 giờ, thu

dịch nổi của dịch nuôi tế bào và sự đo sự tạo thành của huIL-6 bằng thử nghiệm ELISA.

(ii) Thử nghiệm trên các tế bào BJ (các nguyên bào sợi của người)

Nuôi cấy các tế bào BJ (các nguyên bào sợi da của người từ hăng ATCC Cat# CRL 2522) trong RPMI (hãng Gibco Cat# 61870-010) được bổ sung huyết thanh nhau thai bê nồng độ 10% chứa lượng rất nhỏ IgG (hãng Gibco Cat# 16250-078; lot 1074403), β -mercaptoetanol (nồng độ cuối 5×10^{-5} M) và Normoxin (nồng độ 0,1mg/ml; hãng InvivoGen Cat# ant-nr-2). Tách các tế bào bám dính trên đĩa nuôi cấy bằng cách sử dụng dung dịch Accutaza (PAA Cat# L11-007).

Phân bố các tế bào này vào các đĩa vi giếng microtiter 96 giếng ở mật độ là $5 \times 10^3/100\mu\text{l}$ /giếng trong RPMI 1640 không chứa huyết thanh nhau thai bê, β -mercaptoetanol (nồng độ cuối 5×10^{-5} M) và Normoxin (0,1mg/ml). Để các tế bào BJ này bám dính vào các đĩa thử nghiệm qua đêm. Sáng ngày kế tiếp, bổ sung các nồng độ khác nhau của rhuIL-17A (SEQ ID NO: 76; MW 32000), rhuIL-17A/F (MW 32800) và rhuIL-17F (SEQ ID NO: 77; MW 30000), hoặc môi trường đối chứng với sự có mặt của TNF α của người (hãng Novartis; MW 17500) ở thể tích là 50 μl với 3 giếng chứa 50 μl kháng thể thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau (XAB4; XAB1), kháng thể đối chứng (dung dịch Simulect® 1,1%, Batch # C0011; 831179), hoặc môi trường đối chứng để đạt thể tích cuối là 200 μl /giếng và nồng độ cuối của huyết thanh nhau thai bê là 2,5%.

HuIL-17A (30pM), huIL-17A/F (300pM) và huIL-17F (10nM) được bổ sung cùng với huTNF α (6 pM). Bổ sung huIL-17A vô hiệu hóa hóa ở nồng độ từ 1nM đến 0,003nM, huIL-17A/F vô hiệu hóa hóa ở nồng độ từ 10nM đến 0,03nM và huIL-17F ở nồng độ từ 3 μM đến 30nM vào XAB4 (MW 150000). Bổ sung huIL-17A vô hiệu hóa hóa ở nồng độ từ 3nM đến 0,01nM, huIL-17A/F vô hiệu hóa hóa ở nồng độ từ 10nM đến 0,03nM đến huIL-17F ở nồng độ từ 3 μM đến 30nM vào XAB1 (MW 150000). Bổ sung Simulect® ở nồng độ từ 3 μM đến 100nM. Sau khi ủ trong thời gian 24 giờ, thu dịch nổi của dịch nuôi tế bào và sự đo sự tạo thành của huIL-6 và huGRO α bằng thử nghiệm ELISA.

(iii) Các thử nghiệm phát hiện

1) Thử nghiệm ELISA phát hiện sự sản xuất IL-6 của người

Phủ các đĩa ELISA vi giếng microtiter với Mab của chuột bạch kháng IL-6 của người (hãng R&D Systems® Cat# MAB206; 100µl/giếng ở nồng độ 1µg/ml) trong dung dịch PBS NaN₃ nồng độ 0,02% và ủ qua đêm ở nhiệt độ +4°C. Ngày kế tiếp, cố định các đĩa vi giếng microtiter này bằng 300µl dung dịch PBS/BSA nồng độ 2%/NaN₃ nồng độ 0,02% trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa các đĩa ELISA 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%. Bổ sung dịch nuôi của dịch nuôi cấy tế bào C20A4Cl6 (tỷ lệ pha loãng cuối cùng là 1:5 với các dịch nuôi cấy được kích thích bằng huIL-17A cộng với huTNFα, hoặc 1:2 các dịch nuôi cấy được kích thích bằng huTNFα cộng với huIL-17A/F hoặc IL-17F; 100µl/giếng) hoặc các tế bào BJ (tỷ lệ pha loãng cuối cùng là 1:10 với các dịch nuôi cấy được kích thích bằng huIL-17A cộng với huTNFα, hoặc 1:5 với các dịch nuôi cấy được kích thích bằng huTNFα cộng với huIL-17A/F hoặc IL-17F; 100µl/giếng).

Để thiết lập đường cong chuẩn độ, chuẩn độ rhuIL-6 (hãng Novartis; 100µl/giếng) từ nồng độ 500 pg/ml đến 7,8 pg/ml trong các bước pha loãng 1:2. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng, rửa các đĩa 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%. Bổ sung kháng thể của dê kháng IL-6 của người tiếp hợp với biotin (hãng R&D Systems® Cat# BAF206; nồng độ 30ng/ml; 100µl/giếng). Để các mẫu thử nghiệm phản ứng trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa (4 lần), bổ sung streptavidin tiếp hợp alkaline phosphatase (hãng Jackson ImmunoResearch Cat# 016-050-084) ở tỷ lệ pha loãng cuối cùng là 1/10000 (100µl/giếng).

Sau 40 phút ở nhiệt độ phòng, rửa lại các đĩa này 4 lần. Các viên cơ chất P-nitrophenyl phosphat (hãng Sigma; loại 5mg, Cat# N9389; loại 20mg, Cat# N2765) đã được hòa tan trong dung dịch đệm diethanolamin có độ pH là 9,8 đến khi đạt nồng độ cuối là 1mg/ml. Bổ sung 100µl dung dịch thu được vào mỗi giếng và sau thời gian 1 giờ, đọc O.D bằng hệ thống đọc vi đĩa Spectra Max M5 Microplate (hãng Molecular Devices) sử dụng các bước sóng 405nm và 490nm.

2) ELISA phát hiện sự sản xuất GRO α của người

Phủ các đĩa ELISA vi giếng microtiter với mAb của chuột bạch kháng GRO α của người (hãng R&D Systems® Cat# MAB275; 100 μ l/giếng ở nồng độ 1,5 μ g/ml) trong dung dịch PBS/NaN₃ nồng độ 0,02% và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Ngày kế tiếp, cố định các đĩa vi giếng microtiter này bằng 300 μ l dung dịch PBS/BSA nồng độ 2%/NaN₃ nồng độ 0,02% trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa các đĩa ELISA 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%. Bổ sung dịch nổi của dịch nuôi cấy tế bào BJ (tỷ lệ pha loãng cuối cùng là 1:2; 100 μ l/giếng).

Để thiết lập đường cong chuẩn độ, chuẩn độ GRO α của người (hãng R&D Systems® Cat# 275-GR/CF; 100 μ l/giếng) từ nồng độ 2ng/ml đến 0,03ng/ml trong các bước pha loãng theo tỷ lệ 1:2. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng, rửa các đĩa 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%.

Bổ sung kháng thể của dê kháng GRO α của người tiếp hợp với biotin của người (hãng R&D Systems® Cat# BAF275; nồng độ 100ng/ml; 100 μ l/giếng). Để phản ứng xảy ra trong các mẫu thử nghiệm trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau bước rửa (4 lần), bổ sung streptavidin tiếp hợp alkaline phosphatase (hãng Jackson ImmunoResearch Cat# 016-050-084) ở tỷ lệ pha loãng cuối cùng là 1/10000 (100 μ l/giếng). Sau 40 phút ở nhiệt độ phòng, rửa lại các đĩa này 4 lần. Hòa tan các viên cơ chất P-nitrophenyl phosphat (hãng Sigma; loại 5mg Cat# N9389; loại 20mg, Cat# N2765) trong dung dịch đệm dietanolamin có độ pH là 9,8 đến khi thu được nồng độ cuối là 1mg/ml. Bổ sung 100 μ l vào mỗi giếng và đọc O.D. sau thời gian 1 giờ bằng hệ thống đọc vi đĩa Spectra Max M5 Microplate (hãng Molecular Devices) sử dụng các bước sóng lọc là 405nm và 490nm.

3) Tính toán

Dữ liệu được báo cáo là Giá trị trung bình $\pm$ SEM. Sử dụng phần mềm khớp đường cong chuẩn độ bốn tham số để tính toán kết quả ELISA. Các giá trị IC₅₀ của sự ức chế tiết IL-6 và tiết GRO- α bởi các kháng thể được tính bằng chương trình Xlfit (FIT model 205).

(iv) Kết quả

1) Thử nghiệm trên tế bào C20A4Cl6 (dòng tế bào sụn của người)

Cả hai kháng thể XAB4 và XAB1 đều có khả năng vô hiệu hóa sự cảm ứng sự tiết huIL-6 bởi các tế bào C20A4Cl6 được kích thích bằng rhuIL-17A và rhuIL-17A/F và có mặt rhuTNF α . Kháng thể đối chứng (Simulect®) ở nồng độ 100nM không có tác dụng này. Các giá trị IC₅₀ (giá trị trung bình $\pm$ SEM) của XAB4 và XAB1 được trình bày trong bảng 27. Không có sự ức chế lên huIL-17F được quan sát thấy thậm chí ở nồng độ Ab là 3 μ M.

Bảng 27. Tác động ức chế của XAB4 và XAB1 lên sự tiết huIL-6 secretion bởi các tế bào C20A4Cl6.

Yếu tố kích thích	XAB4 IC ₅₀ (nM) (giá trị trung bình $\pm$ SEM)	XAB1 IC ₅₀ (nM) (giá trị trung bình $\pm$ SEM)	Kháng thể đối chứng (nM)
rhuIL-17A (1nM) ^a	0,44 $\pm$ 0,06		>100
rhuIL-17A/F (3nM) ^a	1,30 $\pm$ 0,18		>100
rhuIL-17F (30nM) ^a	>3000		>1000
rhuIL-17A (30pM) + rhuTNF- α (6pM) ^b	0,024 $\pm$ 0,004	1,21 $\pm$ 0,09	>3000
rhuIL-17A/F (300pM) + rhuTNF- α (6pM) ^b	0,108 $\pm$ 0,02	>10	>3000
rhuIL-17F (10nM) + rhuTNF- α (6pM) ^b	>3000	>3000	>3000

^a Trừ giá trị nền từ sự sản xuất huIL-6 không do sự kích thích (0,13 $\pm$ 0,003)

^b Trừ giá trị nền từ sự sản xuất huIL-6 trong nuôi cấy tế bào chỉ với TNF (0,20 $\pm$ 0,003)

Các thí nghiệm này là bằng chứng cho thấy kháng thể XAB1 gốc ban đầu chia sẻ hoạt tính vô hiệu hóa với các biến thể của nó. Biến thể XAB4 cũng được nhận thấy là có hoạt tính vô hiệu hóa cao hơn XAB1.

Trong thí nghiệm khác, tương tự với thí nghiệm nêu trên, tất cả các kháng thể XAB1-XAB5 đã được so sánh, như được trình bày trong bảng 28. Trong bảng này có thể nhận thấy rằng tập hợp các đặc điểm về sự ức chế của XAB2, XAB3 và XAB5 là có thể so sánh được với tập hợp các đặc điểm về sự ức chế của XAB4 và XAB1, đặc biệt là với XAB4.

Bảng 281. Bảng các tác động ức chế của các kháng thể XAB lên sự tiết huIL-6 bởi tế bào C20A4Cl6.

Yếu tố kích thích	XAB1 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB2 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB3 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB4 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB5 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM
rhuIL-17A (0,5nM) ^a	0,29 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,15	0,51 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,01

^a Trừ giá trị nền từ sự sản xuất huIL-6 không do các yếu tố kích thích (0,04 $\pm$ 1,13ng/ml).

2) Thử nghiệm trên các tế bào BJ (các nguyên bào sợi của người)

Cả XAB4 và XAB1 vô hiệu hóa sự cảm ứng sự tiết huIL-6 và huGRO α bởi các tế bào BJ được kích thích bằng rhuIL-17A và rhuIL-17A/F khi có mặt huTNF α . Kháng thể đối chứng (Simulect®) ở nồng độ 100nM không có tác động này. Các giá trị IC₅₀ của sự ức chế tiết IL-6 và hu GRO α được trình bày trong bảng 29 và Bảng 30. Sự ức chế huIL-17F không quan sát được thậm chí khi ở nồng độ của Ab là 3 μ M. Các thí nghiệm này là bằng chứng chứng minh các biến thể của XAB1 gốc ban đầu cũng có hoạt tính vô hiệu hóa.

Biến thể XAB4 cũng được nhận thấy là có hoạt tính vô hiệu hóa cao hơn so với XAB1.

Bảng 29. Tác động ức chế của XAB4 và XAB1 lên sự tiết huIL-6 bởi các tế bào BJ.

Yếu tố kích thích	XAB4 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB1 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Kháng thể đối chứng (nM)
rhIL-17A (1nM) ^a	0,63 $\pm$ 0,02		>100
rhIL-17A/F (3nM) ^a	1,68 $\pm$ 0,05		>100
rhIL-17F (30nM) ^a	>3000		>1000
rhIL-17A (30pM) + rhuTNF- α (6pM) ^b	0,012 $\pm$ 0,002	0,47 $\pm$ 0,02	>3000
rhIL-17A/F (300pM) + rhuTNF- α (6pM) ^b	0,17 $\pm$ 0,01	3,83 $\pm$ 0,63	>3000
rhIL-17F (10nM) + rhuTNF- α (6pM) ^b	>3000	>3000	>3000

^a Trừ giá trị nền từ sự sản xuất huIL-6 không do các yếu tố kích thích (0,32 $\pm$ 0,002ng/ml).

^b Trừ giá trị nền từ sự sản xuất huIL-6 trong môi trường nuôi cấy chỉ được kích thích bằng TNF (0,45 $\pm$ 0,02ng/ml).

Bảng 30. Tác động ức chế của XAB4 và XAB1 lên sự tiết hu-GRO-alpha bởi các tế bào BJ.

Yếu tố kích thích	XAB4 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB1 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Kháng thể đối chứng (nM)
IL-17A (1nM) ^a	0,35 $\pm$ 0,01		>100
IL-17A/F (3nM) ^a	1,11 $\pm$ 0,05		>100
IL-17F (30nM) ^a	>3000		>1000
IL-17A (30pM) + TNF- α (6pM) ^b	0,007 $\pm$ 0,0004	0,72 $\pm$ 0,12	>3000

IL-17A/F (300pM) + TNF- α (6pM) ^b	0,1 $\pm$ 0,01	6,22 $\pm$ 0,44	>3000
IL-17F (10nM) + TNF- α (6pM) ^b	>3000	>3000	>3000

^a Trừ giá trị nền từ sự sản xuất huGRO α không do yếu tố kích thích (0,03 $\pm$ 0,01ng/ml).

^b Trừ giá trị nền từ sự sản xuất huGRO α trong môi trường nuôi cấy chỉ với TNF (0,15 $\pm$ 0,008ng/ml).

Các thí nghiệm bổ sung khác, tương tự với các thí nghiệm đã nêu, tất cả các kháng thể XAB1-XAB5 đã được so sánh, như được trình bày trong bảng 31 và Bảng 32. Trong các bảng này, có thể nhận thấy rằng tập hợp các đặc điểm về sự ức chế của XAB2, XAB3 và XAB5 là có thể so sánh được với tập hợp các đặc điểm về sự ức chế của XAB4 và XAB1, đặc biệt là với XAB4.

Bảng 31. Tác động ức chế của các kháng thể XAB lên sự tiết huIL-6 bởi các tế bào BJ.

Yếu tố kích thích	XAB1	XAB2	XAB3	XAB4	XAB5
	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)
	Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Giá trị trung bình $\pm$ SEM
rhuIL-17A (0,5nM) ^a	4,97 $\pm$ 0,59	0,64 $\pm$ 0,22	0,50 $\pm$ 0,002	0,55 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,02

^a Loại trừ giá trị nền từ sự sản xuất huIL-6 không do các yếu tố kích thích (0,15 $\pm$ 4,06ng/ml)

Bảng 32. Tác động ức chế của các kháng thể XAB lên sự tiết huGRO α bởi các tế bào BJ.

Yếu tố kích thích	XAB1	XAB2	XAB3	XAB4	XAB5
	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)
	Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Giá trị trung bình $\pm$ SEM
rhuIL-17A	1,39 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,05

(0,5nM) ^a					
----------------------	--	--	--	--	--

^a Trừ đi giá trị nền từ sự sản xuất HuGRO α không do yếu tố kích thích ($0,03 \pm 0,02\text{ng/ml}$)

Ví dụ 13. Sự vô hiệu hóa hoạt tính của IL-17A và IL-17A/F của chuột bạch in vitro bằng các biến thể của kháng thể theo sáng chế

Nuôi cấy các tế bào CMT-93 (ATCC CCL-223) trong RPMI (hãng Gibco Cat# 61870-010) bổ sung thêm huyết thanh nhau thai bê nồng độ 10% chứa lượng rất nhỏ IgG (hãng Gibco Cat# 16250-078; lot 1074403), β -mercaptoetanol (nồng độ cuối là $5 \times 10^{-5}\text{M}$) và Normoxin (nồng độ 0,1mg/ml; InvivoGen Cat# ant-nr-2).

Tách các tế bào bám dính trên đĩa nuôi cấy bằng dung dịch Accutaza (PAA Cat# L11-007) và phân bố các tế bào này vào các đĩa vi giếng microtiter 96 giếng ở mật độ tế bào là $5 \times 10^3/100\mu\text{l}$ /giếng trong RPMI 1640 không chứa huyết thanh nhau thai bê, β -mercaptoetanol và Normoxin.

Để qua đêm để các tế bào này bám dính vào đĩa ELISA. Sáng ngày kế tiếp, bổ sung rmIL-17A (SEQ ID NO: 83, MW 31000) ở nồng độ 1nM, rmIL-17A/F (hãng R&D Systems® Cat# 5390-IL; MW 30400) ở nồng độ 3nM, rmIL-17F (SEQ ID NO: 84; MW 30000) ở nồng độ 30nM, rratIL-17A (SEQ ID NO: 85; MW 31000) ở nồng độ 1nM hoặc môi trường đối chứng ở thể tích 50 μl vào ba giếng khi có mặt 50 μl của các kháng thể thử nghiệm (XAB4 hoặc XAB1), các kháng thể đối chứng (Simulect® 1,1% solution; C0011, 831179) hoặc môi trường đối chứng ở các nồng độ khác nhau đến khi đạt thể tích cuối là 200 μl /giếng và nồng độ cuối của huyết thanh nhau thai bê là 1%.

Thu dịch nuôi cấy tế bào sau khi ủ trong thời gian 24 giờ và đo sự sản xuất KC bằng thử nghiệm ELISA.

(i) ELISA phát hiện sự sản xuất KC bởi chuột bạch

Các đĩa ELISA vi giếng microtiter được phủ với Mab của chuột kháng KC của chuột bạch (hãng R&D Systems® Cat# MAB453; 100 μl /giếng ở nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$) trong PBS/NaN₃ nồng độ 0,02% và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Ngày kế tiếp, cố định các đĩa

vi giếng microtiter này bằng 300 μ l dung dịch PBS/BSA nồng độ 2%/NaN₃ nồng độ 0,02% trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa các đĩa ELISA 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%. Bổ sung dịch nổi của dịch nuôi cấy tế bào CMT-93 (tỷ lệ pha loãng cuối cùng là 1:5; 100 μ l/giếng).

Để thiết lập đường cong chuẩn độ, chuẩn độ KC của chuột bạch (hãng R&D Systems® # 453-KC, 100 μ l/giếng) từ nồng độ 1ng/ml đến 0,016ng/ml theo các được pha loãng theo tỷ lệ 1:2. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng, rửa các đĩa 4 lần bằng dung dịch PBS/Tween 20 nồng độ 0,05%/NaN₃ nồng độ 0,02%. Bổ sung kháng thể của dê kháng KC của chuột bạch được tiếp hợp biotin (hãng R&D Systems® Cat# BAF453; 100 μ l/giếng) ở nồng độ 0,1 μ g/ml. Để các mẫu thử nghiệm này phản ứng trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau bước rửa (4 lần), bổ sung streptavidin tiếp hợp alkaline phosphatase (hãng Jackson ImmunoResearch Cat# 016-050-084) ở tỷ lệ pha loãng cuối là 1/10000 (100 μ l/giếng). Sau 40 phút ở nhiệt độ phòng, rửa lại các đĩa này 4 lần. Hòa tan các viên cơ chất P-nitrophenyl phosphat (hãng Sigma; dạng 5mg Cat# N9389; dạng 20mg Cat# N2765) trong dung dịch đệm dietanolamin độ pH là 9,8 đến khi đạt nồng độ cuối là 1mg/ml. Bổ sung 100 μ l dịch nổi nuôi cấy tế bào vào mỗi giếng và sau thời gian 1 giờ, đọc giá trị O.D. bằng thiết bị đọc vi đĩa Spectra Max M5 Microplate (hãng Molecular Devices) sử dụng các bước sóng lọc là 405nm và 490nm.

(ii) Tính toán

Các dữ liệu được báo cáo là các giá trị trung bình $\pm$ SEM. sử dụng phần mềm khớp đường cong bốn tham số để tính toán kết quả ELISA. Các giá trị IC₅₀ cho sự ức chế tiết KC bởi các kháng thể được tính toán bằng cách sử dụng Xlfit™ (FIT model 205).

(iii) Kết quả

Cả XAB4 và XAB1 đều có khả năng để vô hiệu hóa sự cảm ứng sự tiết KC của chuột bạch bằng các tế bào CMT-93 được kích thích bằng IL-17A của chuột bạch hoặc của chuột và IL-17A/F của chuột bạch. Kháng thể đối chứng (Simulect®) không có tác động này. Các giá trị IC₅₀ (giá trị trung bình $\pm$ SEM) của XAB4 và XAB1 được trình bày trong bảng 33. Sự ức chế huIL-17F không được quan sát thấy kể cả khi nồng độ Ab là 10 μ M.

Bảng 33. Tác động ức chế XAB4 và XAB1 lên sự tiết KC của chuột bạch bởi các tế bào CMT-93.

Yếu tố kích thích	XAB4 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB1 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	Kháng thể đối chứng (nM)
mIL-17A (1nM) ^a	13,8 $\pm$ 0,48	539 $\pm$ 29,4	>3000
mIL-17A/F (3nM) ^a	10,3 $\pm$ 1,06	>1000	>3000
mIL-17F (30nM) ^a	>10000	>10000	>3000
rIL-17A (1nM) ^a	6,7 $\pm$ 0,84	467 $\pm$ 25,1	>3000

^a Trừ đi giá trị nền từ sự sản xuất KC không do yếu tố kích thích ($0,07 \pm 0,001$ ng/ml).

Từ các thí nghiệm này, rõ ràng là cả kháng thể XAB1 gốc ban đầu, cũng như các biến thể của nó, có hoạt tính vô hiệu hóa. Biến thể XAB4 cũng được nhận thấy là có hoạt tính vô hiệu hóa cao hơn XAB1.

Trong một thí nghiệm khác, tương tự với thí nghiệm nêu trên, tất cả các kháng thể XAB1-XAB5 đã được so sánh, như được nhìn thấy trong bảng 34. Trong bảng này có thể nhận thấy rằng tập hợp các đặc điểm về sự ức chế của XAB2, XAB3 và XAB5 là có thể so sánh được với tập hợp các đặc điểm về sự ức chế quan sát được của XAB4 và XAB1, đặc biệt là với XAB4.

Bảng 34 Tác động ức chế của các kháng thể XAB lên sự tiết KC bằng các tế bào CMT-93.

Yếu tố kích thích	XAB1 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB2 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB3 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB4 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM	XAB5 IC50 (nM) Giá trị trung bình $\pm$ SEM
mIL-17A (0,15nM) ^a	128 $\pm$ 14,2	20,9 $\pm$ 0,96	<1	7,0 $\pm$ 0,29	7,8 $\pm$ 0,78

^a Trừ đi giá trị nền từ sự sản xuất KC không do yếu tố kích thích ($0,19 \pm 5,81\text{ng/ml}$).

Ví dụ 14. Thử nghiệm viêm khớp cảm ứng bởi kháng nguyên của chuột (Chuột AIA)

Chuột Lewis cái (trọng lượng 120-150g) được nhạy cảm hóa nội bì ở hai vị trí trên lưng với albumin huyết thanh bò được metyl hóa (methylated bovine serum albumin - mBSA) được đồng nhất hóa theo tỷ lệ 1:1 với tá được Freund hoàn toàn vào các ngày -21 và -14 (0,1ml chứa 5mg/ml mBSA). Vào ngày 0, chuột thử nghiệm được gây mê bằng cách sử dụng hỗn hợp 5% isofluran/không khí và được duy trì bằng cách sử dụng isofluran ở nồng độ 3,5% qua mặt nạ cho các lần tiêm trong khớp. Đầu gối bên phải nhận 50 μ l mBSA nồng độ 10mg/ml trong dung dịch glucoza 5% (đầu gối được tiêm kháng nguyên), trong khi đầu gối bên trái chỉ nhận 50 μ l dung dịch glucoza 5% (đầu gối được tiêm chất dẫn thuốc). Sau đó, đường kính của đầu gối trái và đầu gối phải được đo bằng cách sử dụng thước kẹp ngay sau khi tiêm trong khớp cả đo lại vào các ngày 2, 4, và 7.

Việc điều trị được áp dụng bằng sự tiêm dưới da một lần vào ngày -3. Kháng thể theo sáng chế được tiêm ở liều lượng 0,15mg/kg, 1,5mg/kg, 15mg/kg và 116mg/kg. Độ phình của đầu gối phải được tính theo tỷ lệ với độ phình của đầu gối trái, và tỷ lệ phình của đầu gối phải/trái được dựng đồ thị theo thời gian để tạo ra các biểu đồ Diện tích dưới Đường cong (Area Under the Curve -AUC) cho nhóm đối chứng và nhóm điều trị. Phần trăm ức chế của mỗi cá thể động vật thử nghiệm trong mỗi AUC của nhóm điều trị được tính với AUC nhóm đối chứng (sự ức chế 0%) bằng cách sử dụng bảng tính Excel.

Kết quả

Kết quả được trình bày trong Bảng . Liều lượng tỷ lệ với sự ức chế độ phình của gối phải được mô tả cho XAB4 với ED₅₀ được tính là 1,68mg/kg s.c.

Bảng 35. Các tác động của sự điều trị liều duy nhất bằng XAB4 lên độ phình đầu gối từ ngày 0 đến ngày 7 ở bệnh viêm khớp cảm ứng bởi kháng nguyên ở chuột Lewis.

Liều lượng kháng thể (mg/kg)	AUC- Phần trăm ức chế độ phình đầu gối
0,15	18,46 ± 1,61*
1,5	65,76 ± 3,41**
15	71,59 ± 1,27**
116	77,01 ± 1,72**

Các điểm dữ liệu biểu thị giá trị trung bình ± SEM của cỡ mẫu n=5 động vật thử nghiệm. * p<0,05 và ** p<0,01 ANOVA theo sau bởi chuẩn Dunnett và đường cong Đối chứng.

Tương tự như vậy, liều lượng tỷ lệ với sự ức chế độ phình đầu gối đã được chứng minh với XAB4 trong mô hình sử dụng chuột Wistar (dữ liệu không được mô tả), và trong mô hình sử dụng chuột bạch mô hình viêm khớp được cảm ứng bởi kháng nguyên (dữ liệu không được mô tả).

Ví dụ 15. Mô hình cơ học tạo tân mạch

Các khoang chứa IL-17A của người (giữa 150ng và 200 ng), khi được đặt dưới da của chuột bạch, dẫn đến sự phát triển mạch máu mới xung quanh vị trí cấy. Lượng mạch mới sinh ra liên quan đến khối lượng của mô được tạo mới trong khu vực này. Điều trị để phòng bệnh bằng XAB4 ở các liều lượng 0,01mg/kg, 0,03mg/kg, 0,1mg/kg, 0,3mg/kg, 1mg/kg và 3mg/kg đã ức chế sự sinh tân mạch cảm ứng bởi IL-17 của người. Tất cả các liều lượng cao hơn 5 dẫn đến sự ức chế tiềm lực và đáng kể khối lượng khoang mô. Các liều lượng cao hơn 4 cho thấy tính phụ thuộc liều lượng, tuy nhiên, liều lượng 0,03mg/kg có hiệu quả nhỏ hơn so với liều lượng 0,1mg/kg và các liều lượng lớn hơn.

Nghiên cứu này chứng minh rằng tác động sinh tân mạch có hiệu lực của IL-17A có thể được vô hiệu hóa bởi kháng thể kháng IL-17A và cung cấp bằng chứng thực nghiệm về hiệu lực của XAB4 với IL-17A của người in vivo.

Ví dụ 16. Mô hình viêm não tủy tự miễn thực nghiệm (EAE)

Mô hình viêm não tủy tự miễn thực nghiệm (EAE) là một mô hình động vật đã biết của bệnh đa xơ cứng (xem, ví dụ, trong tài liệu của Constantinescu et al., Br J Pharmacol 2011). Mô hình này đã chứng minh rằng sự ức chế IL-17 làm giảm tính nghiêm trọng của EAE ở chuột bạch C57Bl/6 (Haak S et al 2009, JCI; 119:61-69).

Chuột bạch C57Bl/6 cái (9 tuần tuổi, hãng Harlan, Đức) được tạo miễn dịch với hỗn hợp theo tỷ lệ 50/50 chứa peptit tế bào thần kinh đệm ít gai myelin của chuột tái tổ hợp (MOG₁₋₁₂₅) (tạo ra bằng thao tác thí nghiệm) và tá được Freund hoàn toàn (CFA, được tạo ra bằng cách bổ sung chủng vi khuẩn Mycobacterium tuberculosis H37RA (Difco) nồng độ 8mg/ml vào tá được Freund không hoàn toàn (IFA, hãng Sigma). Thực hiện bước tạo miễn dịch bằng cách tiêm dưới da I MOG₁₋₁₂₅ ở liều lượng 200 µg/động vật thử nghiệm ở phần cuối của đuôi vào ngày 0. Ngoài ra, tiêm màng bụng chất gây độc pertussis (PT) ở liều lượng 200ng/động vật thử nghiệm vào các ngày 0 và ngày 2.

Thử nghiệm cả tác dụng điều trị để chữa bệnh và tác dụng điều trị để phòng bệnh.

Điều trị để chữa bệnh

Với việc điều trị để chữa bệnh, sử dụng 16 con chuột bạch (8 con để thử nghiệm với XAB4 và 8 con làm đối chứng). Bắt đầu việc điều trị khi các động vật này có điểm đánh giá lâm sàng ít nhất là 2,5 (suy yếu chân sau nghiêm trọng) trong thời gian 3 ngày. Sau đó, tiêm dưới da XAB4 hoặc kháng thể isotyp đối chứng ở liều lượng 15mg/kg mỗi tuần với liều dùng duy nhất.

Kết quả được trình bày trong các Fig. 11 đến Fig.15 (d.p.i là ngày sau sự tạo miễn dịch). Trong tất cả các fig., XAB4 được biểu diễn bằng hình tròn và isotyp đối chứng được biểu diễn bằng hình vuông. Điểm đánh giá việc chữa bệnh (giá trị trung bình+SEM) được biểu diễn trong Fig. 11. Có thể nhận thấy rõ ràng rằng các động vật được điều trị bằng XAB4 có điểm đánh giá lâm sàng trung bình thấp hơn của isotyp

đối chứng. Fig. 12 thể hiện sự thay đổi trong lượng (%) của hai nhóm chuột bạch thử nghiệm e, và Fig. 13 thể hiện điểm đánh giá tích lũy việc chữa bệnh. Các Fig. 14 và Fig. 15 là các phép so sánh điểm đánh giá việc chữa bệnh trước và sau điều trị. Có thể nhận thấy rõ ràng ở tất cả các biểu đồ rằng XAB4 có tác dụng chữa bệnh so với isotyp đối chứng. Do đó, điều trị chữa bệnh bằng XAB4 đã làm giảm đáng kể mức độ nghiêm trọng của EAE.

Điều trị phòng bệnh

Với việc điều trị phòng bệnh, sử dụng 19 chuột bạch (10 con để thử nghiệm với XAB4 và 9 con làm đối chứng). mỗi động vật thử nghiệm được điều trị một ngày trước khi được tạo miễn dịch bằng XAB4 hoặc isotyp đối chứng liều lượng 15mg/kg, bằng một mũi tiêm dưới da duy nhất. Sau đó, tiêm dưới da XAB4 hoặc kháng thể isotyp đối chứng liều lượng 15mg/kg mỗi tuần với liều dùng duy nhất.

Kết quả được trình bày trong các Fig.16 đến Fig.20 (d.p.i là ngày sau sự tạo miễn dịch). Trong các fig.16 đến Fig.19, XAB4 được biểu diễn bằng hình tròn và isotyp đối chứng được biểu diễn bằng hình vuông. Điểm đánh giá việc phòng bệnh (giá trị trung bình+SEM) được biểu diễn trong Fig. 16. Có thể nhận thấy rõ ràng rằng các động vật thử nghiệm được điều trị bằng XAB4 có điểm đánh giá lâm sàng trung bình thấp hơn. Fig. 17 thể hiện sự thay đổi trong lượng (%) của hai nhóm chuột bạch thử nghiệm, và Fig. 18 thể hiện điểm đánh giá tích lũy việc phòng bệnh. Điểm đánh giá việc phòng bệnh lớn nhất được quan sát thấy ở Fig.19. Có thể nhận thấy rõ ràng ở tất cả các biểu đồ rằng XAB4 có tác dụng so với isotyp đối chứng. Ngoài ra, trong Fig.20, có thể quan sát thấy rằng sự khởi phát EAE là muộn hơn với nhóm chuột bạch thử nghiệm được điều trị bằng XAB4, khi so sánh với nhóm chuột bạch được điều trị bằng isotyp đối chứng.

Do đó, thử nghiệm này chứng minh rằng điều trị phòng bệnh bằng XAB4 đã trì hoãn đáng kể sự khởi phát EAE và giảm tối đa độ nghiêm trọng của EAE.

Ví dụ 17. Sự suy giảm nồng độ của IL6 CXCL1, IL-8, GM-CSF, và CCL2 được cảm ứng bởi IL17A trong các tế bào hình sao của người

Điều tra các tác động của XAB4 lên nồng độ của IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF và CCL2 trong các tế bào hình sao được phân lập từ vỏ não của não người. Các tế bào hình sao giải phóng nhiều yếu tố tăng trưởng, xytokin và chemokin, cho phép các tế bào này điều hòa sự trao đổi thông tin trong tế bào, sự di cư và sự sống sót của các tế bào thần kinh, tế bào thần kinh hệ đệm và tế bào miễn dịch. Sự trao đổi thông tin trực tiếp giữa phía cuối phần chân của tế bào hình sao với các tế bào nội mô cũng cho phép các tế bào hình sao điều khiển chức năng của hàng rào máu-não. Hơn nữa, các tế bào hình sao giải phóng và tiếp nhận các chất dẫn truyền thần kinh, như glutamat, ở phần khe synap cho phép các tế bào này điều hòa sự dẫn truyền tín hiệu giữa các synap và sự nhiễm độc thần kinh dạng kích thích của các synap. Điều này là có ý nghĩa khi các tế bào hình sao tạo ra sẹo bệnh lý sau khi bị tổn thương CNS, do đó các tế bào này có các vai trò đối lập rõ ràng giữa tình trạng sinh lý bình thường và tình trạng bệnh lý. Trong trường hợp bệnh lý, các tế bào hình sao được dự đoán là góp phần gây ra một loạt các rối loạn về tâm thần, thần kinh và thoái hóa thần kinh, trong đó vai trò của chúng trong bệnh viêm thần kinh có khả năng là quan trọng.

Dữ liệu cho thấy rằng sự kích thích đồng thời bằng IL-17A và TNF α đã tăng cường sự giải phóng IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF, và CCL2, và cho thấy rằng XAB4 ức chế nồng độ IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF, và CCL2 trong các tế bào hình sao của người. Các dữ liệu này chỉ ra vai trò chính (chủ yếu) của IL-17A trong sự giải phóng xytokin từ các tế bào hình sao và hỗ trợ việc sử dụng của chúng làm các đích cho được phẩm để điều trị các bệnh viêm thần kinh. Điều đáng chú ý là sự xử lý sơ bộ các tế bào hình sao của người bằng XAB4 ức chế nồng độ IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF, và CCL2 do sự cảm ứng của IL-17A và sự cảm ứng của IL-17A/TNF α , mà không ảnh hưởng đến sự cảm ứng của TNF α . Tổng hợp lại với nhau, các dữ liệu này dẫn đến giả thuyết là sự ức chế chọn lọc truyền tín hiệu của IL-17A với XAB4 làm giảm nồng độ của các xytokin trước viêm trong các tế bào hình sao của người. Trong trường hợp bệnh lý, các tế bào hình sao được dự đoán là góp phần gây ra một loạt các rối loạn về tâm thần, thần kinh và thoái hóa thần kinh, trong đó vai trò của chúng trong bệnh viêm thần kinh có khả năng là quan trọng. Vì thế, các được phẩm mới làm biến đổi chức năng của các

tế bào hình sao có giá trị tiềm năng, trong đó sự điều hòa chức năng của các tế bào hình sao có thể chứng tỏ sự hữu ích trong điều trị bệnh. Hệ quả là, do XAB4 đã được chứng minh là có tác động lên sự sản xuất IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF, và CCL2 của các tế bào hình sao, điều này có thể được kết luận là XAB4 có thể là chất điều trị bệnh hữu ích, như để điều trị bệnh đa xơ cứng (MS).

Nguyên liệu và Phương pháp

Tất cả các xytokin được mua của hãng R&D Systems. Basiliximab (hãng Novartis, Basel, Thụy Sĩ) được sử dụng làm đối chứng isotyp. Các kháng thể sơ cấp đã sử dụng gồm: Alexa Fluor 647 kháng IL17RA (BG/hIL17AR, hãng Biolegend), Alexa Fluor 488 kháng IL17RC (309822, hãng R&D Systems, UK), kháng thể kháng p65 (hãng Santa Cruz, USA), kháng thể Alexa Fluor 647 kháng IgG của chuột bạch (MOPC-21, hãng Biolegend, UK), kháng thể Alexa Fluor 488 kháng IgG của chuột bạch (133303, hãng R&D System, UK), IgG của chuột bạch gắn Biotin (G155-178, hãng BD Biosciences, Thụy Sĩ) và IgG của chuột gắn PE (A95-1, hãng BD Biosciences, Thụy Sĩ). Các kháng thể thứ cấp và các chất nhuộm màu đã sử dụng gồm: kháng thể của dê kháng IgG của thỏ được biotin hóa (BA1000, hãng Vector, UK), Alexa Fluor 488 và Alexa Fluor 633 được tiếp hợp với streptavidin (S11223 và S2137, hãng Life Technology, USA), kháng thể của dê kháng IgG của chuột bạch tiếp hợp với Alexa Fluor 488 và Alexa Fluor 633 (A1101 và A21050, hãng Life Technology, USA), streptavidin BV421 (405226, Biolegend, UK), Hoechst 34580 (H21486, hãng Life Technology, USA).

Các tế bào hình sao của người có nguồn gốc từ vỏ não mua của hãng ScienCell Research Laboratory (USA) (mã sản phẩm 1800). Các tế bào được nuôi theo sự hướng dẫn của nhà cung cấp. Tóm lại là các tế bào này được nuôi trong môi trường tế bào hình sao của người (hãng ScienCell mã sản phẩm 1801) bổ sung thêm chất hỗ trợ tăng trưởng của tế bào hình sao nồng độ 1% (hãng ScienCell mã sản phẩm 1852), huyết thanh nhau thai bê nồng độ 5% (hãng ScienCell mã sản phẩm 0010) và Penixilin/Streptomycin nồng độ 1% (hãng ScienCell mã sản phẩm 0503). Giữ các tế bào trong các bình nuôi cấy T75 ở nồng độ CO₂ là 5% và nhiệt độ là 37°C và thay môi trường sau mỗi ba ngày cho đến khi 80% vào pha suy vong. Với tất cả các lần xử lý

bằng XAB4, trải kỹ 70,000 tế bào lên các đĩa 24 giếng, nuôi trong 3 ngày, để các tế bào này thiếu huyết thanh trong thời gian 2-4 giờ, sau đó, xử lý các tế bào hình sao trong thời gian 2 giờ với XAB4, và sau đó xử lý trong thời gian 18-20 giờ với các xytokin của người tái tổ hợp như được đề cập trong các fig. minh họa. Sử dụng tua tế bào để định lượng nồng độ mRNA của xytokin bằng kỹ thuật qPCR và sử dụng phản dịch nổi để định lượng nồng độ protein của xytokin bằng HTRF (hãng Cisbio, Pháp, đã sử dụng cho IL-6, IL-8 & CXCL1) hoặc AlphaLISA (hãng PerkinElmer, Mỹ, đã sử dụng cho CCL2 & GM-CSF).

Thực hiện phép đo lường mRNA xytokin bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi trùng hợp thời gian thực tế (RT-PCR). Tóm lại là, nhẹ nhàng ly giải các tế bào hình sao trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ phòng trong 350µl dung dịch đệm ly giải (đệm RLT chứa β -mercaptoethanol nồng độ 1%) và tách chiết lấy ARN tổng số bằng cách sử dụng kit RNeasy Microkit (74004, hãng Qiagen, Thụy Sĩ). Tổng hợp cADN bằng cách sử dụng enzym phiên mã ngược SuperScript III reverse transcriptaza (18080-400, hãng Life Technology, Thụy Sĩ). Đánh giá mức độ biểu hiện của mỗi gen bằng kỹ thuật q-PCR trong hệ thống máy Real-time PCR Viia7 (hãng Life Technology, Thụy Sĩ). Các mẫu dò Taqman được mua của hãng Life Technology, Thụy Sĩ. Phân tích mỗi mẫu ba lần và chuẩn hóa bằng hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase -HPRT). Đánh giá nồng độ của các protein IL6, IL8, CXCL1 của người (ng/ml) trong dịch nổi tế bào hình sao của người (10 µl) bằng HTRF (IL6: 62IL6PEC; IL8: 62IL8PEC; CXCL1: 6FGROPEG, hãng Cisbio, Pháp) và nồng độ protein CCL2 của người (ng/ml) trong dịch nổi tế bào hình sao của người (5µl) bằng AlphaLISA CCL2/MCP1 của người (AL244C, hãng PerkinElmer, USA). Thực hiện tất cả các phép đo theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thu huyền phù tế bào của các tế bào hình sao của người từ dịch nuôi cấy bám dính sử dụng PBS- EDTA có nồng độ 5mM. Để nhuộm màu ngoại bào, ủ các tế bào được với toàn bộ IgG của chuột bạch trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C trong dung dịch PBS BSA nồng độ 2%, và sau đó, nhuộm với kháng thể trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C trong dung dịch PBS BSA nồng độ 2%. Để nhuộm màu nội bào, khả thẩm hóa các tế bào bằng dung dịch Xytofix/Xytoperm (554714, hãng BD Biosciences, Thụy Sĩ) trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C trước khi ủ với kháng thể trong thời gian 30

phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi lọc qua dụng cụ lọc có kích thước lỗ lọc là 70µm, các tế bào được thu lên BDFortessa (hãng BD Biosciences, Thụy Sĩ) và phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo (hãng Tree Star Inc., USA).

Sau khi xử lý bằng hợp chất, rửa các tế bào trong dung dịch PBS (hãng Sigma Aldrich, Đức) sau đó, cố định trong metanol 100% nước đá lạnh trong thời gian 10 phút. Rửa các tế bào 3 lần mỗi lần 5 phút trong PBS vô khuẩn, sau đó khả thấm hóa các tế bào này bằng cách ủ với Triton-X-100 nồng độ 0,2% (hãng Sigma Aldrich, Đức) trong dung dịch PBS trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ phòng. Cố định các vị trí không phản ứng qua đêm ở nhiệt độ +4°C bằng dung dịch đệm cố định chứa 10% huyết thanh dê bình thường (hãng Life Technology, USA) và 2% albumin huyết thanh bò (hãng Sigma Aldrich, Đức) trong dung dịch PBS. Sau đó, ủ các tế bào này trong kháng thể sơ cấp qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Loại bỏ kháng thể sơ cấp và rửa các tế bào 3 lần mỗi lần 5 phút trong PBS, sau đó bổ sung kháng thể thứ cấp phát huỳnh quang trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa các tấm che phủ 5 lần mỗi lần 5 phút trong PBS và nhuộm ngược lại bằng chất nhuộm nhân Hoescht 34580. Cuối cùng đặt các tấm che phủ này lên lam kính của kính hiển vi trong môi trường gắn VectashieldR (hãng Vector, UK) và các cạnh bên của tấm che phủ được hàn kín bằng sơn móng tay. Chụp ảnh các tế bào này bằng cách sử dụng kính hiển vi quét laze đồng tiêu cự Zeiss LSM 510 META sử dụng kính hiển vi nghịch đảo Axiovert 200M (hãng Zeiss Ltd, Đức).

Kết quả

Sự đối kháng của sự kích thích TNF- α hoặc IL-17A, hoặc sự đồng kích thích IL-17A/TNF- α bằng XAB4 được trình bày trong các Fig.21 A đến Fig.25 A. Sự đối kháng của sự kích thích IL-1 β hoặc sự đồng kích thích IL-17A/IL-1 β bằng XAB4 được trình bày trong các Fig.21B đến 25B.

Fig. 21 thể hiện tác động có tính đối kháng lên sự giải phóng IL-6, Fig. 22 thể hiện tác động có tính đối kháng lên sự giải phóng CXCL1, Fig. 23 thể hiện tác động có tính đối kháng lên IL-8, Fig. 24 thể hiện tác động có tính đối kháng lên GM-CSF và Fig. 25 thể hiện tác động có tính đối kháng lên CCL2.

Xử lý các tế bào hình sao sơ cấp của người với các nồng độ tăng dần của XAB4 (0,01nM, 0,1nM 1nM và 10nM), có hoặc không cùng với IL-17A (50ng/ml), TNF- α (10ng/ml), IL-1 β , IL-17A/TNF- α và IL-1 β /TNF- α . Tất cả các nồng độ đã sử dụng được chỉ ra trong các fig. đã nêu. Các dữ liệu này đã biểu diễn là đại diện của hai thí nghiệm cho XAB4 ở nồng độ 0,01nM, và của ba thí nghiệm cho XAB4 ở các nồng độ 0,1nM, 1nM và 10nM. Các giá trị được biểu diễn là giá trị trung bình $\pm$ S.E.M.

Như được nhìn thấy trong Fig. 21A, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) có tác động đối kháng, so với cả đối chứng và isotyp, lên sự giải phóng IL-6 từ các tế bào hình sao được kích thích bằng IL-17A, hoặc IL-17A/TNF- α . Nồng độ IL-6 (ng/ml) được biểu diễn bằng trục y và nồng độ của XAB4 được biểu diễn trên trục x (0, tức là đối chứng, 0,01nM, 0,1nM 1nM và 10nM) cho mỗi tập hợp dữ liệu, và 10nM cho isotyp. Tập hợp dữ liệu ở phía bên trái đề cập đến các tế bào không bị kích thích, tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào bị kích thích bằng TNF- α (10ng/ml), tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào bị kích thích bằng IL-17A (50ng/ml) và tập hợp dữ liệu cuối cùng đề cập đến các tế bào bị kích thích đồng thời bằng TNF- α (10ng/ml) và IL-17A (50ng/ml). Tập hợp dữ liệu cuối có mức chia của trục y cao hơn gấp khoảng 10 lần. Như được nhìn thấy trong Fig. 21B, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) không có tác động đối kháng lên các tế bào bị kích thích bằng IL-1 β (0,1ng/ml) hoặc bị kích thích đồng thời bằng IL-1 β (0,1ng/ml) và IL-17A (50ng/ml), so sánh với isotyp.

Như được nhìn thấy trong Fig.22A, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) có tác động đối kháng, khi so sánh với cả đối chứng và isotyp, lên sự giải phóng CXCL1 từ các tế bào hình sao được kích thích bằng IL-17A, hoặc IL-17A/TNF- α . Các nồng độ CXCL1 (ng/ml) được biểu diễn bằng trục y và các nồng độ của XAB4 được biểu diễn trên trục x (0, tức là nồng độ đối chứng, 0,01nM, 0,1nM 1nM và 10nM) cho mỗi tập hợp dữ liệu, và 10nM cho isotyp. Tập hợp dữ liệu ở phía bên trái đề cập đến các tế bào không bị kích thích, tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào được kích thích bằng TNF- α (10ng/ml), tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào được kích thích bằng IL-17A (50ng/ml) và tập hợp dữ liệu cuối đề cập đến các tế bào được kích thích đồng thời bằng TNF- α (10ng/ml) và IL-17A (50ng/ml). Tập hợp dữ liệu cuối có mức chia của trục y cao hơn khoảng 10 lần. Như được nhìn thấy trong Fig.22B, XAB4 (ở tất cả

các nồng độ) không có tác động đối kháng lên các tế bào được kích thích bằng IL-1 β (0,1ng/ml) hoặc được kích thích đồng thời bằng IL-1 β (0,1ng/ml) và IL-17A (50ng/ml), so sánh với isotyp.

Như được nhìn thấy trong Fig.23A, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) có tác động đối kháng, so sánh với đối chứng, lên sự giải phóng IL-8 từ các tế bào hình sao được kích thích bằng IL-17A, hoặc IL-17A/TNF- α . So sánh với isotyp, XAB4 (0,1nM, 1nM và 10nM) có tác động đối kháng lên sự giải phóng IL-8. Các nồng độ IL-8 (ng/ml) được biểu diễn bằng trục y và các nồng độ của XAB4 được biểu diễn trên trục x (0, tức là nồng độ đối chứng, 0,01nM, 0,1nM 1nM và 10nM) cho mỗi tập hợp dữ liệu, và 10nM với isotyp. Tập hợp dữ liệu ở phía bên trái đề cập đến các tế bào không bị kích thích, tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào được kích thích bằng TNF- α (10ng/ml), tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào được kích thích bằng IL-17A (50ng/ml) và tập hợp dữ liệu cuối đề cập đến các tế bào được kích thích đồng thời bằng TNF- α (10ng/ml) và IL-17A (50ng/ml). Tập hợp dữ liệu cuối có mức chia của trục y cao hơn gấp khoảng 5 lần. Như được nhìn thấy trong Fig.23B, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) không có tác động đối kháng lên các tế bào được kích thích bằng IL-1 β (0,1ng/ml) hoặc được kích thích đồng thời bằng IL-1 β (0,1ng/ml) và IL-17A (50ng/ml), so sánh với isotyp.

Như được nhìn thấy trong Fig.24A, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) có tác động đối kháng, khi so sánh với cả đối chứng và isotyp, lên sự giải phóng của GM-CSF từ các tế bào hình sao được kích thích bằng IL-17A/TNF- α . XAB4 (0,1nM, 1nM và 10nM) có tác động đối kháng lên sự giải phóng GM-CSF từ các tế bào hình sao được kích thích bằng IL-17A, so sánh với isotyp và đối chứng. Các nồng độ của GM-CSF (ng/ml) được biểu diễn bằng trục y và các nồng độ của XAB4 được biểu diễn trên trục x (0, tức là nồng độ đối chứng, 0,01nM, 0,1nM 1nM và 10nM) cho mỗi tập hợp dữ liệu, và 10nM với isotyp. Tập hợp dữ liệu ở phía bên trái đề cập đến các tế bào không bị kích thích, tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào được kích thích bằng TNF- α (10ng/ml), tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào được kích thích bằng IL-17A (50ng/ml) và tập hợp dữ liệu cuối đề cập đến các tế bào được kích thích đồng thời bằng TNF- α (10ng/ml) và IL-17A (50ng/ml). Như được nhìn thấy trong Fig.24B, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) không có hoặc có ít tác động đối lập lên các tế bào được

kích thích bằng IL-1 β (0,1ng/ml) hoặc được kích thích đồng thời bằng IL-1 β (0,1ng/ml) và IL-17A (50ng/ml), so sánh với isotyp.

Như được nhìn thấy trong Fig.25A, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) có tác động đối kháng, khi so sánh với cả đối chứng và isotyp, lên sự giải phóng của CCL2 từ các tế bào hình sao được kích thích bằng IL-17A. XAB4 (0,1nM, 1nM và 10nM) có tác động đối kháng lên sự giải phóng CCL2 từ các tế bào hình sao được kích thích bằng IL-17A/TNF- α , so sánh với isotyp và đối chứng. Các nồng độ CCL2 (ng/ml) được biểu diễn bằng trục y và các nồng độ của XAB4 được biểu diễn trên trục x (0, tức là nồng độ đối chứng, 0,01nM, 0,1nM 1nM và 10nM) cho mỗi tập hợp dữ liệu, và 10nM với isotyp. Tập hợp dữ liệu ở phía bên trái đề cập đến các tế bào không bị kích thích, tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào được kích thích bằng TNF- α (10ng/ml), tập hợp dữ liệu tiếp theo đề cập đến các tế bào được kích thích bằng IL-17A (50ng/ml) và tập hợp dữ liệu cuối đề cập đến các tế bào được kích thích đồng thời bằng TNF- α (10ng/ml) và IL-17A (50ng/ml). Như được nhìn thấy trong Fig.25B, XAB4 (ở tất cả các nồng độ) không có tác động đối kháng on các tế bào được kích thích bằng IL-1 β (0,1ng/ml) hoặc được kích thích đồng thời bằng IL-1 β (0,1ng/ml) và IL-17A (50ng/ml), so sánh với isotyp.

Tổng hợp lại với nhau, các dữ liệu này đã gợi ý rằng sự ức chế chọn lọc sự truyền tín hiệu IL-17A bằng XAB4 làm giảm nồng độ của xytokin trước viêm trong các tế bào hình sao của người. Trong trường hợp bệnh lý, các tế bào hình sao được dự đoán là góp phần gây ra một loạt các rối loạn về tâm thần, thần kinh và thoái hóa thần kinh, trong đó vai trò của chúng trong bệnh viêm thần kinh có khả năng là quan trọng. Do XAB4 được chứng minh là có tác động lên sự sản xuất IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF, và CCL2 của các tế bào hình sao, XAB4 có thể là một chất điều trị bệnh hữu ích, như là để điều trị bệnh đa xơ cứng (MS).

Thông tin trình tự

Các dữ liệu trình tự liên quan tới XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 sau đây được tóm tắt để dễ dàng tham khảo.

Bảng 1 mô tả trình tự axit amin (các SEQ ID NO) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ chiều dài của, ví dụ, XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5.

Các kháng thể XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các quy trình sản xuất và tinh sạch kháng thể tái tổ hợp thông thường. Ví dụ, trình tự mã hóa như được mô tả trong bảng 3 hoặc Bảng 4 được tách dòng thành vector sản xuất cho sự biểu hiện tái tổ hợp trong dòng tế bào sản xuất là động vật có vú.

Bảng 5 tóm tắt trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và chuỗi nhẹ (V_L) của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5, mà có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể dạng khảm từ XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 hoặc XAB5.

Bảng 6 tóm tắt trình tự CDR có ích của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 (cộng với trình tự liên ứng) để tạo ra các kháng thể ghép với vùng CDR của kháng thể khác, trong đó vùng CDR này từ XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 được xác định theo sự xác định Kabat.

Bảng 6 tóm tắt trình tự CDR có ích của XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 (cộng với trình tự liên ứng) để tạo ra các kháng thể ghép với vùng CDR của kháng thể khác, trong đó vùng CDR này từ XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 và XAB5 được xác định theo sự xác định Chothia.

Tất cả trình tự được đề cập đến trong bản mô tả (các SEQ ID NO) được tìm thấy trong bảng 36.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

Các axit amin và trình tự nucleotit hữu ích cho việc thực hiện sáng chế được tìm thấy trong bảng 36.

Bảng 36. Danh mục trình tự

Kháng thể/Mảnh	Mã số nhận biết trình tự (SEQ ID NO:)	Trình tự axit amin hoặc trình tự polynucleotit (PN)

XAB1, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB1, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB1, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB1, CDRL1 (CHOTHIA)	4	SQGIISA
XAB1, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB1, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB1, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB1, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB1, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB1, CDRL1 (KABAT)	9	RPSQGIISALA
XAB1, CDRL2 (KABAT)	10	DASSLEN
XAB1, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB1, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLYYWGQGTLVTVSS
XAB1, VL	13	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGIISAL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPL TFGGGTKVEIK
XAB1, CHUỖI NẶNG	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLYYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHCTCPPELLEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB1, CHUỖI	15	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGIISAL

NHE		AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPL TFGGGTGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLISKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 13	17	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGCCAAGTCAGGGCATTAT CAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTAT GATGCCTCCAGTTTGGAAAATGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGC AGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTC AACAGTTTAATAGTTACCCTCTCACTTTCG GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGCG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGT

		GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGACACC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC AGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATC GAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 15	19	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCAC CATCACTTGCCGGCCAAGTCAGGGCATTAT CAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTAT GATGCCTCCAGTTTGGAAAATGGGGTCCC ATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGC AGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTC AACAGTTTAATAGTTACCCTCTCACTTTCG GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT ACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGG CACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGG ACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTG

		ACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
XAB2, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB2, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB2, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB2, CDRL1 (CHOTHIA)	20	SQVIISA
XAB2, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB2, CDRL3 (CHOTHIA)	21	FDSYPL
XAB2, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB2, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB2, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB2, CDRL1 (KABAT)	22	RPSQVIISALA
XAB2, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB2, CDRL3 (KABAT)	24	QQFDSYPLT
XAB2, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLYYWGQGTLVTVSS
XAB2, VL	25	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQVIISAL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSG SVSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFDSYPL TFGGGTKVEIK
XAB2, CHUỖI NẶNG	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLYYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

XAB2, CHUỖI NHE	26	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRPSQVIISAL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSG SVSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFDSYPL TFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCCAGC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 25	27	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTCGGCCAGCCAGGTCATCA TCAGCGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA CGACGCCAGCTCCCTGGAACAGGGCGTGC CCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGTGTCCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTTTCGACAGCTACCCCTGACCTTC GGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCCAGCG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGC

		AGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC AGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATC GAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 26	28	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTGCGGCCAGCCAGGTCATCA TCAGCGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA CGACGCCAGCTCCCTGGAACAGGGCGTGC CCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGTGTCCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTTCGACAGCTACCCCTGACCTTC GGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCG TACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCTCTT CCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCG GCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCG GCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG

		GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGT GACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 12	29	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGAGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTA GTAGCTACTGGATGAGCTGGGTGCGACAG GCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC CAATATTAAGCAGGACGGCTCAGAGAAGT ACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCGGTTC ACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAG CCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCT AGAGATAGAGGCTCACTGTACTACTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTTCT
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 25	30	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGACCTAGTCAGGTGATCAT TAGCGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTAC GACGCTAGTAGTCTGGAACAGGGCGTGCC CTCTAGGTTTAGCGGCTCAGTGTACGGCAC CGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCA GCCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCA GCAGTTCGATAGCTACCCCTGACCTTCGG CGGAGGCACTAAGGTGGAAATCAAG
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGAGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTA GTAGCTACTGGATGAGCTGGGTGCGACAG GCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC CAATATTAAGCAGGACGGCTCAGAGAAGT ACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCGGTTC ACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAG CCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCT AGAGATAGAGGCTCACTGTACTACTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTTCTGC TAGCACCAAGGGCCCAAGTGTCTTTCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAGCGGAG GCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCA GCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTG ACTGTGCCTAGTTCCAGCCTGGGCACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC

		TGCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTG GGAGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG ACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGT CTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCG AAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACT ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 26	32	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGACCTAGTCAGGTGATCAT TAGCGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTAC GACGCTAGTAGTCTGGAACAGGGCGTGCC CTCTAGGTTTAGCGGCTCAGTGTACAGGCAC CGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCA GCCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCA GCAGTTCGATAGCTACCCCCTGACCTTCGG CGGAGGCACTAAGGTGGAAATCAAGCGTA CGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCC CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGC ACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGA CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCA GCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC GAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGT GACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
XAB3, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB3, CDRH2	2	KQDGSE

(CHOTHIA)		
XAB3, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB3, CDRL1 (CHOTHIA)	33	SQGIYWE
XAB3, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB3, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB3, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB3, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB3, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB3, CDRL1 (KABAT)	34	RPSQGIYWELA
XAB3, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB3, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB3, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLEYWGQGTLLTVSS
XAB3, VL	35	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRPSQGIYWE LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGTKVEIK
XAB3, CHUỖI NẶNG	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLEYWGQGTLLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB3, CHUỖI NHẸ	36	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRPSQGIYWE LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS

		GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLISKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGCA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 35	37	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTGCGGCCAGCCAGGGCATCT ACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA CGACGCCAGCTCCCTGGAACAGGGCGTGC CCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGATCCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTTCAACAGCTACCCCCTGACCTTC GGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGCA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGCG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT

		GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC AGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATC GAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCACTGTCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAG AGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 36	38	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTTCGGCCAGCCAGGGCATCT ACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA CGACGCCAGCTCCCTGGAACAGGGCGTGC CCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGATCCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC CAGCAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTC GGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCG TACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTT CCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCG GCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCG GCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGT GACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO:	29	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGAC

12		TGAGCTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTA GTAGCTACTGGATGAGCTGGGTGCGACAG GCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC CAATATTAAGCAGGACGGCTCAGAGAAGT ACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCGGTTC ACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAG CCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCT AGAGATAGAGGCTCACTGTACTACTGGGG CCAGGGGCACCCTGGTGACAGTGTCTTCT
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 35	39	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGACCTAGCCAGGGAATCT ACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA CGACGCTAGTAGTCTGGAACAGGGCGTGC CCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGGCA CCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGC AGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTC AGCAGTTTAACTCCTACCCCTGACCTTCG GCGGAGGCACTAAGGTGGAAATCAAG
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTA GTAGCTACTGGATGAGCTGGGTGCGACAG GCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC CAATATTAAGCAGGACGGCTCAGAGAAGT ACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCGGTTC ACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAG CCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCT AGAGATAGAGGCTCACTGTACTACTGGGG CCAGGGGCACCCTGGTGACAGTGTCTTCTGC TAGCACCAAGGGCCCAAGTGTCTTTCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAGCGGAG GCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCA GCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTG ACTGTGCCTAGTTCCAGCCTGGGCACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTG GGAGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG

		ACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGT CTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCG AAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 36	40	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGACCTAGCCAGGGAATCT ACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA CGACGCTAGTAGTCTGGAACAGGGCGTGC CCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGGCA CCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGC AGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTC AGCAGTTTAACTCCTACCCCCTGACCTTCG GCGGAGGCACTAAGGTGGAAATCAAGCGT ACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGG CACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGG ACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCATAAGGTGTACGCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTG ACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
XAB4, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB4, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB4, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB4, CDRL1	41	SQGINWE

(CHOTHIA)		
XAB4, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB4, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB4, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB4, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB4, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB4, CDRL1 (KABAT)	42	RPSQGINWELA
XAB4, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB4, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB4, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLLYYWGQGTLLTVSS
XAB4, VL	43	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRPSQGINWE LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGTKVEIK
XAB4, CHUỖI NẶNG	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLLYYWGQGTLLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV HEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB4, CHUỖI NHẸ	44	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRPSQGINWE LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN MÃ HÓA SEQ	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGA

ID NO: 12		CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 43	45	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTCGGCCCAGCCAGGGCATC AACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAA GCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCT ACGACGCCAGCTCCCTGGAACAGGGCGTG CCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGATCCGG CACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACT GCCAGCAGTTCAACAGCTACCCCTGACCT TCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGCG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGACACC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC

		AGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATC GAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTACGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 44	46	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTTCGGCCAGCCAGGGGCATC AACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAA GCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCT ACGACGCCAGCTCCCTGGAACAGGGCGTG CCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGATCCGG CACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACT GCCAGCAGTTCAACAGCTACCCCCTGACCT TCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATC TTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAG CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGA ACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAG CGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGC AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTG AGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCC GTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG C
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 12	29	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTA GTAGCTACTGGATGAGCTGGGTGCGACAG GCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC

		CAATATTAAGCAGGACGGCTCAGAGAAGT ACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCGGTTC ACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAG CCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCT AGAGATAGAGGCTCACTGTACTACTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTTCT
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 43	47	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGACCTAGTCAGGGGATTA ACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA CGACGCTAGTAGTCTGGAACAGGGCGTGC CCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGGCA CCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGC AGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTC AGCAGTTTAACTCCTACCCCTGACCTTCG GCGGAGGCACTAAGGTGGAAATCAAG
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTA GTAGCTACTGGATGAGCTGGGTGCGACAG GCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC CAATATTAAGCAGGACGGCTCAGAGAAGT ACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCGGTTC ACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAG CCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCT AGAGATAGAGGCTCACTGTACTACTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTTCTGC TAGCACCAAGGGCCCAAGTGTCTTTCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAGCGGAG GCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCA GCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTG ACTGTGCCTAGTTCCAGCCTGGGCACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTG GGAGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG ACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG

		AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGT CTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCG AAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 44	48	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGACCTAGTCAGGGGATTA ACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA CGACGCTAGTAGTCTGGAACAGGGCGTGC CCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGGCA CCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGC AGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTC AGCAGTTTAACTCCTACCCCCTGACCTTCG GCGGAGGCACTAAGGTGGAAATCAAGCGT ACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGG CACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGG ACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTG ACCAAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
PN BIẾN ĐỔI THỨ HAI MÃ HÓA SEQ ID NO: 12	49	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACT GTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTC CAGCTACTGGATGTCCTGGGTGCGACAGG CCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCC AACATCAAGCAGGACGGCTCCGAGAAGTA CTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCC CTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG

		GGACCGGGGCTCCCTGTACTATTGGGGCC AGGGCACCTGGTGACAGTGTCTCC
PN BIẾN ĐỔI THỨ HAI MÃ HÓA SEQ ID NO: 43	50	GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGC CTGTCTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGAC CATCACCTGTGCGGCCCTCCCAGGGGCATCAA CTGGGAACTGGCCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTAC GACGCCAGCTCCCTGGAACAGGGCGTGCC CTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCA GCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA GCAGTTCAACTCCTACCCCCTGACCTTCGG CGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN BIẾN ĐỔI THỨ HAI MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	51	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACT GTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTC CAGCTACTGGATGTCCTGGGTGCGACAGG CCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCC AACATCAAGCAGGACGGCTCCGAGAAGTA CTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCC CTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG GGACCGGGGCTCCCTGTACTATTGGGGCC AGGGCACCTGGTGACAGTGTCTCCGCCT CCACCAAGGGGCCCAAGCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCT GGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAG ACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCCAGCCCCGAGCTGCTG GGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTCCTCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG AACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGG ACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGG TGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATC GAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA

		GCCAAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CACCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCAAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA GGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCAGGCAAG
PN BIẾN ĐỔI THỨ HAI MÃ HÓA SEQ ID NO: 44	52	GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGC CTGTCTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGAC CATCACCTGTCTGGCCCTCCCAGGGGCATCAA CTGGGAACTGGCCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTAC GACGCCAGCTCCCTGGAACAGGGCGTGCC CTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCAC CGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCA GCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA GCAGTTCAACTCCTACCCCCTGACCTTCGG CGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTA CGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCC CCCCAAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGC ACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAA CTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGA CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCA GCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGT GACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
XAB5, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB5, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB5, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB5, CDRL1 (CHOTHIA)	41	SQGINWE
XAB5, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB5, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB5, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB5, CDRH2	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG

(KABAT)		
XAB5, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB5, CDRL1 (KABAT)	42	RPSQGINWELA
XAB5, CDRL2 (KABAT)	10	DASSLEN
XAB5, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB5, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLLYYWGQGTLVTVSS
XAB5, VL	53	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRPSQGINWE LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGTKVEIK
XAB5, CHUỖI NẶNG	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRGSLLYYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB5, CHUỖI NHẸ	54	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRPSQGINWE LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYP LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG

		CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 53	55	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTTCGGCCAGCCAGGGCATC AACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAA GCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCT ACGACGCCAGCTCCCTGGAAAACGGCGTG CCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGATCCGG CACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACT GCCAGCAGTTCAACAGCTACCCCTGACCT TCGGCGGAGGACCAAGGTGGAAATCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGTACTGGATGTCCTGGGTCCGCCAG GCCCCCTGGCAAAGGCCTCGAATGGGTGGC CAACATCAAGCAGGACGGCAGCGAGAAGT ACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCGGGGCAGCCTGTACTATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCCAGCG CTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGACCCC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC AGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATC

		GAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 54	56	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTTCGGCCCAGCCAGGGCATC AACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAA GCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCT ACGACGCCAGCTCCCTGGAAAACGGCGTG CCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGATCCGG CACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACT GCCAGCAGTTCAACAGCTACCCCCCTGACCT TCGGCGGAGGACCAAGGTGGAAATCAAG CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATC TTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAG CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGA ACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAG CGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGC AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTG AGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCC GTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG C
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 12	29	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTA GTAGCTACTGGATGAGCTGGGTGCGACAG GCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC CAATATTAAGCAGGACGGCTCAGAGAAGT ACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCGGTTC ACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAG CCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCT AGAGATAGAGGCTCACTGTACTACTGGGG CCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTTCT
PN BIẾN ĐỔI MÃ	57	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGC

HÓA SEQ ID NO: 53		CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGACCTAGTCAGGGGATTA ACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA CGACGCTAGTAGTCTGGAAAACGGCGTGC CCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGGCA CCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGC AGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTC AGCAGTTTAACTCCTACCCCTGACCTTCG GCGGAGGCACTAAGGTGGAAATCAAG
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGAGGCGA CCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTA GTAGCTACTGGATGAGCTGGGTGCGACAG GCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGC CAATATTAAGCAGGACGGCTCAGAGAAGT ACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCGGTTC ACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAG CCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCT AGAGATAGAGGCTCACTGTACTACTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTTCTGC TAGCACCAAGGGCCCAAGTGTCTTTCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAGCGGAG GCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCA GCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTG ACTGTGCCTAGTTCCAGCCTGGGACACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTG GGAGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG ACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTCCTGACAGTGTGTCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGT CTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCG AAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG

		CTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA ACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 54	58	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGC CTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAC TATCACCTGTAGACCTAGTCAGGGGATTA ACTGGGAGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA CGACGCTAGTAGTCTGGAAAACGGCGTGC CCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGGCA CCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGC AGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTC AGCAGTTTAACTCCTACCCCCTGACCTTCG GCGGAGGCACTAAGGTGGAAATCAAGCGT ACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGG CACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGG ACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTG ACCAAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
TRÌNH TỰ DẪN ĐẦU CỦA CHUỖI NẶNG	59	MEFGLSWVFLVAILEGVHC
TRÌNH TỰ DẪN ĐẦU CỦA CHUỖI NHẸ	60	MDMRVPAQLLGLLLLWLPARC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 59	61	ATGGAATTCGGCCTGAGCTGGGTGTTCTG GTCGCGATTCTGGAAGGCGTGCACTGC
PN MÃ HÓA SEQ ID NO: 60	62	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCT GGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGCGC CAGATGT
TRÌNH TỰ DẪN ĐẦU THỨ HAI CỦA CHUỖI NẶNG	63	MAVWVWTLPLMAAAQSVQA
TRÌNH TỰ DẪN ĐẦU THỨ HAI CỦA CHUỖI NHẸ	64	MSVLTQVLALLLLWLTGTRC

PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 63	65	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCCCTTCCTG ATGGCCGCTGCTCAGTCAGTGCAGGCC
PN BIẾN ĐỔI MÃ HÓA SEQ ID NO: 64	66	ATGAGCGTGCTGACTCAGGTGCTGGCCCT GCTGCTGCTGTGGCTGACCGGCACCCGCTG C
TRÌNH TỰ DẪN ĐẦU BIẾN ĐỔI THỨ HAI CỦA CHUỖI NẶNG	67	MEWSWVFLFFLSVTTGVHS
TRÌNH TỰ DẪN ĐẦU BIẾN ĐỔI THỨ HAI CỦA CHUỖI NHẸ	68	MSVPTQVLGLLLLWLT DARC
PN BIẾN ĐỔI THỨ HAI MÃ HÓA SEQ ID NO: 67	69	ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCTTCTTC CTGTCCGTGACCACAGGCGTGCCTCC
PN BIẾN ĐỔI THỨ HAI MÃ HÓA SEQ ID NO: 68	70	ATGTCCGTGCCCACACAGGTGCTGGGCCT GCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGAT GC
LIÊN ỨNG, CDRL1 (CHOTHIA)	71	SQX ₁ IX ₂ X ₃ X ₄
LIÊN ỨNG, CDRL3 (CHOTHIA)	72	FX ₁ SYPL
LIÊN ỨNG, CDRL1 (KABAT)	73	RPSQX ₁ IX ₂ X ₃ X ₄ LA
LIÊN ỨNG, CDRL2 (KABAT)	74	DASSLEX ₁
LIÊN ỨNG, CDRL3 (KABAT)	75	QQFX ₁ SYPLT
huIL-17A	76	GITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR NTNTNPKRSSDY YNRSTSPWNLHRNEDPER YPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYH MNSVP IQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTC VTPIVHHVAEFRH
huIL-17F	77	MRKIPKVGHTFFQKPESC PVPGGSMKLDIGI INENQRVSM SRNIESRSTSPWNYTVTWDPNR YPSEVVQAQCRNLGCINAQ GKEDISMNSVPI QQETLVVRRKHQGC SVSFQLEKVLVTVGCT CVTPVIHHVQ
huIL-17A biến đổi	78	GPIVKAGITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNL NIHNRNTNTNPKRSSDY YNRSTSPWNLHRN EDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYH MNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVS VGCTCVTPIVHHVA

cynoIL-17A	79	GIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR NTSTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERY PSVIWEAKCRHLGCVKADGNVDYHMNSVPI QQEILVLRREPRHCPNSFRLEKILVSVGCTCV TPIVHHVA
cynoIL-17F	80	MRKIPKVGHTFFQKPESCPPVPEGSMKLDTG IINENQRVMSRNIESTSPWNYTWTWDPN RYPSEVVQAQCKHLGCINAQGKEDISMNSV PIQQETLVLRKHHQGCVSFQLEKVLVTVC TCVTPVVHHVQ
rezutIL-17A	81	GIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR NTSTSPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERY PSVIWEAKCRHLGCVKADGNVDYHMNSVPI QQEILVLRREPRHCPNSFRLEKILVSVGCTCV TPIVHHVA
marmosetIL-17A	82	SPQNPGCPNAEDKNFPRTVMVNLNIRNRNT NSKRASDYNNRSSSPWNLHRNEDPERYPSVI WEAKCRHLGCVADGNVDYHMNSVPIQQE ILVLRREPRHCTNSFRLEKMLVSVGCTCVTPI VHHVA
mIL-17A	83	MAAIIPQSSACPNTAKDFLQNVKVNLIKVFN SLGAKVSSRRPSDYLNRSTSPWTLHRNEDPD RYPSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHMHNS VLIQQEILVLKREPESCPFTFRVEKMLVGVG CTCVASIVRQAA
mIL-17F	84	APEPEFRHRKNPKAGVPALQKAGNCPPLED NTVRVDIRIFNQNGISVPREFQNRSSSPWDY NITRDPHRFPSEIAEAQCRHSGCINAQGQEDS TMNSVAIQQEILVLRREPQGCSNSFRLEKML LKVGCTCVKPIVHQAA
ratIL-17A	85	MAVLIPQSSVCPNAEANNFLQNVKVNLIKVI NSLSSKASSRRPSDYLNRSTSPWTLNRNEDP DRYPSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHMHNS SVLIQQEILVLKREPEKCPFTFRVEKMLVGV GCTCVSSIVRHAS
huIL-17RA	86	NCTVKNSTCLDDSWIHPRNLTPSSPKDLQIQ LHFAHTQQGDLFPVAHIEWTLQTDASILYLE GAELSVLQLNTNERLCVRFEFLSKLRHHHR WRFTFSHFVVDPDQEYEVTVHHLKPIPDGD PNHQSKNFLVPDCEHARMKVTTPCMSSGSL WDPNITVETLEAHQLRVSTLWNESTHYQIL LTSFPHMENHSCFEHMHIPAPRPEEFHQRS NVTLTLRNLKGCCRHHQVQIQPFSSCLNDCL RHSATVSCPEMPDTPEPIPDYMPLEWFRHDS GGGLNDIFEAQKIEWHE

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập được của người để điều trị bệnh hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) theo SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) theo SEQ ID NO: 43, và trong đó kháng thể đã nêu hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với IL-17A homodime và IL-17AF heterodime, nhưng không gắn kết đặc hiệu với IL-17F homodime.
2. Kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó IL-17A, IL-17AF hoặc IL-17F được chọn từ một hoặc nhiều trong số khi đuôi dài, khi vàng, khi đuôi sóc, chuột, chuột nhắt hoặc người.
3. Kháng thể phân lập được theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin của chuỗi nặng theo SEQ ID NO: 14 và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO: 44.
4. Kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này có khả năng ức chế sự tiết IL-6, hoặc sự tiết GRO- α khi được đánh giá *in vitro*, tốt hơn là bằng cách sử dụng các tế bào sụn hoặc nguyên bào sợi được nuôi cấy.
5. Kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này có khả năng ức chế sự sưng đầu gối trong mô hình thử nghiệm viêm khớp cảm ứng bởi kháng nguyên *in vivo*.
6. Kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này được liên hợp với gốc hoạt động khác.

7. Kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó.

8. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

9. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó dược phẩm này còn chứa một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung.

10. Kháng thể của người để điều trị bệnh phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng làm thuốc chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) theo SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) theo SEQ ID NO: 43, và trong đó kháng thể đã nêu hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với IL-17A homodime và IL-17AF heterodime, nhưng không gắn kết đặc hiệu với IL-17F homodime.

11. Kháng thể của người để điều trị bệnh phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị rối loạn hoặc tình trạng viêm chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) theo SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) theo SEQ ID NO: 43, và trong đó kháng thể đã nêu hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với IL-17A homodime và IL-17AF heterodime, nhưng không gắn kết đặc hiệu với IL-17F homodime.

12. Kháng thể của người để điều trị bệnh phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị rối loạn hoặc tình trạng viêm, và rối loạn hoặc tình trạng viêm là chứng viêm khớp, chứng viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh luput ban đỏ hệ thống (Systemic Lupus Erythematosus-SLE), bệnh viêm thận do luput, bệnh hen, bệnh đa xơ cứng hoặc bệnh xơ nang chứa

vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO: 43,

và trong đó kháng thể đã nêu hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với IL-17A homodime và IL-17AF heterodime, nhưng không gắn kết đặc hiệu với IL-17F homodime.

13. Phân tử axit nucleic phân lập được mã hóa kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7.

14. Vector tách dòng hoặc vector biểu hiện chứa một hoặc nhiều trình tự axit nucleic theo điểm 13, trong đó vector này thích hợp cho việc sản xuất tái tổ hợp kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định bằng điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7.

15. Tế bào chủ chứa một hoặc nhiều vector tách dòng hoặc vector biểu hiện theo điểm 14.

16. Phân tử axit nucleic phân lập được theo điểm 13, trong đó phân tử axit nucleic này là ARN thông tin (mRNA).

17. Quy trình sản xuất kháng thể phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7, trong đó quy trình sản xuất này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 15, tinh sạch và thu kháng thể đã nêu hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó.

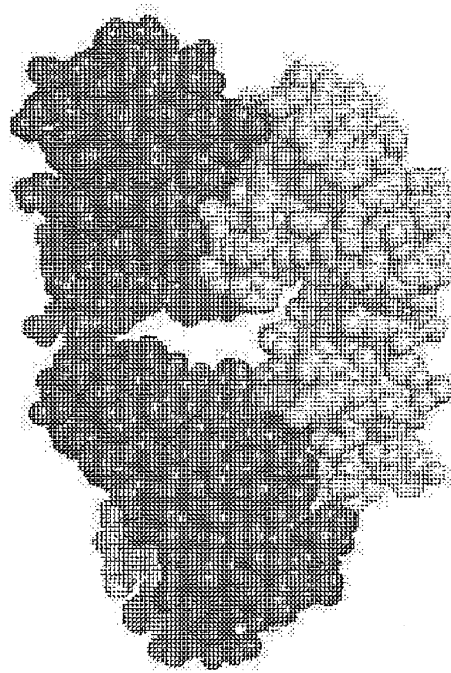


Fig. 1A

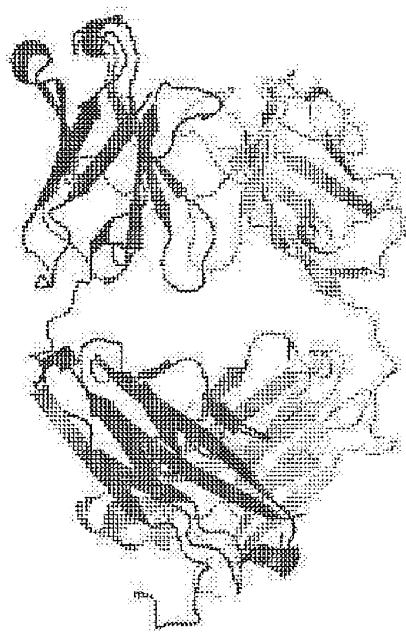


Fig. 1B

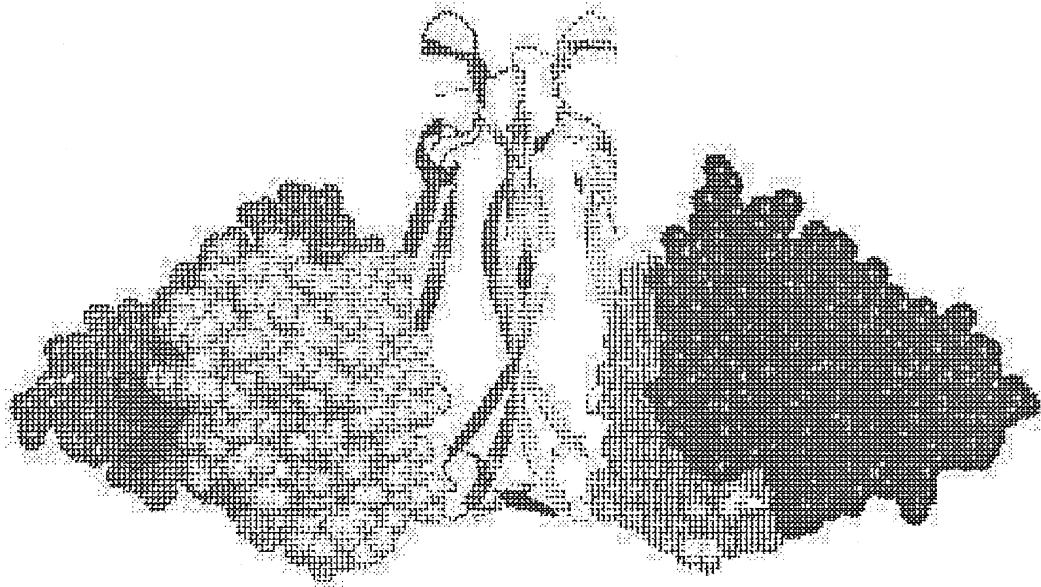


Fig. 2A

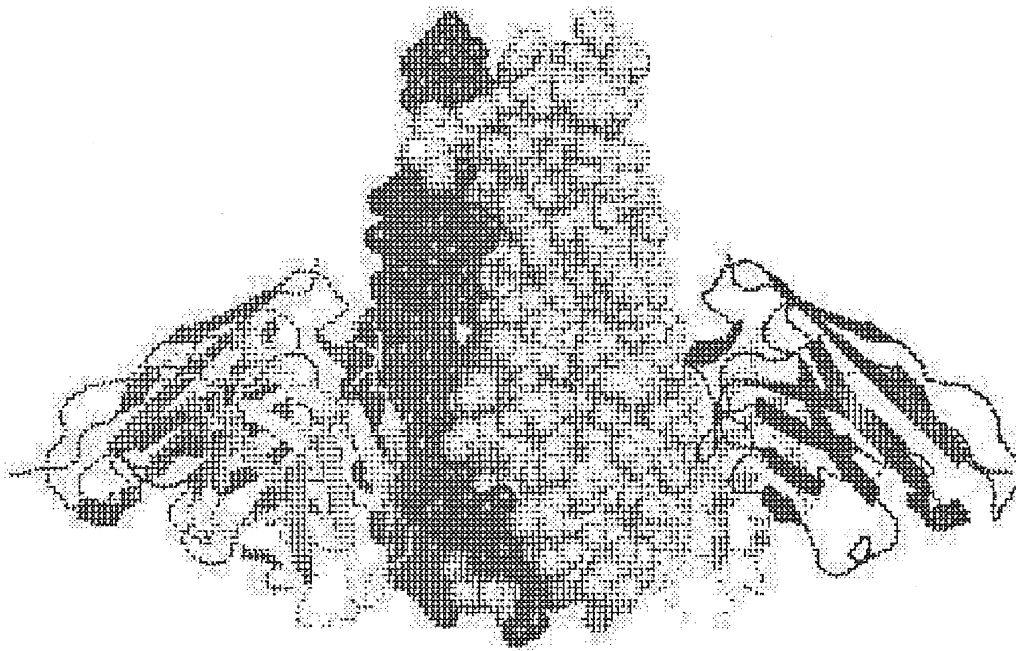
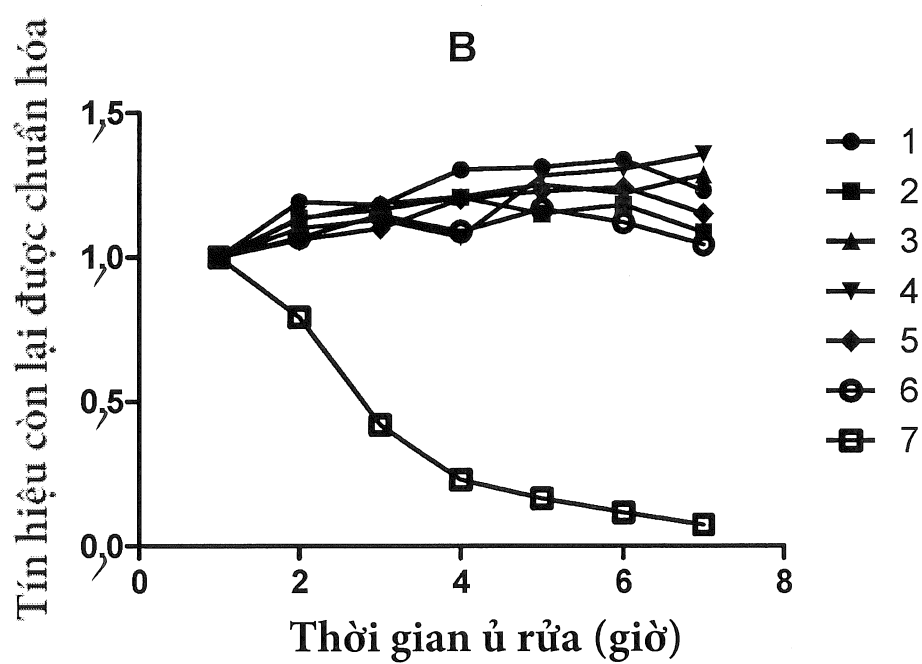
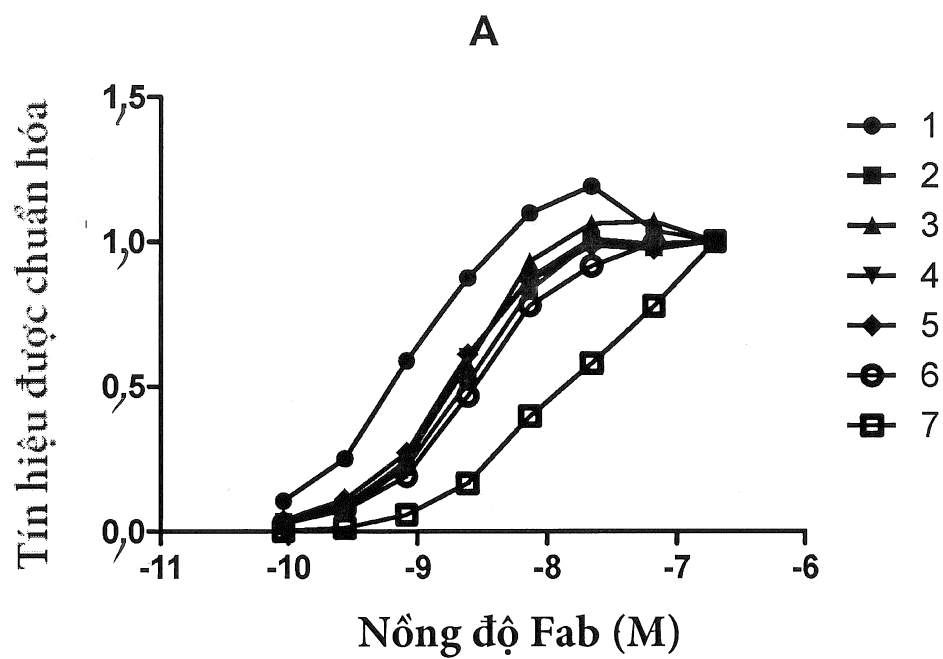


Fig. 2B



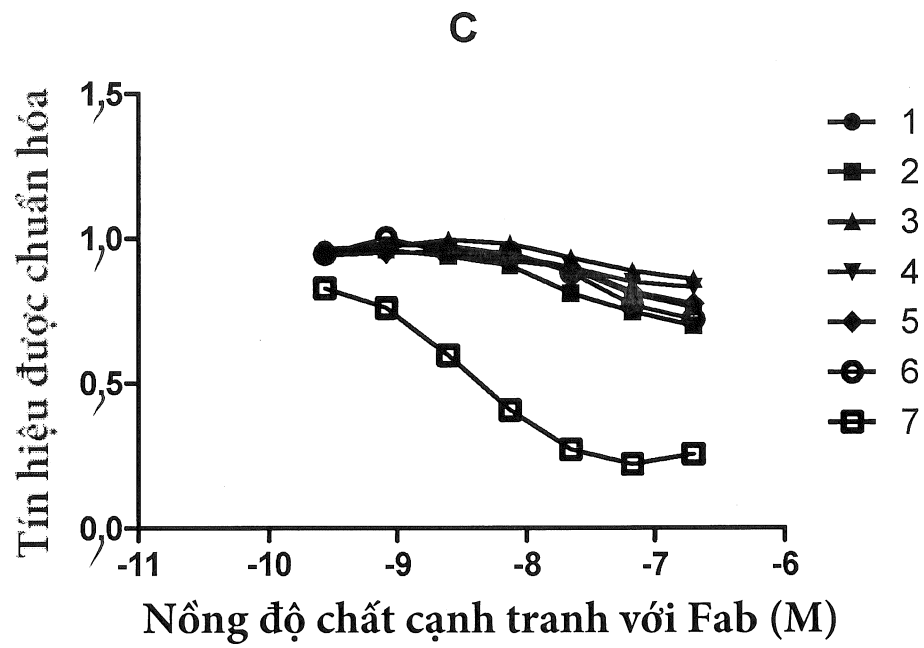


Fig. 3C

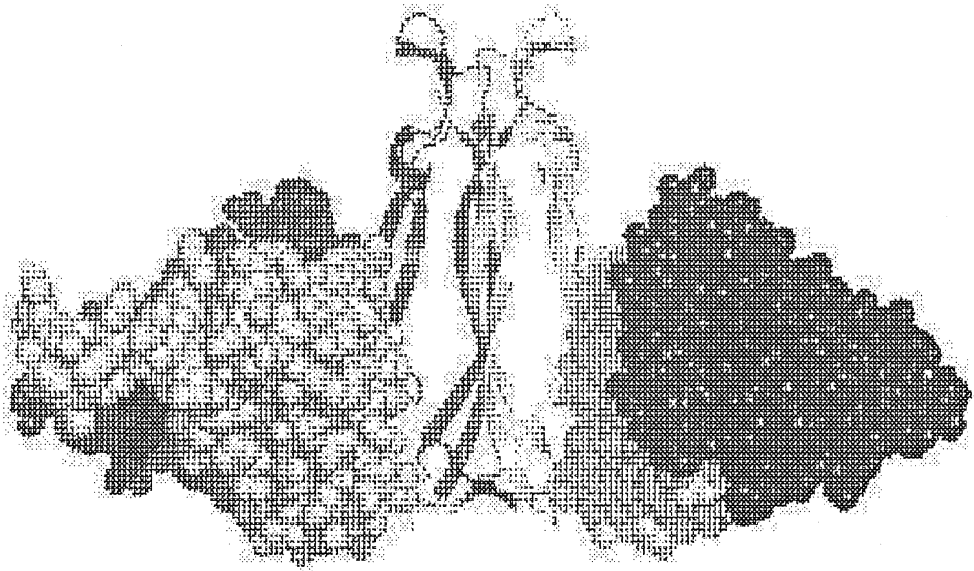


Fig. 4A

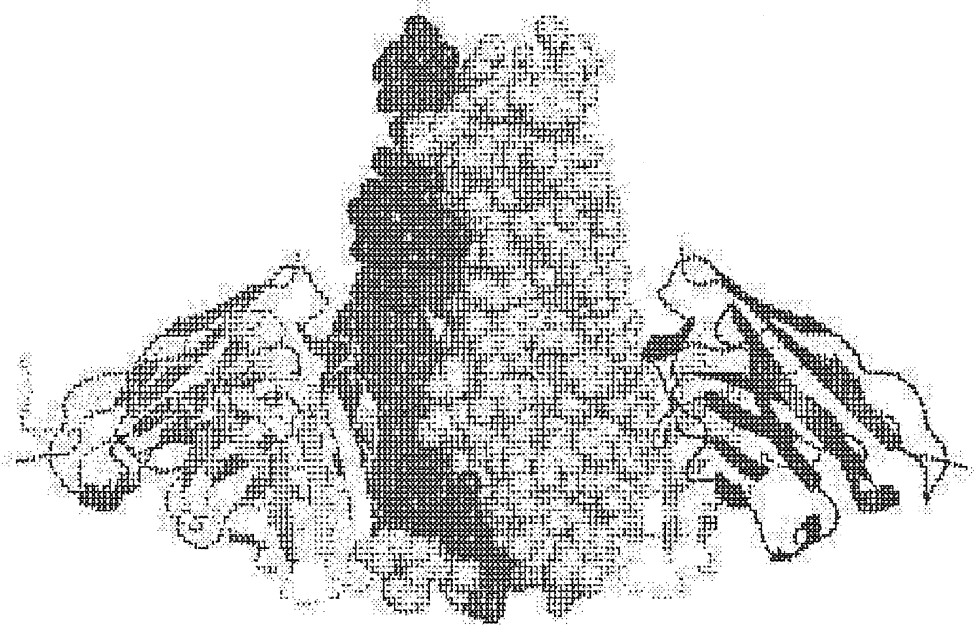


Fig. 4B

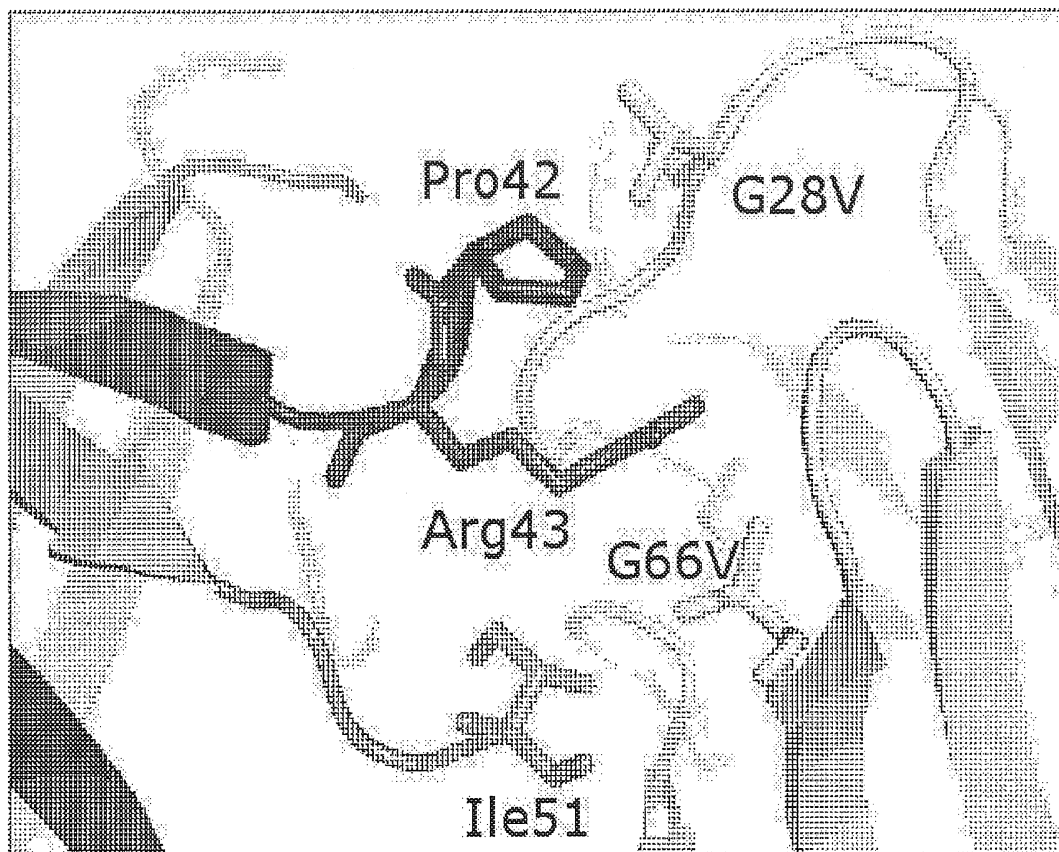


Fig. 5

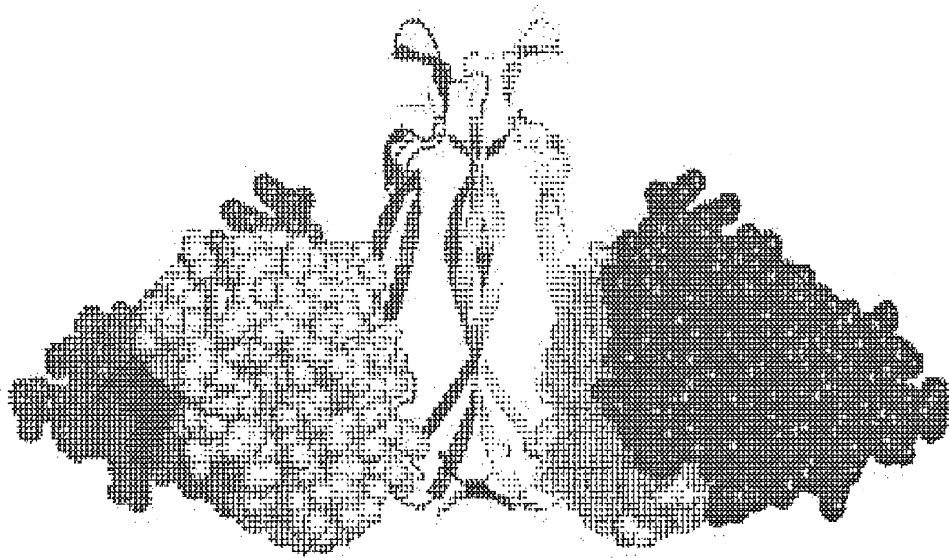


Fig. 6A

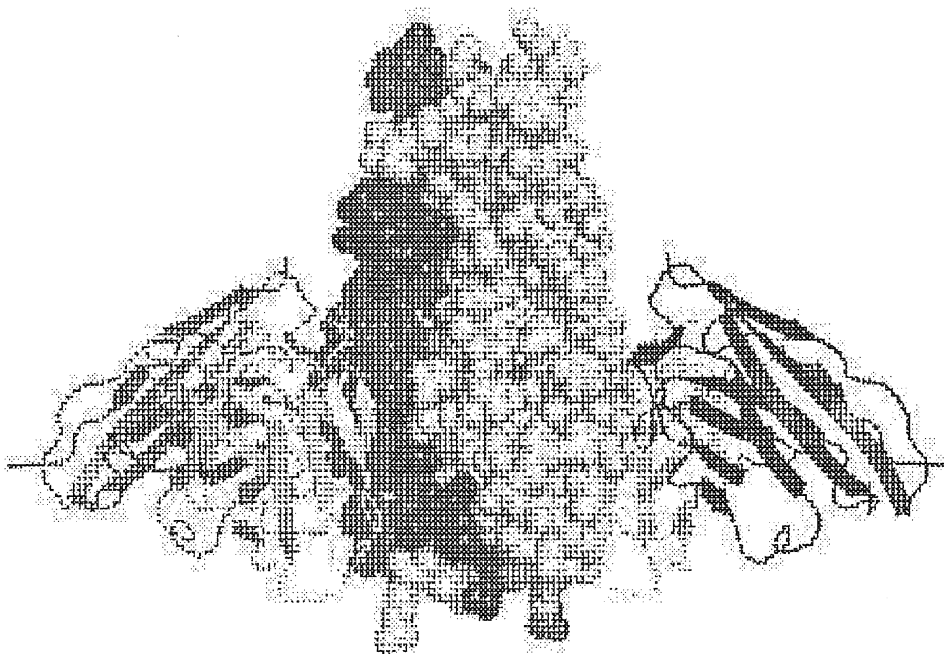


Fig. 6B

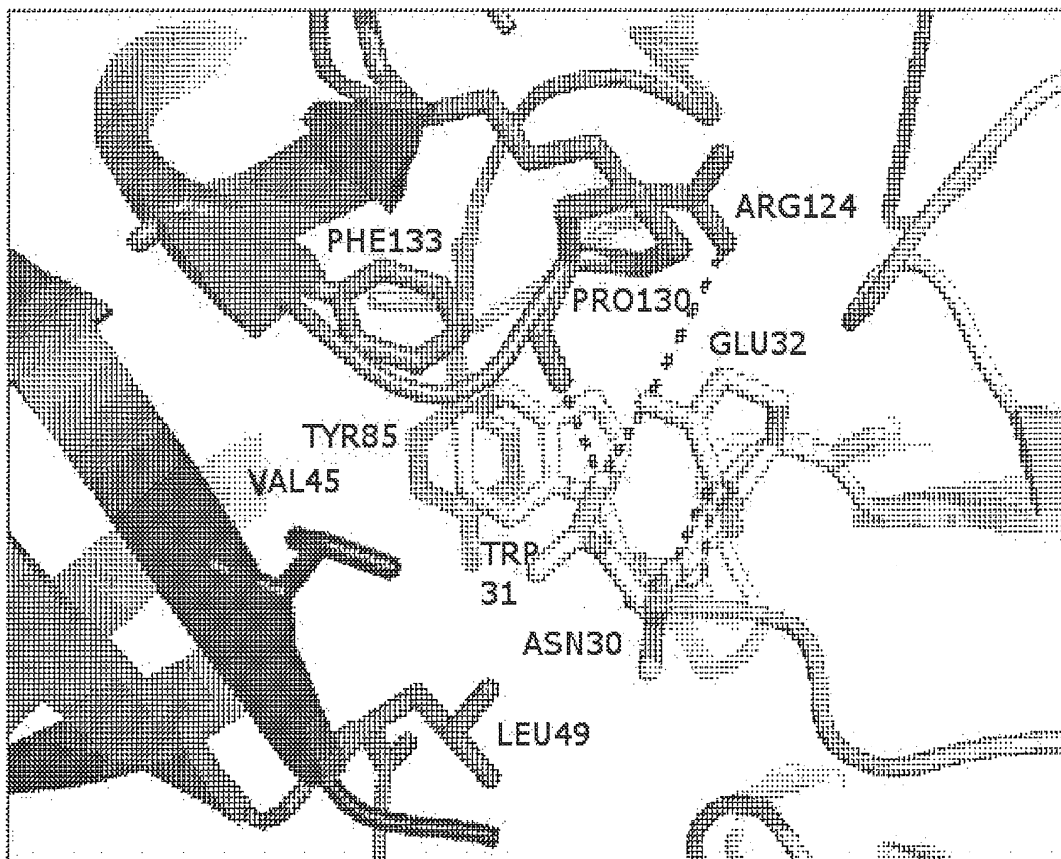


Fig. 7

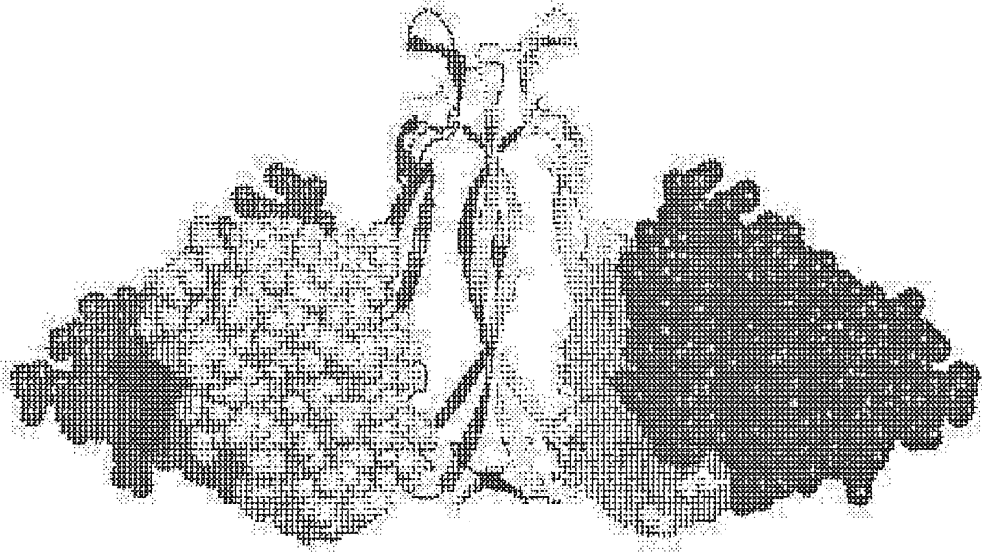


Fig. 8A

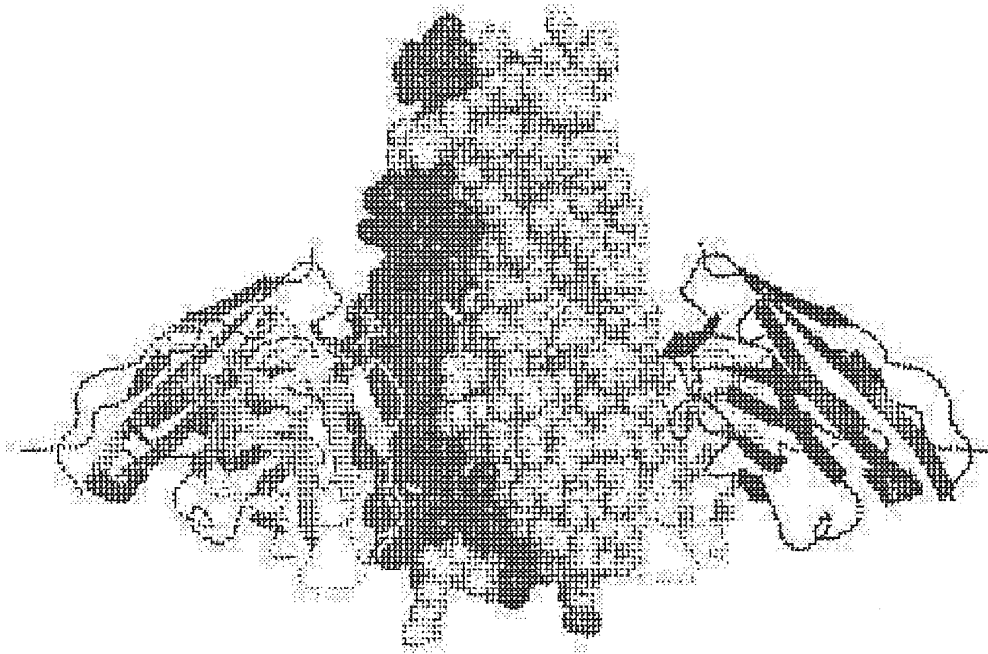


Fig. 8B

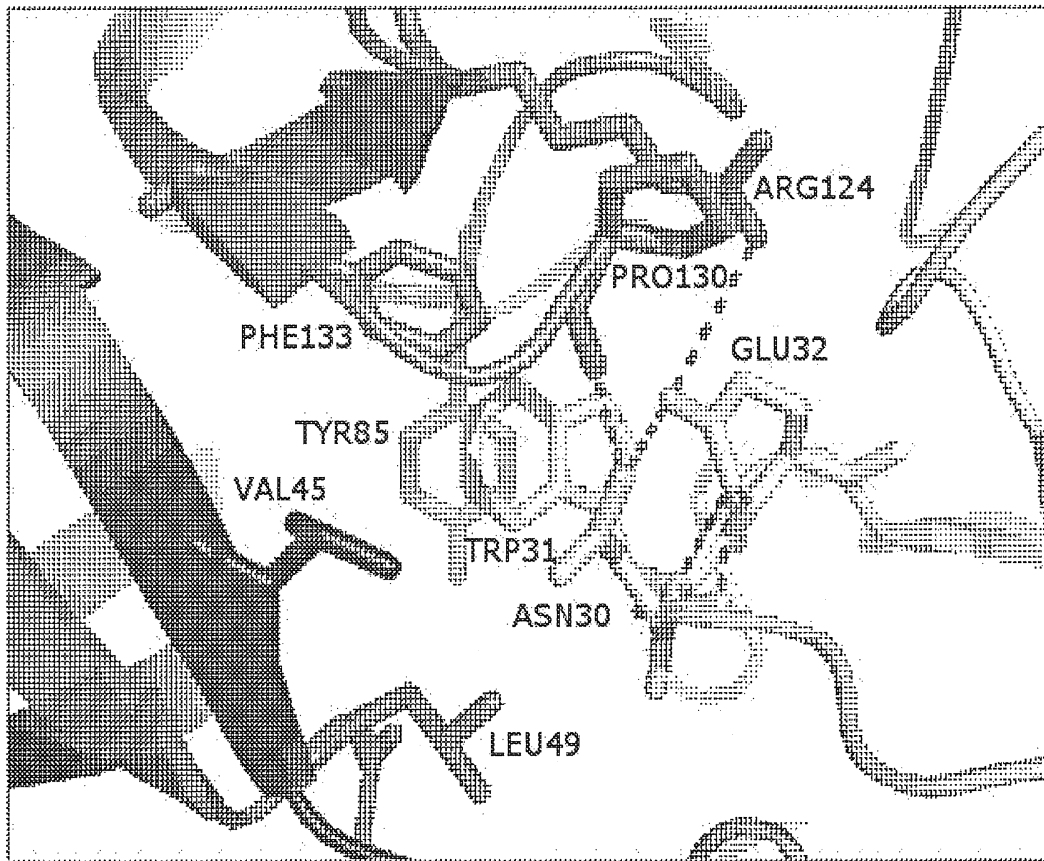


Fig. 9

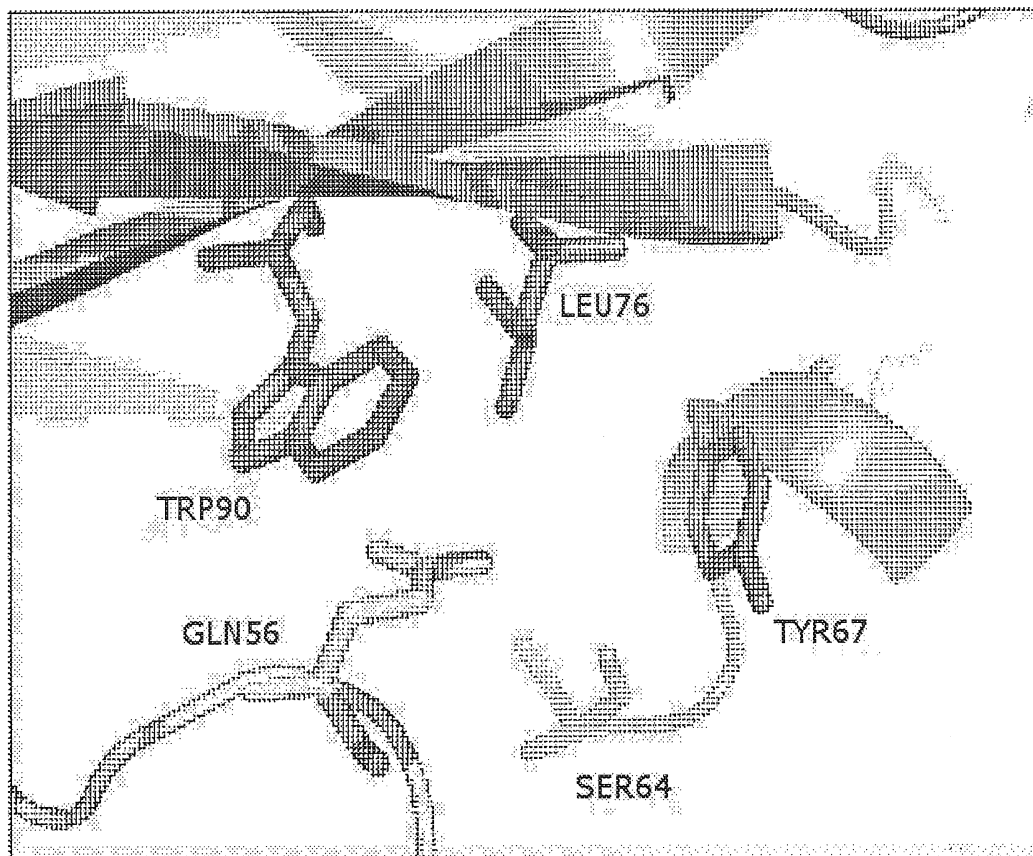


Fig. 10

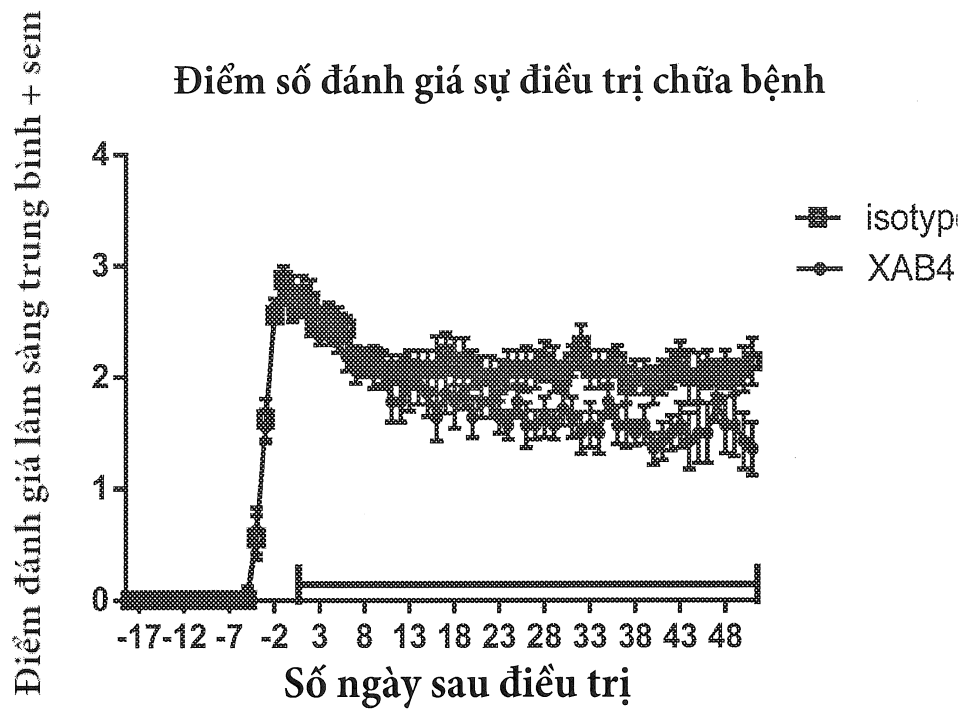


Fig. 11

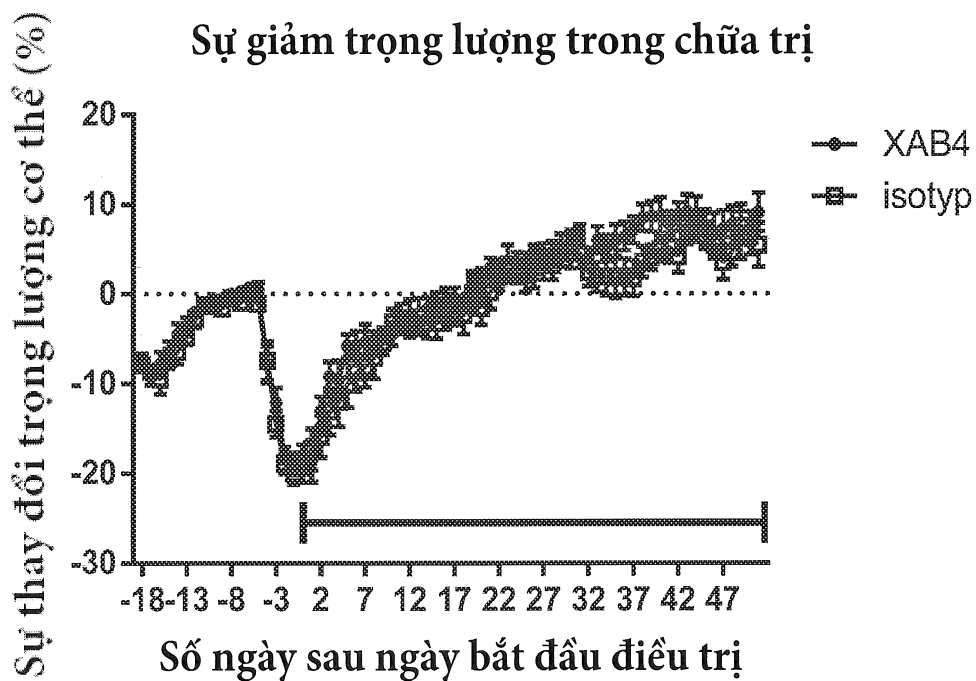


Fig. 12

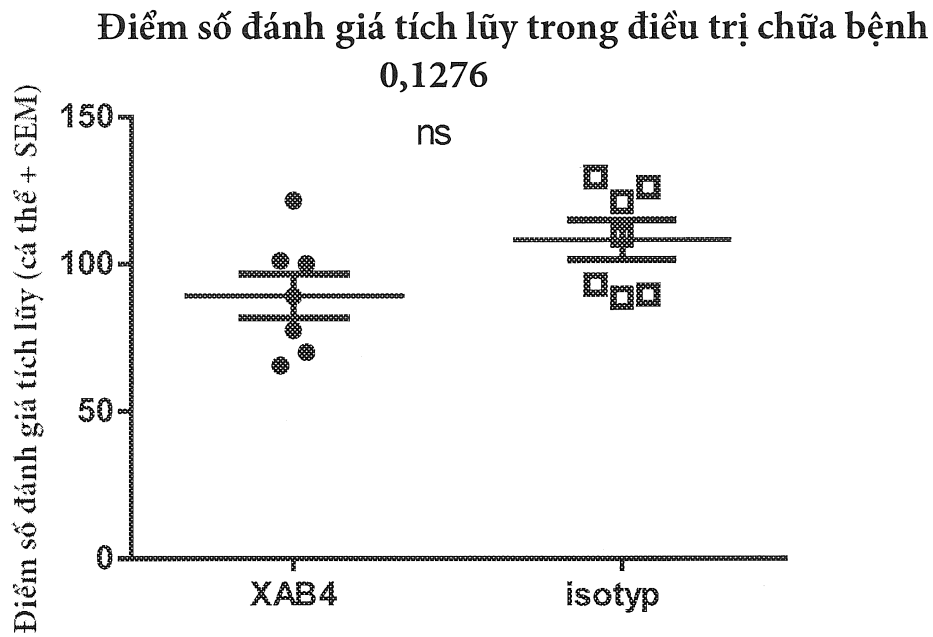


Fig. 13

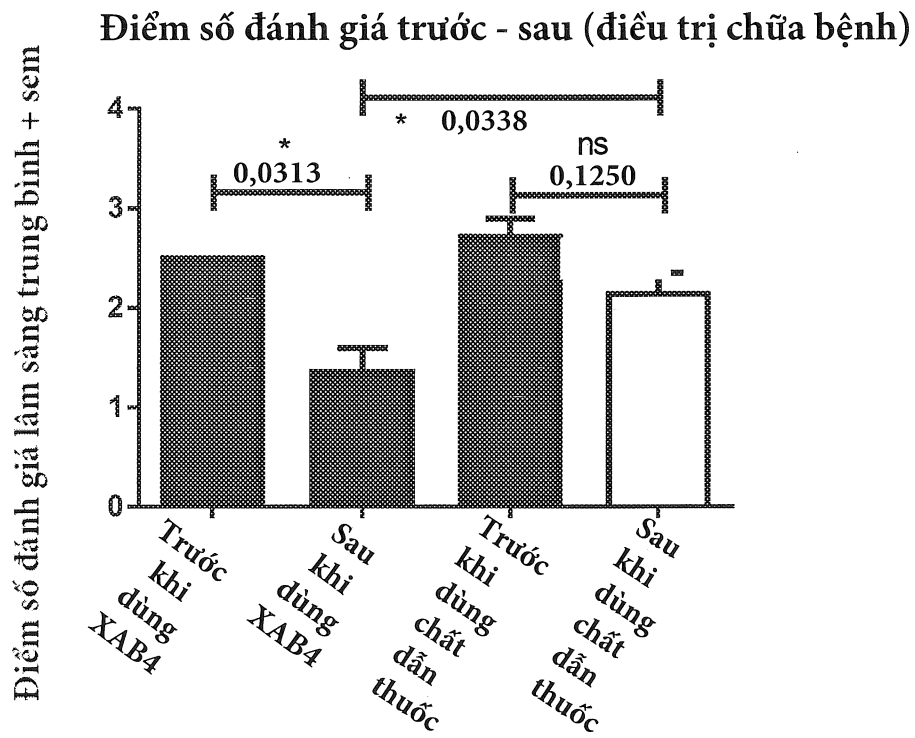


Fig. 14

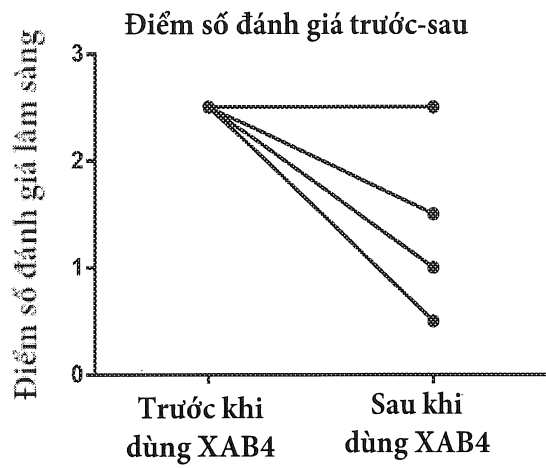


Fig. 15A

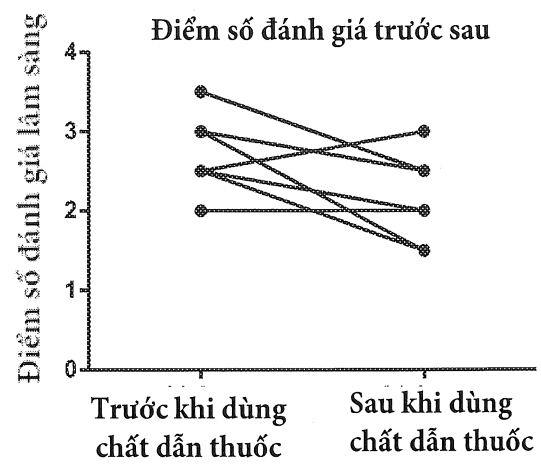


Fig. 15B

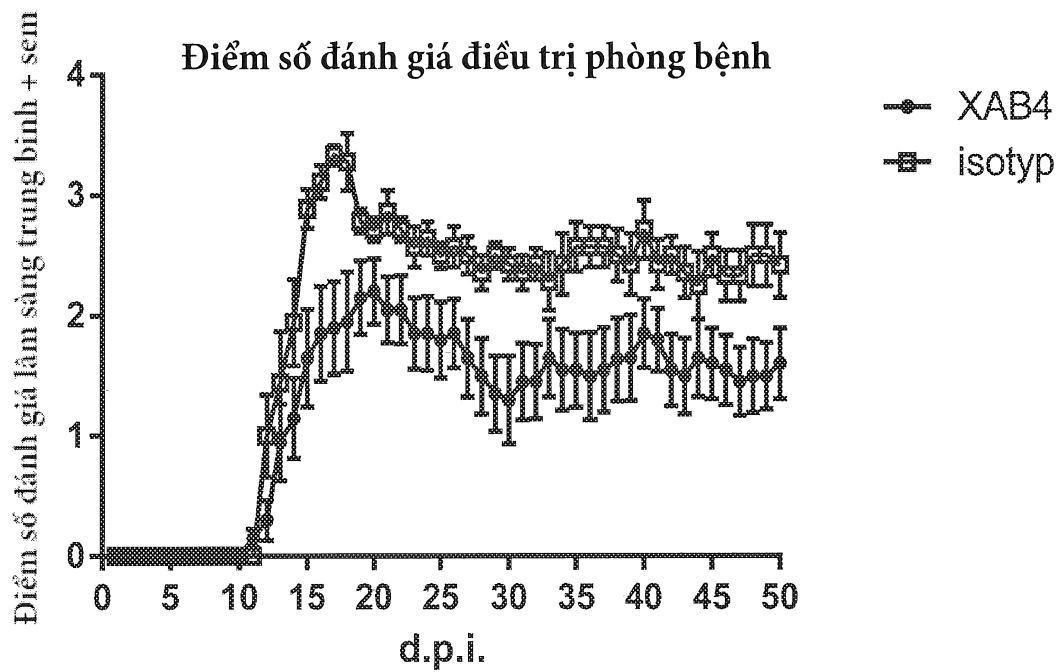


Fig. 16

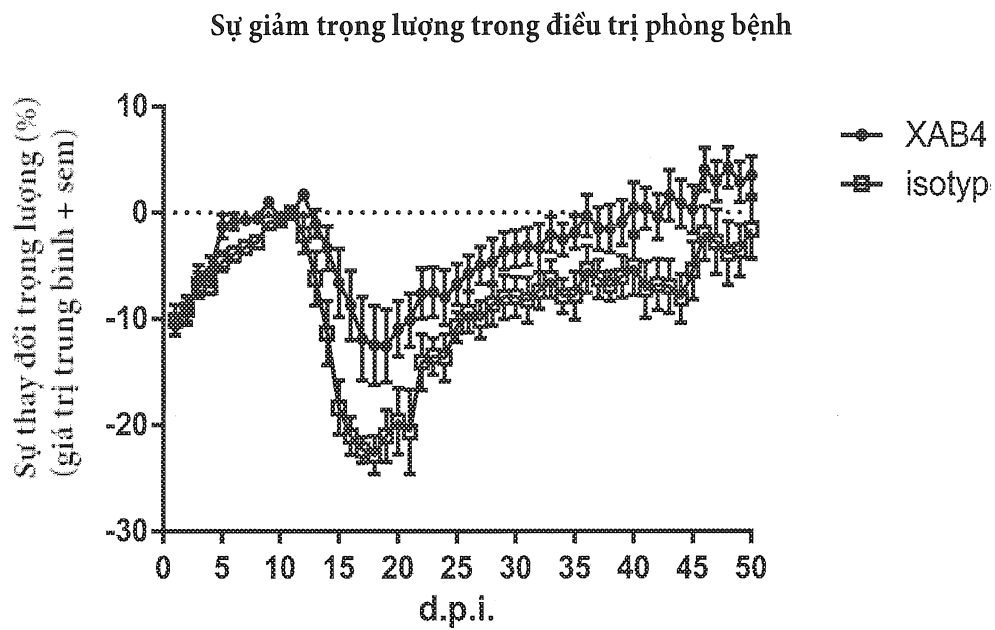


Fig. 17

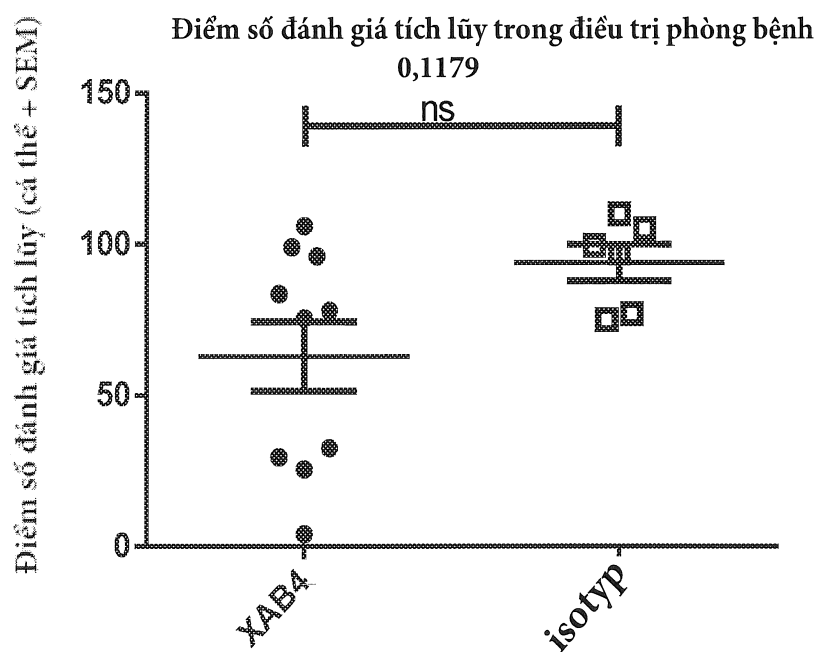


Fig. 18

Điểm số đánh giá tối đa

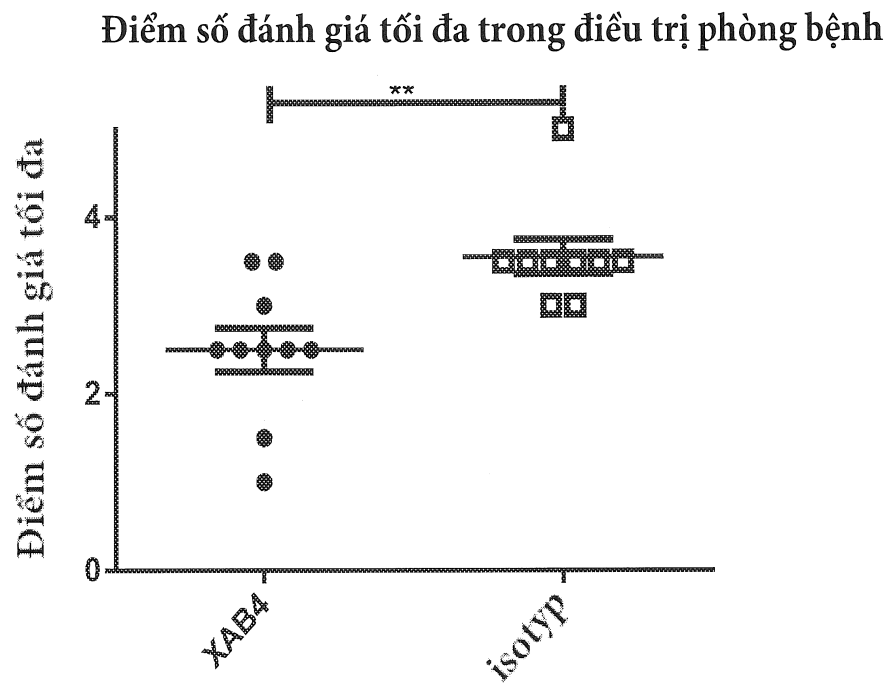


Fig. 19

Sự khởi phát EAE trong nhóm điều trị phòng bệnh

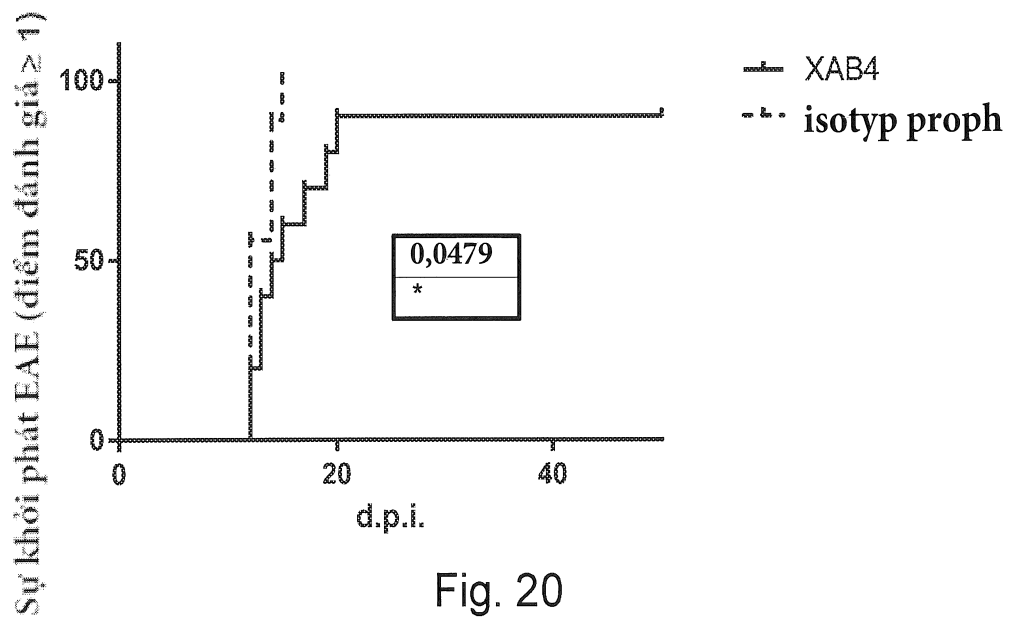


Fig. 20

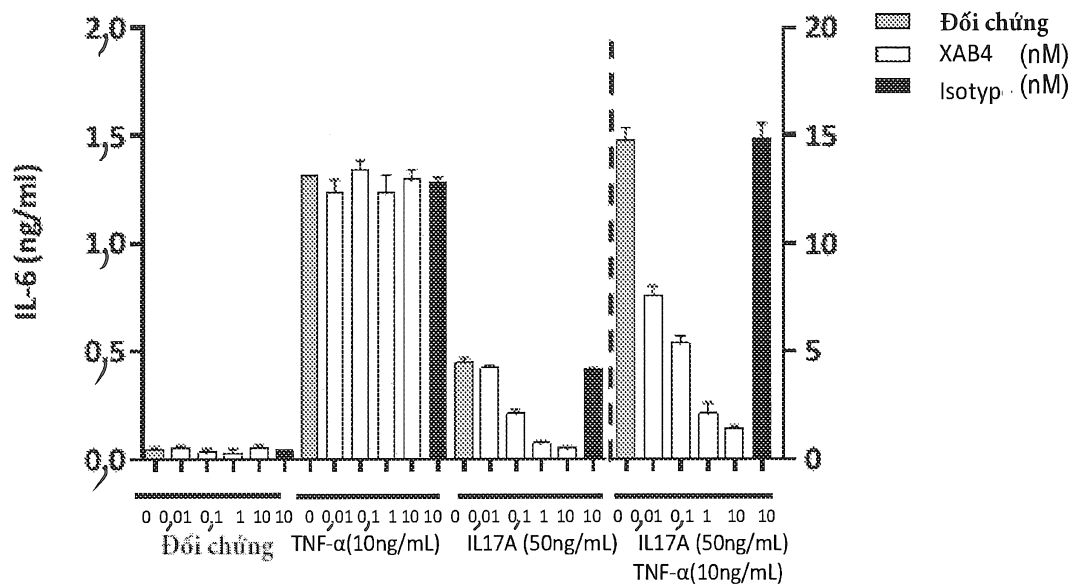


Fig. 21A

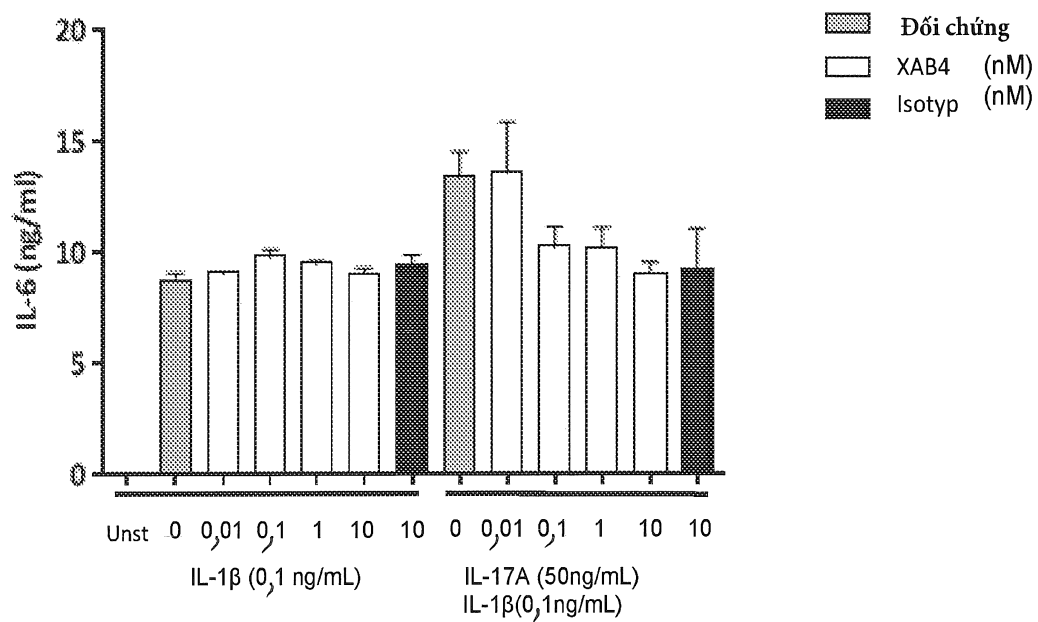


Fig. 21B

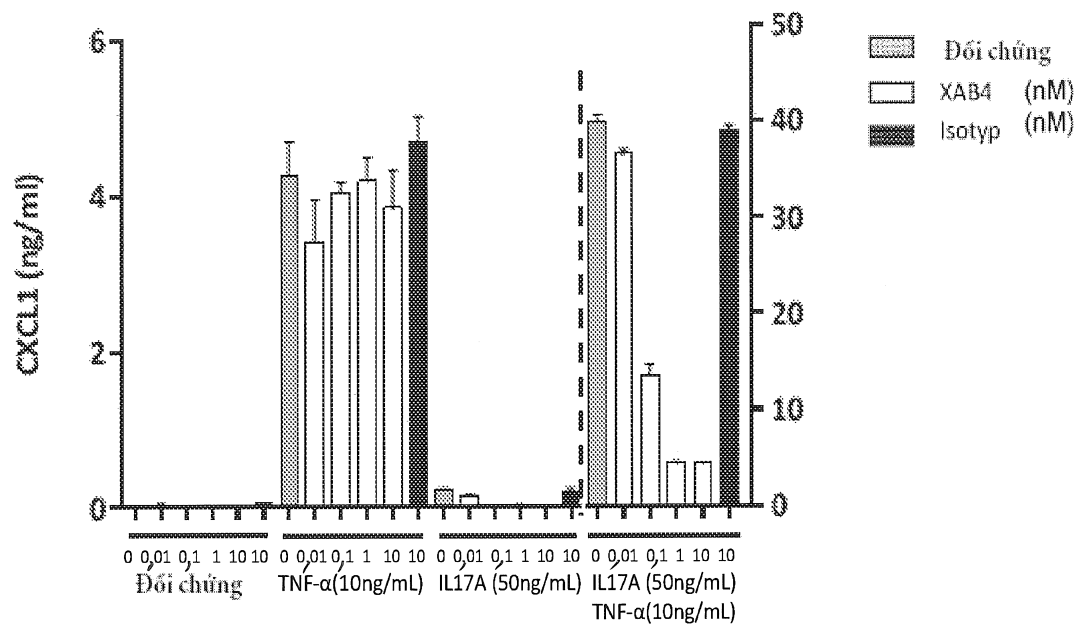


Fig. 22A

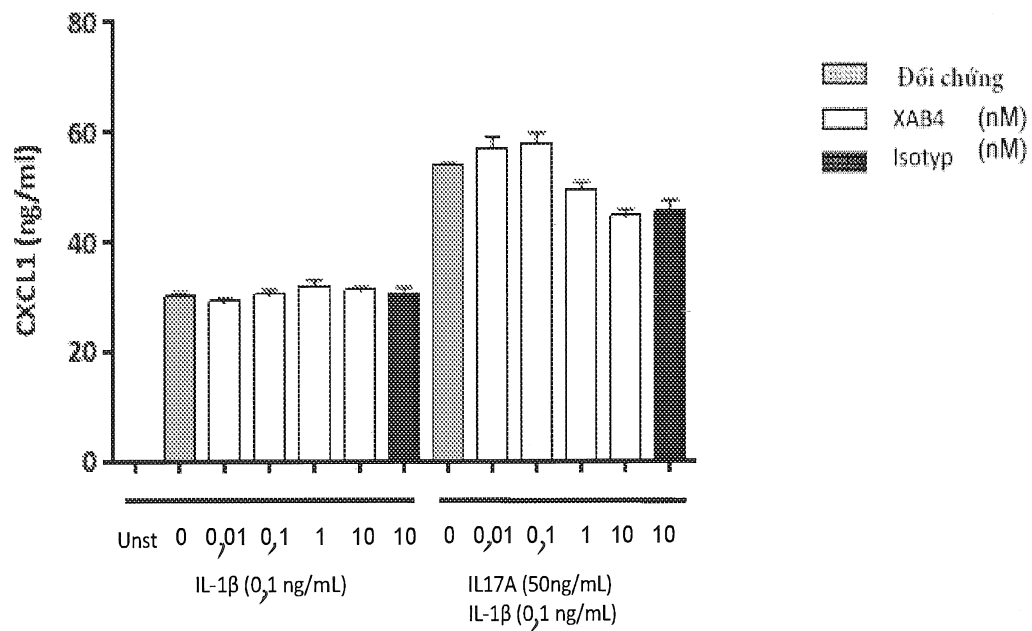


Fig. 22B

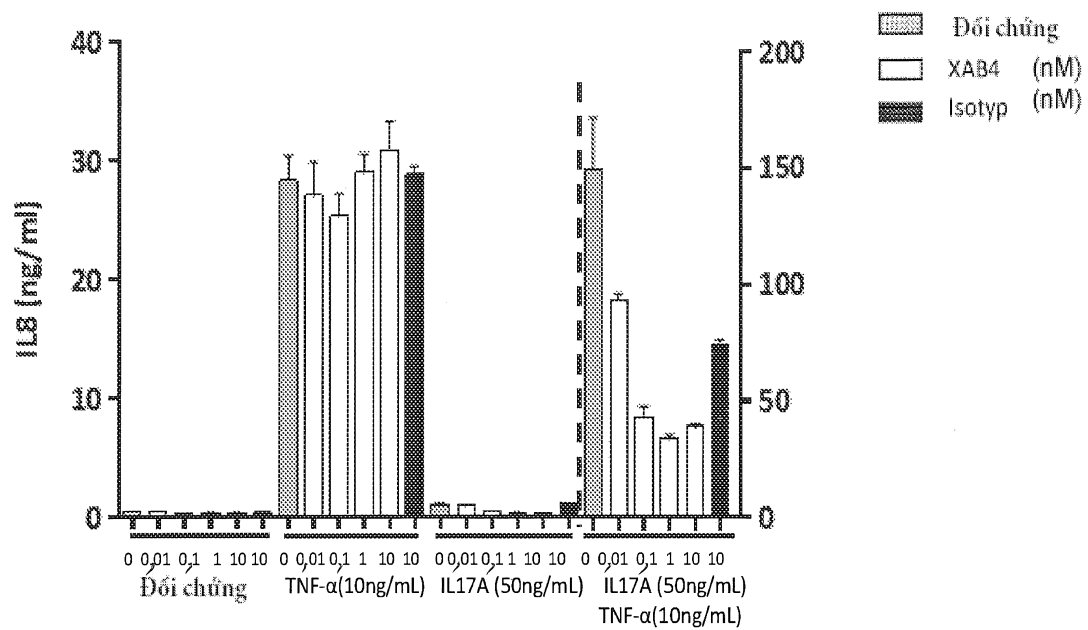


Fig. 23A

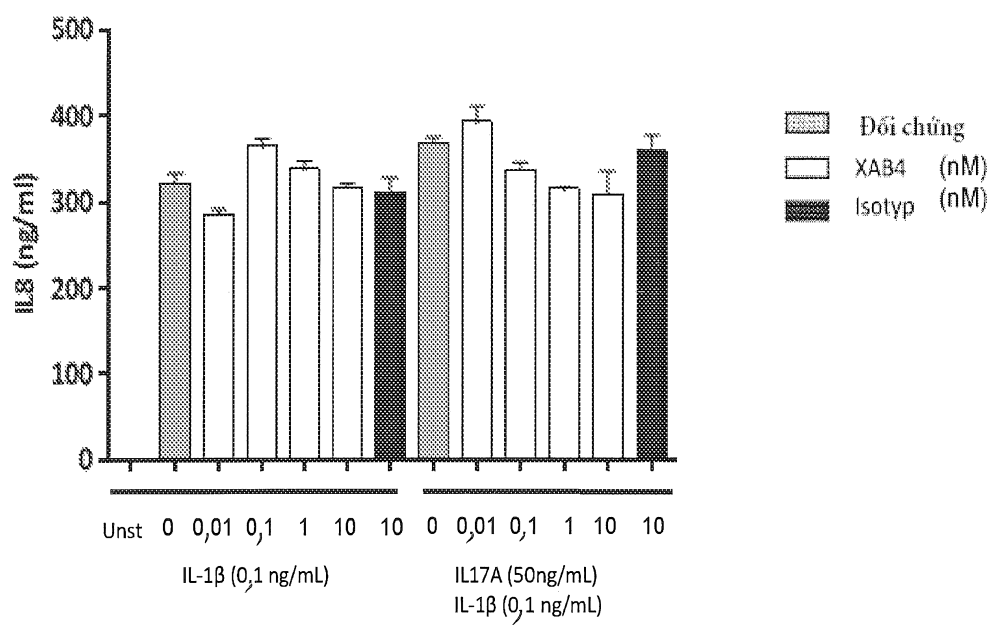


Fig. 23B

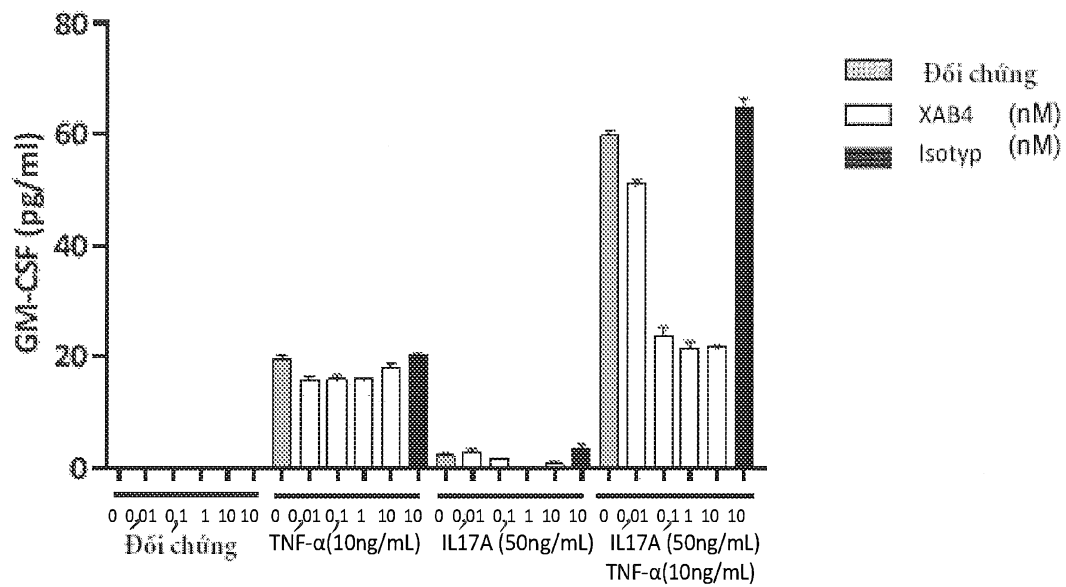


Fig. 24A

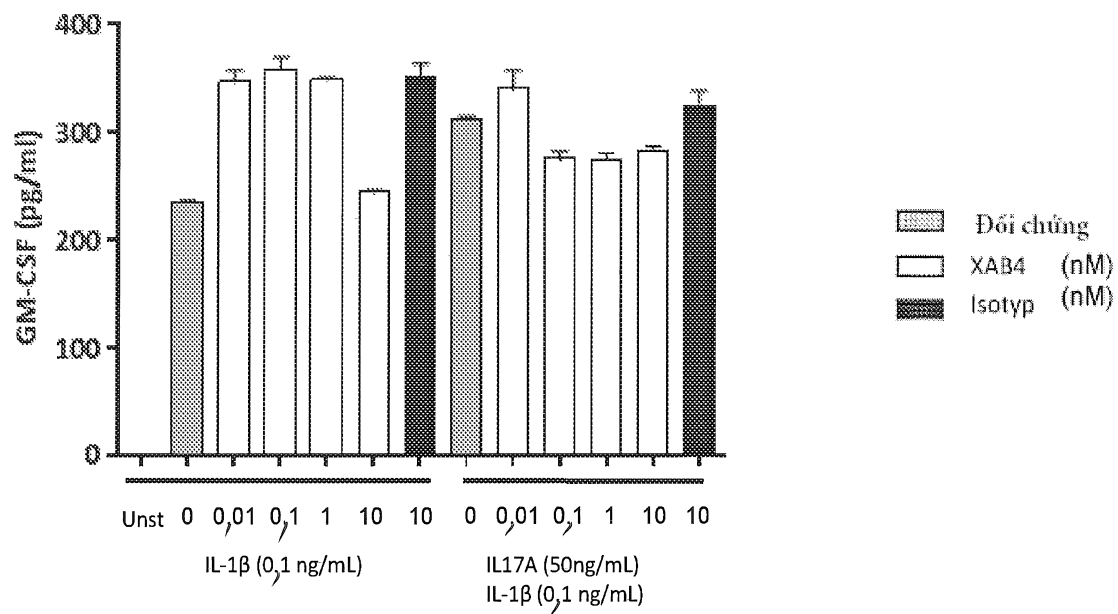


Fig. 24B

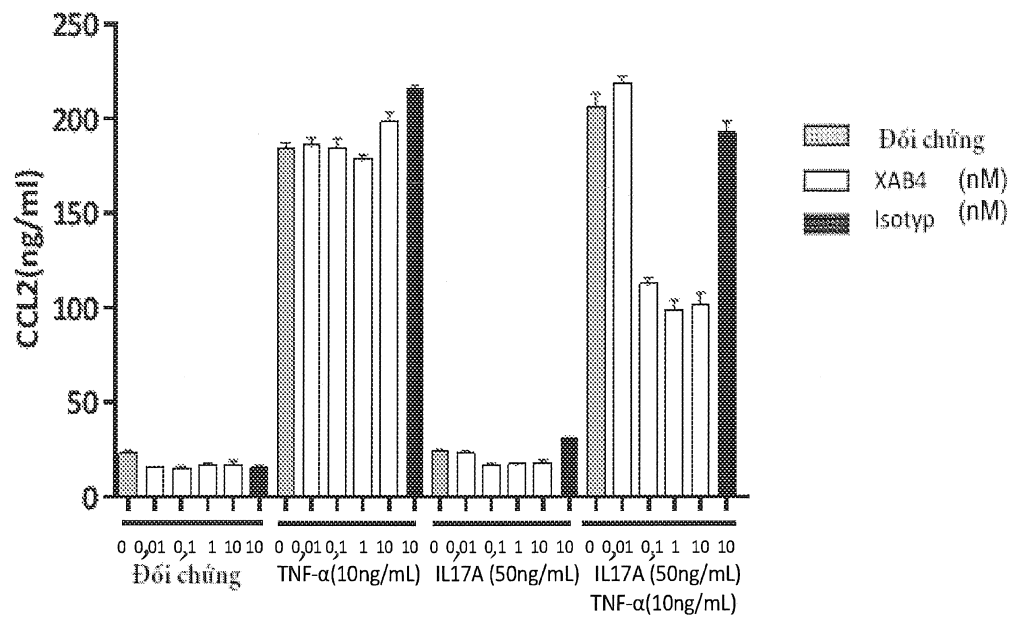


Fig. 25A

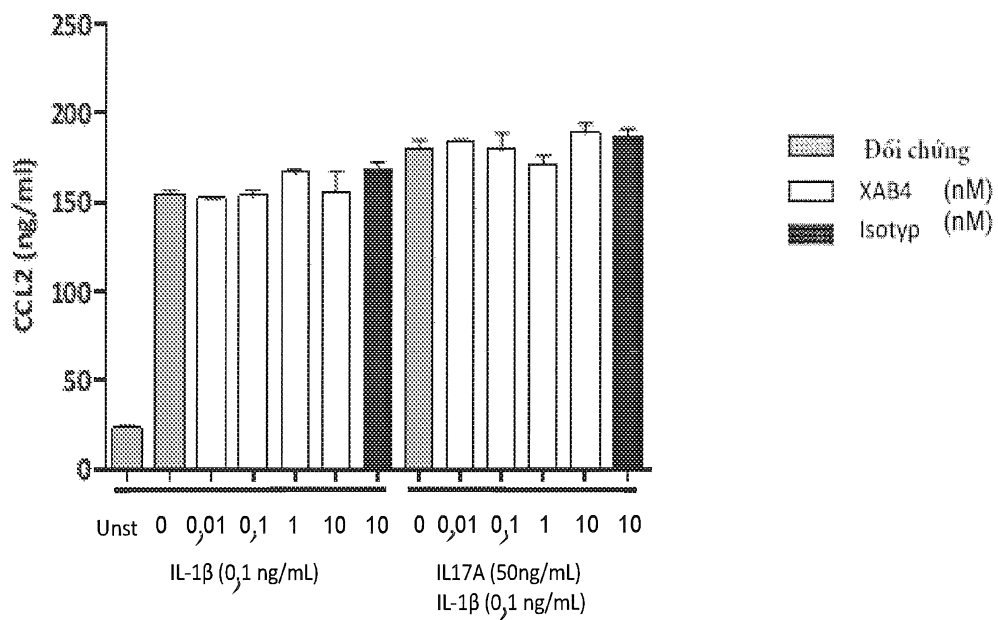


Fig. 25B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Novartis AG

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG IL-17A PHÂN LẬP ĐƯỢC, DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

<130> PAT055329

<140> PCT/IB2014/058854

<141> 2014-02-07

<150> US 61/762406

<151> 2013-02-08

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Gln Asp Gly Ser Glu
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Arg Gly Ser Leu Tyr Tyr
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Gln Gly Ile Ile Ser Ala
1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Ser
1

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Ile Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 14
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 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> 16
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggcgac ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg
 60
 agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctactgga tgcctgggt ccgccaggcc
 120
 cctggcaaag gcctcgaatg ggtggccaac atcaagcagg acggcagcga gaagtactac
 180
 gtggacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac
 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg
 300
 ggcagcctgt actattgggg ccagggcacc ctggtcaccg tgtccagc
 348

<210> 17
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
 60
 atcacttgcc ggccaagtca gggcattatc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaaatgg ggtcccatca
 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 18
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 18

gaggtgcagc tggtcgagtc tggcgggcgac ctggtgcagc ctggcgggcag cctgagactg
60

agctgcgccg ccagcggtt caccttcagc agctactgga tgtcctgggt cggccaggcc
120

cctggcaaag gcctcgaatg ggtggccaac atcaagcagg acggcagcga gaagtactac
180

gtggacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac
240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg
300

ggcagcctgt actattgggg ccagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag
360

ggccccagcg tgttccccct ggcccccagc agcaagagca ccagcgggcg cacagccgcc
420

ctgggctgcc tggatgaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcggg
480

gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc
540

ctgtccagcg tggatgacagt gccagcagc agcctgggca ccagaccta catctgcaac
600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac
660

aagaccaca cctgcccccc ctgcccagcc ccagagctgc tgggcggacc ctccgtgttc
720

ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc
780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc
840

gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg
900

gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc
960

aaggctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc
1020

cagccacggg agccccaggt gtacaccctg cccccctccc gggaggagat gaccaagaac
1080

caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccca gcgacatcg cgtggagtgg
1140

gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac
1200

ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac
1260

gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg
1320

agcctgtccc ccggcaag
1338

<210> 19
<211> 642
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 19
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc ggccaagtca gggcattatc agtgcttttag cctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaaatgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac tttcggcgga
300

gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac
420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag
480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 20
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Gln Val Ile Ile Ser Ala
1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Phe Asp Ser Tyr Pro Leu
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Pro Ser Gln Val Ile Ile Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Phe Asp Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

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

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

Ser Val 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 Phe Asp Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 26

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

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

Ser Val 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 Phe Asp Ser Tyr Pro Leu
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> 27

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 27

gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
60

atcacctgtc ggcccagcca ggtcatcatc agcgccctgg cctggtatca gcagaagcct
120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgcccagc
180

cggttcagcg gcagcgtgtc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttgcagagct accccctgac cttcggcgga
300

ggcaccaagg tggaaatcaa g
321

<210> 28
<211> 642
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 28
gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc
60

atcacctgtc ggcccagcca ggtcatcatc agcgccctgg cctggtatca gcagaagcct
120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgccagc
180

cggttcagcg gcagcgtgtc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcgacagct accccctgac cttcggcgga
300

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac
420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag
480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgagggtgac ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggagcagc gc
642

<210> 29
<211> 348
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 29
gagggtgcagc tgggtggaatc aggaggcgac ctgggtgcagc ctggcggtc actgagactg
60

agctgcgccg ctagtggctt cacctttagt agctactgga tgagctgggt gcgacaggcc
120

cctggcaagg gactggagtg ggtggccaat attaagcagg acggctcaga gaagtactac
180

gtggactcag tgaagggccg gttcactatt agccgggata acgctaagaa tagcctgtac
240

ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc tagagataga
300

ggctcactgt actactgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcttct
348

<210> 30
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 30
gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcca tagagtgact
60

atcacctgta gacctagtca ggtgatcatt agcgccctgg cctggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct
180

aggtttagcg gctcagtgtc aggcaaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc
240

gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttcgatagct accccctgac cttcggcgga
300

ggcactaagg tggaatcaa g
321

<210> 31
<211> 1338
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 31
gaggtgcagc tgggtggaatc aggaggcgac ctggtgcagc ctggcggctc actgagactg
60

agctgcgccg ctagtggctt cacctttagt agctactgga tgagctgggt gcgacaggcc
120

cctggcaagg gactggagtg ggtggccaat attaagcagg acggctcaga gaagtactac
180

gtggactcag tgaagggccg gttcactatt agccgggata acgctaagaa tagcctgtac
240

ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc tagagataga
300

ggctcactgt actactgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcttctgc tagcaccaag
360

ggcccaagtg tctttccctt ggcccccagc agcaagtcca caagcggagg cactgcagct
420

ctgggttgtc tggatgaagga ctacttcccc gagcccgtga cagtgtcctg gaacagcgga
480

gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc
540

ctgagcagcg tcgtgactgt gcctagtctc agcctgggca ccagaccta tatctgcaac
600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac
660

aagaccaca cctgcccccc ctgccagct ccagaactgc tgggaggacc cagcgtgttc
720

ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc
780

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggg
840

gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg
900

gtggtgtccg tcctgacagt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga atacaagtgc
960

aaagtctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga caatcagcaa ggccaagggc
1020

cagccacggg agccccaggt gtacacctg cccccagcc gggaggagat gaccaagaac
1080

caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccca gcgatatcgc cgtggagtgg
1140

gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac
1200

ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggaac
1260

gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg
1320

agcctgagcc ccggcaag
1338

<210> 32
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact
 60

atcacctgta gacctagtca ggtgatcatt agcgccctgg cctggtatca gcagaagccc
 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct
 180

aggttttagcg gctcagtgtc aggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc
 240

gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttcgatagct accccctgac cttcggcgga
 300

ggcactaagg tggaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac
 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgagagcgga caacagccag
 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc
 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
 642

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu
 1 5

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu Leu Ala
 1 5 10

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

27341

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
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> 37

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 37

gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatctac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct
120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgcccagc
180

cgtttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga
300

ggcaccaagg tggaaatcaa g
321

<210> 38

<211> 642

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 38

gccatccagc tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatctac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct
120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgcccagc
180

cgtttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga
300

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac
420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcaagcgg caacagccag
480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggagcgc gc
642

<210> 39

<211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact
 60
 atcacctgta gacctagcca gggaatctac tgggagctgg cctggatatca gcagaagccc
 120
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct
 180
 aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc
 240
 gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct acccctgac cttcggcgga
 300
 ggcaactaagg tggaatcaa g
 321

<210> 40
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact
 60
 atcacctgta gacctagcca gggaatctac tgggagctgg cctggatatca gcagaagccc
 120
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct
 180
 aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc
 240
 gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct acccctgac cttcggcgga
 300
 ggcaactaagg tggaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
 360
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcttgctgaa caacttctac
 420
 ccccgaggagg ccaagggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcaagcgcg caacagccag
 480
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gctgagcag caccctgacc
 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu
1 5

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu Leu Ala
1 5 10

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu

85

90

95

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

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
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> 45
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct
 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgcccagc
 180

cggttcagcg gcagcggatc cggcacccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctaacta ctgccagcag ttcaacagct acccctgac cttcgggcgga
 300

ggcaccaagg tggaaatcaa g
 321

<210> 46
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct
 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgcccagc
 180

cggttcagcg gcagcggatc cggcacccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga
300

ggcaccaagg tggaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac
420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgacagagcg caacagccag
480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtagc ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggagcgt gc
642

<210> 47

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 47

gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact
60

atcacctgta gacctagtca ggggattaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct
180

aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcacctga ctattagtag cctgcagccc
240

gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga
300

ggcactaagg tggaatcaa g
321

<210> 48

<211> 642

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 48

gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact
60

atcacctgta gacctagtca ggggattaac tgggagctgg cctggatatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct
180

aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc
240

gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttttaactcct accccctgac cttcggcgga
300

ggcactaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac
420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag
480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 49

<211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 49

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgac ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg
60

tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agctactgga tgcctgggt gcgacaggcc
120

cctggcaagg gactggaatg ggtggccaac atcaagcagg acggctccga gaagtactac
180

gtggactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac
240

ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg
300

ggctccctgt actattgggg ccagggcacc ctggtgacag tgcctcc
348

<210> 50

<211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 gccatccagc tgacccagtc cccctccagc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgacc
 60
 atcacctgtc ggccctccca gggcatcaac tgggaactgg cctggtatca gcagaagccc
 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggc cgtgccctcc
 180
 agattctccg gctctggctc cggcacccgac ttcacctga ccatctccag cctgcagccc
 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaactcct acccctgac cttcggcgga
 300
 ggcaccaagg tggaaatcaa g
 321

<210> 51
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 gaggtgcagc tgggtggaatc tggcgggcgac ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg
 60
 tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agctactgga tgcctgggt gcgacaggcc
 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccaac atcaagcagg acggctccga gaagtactac
 180
 gtggactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac
 240
 ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg
 300
 ggctccctgt actattgggg ccagggcacc ctggtgacag tgcctccgc ctccaccaag
 360
 ggcccaagcg tggtccccct ggccccagc agcaagagca ccagcggcg cacagccgcc
 420
 ctgggctgcc tgggtgaagga ctacttcccc gagcccgta ccgtgtcctg gaacagcgga
 480
 gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc
 540

ctgagcagcg tggtagaccgt gccagcagc agcctgggca cccagaccta catctgtaac
600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgtgac
660

aagaccaca cctgcccccc ctgccagcc cccgagctgc tgggaggacc cagcgtgttc
720

ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt
780

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc
840

gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg
900

gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt
960

aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc
1020

cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac
1080

caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccaa gcgacatcgc cgtggagtgg
1140

gagagcaacg gccagccga gaacaactac aagaccacc cccagtgtgt ggacagcgac
1200

ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac
1260

gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg
1320

agcctgtccc caggcaag
1338

<210> 52

<211> 642

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 52

gccatccagc tgaccagtc cccctccagc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc
60

atcacctgtc ggccctccca gggcatcaac tgggaactgg cctggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ccaagctgt gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgccctcc
180

agatttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccattctccag cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaactcct acccctgac cttcgggcga
300

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccca
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac
420

cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgagagcgg caacagccag
480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Pro	Ser	Gln	Gly	Ile	Asn	Trp	Glu
			20					25					30		

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

Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	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	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	

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

<210> 54
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
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> 55
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 gccatccagc tgacctagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct
 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaaaacgg cgtgcccagc
 180

cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct acccctgac cttcggcgga
 300

ggcaccaagg tggaaatcaa g
 321

<210> 56
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 gccatccagc tgacctagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc
 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct
 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaaaacgg cgtgcccagc
 180

cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc
 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct acccctgac cttcggcgga
 300

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac
420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag
480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgagggtgac ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 57
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 57
gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgccta gtgtgggcga tagagtgact
60

atcacctgta gacctagtca ggggattaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaaaacgg cgtgccctct
180

aggtttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc
240

gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga
300

ggcactaagg tggaaatcaa g
321

<210> 58
<211> 642
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 58
gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgccta gtgtgggcga tagagtgact
60

atcacctgta gacctagtca ggggattaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaaaacgg cgtgccctct
180

aggtttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc
240

gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga
300

ggcactaagg tggaaatcaa gcgtacgggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac
420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag
480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc
600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 59

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain leader sequence

<400> 59

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Val His Cys

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Light chain leader sequence

<400> 60

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 61
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Coding sequence for heavy chain leader sequence

<400> 61
atggaattcg gcctgagctg ggtgttctctg gtcgcgattc tggaaggcgt gcactgc
57

<210> 62
<211> 66
<212> ADN
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Coding sequence for light chain leader sequence

<400> 62
atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccagggcgc
60

agatgt
66

<210> 63
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Alternative heavy chain leader sequence

<400> 63

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala

<210> 64
<211> 20
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Alternative light chain leader sequence

<400> 64

Met	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr
1				5					10					15	

Gly	Thr	Arg	Cys
			20

<210> 65

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Coding sequence for alternative heavy chain leader sequence

<400> 65

atggcctggg tgtggaccct gcccttcctg atggccgctg ctgagtcagt gcaggcc
57

<210> 66

<211> 60

<212> ADN

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Coding sequence for alternative light chain leader sequence

<400> 66

atgagcgtgc tgactcaggt gctggccctg ctgctgctgt ggctgaccgg caccgctgc
60

<210> 67

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Second alternative heavy chain leader sequence

<400> 67

Met	Glu	Trp	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Gly
1				5					10					15	

Val	His	Ser
-----	-----	-----

<210> 68
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Second alternative light chain leader sequence

<400> 68

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys
 20

<210> 69
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Coding sequence for second alternative heavy chain leader sequence

<400> 69
 atggaatggt cctgggtggt cctgttcttc ctgtccgtga ccacaggcgt gcactcc
 57

<210> 70
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Coding sequence for second alternative light chain leader sequence

<400> 70
 atgtccgtgc ccacacaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc
 60

<210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(3)

<223> Variable

<220>

<221> Xaa

<222> (5)..(7)

<223> Variable

<400> 71

Ser Gln Xaa Ile Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Variable

<400> 72

Phe Xaa Ser Tyr Pro Leu
1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Xaa

<222> (5)..(5)

<223> Variable

<220>

<221> Xaa

<222> (7)..(9)

<223> Variable

<400> 73

Arg Pro Ser Gln Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Variable

<400> 74

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Xaa
 1 5

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Xaa
 <222> (4)..(4)
 <223> Variable

<400> 75

Gln Gln Phe Xaa Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 76
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
 1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
 20 25 30

Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
 35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
 50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp
 65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile

85 90 95
 Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
 100 105 110
 Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
 115 120 125
 His His Val Ala Glu Phe Arg His
 130 135
 <210> 77
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 77
 Met Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu
 1 5 10 15
 Ser Cys Pro Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile
 20 25 30
 Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg
 35 40 45
 Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr
 50 55 60
 Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn
 65 70 75 80
 Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln
 85 90 95
 Glu Thr Leu Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe
 100 105 110
 Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro
 115 120 125
 Val Ile His His Val Gln
 130

<210> 78
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

Gly Pro Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys
 1 5 10 15

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

Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp
 35 40 45

Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp
 50 55 60

Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val
 85 90 95

Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys
 100 105 110

Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr
 115 120 125

Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
 130 135

<210> 79
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

<400> 79

Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
 1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
 20 25 30

Thr Ser Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Lys Ala Asp
65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
115 120 125

His His Val Ala
130

<210> 80

<211> 134

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 80

Met Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu
1 5 10 15

Ser Cys Pro Pro Val Pro Glu Gly Ser Met Lys Leu Asp Thr Gly Ile
20 25 30

Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg
35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr
50 55 60

Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Lys His Leu Gly Cys Ile Asn
65 70 75 80

Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln
85 90 95

Glu Thr Leu Val Leu Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe
100 105 110

Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro
115 120 125

Val Val His His Val Gln
130

<210> 81
<211> 132
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 81

Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
20 25 30

Thr Ser Thr Ser Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Lys Ala Asp
65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
115 120 125

His His Val Ala
130

<210> 82
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Callithrix jacchus

<400> 82

Ser Pro Gln Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ala Glu Asp Lys Asn Phe Pro
 1 5 10 15

Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile Arg Asn Arg Asn Thr Asn Ser
 20 25 30

Lys Arg Ala Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Ser Ser Pro Trp Asn Leu
 35 40 45

His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala
 50 55 60

Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Asp Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr
 65 70 75 80

His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg
 85 90 95

Glu Pro Arg His Cys Thr Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Met Leu Val
 100 105 110

Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
 115 120 125

<210> 83
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 83

Met Ala Ala Ile Ile Pro Gln Ser Ser Ala Cys Pro Asn Thr Glu Ala
 1 5 10 15

Lys Asp Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val Phe Asn Ser
 20 25 30

Leu Gly Ala Lys Val Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr Leu Asn Arg

35

40

45

Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Asp Arg Tyr
 50 55 60

Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu Ile Gln Gln
 85 90 95

Glu Ile Leu Val Leu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Cys Pro Phe Thr Phe
 100 105 110

Arg Val Glu Lys Met Leu Val Gly Val Gly Cys Thr Cys Val Ala Ser
 115 120 125

Ile Val Arg Gln Ala Ala
 130

<210> 84

<211> 141

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

Ala Pro Glu Pro Glu Phe Arg His Arg Lys Asn Pro Lys Ala Gly Val
 1 5 10 15

Pro Ala Leu Gln Lys Ala Gly Asn Cys Pro Pro Leu Glu Asp Asn Thr
 20 25 30

Val Arg Val Asp Ile Arg Ile Phe Asn Gln Asn Gln Gly Ile Ser Val
 35 40 45

Pro Arg Glu Phe Gln Asn Arg Ser Ser Ser Pro Trp Asp Tyr Asn Ile
 50 55 60

Thr Arg Asp Pro His Arg Phe Pro Ser Glu Ile Ala Glu Ala Gln Cys
 65 70 75 80

Arg His Ser Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly Gln Glu Asp Ser Thr Met
 85 90 95

Asn Ser Val Ala Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro
 100 105 110

Gln Gly Cys Ser Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Met Leu Leu Lys Val
 115 120 125

Gly Cys Thr Cys Val Lys Pro Ile Val His Gln Ala Ala
 130 135 140

<210> 85
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 85

Met Ala Val Leu Ile Pro Gln Ser Ser Val Cys Pro Asn Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Asn Asn Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val Ile Asn Ser
 20 25 30

Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr Leu Asn Arg
 35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu Ser Arg Asn Glu Asp Pro Asp Arg Tyr
 50 55 60

Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu Ile Gln Gln
 85 90 95

Glu Ile Leu Val Leu Lys Arg Glu Pro Glu Lys Cys Pro Phe Thr Phe
 100 105 110

Arg Val Glu Lys Met Leu Val Gly Val Gly Cys Thr Cys Val Ser Ser
 115 120 125

Ile Val Arg His Ala Ser
 130

<210> 86

<211> 295
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86

Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile His
 1 5 10 15

Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu
 20 25 30

His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile
 35 40 45

Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala
 50 55 60

Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg
 65 70 75 80

Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe
 85 90 95

Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr
 100 105 110

Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln
 115 120 125

Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val
 130 135 140

Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr
 145 150 155 160

Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp
 165 170 175

Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met
 180 185 190

Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg
 195 200 205

Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn
 210 215 220

Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser
 225 230 235 240

Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro
 245 250 255

Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp
 260 265 270

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
 275 280 285

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 290 295