



(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)



1-0032006

(51)⁷ A61K 39/395

(13) B

(21) 1-2016-01638

(22) 06/11/2014

(86) PCT/US2014/064302 06/11/2014

(87) WO 2015/069865 A1 14/05/2015

(30) 61/900,596 06/11/2013 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 26/09/2016 342A

(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)

800/850 Ridgeview Drive Horsham, Pennsylvania 19044 (US)

(72) BOAKYE, Ken (US); DEL VECCHIO, Alfred (US); KEHOE, John (US); LACY, Eilyn (US); MURRAY, Lynne (GB); RYAN, Mary (US); SANTULLI-MAROTTO, Sandra (US); WHEELER, John (US); WHITAKER, Brian (US); TEPLYAKOV, Alexey (US).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CCL17 CỦA NGƯỜI VÀ
DƯỢC PHẨM BAO GỒM KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17, các polynucleotit mã hóa các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể, và các phương pháp tạo và sử dụng chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17, các polynucleotit mã hóa các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể, và các phương pháp tạo và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chemokin cân bằng nội môi, CCL17 (TARC, phối tử 17 chemokin (loại C-C)) là chất hóa ứng động lympho bào hiệu lực cao. CCL17 là phối tử cho CCR4, một GPCR được cho là quan trọng trong chức năng của các tế bào T, trong sự hướng hóa chất cũng như trong di chuyển các tế bào miễn dịch tới các vị trí viêm. CCR4 chủ yếu được biểu hiện trên các lympho bào Th2, các tế bào tiêu diệt tự nhiên và các tế bào iNKT.

CCL17 có liên quan đến các căn bệnh ở người ảnh hưởng tới các cơ quan khác nhau như viêm loét đại tràng (UC), viêm da dị ứng (AD), xơ hóa phổi tự phát/vô căn (IPF) và hen suyễn (Belperio và cộng sự, *J Immunol (Tập chí Miễn dịch học)*, 173: 4692-469, 2004; Christophi và cộng sự, *Inflamm Bowel Dis. (Bệnh viêm đường ruột)* Mã số: 10.1002/ibd.2295; Inoue và cộng sự, *Eur Respir J (Tập chí Hô hấp châu Âu)*, 24: 49-56, 2004; Kakinuma và cộng sự, *J Allergy Clin Immunol (Tập chí Miễn dịch học lâm sàng và Dị ứng)*, 107: 535-541, 2001; Saeki và Tamaki, *J Dermatol Sci (Tập chí Khoa học da liễu)*, 43: 75-84, 2006; Tamaki và cộng sự, *J Dermatol (Tập chí Khoa da liễu)*, 33: 300-302, 2006). Ở chuột, CCL17 gắn liền với các bệnh truyền nhiễm và tình trạng viêm khác nhau như viêm phổi mạn tính có trong các mẫu bị bệnh xơ hóa và hen suyễn, đại tràng và bệnh sán máng, có lẽ bằng cách gây ra các đáp ứng Th2 qua việc tăng các tế bào miễn dịch CCR4⁺. Sự trung hòa CCL17 làm cải thiện các ảnh hưởng của bệnh hen suyễn ở cả hai mẫu nhiễm nấm *A. fumigatus* và albumin trứng (ovalbumin, OVA), và sự tổn thương gan trong mẫu chuột bị nhiễm vi khuẩn *P. acnes* mắc chứng tổn thương gan gây ra, bằng

cách chặn dòng chảy vào của các tế bào T (Carpenter và Hogamoam *Infect Immun (Bệnh truyền nhiễm và Miễn dịch)*, 73:7198-7207, 2005; Heiseke và cộng sự, *Gastroenterology (Ngành học dạ dày-ruột)*, 142:335-345; Hogamoam và cộng sự, *Med Mycol (Nấm y học)*, 43 Suppl 1, S197-202, 2005; Ismailoglu và cộng sự, Việc định mục tiêu điều trị CCL17 thông qua điều trị toàn thân bằng kháng thể đơn dòng sẽ cải thiện bệnh hen suyễn do nấm trong thực nghiệm. Tài liệu được trình bày trong *Am J Respir Crit Care Med (Tạp chí Hô hấp và Hồi sức cấp cứu Hoa Kỳ)*, 2011; Jakubzick và cộng sự, *Am J Pathol (Tạp chí bệnh học Hoa Kỳ)*, 165:1211-122, 2004; Kawasaki và cộng sự, *J Immunol (Tạp chí miễn dịch học)*, 166:2055-2062, 2001; Yoneyama và cộng sự, *J Clin Invest (Tạp chí xét nghiệm lâm sàng)*, 102:1933-1941, 1998;

CCL22 (MDC) là phối tử thứ hai cho CCR4. Tương tác CCR4 với từng chemokine tạo ra các kết quả khác nhau (Allen và cộng sự, *Annu Rev Immunol (Tạp chí miễn dịch học niên san)* 25:787-820, 2007; Imai và cộng sự, *J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học)* 273:1764-1768, 1998), có thể do sự chênh lệch trong các ái lực liên kết của hai phối tử đối với CCR4. CCL22 liên kết với CCR4 bằng ái lực cao hơn và tạo ra sự nội thực hóa của thụ thể nhanh hơn CCL17 (Baatar và cộng sự, *J Immunol (Tạp chí miễn dịch học)* 179:1996-2004, 2007; Imai và cộng sự, *J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học)*, 273:1764-1768, 1998; Mariani và cộng sự, *Eur J Immunol (Tạp chí miễn dịch học châu Âu)* 34:231-240, 2004), và làm tăng sự gắn kết tế bào nhanh hơn CCL17 (D'Ambrosio và cộng sự, *J Immunol (Tạp chí miễn dịch học)* 169:2303-2312, 2002). CCL22 cho thấy biểu hiện bị hạn chế hơn với việc sản xuất chúng bị hạn chế trong các tế bào miễn dịch, trong khi CCL17 được biểu hiện và tiết ra bởi nhiều loại tế bào bao gồm cả các tế bào không phải tế bào miễn dịch (Alferink và cộng sự, *J Exp Med (Tạp chí y học thực nghiệm)* 197:585-599, 2003; Berin và cộng sự, *Am J Respir Cell Mol Biol (Tạp chí Tế bào hô hấp và Sinh học phân tử Hoa Kỳ)* 24:382-389, 2001; Godiska và cộng sự, *J Exp Med (Tạp chí y học thực nghiệm)*, 185:1595-1604, 1997; Imai và cộng sự, *J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học)*, 271:21514-21521, 1996; Saeki và Tamaki, *J Dermatol Sci (Tạp chí Khoa học da liễu)*, 43:75-84, 2006). Trong mẫu chuột thí nghiệm bị thắt và chọc thủng manh tràng (cecal ligation and puncture, CLP) bị nhiễm trùng huyết, CCL22 làm tăng hệ miễn dịch bẩm sinh trong khi

CCL17 có vẻ can thiệp, và trong một số trường hợp, góp phần gây tổn hại cơ quan (Matsukawa và cộng sự, *Rev Immunogenet (Tập chí miễn dịch di truyền học)* 2:339-358, 2000). Trong mẫu chuột bị nhiễm trùng xâm lấn do nấm *Aspergillus*, CCL22 đóng vai trò bảo vệ trong phản ứng kháng nấm bẩm sinh trong khi CCL17 đóng vai trò làm thành phần ức chế (Carpenter và Hogaboam, *Infect Immun (Bệnh truyền nhiễm và Miễn dịch)* 73:7198-7207, 2005). Hai chemokin này đóng các vai trò đối lập trong thiết lập các vị trí viêm cục bộ do các tác động khác nhau lên sự cân bằng nội môi của các Treg (T Regulator Cell, tế bào điều hòa T) trong đó việc tăng Treg là do CCL22 chứ không phải CCL17 (Heiseke và cộng sự, *Gastroenterology ((Ngành học dạ dày-ruột)* 142:335-345, 2011; Montane và cộng sự, *J Clin Invest (Tập chí xét nghiệm lâm sàng)*, 121:3024-30, 2011; Weber và cộng sự, *J Clin Invest (Tập chí xét nghiệm lâm sàng)*, 121:2898-2910, 2011).

Trong mẫu động vật quá mẫn do tiếp xúc, CCL17 là yếu tố chính trong khởi động sự quá mẫn do tiếp xúc điều khiển phản ứng viêm (CHS) để thử nghiệm với FITC hoặc DNFB, và việc bất hoạt CCL17 trong các con chuột này làm tăng sự sống của các trường hợp ghép mô tim cùng loại so với các con chuột dị hợp có một alen CCL17 hoạt động (Alferink và cộng sự, *J Exp Med (Tập chí y học thực nghiệm)* 197:585-599, 2003).

Chất đối kháng CCR4 có thể không có tính chọn lọc và ức chế các chức năng của cả CCL17 và CCL22. Do đó, cần phải có kháng thể kháng CCL17 để điều trị các căn bệnh qua trung gian CCL17 bao gồm hen suyễn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một phương án của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 của người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó kháng thể cạnh tranh để liên kết với CCL17 người với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 45 và VL có SEQ ID NO: 52.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 của người có trình tự có SEQ ID NO: 1, trong đó kháng thể liên kết với CCL17 người ít nhất trong các gốc axit amin 21-23, 44-45 và 60-68.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người, trong đó kháng thể liên kết với CCL17 người bằng hằng số ái lực (K_D) bằng khoảng 1×10^{-10} M hoặc thấp hơn, khi K_D được đo bằng cách sử dụng ái lực cân bằng trong dung dịch trong dung dịch đệm là dung dịch muối đẳng trương gốc tris chứa 0,05 % Tween-20 sau khi đồng nuôi cấy kháng thể và CCL17 người trong 48 giờ tại 4 °C.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người, bao gồm các trình tự HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nhất định.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người bao gồm các trình tự VH và VL nhất định.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người, trong đó kháng thể bao gồm VH bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % hoặc 99 % với VH có SEQ ID NO: 46 và VL bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % hoặc 99 % với VL có SEQ ID NO: 62.

Phương án khác của sáng chế là dược phẩm bao gồm kháng thể của sáng chế và chất mang dược dụng.

Phương án khác của sáng chế là polynucleotit phân lập mã hóa VH hoặc VL của sáng chế.

Phương án khác của sáng chế là vector bao gồm polynucleotit của sáng chế.

Phương án khác của sáng chế là tế bào chủ bao gồm vector của sáng chế.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp tạo kháng thể của sáng chế, bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ của sáng chế trong các điều kiện sản sinh kháng thể.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp điều trị căn bệnh qua trung gian CCL17, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể của sáng chế trong khoảng thời gian đủ để điều trị căn bệnh qua trung gian CCL17.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp điều trị bệnh hen suyễn hoặc chứng tăng phản ứng đường hô hấp, bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể của sáng chế trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh hen suyễn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A minh họa sự ức chế sự hướng hóa chất bằng kháng thể B302 kháng CCL17, được tạo ra bởi 1 nM CCL17 người trong các tế bào CCRF-CEM. B302 là C17B302.

Hình 1B minh họa sự ức chế sự hướng hóa chất bằng kháng thể B311 kháng CCL17, được tạo ra bởi 1 nM CCL17 người trong các tế bào CCRF-CEM. B311 là C17B311.

Hình 1C minh họa tác động của lớp kháng thể đối chứng IgG2 lên sự hướng hóa chất, gây ra bởi 1 nM CCL17 người trong các tế bào CCRF-CEM.

Hình 1D minh họa tác động của lớp kháng thể đối chứng IgG4 lên sự hướng hóa chất, gây ra bởi 1 nM CCL17 người trong các tế bào CCRF-CEM.

Hình 2A minh họa sự ức chế sự hướng hóa chất bằng kháng thể B302 kháng CCL17, gây ra bởi 1 nM CCL17 khỉ trong các tế bào HSC-F. B302 là C17B302.

Hình 2B minh họa sự ức chế sự hướng hóa chất bằng kháng thể B311 kháng CCL17, gây ra bởi 1 nM CCL17 khỉ trong các tế bào HSC-F. B311 là C17B311.

Hình 2C minh họa tác động của lớp kháng thể đối chứng IgG2 lên sự hướng hóa chất, gây ra bởi 1 nM CCL17 khỉ trong các tế bào HSC-F.

Hình 2D minh họa tác động của lớp kháng thể đối chứng IgG4 lên sự hướng hóa chất, gây ra bởi 1 nM CCL17 khỉ trong các tế bào HSC-F.

Hình 3 minh họa các trình tự VH của các kháng thể kháng CCL17 liên kết với CCL17 người bằng K_D nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM. C17B234VH: SEQ ID NO: 45; C17B235VH: SEQ ID NO: 45; C17B236VH: SEQ ID NO: 45; C17B239VH: SEQ ID NO: 45; C17B240VH: SEQ ID NO: 45; C17B241VH: SEQ ID NO: 45; C17B243VH: SEQ ID NO: 45; C17B244VH: SEQ ID NO: 45; C17B293VH: SEQ ID NO: 46; C17B294VH: SEQ ID NO: 47.

Hình 4 minh họa các trình tự HCDR và VH liên ứng của các kháng thể kháng CCL17 minh họa trong Hình 3 liên kết với CCL17 người bằng K_D nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM.

Hình 5 minh họa các trình tự VL của các kháng thể kháng CCL17 liên kết với CCL17 người bằng K_D nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM. C17B234VL: SEQ ID NO: 50; C17B235VL: SEQ ID NO: 51; C17B236VL: SEQ ID NO: 52; C17B239VL: SEQ ID NO: 55; C17B240VL: SEQ ID NO: 56; C17B241VL: SEQ ID NO: 57; C17B243VL: SEQ ID NO: 59; C17B244VL: SEQ ID NO: 60; C17B293VL: SEQ ID NO: 62; C17B294VL: SEQ ID NO: 62.

Hình 6A minh họa các trình tự VL liên ứng của các kháng thể kháng CCL17 minh họa trong Hình 5 liên kết với CCL17 người bằng K_D nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM.

Hình 6B minh họa các trình tự LCDR liên ứng của các kháng thể kháng CCL17 minh họa trong Hình 5 liên kết với CCL17 người bằng K_D nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM.

Hình 7 minh họa các gốc quyết định kháng nguyên (epitope) và vị trí liên kết với kháng nguyên (paratope) của kháng thể C17B236. Các gốc của paratope của VH và VL ở trong ô hình hộp, và các gốc của epitope CCL17 được khoanh tròn. Việc đánh số gốc tuân theo SỐ ID TRÌNH TỰ: 45 (VH), SỐ ID TRÌNH TỰ: 52 (VL), SỐ ID TRÌNH TỰ: 1 (CCL17).

Mô tả chi tiết sáng chế

Tất cả các tài liệu ẩn phẩm, bao gồm nhưng không giới hạn trong các bằng sáng chế và đơn xin cấp bằng sáng chế, được nêu trong bản mô tả này sau đây được kết hợp đầy đủ vào bản mô tả này bằng viện dẫn.

Cần hiểu rằng hệ thuật ngữ sử dụng trong tài liệu này chỉ nhằm mô tả các phương án cụ thể và không có ý giới hạn. Trừ khi được quy định khác đi, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong tài liệu này có cùng nghĩa thông thường theo hiểu biết của chuyên gia trong ngành mà sáng chế này liên quan tới.

Có thể sử dụng các phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong tài liệu này trong thực hành thử nghiệm sáng chế, và các phương pháp và vật liệu mô tả trong tài liệu này chỉ là ví dụ. Trong mô tả và yêu cầu bảo hộ sáng chế, hệ thuật ngữ sau sẽ được sử dụng.

"Liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết một cách đặc hiệu" hoặc "liên kết" như sử dụng trong tài liệu này chỉ việc kháng thể liên kết với kháng nguyên xác định trước bằng ái lực lớn hơn ái lực với các kháng nguyên khác. Thông thường, kháng thể liên kết với kháng nguyên xác định trước bằng hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-7} M, ví dụ nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-13} M hoặc nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-14} M, thông thường với K_D ít nhất nhỏ hơn 10 lần so với K_D của nó khi liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu hoặc epitope (ví dụ BSA, casein). Có thể đo hằng số phân ly bằng các quy trình chuẩn. Tuy nhiên, các kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên được xác định trước có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên liên quan khác, ví dụ với cùng kháng nguyên xác định trước từ các loài khác (đồng đẳng), như người hoặc khỉ, ví dụ, Khỉ đuôi dài *Macaca fascicularis* (khỉ) hoặc Tinh tinh thường *Pan troglodytes* (tinh tinh).

"Kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với CCL17 người" chỉ các kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 người trưởng thành có trình tự thể hiện trong SEQ ID NO: 1.

Trong tài liệu này, "sự trung hòa" hoặc "trung hòa" hoặc "kháng thể trung hòa" hoặc "chất đối kháng kháng thể" chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể ức chế một phần hoặc hoàn toàn, bằng cơ chế bất kỳ, hoạt tính sinh học của CCL17. Có thể nhận diện các kháng thể trung hòa bằng cách sử dụng các xét nghiệm hoạt tính sinh học của CCL17 như được mô tả dưới đây. Kháng thể trung hòa CCL17 có thể ức chế hoạt tính sinh học đo được của CCL17 ở mức 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % hoặc 100 %.

Trong bản mô tả này, "CCL17 của người" hoặc "huCCL17" được sử dụng thay thế cho nhau chỉ protein CCL17 của người có trình tự axit amin biểu hiện trong SEQ ID NO: 1. Trình tự của toàn bộ chiều dài CCL17 bao gồm trình tự tín hiệu có trong GenBank; Mã số truy cập NP_002978.

Trong bản mô tả này, “CCL17 khi” hoặc “cCCL17” được sử dụng thay thế cho nhau chỉ protein CCL17 khi đuôi dài *Macaca fascicularis* (khi) có trình tự axit amin biểu hiện trong SEQ ID NO: 2.

Trong bản mô tả này, "các kháng thể" có nghĩa rộng và bao gồm các phân tử globulin miễn dịch bao gồm các kháng thể đơn dòng bao gồm các kháng thể chuột, người, nhân hóa và tinh tinh, các mảnh kháng thể, các kháng thể đặc hiệu kép (bispecific) hoặc các kháng thể đa hiệu có cấu tạo từ ít nhất hai kháng thể còn nguyên vẹn hoặc các mảnh kháng thể, các kháng thể dạng dimer, dạng tetramer hoặc đa phân, kháng thể đơn chuỗi, và cấu hình cải biến khác bất kỳ của phân tử globulin miễn dịch bao gồm vị trí nhận dạng kháng nguyên có tính đặc hiệu yêu cầu.

Các globulin miễn dịch có thể được phân thành 5 lớp chính, là IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, tùy vào trình tự axit amin của miền hằng định chuỗi nặng. IgA và IgG được phân tiếp thành các lớp kháng thể IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ và IgG₄. Chuỗi nhẹ của kháng thể từ loài động vật có xương sống bất kỳ được phân thành một hoặc hai loại có sự khác biệt rõ ràng, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của các miền hằng định của chúng.

Thuật ngữ “mảnh kháng thể” chỉ một phần của phân tử globulin miễn dịch giữ lại vị trí liên kết kháng nguyên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, như vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) 1, 2, và 3, và vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) 1, 2, và 3, và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH), hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Các mảnh kháng thể bao gồm mảnh Fab, là mảnh đơn trị bao gồm VL hoặc VH; mảnh F(ab)₂, là mảnh lưỡng trị bao gồm 2 mảnh Fab liên kết với nhau bằng liên kết cầu disulfua tại vùng bản lề; mảnh Fd bao gồm các miền VH và CHI; mảnh Fv bao gồm các miền VH và VL của một nhánh của kháng thể; mảnh dAb (Ward và cộng sự, *Nature (Tự nhiên)* 341:544-546, 1989), bao gồm miền VH. Các miền VH và VL có thể được kiến tạo và liên kết với nhau qua cầu nối tổng hợp để tạo các loại cấu hình kháng thể đơn chuỗi khác nhau trong đó các miền VH/VL ghép cặp trong phân tử, hoặc giữa các phân tử trong các trường hợp khi các miền VH và VL được biểu hiện bằng các cấu trúc kháng thể đơn chuỗi riêng biệt, để tạo vị trí liên kết kháng nguyên đơn trị, như Fv đơn chuỗi (scFv) hoặc diabody; được

mô tả, ví dụ, trong Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO1998/44001, Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO1988/01649; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO1994/13804; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO1992/01047. Thu được các mảnh kháng thể này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong ngành và các mảnh này có biểu hiện đặc điểm giống như các kháng thể còn nguyên vẹn.

Cụm từ "kháng thể phân lập" chỉ các kháng thể về cơ bản được tách ra khỏi các kháng thể khác có các tính đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 của người về căn bản được tách khỏi các kháng thể liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác không phải CCL17 của người). Tuy nhiên, kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 của người có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, ví dụ như các đồng đẳng của CCL17 của người, như CCL17 khi đuôi dài *Macaca fascicularis* (khỉ). Ngoài ra, kháng thể phân lập có thể gần như không có vật liệu xấp và/hoặc hóa chất.

Vùng biến đổi của kháng thể bao gồm vùng "khung" bị can thiệp bởi ba "vị trí liên kết kháng nguyên". Các vị trí liên kết kháng nguyên được định nghĩa bằng các thuật ngữ khác nhau: (i) Các vùng xác định bỏ thể (CDR), ba trong VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) và ba trong VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) dựa trên sự biến đổi trình tự (Wu và Kabat, *J Exp Med (Tập chí y học thực nghiệm)* 132:211-50, 1970; Kabat và cộng sự, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Trình tự protein có lợi ích miễn dịch), Tái bản lần 5. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) "Các vùng siêu biến", "HVR", hoặc "HV", ba trong VH (H1, H2, H3) và ba trong VL (L1, L2, L3) chỉ các vùng của các miền biến đổi của kháng thể siêu biến trong cấu trúc như Chothia và Lesk đã định nghĩa (Chothia và Lesk *Mol Biol (Sinh học phân tử)* 196:901-17, 1987). Các thuật ngữ khác bao gồm "IMGT-CDR" (Lefranc và cộng sự, *Dev Comparat Immunol (Tập chí Miễn dịch học so sánh và thực nghiệm)* 27:55-77, 2003) và "Specificity Determining Residue Usage" ("Cách sử dụng gốc quyết định tính đặc hiệu") (SDRU) (Almagro *Mol Recognit (Tập chí Nhận diện phân tử)*, 17:132-43, 2004). Cơ sở dữ liệu International ImMunoGeneTics (IMGT) (http://www_imgt_org) cung cấp cách đánh số chuẩn hóa và định nghĩa các vị trí liên kết với kháng nguyên. Sự tương ứng giữa các mô tả

về CDR, HV và IMGT được trình bày trong Lefranc và cộng sự, *Dev Comparat Immunol (Tập chí Miễn dịch học so sánh và thực nghiệm)* 27:55-77, 2003.

Trong tài liệu này, “các gốc Chothia” là các gốc VL và VH của kháng thể được đánh số theo Al-Lazikani (Al-Lazikani và cộng sự, *J Mol Biol (Tập chí Sinh học phân tử)* 273:927-48, 1997).

"Khung" hoặc "trình tự khung" là các trình tự còn lại của vùng biến đổi khác với các trình tự được định nghĩa là vị trí liên kết kháng nguyên. Bởi vì có thể định nghĩa vị trí liên kết kháng nguyên bằng nhiều thuật ngữ khác nhau như mô tả trên đây, trình tự axit amin chính xác của khung tùy thuộc vào việc vị trí liên kết kháng nguyên được định nghĩa như thế nào.

"Kháng thể nhân hóa" chỉ kháng thể trong đó vị trí liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ các loài không phải là người và các khung của vùng biến đổi có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch người. Kháng thể nhân hóa có thể bao gồm các thay thế trong các vùng khung sao cho khung có thể không phải là bản sao chính xác của các trình tự globulin miễn dịch người hoặc trình tự gen dòng mầm (germline) được biểu hiện.

"Kháng thể người" chỉ kháng thể có các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong đó cả vùng khung và vùng vị trí liên kết kháng nguyên đều có nguồn gốc từ các trình tự có nguồn gốc là người. Nếu kháng thể chứa vùng hằng định, vùng hằng định cũng có nguồn gốc từ các trình tự có nguồn gốc là người.

Kháng thể người bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là các trình tự "có nguồn gốc" là người nếu các vùng biến đổi của kháng thể được thu từ hệ thống sử dụng globulin miễn dịch dòng mầm của người hoặc các gen globulin miễn dịch được sắp xếp lại. Các hệ thống này bao gồm các thư viện gen globulin miễn dịch, ví dụ các thư viện biểu hiện trên thực khuẩn, và các động vật biến đổi gen không phải là người như chuột mang lôcut globulin miễn dịch người như được mô tả trong tài liệu này. "Kháng thể người" có thể có các khác biệt về axit amin khi so sánh với dòng mầm người hoặc các trình tự globulin miễn dịch được sắp xếp lại, ví dụ, do các đột biến soma xảy ra tự nhiên hoặc do đưa các thay thế vào một cách có chủ ý. Thông thường, “kháng thể người” có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất ở mức khoảng 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 100 %.

90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % hoặc 100 % với trình tự axit amin được mã hóa bởi dòng mầm người hoặc gen globulin miễn dịch được sắp xếp lại. Trong một số trường hợp, "kháng thể người" có thể bao gồm các trình tự khung liên ứng có nguồn gốc từ các phân tích trình tự khung của người, ví dụ như được mô tả trong Knappik và cộng sự, *J Mol Biol (Tập chí Sinh học phân tử)* 296:57-86, 2000), hoặc HCDR3 tổng hợp được hợp nhất vào thư viện gen globulin miễn dịch biểu hiện trên thực khuẩn, ví dụ như được mô tả trong Shi và cộng sự, *J Mol Biol (Tập chí Sinh học phân tử)* 397:385-96, 2010 và Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2009/08546).

Các kháng thể nhân hóa phân lập có thể được tổng hợp. Các kháng thể người, mặc dù có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch người, có thể được tạo bằng cách sử dụng các hệ thống như CDR tổng hợp và/hoặc các khung tổng hợp hợp nhất vào bề mặt biểu hiện của thực khuẩn (phage display), hoặc có thể được gây đột biến *trong ống nghiệm* để tăng cường các đặc tính của kháng thể, dẫn đến việc các kháng thể không tồn tại một cách tự nhiên trong dòng mầm của kháng thể người được lưu giữ *trong cơ thể sống*.

Kháng thể người có thể bao gồm các thay thế trong khung hoặc tại các vị trí liên kết kháng nguyên khiến cho chúng có thể không phải là bản sao chính xác của các trình tự globulin miễn dịch người hoặc trình tự gen dòng mầm (germline) được biểu hiện. Tuy nhiên, các kháng thể trong đó các vị trí liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ các loài không phải là người không bao gồm trong định nghĩa "kháng thể người".

Trong tài liệu này thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp" bao gồm tất cả các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo hoặc phân lập bằng phương tiện tái tổ hợp, như các kháng thể phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) được biến đổi gen hoặc chuyển đoạn nhiễm sắc thể đối với các gen globulin miễn dịch người hoặc tế bào lai được tạo từ đó (sẽ được mô tả chi tiết ở phần sau), các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể, các kháng thể được phân lập từ tái tổ hợp, thư viện kháng thể tổ hợp, và các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo hoặc phân lập bằng phương tiện khác bất kỳ liên quan đến việc cắt nối các trình tự gen globulin miễn dịch người với các trình tự ADN khác.

Trong tài liệu này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" chỉ sự điều chế các phân tử kháng thể có thành phần đơn phân tử.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "về căn bản là đồng nhất" có nghĩa là hai trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể được so sánh là đồng nhất hoặc có "ít khác biệt". Các khác biệt không đáng kể là việc thay thế 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 axit amin trong trình tự của vùng biến đổi của kháng thể, không ảnh hưởng bất lợi đến các tính chất của kháng thể. Các trình tự axit amin về căn bản là đồng nhất với các trình tự của vùng biến đổi được công bố trong bản mô tả này thuộc phạm vi của sáng chế. Trong một số phương án, mức đồng nhất trình tự có thể vào khoảng 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % hoặc cao hơn. Có thể xác định phần trăm đồng nhất, ví dụ, bằng cách bắt cặp từng đôi một (pairwise alignment) sử dụng thiết lập mặc định của mô-đun AlignX của Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Có thể sử dụng các trình tự protein của sáng chế làm trình tự truy vấn để thực hiện tìm kiếm trong cơ sở dữ liệu sáng chế hoặc cơ sở dữ liệu chung để, ví dụ, nhận diện các trình tự liên quan. Các chương trình ví dụ được sử dụng để thực hiện các tìm kiếm này là các chương trình XBLAST hoặc BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), hoặc bộ sản phẩm GenomeQuest™ (GenomeQuest, Westborough, MA) sử dụng các thiết lập mặc định.

Thuật ngữ "epitope" trong tài liệu này có nghĩa là phần kháng nguyên mà kháng thể liên kết đặc hiệu với nó. Các epitope thường bao gồm các nhóm có bề mặt hoạt tính hóa học (như phân cực, không phân cực hoặc kỵ nước) của các gốc như axit amin hoặc các chuỗi phía polysacarit và có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc hiệu, cũng như các đặc điểm điện tích đặc hiệu. Epitope có thể được cấu tạo từ các axit amin liên kề và/hoặc không liên kề tạo thành đơn vị cấu hình không gian. Đối với epitope không liên kề, axit amin từ các phần khác nhau của trình tự tuyến tính của kháng nguyên sẽ tiến tới gần nhau trong không gian 3 chiều bằng cách gập phân tử protein.

Trong bản mô tả này, "đặc hiệu kép" ("bispecific") chỉ kháng thể hoặc phân tử liên kết với hai kháng nguyên khác nhau hoặc hai epitope khác nhau trong một kháng nguyên.

Trong bản mô tả này "đặc hiệu đơn" ("monospecific") chỉ kháng thể liên kết với một kháng nguyên hoặc một epitope.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "kết hợp với" có nghĩa rằng có thể cho động vật sử dụng các chất được mô tả trong một hỗn hợp, đồng thời theo từng chất hoặc lần lượt theo từng chất theo thứ tự bất kỳ.

Thuật ngữ "vector" có nghĩa là polynucleotit phi tự nhiên có khả năng sao chép bên trong hệ sinh học hoặc có thể được di chuyển giữa các hệ này. Các polynucleotit vector thông thường chứa ADN bổ sung (cADN) mã hóa protein có lợi và các phần tử bổ sung, như các gốc sao chép, tín hiệu polyadenyl hóa hoặc dấu ấn chọn lọc, có chức năng hỗ trợ sao chép hoặc duy trì các polynucleotit trong hệ sinh học. Các ví dụ về các hệ sinh học có thể bao gồm tế bào, vi rút, động vật, thực vật, và hệ sinh học tái tạo sử dụng các thành phần sinh học có khả năng sao chép vector. Polynucleotit chứa vector có thể là các phân tử AND hoặc ARN hoặc lai giữa chúng.

Thuật ngữ "vector biểu hiện" có nghĩa là vector có thể được sử dụng trong hệ sinh học hoặc hệ sinh học tái tạo để định hướng dịch mã polypeptit mã hóa bởi trình tự polynucleotit có mặt trong vector biểu hiện.

Thuật ngữ "polynucleotit" có nghĩa là phân tử bao gồm chuỗi nucleotit liên kết cộng hóa trị bởi bộ khung đường-phosphat hoặc hóa học cộng hóa trị tương đương khác. Các ADN và ARN sợi đơn và sợi kép là các ví dụ điển hình của polynucleotit.

"ADN bổ sung" hay "cADN" chỉ polynucleotit tổng hợp đã biết, polynucleotit này chia sẻ sự sắp xếp các phân tử của trình tự có trong các loại ARN thông tin trưởng thành tự nhiên với các vùng mã hóa axit amin (êxôn) liên kề, và các vùng không mã hóa axit amin (intron) xen kẽ trong ADN của bộ gen bị loại bỏ. Các codon (bộ ba mã di truyền) mã hóa metionin khởi mào có thể có hoặc không có trong ADN bổ sung. ADN bổ sung có thể được tổng hợp, ví dụ, bằng phiên mã ngược hoặc tổ hợp gen tổng hợp.

Trong tài liệu này, "tổng hợp" hoặc "phi tự nhiên" chỉ phân tử polypeptit hoặc polynucleotit không có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "polypeptit" hoặc "protein" có nghĩa là phân tử bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên kết với nhau bằng liên kết peptit để tạo thành polypeptit. Các polypeptit nhỏ có ít hơn 50 axit amin có thể được gọi là "peptit".

Trong tài liệu này, các mã axit amin có một và ba chữ cái truyền thống được sử dụng như trong Bảng 1.

Bảng 1.

Axit amin	Mã ba chữ cái	Mã một chữ cái
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartate	Asp	D
Xystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glyxin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleuxin	Ile	I
Leuxin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Metionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Thành phần của chất

Sáng chế cung cấp các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với CCL17 người. Các kháng thể của sáng chế ức chế hoạt tính sinh học của CCL17 trong tế bào, và có thể phản ứng chéo với CCL17 khi. Sáng chế cung cấp polynucleotit tổng hợp mã hóa

các kháng thể và mảnh kháng thể, các vector và tế bào chủ, và các phương pháp tạo và sử dụng các kháng thể của sáng chế.

Một phương án của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó kháng thể cạnh tranh để liên kết với CCL17 người với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 45 và VL có SEQ ID NO: 52.

Sự cạnh tranh giữa liên kết đặc hiệu với CCL17 người với các kháng thể của sáng chế bao gồm các trình tự axit amin VH và VL nhất định có thể được xét nghiệm *trong ống nghiệm* sử dụng các phương pháp đã biết. Ví dụ, liên kết của kháng thể gắn nhãn este NHS MSD Sulfo-Tag™ với CCL17 người với sự có mặt của kháng thể không gắn nhãn có thể được xét nghiệm bằng phương pháp ELISA, hoặc có thể sử dụng phân tích Biacore hoặc phương pháp đếm và đo tế bào theo dòng (flow cytometry) để chứng minh sự cạnh tranh với các kháng thể của sáng chế. Khả năng của kháng thể thử nghiệm trong ức chế liên kết của kháng thể bao gồm VH có SỐ ID TRÌNH TỰ: 45 và VL có SEQ ID NO: 52 với CCL17 người chứng tỏ rằng kháng thể thử nghiệm có thể cạnh tranh với các kháng thể này trong liên kết tới CCL17 người.

Phương án khác của sáng chế trong bản mô tả này là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người có trình tự có SEQ ID NO: 1, trong đó kháng thể liên kết với CCL17 người ít nhất trong các gốc axit amin 21-23, 44-45 và 60-68. “Ít nhất trong các gốc axit amin 21-23, 44-45 và 60-68 của CCL17 người” có nghĩa là kháng thể kháng CCL17 liên kết với ít nhất một gốc nằm bên trong dải axit amin có các gốc 21-23 có SEQ ID NO: 1, và ít nhất một gốc nằm bên trong dải axit amin có các gốc 44-45 có SEQ ID NO: 1, và ít nhất một gốc nằm bên trong dải axit amin có các gốc 60-68 có SEQ ID NO: 1. Kháng thể có thể liên kết với nhiều hơn một gốc trong các gốc 21-23, 44-45 và 60-68, và các gốc bổ sung ngoài các gốc 21-23, 44-45 và 60-68 này, có SEQ ID NO: 1.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết với CCL17 người ít nhất tại các gốc R22 và K23 có SEQ ID NO: 1.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết với CCL17 người ít nhất tại các gốc L21, R22, K23, V44, Q45, N60, Y64, S67 và L68 có SEQ ID NO: 1.

Kháng thể ví dụ liên kết với CCL17 người trong các gốc axit amin 21-23, 44-45 và 60-68 của CCL17 có SEQ ID NO: 1 là C17B236 có VH có SEQ ID NO: 45 và VL có SEQ ID NO: 52. Dựa trên phân tích cấu trúc tinh thể, các gốc epitope chính liên kết bởi C17B236 là R22 và K23 của CCL17 có SEQ ID NO: 1, trên cơ sở số tiếp xúc giữa các gốc này và các gốc VH của kháng thể.

Các kháng thể ví dụ khác liên kết với CCL17 người trong các gốc axit amin 21-23, 44-45 và 60-68 của CCL17 là các biến thể trưởng thành ái lực của C17B236, mà tất cả các kháng thể đều có nguồn gốc từ hoạt động trưởng thành ái lực của cùng kháng thể mẹ. Các trình tự VH và VL của các kháng thể ví dụ được trình bày trong Hình 3 và Hình 5. Sự trưởng thành ái lực của các kháng thể thường liên quan đến các thay thế axit amin trong CDR hoặc trong vùng Vernier (các vùng khung phía dưới các CDR). Biến thể trưởng thành được chọn bằng cách quét các thư viện tổ hợp, nơi có thể chứa tới 10^8 đột biến. Phần đáy của thư viện hạn chế số vị trí biến đổi trong 6-7 nếu tất cả 20 axit amin được cho phép tại mỗi vị trí. Phần lớn các gốc paratope được bảo toàn trong từng thư viện tổ hợp, đảm bảo epitope liên kết cũng được bảo toàn tại đây. Một số nghiên cứu tinh thể học về các kháng thể mẹ và kháng thể trưởng thành đã cho thấy là epitope luôn được bảo toàn trong quá trình trưởng thành ái lực (ví dụ, Fransson và cộng sự, J. Mol. Biol. (Tập chí sinh học phân tử) 2010, 398:214-231; Gustchina và cộng sự, PLoS Pathog. (Tác nhân gây bệnh PLoS) 2010, 6:e1001182; La Porte và cộng sự, MAbs 2014; 6:1059-1068).

Các kháng thể kháng CCL17 liên kết với CCL17 người trong các gốc axit amin 21-23, 44-45 và 60-68 của CCL17 liên kết với CCL17 người bằng ái lực cao, thông thường bằng K_D nhỏ hơn khoảng 1×10^{-10} M.

Các kháng thể liên kết với CCL17 người trong các gốc axit amin 21-23, 44-45 và 60-68 của CCL17 có thể được tạo, ví dụ, bằng cách tạo miễn dịch cho chuột bằng protein tinh tinh CCL17 có các trình tự CCL17 người ở các vị trí gốc 21-23, 44-45 và

60-68, hoặc sàng lọc các thư viện biểu hiện trên thực khuẩn có CCL17 người kiểu dại, và sàng lọc chéo các kết quả trùng khớp thu được với các biến thể CCL17 có các thay thế tại mỗi hoặc vài vị trí gốc trong các gốc 21-23, 44-45 và 60-68 của CCL17 người, sử dụng các phương pháp được mô tả trong tài liệu này.

Trong một số phương án của sáng chế được mô tả trong tài liệu này, kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 người ngăn chặn tương tác CCL17/CCR4.

Có thể kiểm tra các kháng thể về khả năng ngăn chặn tương tác CCL17/CCR4 bằng phương pháp đo và đếm tế bào theo dòng tiêu chuẩn. Ví dụ, các tế bào biểu hiện CCR4 được ủ bằng CCL17 người gắn nhãn huỳnh quang và kháng thể thử nghiệm, sau đó đánh giá liên kết của CCL17 người gắn nhãn huỳnh quang lên các tế bào biểu hiện CCR4 bằng các phương pháp tiêu chuẩn. Các kháng thể “ngăn chặn tương tác CCL17/CCR4” hoặc “ức chế tương tác CCL17/CCR4” có thể ức chế liên kết của CCL17 với các tế bào biểu hiện CCR4 ở mức 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % hoặc 100 % khi so sánh với liên kết của CCL17 khi không có kháng thể.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người, trong đó kháng thể liên kết với CCL17 người bằng hằng số ái lực (K_D) nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-13} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-14} M, khi K_D được đo bằng cách sử dụng ái lực cân bằng trong dung dịch trong dung dịch đệm là dung dịch muối đẳng trương gốc tris chứa 0,05 % Tween-20 sau khi đồng nuôi cấy kháng thể và CCL17 người trong 48 giờ ở 4 °C.

Trong một số phương án mô tả trong bản mô tả này, kháng thể liên kết với CCL17 người bằng hằng số ái lực (K_D) nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-10} M, khi K_D được đo bằng cách sử dụng ái lực cân bằng trong dung dịch trong dung dịch đệm là dung dịch muối đẳng trương gốc tris chứa 0,05 % Tween-20 sau khi đồng nuôi cấy kháng thể và CCL17 người trong 48 giờ ở 4 °C.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết với CCL17 người bằng hằng số K_D nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5×10^{-12} M.

Trong phương án khác, kháng thể của sáng chế liên kết đặc hiệu với CCL17 người liên kết với CCL17 của khỉ đuôi dài *Macaca fascicularis* (khỉ) bằng hằng số ái lực (K_D) nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-6} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-12} M, khi K_D được đo bằng cách sử dụng ái lực cân bằng trong dung dịch trong dung dịch đệm là dung dịch muối đẳng trương gốc tris chứa 0,05 % Tween-20 sau khi đồng nuôi cấy kháng thể và CCL17 khỉ trong 48 giờ ở 4 °C.

Trong một số phương án mô tả trong bản mô tả này, kháng thể của sáng chế liên kết với CCL17 của khỉ đuôi dài *Macaca fascicularis* (khỉ) bằng hằng số K_D bằng khoảng 1×10^{-8} M hoặc thấp hơn, khi K_D được đo bằng cách sử dụng ái lực cân bằng trong dung dịch trong dung dịch đệm là dung dịch muối đẳng trương gốc tris chứa 0,05 % Tween-20 sau khi đồng nuôi cấy kháng thể và CCL17 khỉ trong 48 giờ ở 4 °C.

Ái lực của kháng thể liên kết với CCL17 người có trình tự có SEQ ID NO: 1 hoặc CCL17 khỉ có trình tự có SEQ ID NO: 2 có thể được đo thực nghiệm bằng phương pháp phù hợp bất kỳ. Các phương pháp này có thể sử dụng các thiết bị đo Proteon, Biacore hoặc KinExA, như ProteOn XPR36 hoặc Biacore 3000, phương pháp sử dụng ái lực cân bằng trong dung dịch (SEA), ELISA hoặc các xét nghiệm liên kết cạnh tranh được các chuyên gia trong lĩnh vực biết tới. Các phương pháp ví dụ được mô tả trong Ví dụ 3. Ái lực đo được của tương tác giữa kháng thể cụ thể/CCL17 có thể khác nhau nếu đo trong các điều kiện khác nhau (ví dụ, nồng độ mol, độ pH, dung dịch đệm, nồng độ chất tẩy rửa). Do đó, các số đo ái lực và các thông số liên kết khác (ví dụ K_D , K_{on} , K_{off}) tốt nhất là được đo trong các điều kiện tiêu chuẩn và dung dịch đệm tiêu chuẩn, như dung dịch đệm được mô tả trong tài liệu này. Các chuyên gia trong ngành sẽ chấp nhận lỗi nội tại đối với các số đo ái lực, ví dụ, đo bằng phương pháp sử dụng ái lực cân bằng trong dung dịch, Biacore 3000 hoặc ProteOn (được đo theo chênh lệch tiêu chuẩn, SD), thông thường có thể nằm trong

khoảng 5-33 % đối với các số đo nằm trong giới hạn phát hiện thông thường. Do đó, thuật ngữ "khoảng" phản ánh mức chênh lệch tiêu chuẩn thông thường trong xét nghiệm. Ví dụ, SD thông thường đối với K_D bằng 1×10^{-9} M có thể lên tới $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ M.

Phương án khác của sáng chế trong bản mô tả này là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 người, trong đó kháng thể ức chế hoạt tính sinh học của CLL17.

Trong tài liệu này "hoạt tính sinh học của CLL17" chỉ hoạt tính bất kỳ xuất hiện do CCL17 liên kết với thụ thể CCR4 của nó. Hoạt tính sinh học ví dụ của CLL17 tạo sự huy động canxi nội bào hoặc sự hướng hóa chất của các tế bào, ví dụ các tế bào CCRF-CEM (dòng tế bào nguyên bào lympho T từ các bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu cấp). Các kháng thể của sáng chế có thể được thử nghiệm khả năng ức chế hoạt tính sinh học của CLL17 bằng các phương pháp tiêu chuẩn và các phương pháp mô tả trong tài liệu này. Ví dụ, khả năng của các kháng thể của sáng chế trong ức chế sự huy động canxi nội bào phụ thuộc CCL17 có thể được xét nghiệm bằng cách đo hiệu quả của các kháng thể đối với sự huy động canxi do CCL17 gây ra, sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang như Fluo-8 NW, Fluo-4 AM hoặc Fluo-3 AM. Khả năng của các kháng thể của sáng chế trong ức chế sự hướng hóa chất do CCL17 gây ra có thể được đo bằng cách đo sự dịch chuyển của các tế bào CCRF-CEM qua thiết bị lọc bán thấm thấu $5 \mu\text{M}$ trong hệ thống nuôi cấy hai buồng, và đo sức sống của các tế bào dịch chuyển qua thiết bị lọc. Các kháng thể của sáng chế có thể ức chế hoạt tính sinh học của CLL17 ở mức 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % hoặc 100 %.

Phương án khác của sáng chế được mô tả trong tài liệu này là kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17, trong đó kháng thể ức chế canxi huy động do CCL17 người 10 ng/ml gây ra trong các tế bào CCRF-CEM được đo bằng cách sử dụng Fluo-8 NW với giá trị IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-8} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-9} M.

Phương án khác của sáng chế trong bản mô tả này là kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17, trong đó kháng thể bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) và 3 (HCDR3) và vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ

(LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) và 3 (LCDR3), trong đó HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin có các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 71, 72, 73 và 74.

Các kháng thể bao gồm các trình tự HCDR và LCDR có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 4, 5, 71, 72, 73 và 74 liên kết với CCL17 người bằng K_D nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} .

HCDR1: SYWIG (SỐ ID TRÌNH TỰ: 4)

HCDR2: IIDPSDSDTRYSPSFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ: 5)

Trình tự liên ứng HCDR3

VGPADVWDX₁FDY (SỐ ID TRÌNH TỰ: 71),

trong đó

X₁ là S, A hoặc T

Trình tự liên ứng LCDR1:

KSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LA (SỐ ID TRÌNH TỰ: 72),

trong đó

X₁ là L, Y, S hoặc N;

X₂ là F, P, H hoặc I;

X₃ là D, Y, W, T hoặc V;

X₄ là I, F, S, T, Y, N, K hoặc V; và

X₅ là K, A, Q, T hoặc D.

Trình tự liên ứng LCDR2:

X₁ASTRE (SỐ ID TRÌNH TỰ: 73),

trong đó

X₁ là N, H, G, E, T hoặc D.

Trình tự liên ứng LCDR3

QQX₁X₂X₃X₄PX₅T (SỐ ID TRÌNH TỰ: 74);

trong đó

X₁ là F, Y, T hoặc H;

X₂ là Y, L, N hoặc W;

X₃ là S, A, L, I, T, Q hoặc H;

X₄ là V, T, I, Y, L hoặc D; và

X₅ là S, F, A hoặc L.

Trong một số phương án, HCDR1 bao gồm trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 4, HCDR2 có trình tự có SEQ ID NO: 5, và HCDR3 bao gồm trình tự có các SEQ ID NO: 6, 42, 43 hoặc 44 trong kháng thể của sáng chế liên kết đặc hiệu với CCL17.

Trong một số phương án, HCDR1 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 4, HCDR2 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và HCDR3 có trình tự axit amin có các SEQ ID NO: 6, 42 hoặc 43.

Trong một số phương án, LCDR1 bao gồm trình tự có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 hoặc 18; LCDR2 bao gồm trình tự có các SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 39, 16, 40 hoặc 41; và LCDR3 bao gồm trình tự có các SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 hoặc 38 trong kháng thể của sáng chế liên kết đặc hiệu với CCL17.

Trong một số phương án, LCDR1 bao gồm trình tự axit amin có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17 hoặc 18, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 20, 21, 22, 24, 25, và 26 và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37 hoặc 38.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 bao gồm VH có SỐ ID TRÌNH TỰ: 75 và VL có SEQ ID NO: 76.

Trình tự liên ứng VH (SEQ ID NO: 75)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIID
 PSDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYPYCARVGPADV
 WDX₁FDYWGQGTLVTVSS

trong đó

X₁ là S, A hoặc T.

Trình tự liên ứng VL (SEQ ID NO: 76):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LAWYQQKPGQPP
 KLLIYX₆ASTRESGVPRDFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQXX₇X₈X₉X₁₀
 PX₁₁TFGQGTKVEIK; trong đó

X₁ là L, Y, S hoặc N;

X₂ là F, P, H hoặc I;

X₃ là D, Y, W, T hoặc V;

X₄ là I, F, S, T, Y, N, K hoặc V;

X₅ là K, A, Q, T hoặc D;

X₆ là N, H, G, E, T hoặc D;

X₇ là F, Y, T hoặc H;

X₈ là Y, L, N hoặc W;

X₉ là S, A, L, I, T, Q hoặc H;

X₁₀ là V, T, I, Y, L hoặc D; và

X₁₁ là S, F, A hoặc L.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 bao gồm VH có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 45, 46, 47 hoặc 48.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 bao gồm VL có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 hoặc 66.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 bao gồm VH bao gồm trình tự axit amin có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 45, 46 hoặc 47.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 bao gồm VL bao gồm trình tự axit amin có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60 hoặc 62.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17, trong đó kháng thể bao gồm các trình tự HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có

các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 7, 19 và 27;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 8, 20 và 28;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 9, 21 và 29;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 10, 22 và 30;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 11, 23 và 31;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 12, 24 và 32;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 13, 21 và 33;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 14, 20 và 34;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 15, 25 và 35;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 16, 21 và 36;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 17, 25 và 37;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 18, 26 và 38;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 8, 39 và 28;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 8, 24 và 28;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 8, 22 và 28;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 8, 40 và 28;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 8, 26 và 28;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 6, 8, 41 và 28;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 42, 8, 24 và 28;
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 43, 8, 24 và 28; hoặc
 các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là: 4, 5, 44, 8, 24 và 28.

Phương án khác của sáng chế trong bản mô tả này là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17, trong đó kháng thể bao gồm

VH có SEQ ID NO: 45 và VL có các SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 hoặc 66;

VH và VL có các SEQ ID NO lần lượt là 46 và 62;

VH và VL có các SEQ ID NO lần lượt là 47 và 62; hoặc

VH và VL có các SEQ ID NO lần lượt là 48 và 62.

Phương án khác của sáng chế trong bản mô tả này là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17, trong đó kháng thể bao gồm

VH có SEQ ID NO: 45 và VL có các SEQ ID NO: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59 hoặc 60;

VH và VL có các SEQ ID NO lần lượt là 46 và 62; hoặc

VH và VL có các SEQ ID NO lần lượt là 47 và 62.

Phương án khác của sáng chế được mô tả trong tài liệu này là kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17, trong đó kháng thể bao gồm VH bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % hoặc 99 % với VH có SEQ ID NO: 46 và VL bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % hoặc 99 % với VL có SEQ ID NO: 62.

Các kháng thể ví dụ này được trình bày trong Bảng 9.

Các kháng thể có CDR chuỗi nặng, CDR chuỗi nhẹ, các trình tự axit amin của VH hoặc VL khác không đáng kể với các kháng thể trình bày trong các Bảng 3, 4, 6, 7 và 9 đều thuộc phạm vi của sáng chế. Thông thường, điều này liên quan đến một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo thủ bằng axit amin có các đặc điểm điện tích, kỵ nước, hoặc hóa học lập thể tương đồng tại vị trí liên kết kháng nguyên hoặc tại khung mà không làm thay đổi có hại tới các tính chất của kháng thể. Có thể thực hiện các thay thế bảo thủ để cải thiện tính chất của kháng thể, ví dụ tính bền hoặc ái lực. Có thể thực hiện thay thế 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 axit amin đối với trình tự VH hoặc VL. Ví dụ, "sự thay thế axit amin bảo thủ" có thể liên quan đến việc thay thế gốc axit amin tự nhiên bằng gốc được đưa vào sao cho có ít hoặc không có ảnh hưởng đến sự phân cực hoặc điện tích của gốc axit amin tại vị trí đó. Ngoài ra, gốc tự nhiên bất kỳ trong polypeptit có thể được thay thế bằng

alanin, như được mô tả ở phần trước về gây đột biến quét alanin (MacLennan và cộng sự (1998) *Act Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67; Sasaki và cộng sự (1998) *Adv. Biopsy's (Sinh tâm lý học)* 35:1-24). Các chuyên gia trong ngành có thể xác định thay thế axit amin mong muốn vào thời điểm mong muốn. Ví dụ, có thể thay thế axit amin để nhận diện các gốc quan trọng của trình tự phân tử, hoặc để tăng hoặc giảm ái lực của các phân tử được mô tả trong tài liệu này. 8 nhóm sau đây bao gồm các axit amin thay thế axit amin bảo thủ cho nhau: 1) Alanin (A), Glyxin (G); 2) Axit aspartic (D), Axit glutamic (E); 3) Asparagin (N), Glutamin (Q); 4) Arginin (R), Lysin (K); 5) Isoleuxin (I), Leuxin (L), Metionin (M), Valin (V); 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W); 7) Serin (S), Threonin (T); và 8) Xystein (C), Metionin (M) (xem, ví dụ, Creighton, Protein (1984)).

Có thể thực hiện thay thế axit amin, ví dụ, bằng phương pháp gây đột biến PCR (Bảng sáng chế Hoa Kỳ Số 4,683,195). Có thể tạo các thư viện biến thể bằng các phương pháp đã biết, ví dụ, sử dụng các codon ngẫu nhiên (NNK) hoặc codon không ngẫu nhiên, ví dụ codon DVK, codon này mã hóa 11 axit amin (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp) và sàng lọc các thư viện để tìm các biến thể có các đặc tính mong muốn.

Mặc dù các phương án minh họa trong các Ví dụ sáng chế bao gồm các cặp vùng biến đổi, một từ chuỗi nặng và một từ chuỗi nhẹ, chuyên gia trong ngành sẽ nhận thấy các phương án thay thế có thể bao gồm chỉ riêng vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Vùng biến đổi đơn có thể được sử dụng để sàng lọc các miền biến đổi có khả năng tạo thành mảnh kháng thể liên kết với kháng nguyên đặc hiệu hai miền có khả năng, ví dụ, liên kết với CCL17 người có trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 1. Có thể thực hiện sàng lọc bằng phương pháp sàng lọc với kỹ thuật biểu hiện trên thực khuẩn, sử dụng, ví dụ, phương pháp tiếp cận tổ hợp đối ngẫu phân cấp công bố trong Công bố đơn quốc tế số WO1992/01047. Trong phương pháp này, một cụm riêng biệt chứa dòng tế bào của chuỗi H hoặc L được sử dụng để truyền toàn bộ thư viện dòng tế bào mã hóa chuỗi kia (L hoặc H) và miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu hai chuỗi được tạo thành được chọn theo kỹ thuật biểu hiện trên thực khuẩn (phage display) như đã được mô tả. Do đó, các chuỗi polypeptit VH và VL rất hữu ích trong việc nhận diện các kháng thể bổ sung liên kết đặc hiệu với CCL17 người có

trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 1, sử dụng các phương pháp công bố trong Công bố đơn quốc tế số WO1992/01047.

Các kháng thể của sáng chế trong bản mô tả này có thể được tạo bằng cách sử dụng nhiều công nghệ tạo kháng thể đơn dòng khác nhau. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp tế bào lai của Kohler và Milstein, *Nature (Tự nhiên)* 256:495, 1975. Trong phương pháp tế bào lai, chuột nhắt hoặc động vật chủ khác, như chuột hamster, chuột hoặc khỉ, được tạo miễn dịch bằng protein của CCL17 người và/hoặc CCL17 khỉ hoặc các mảnh của các protein này, như phần ngoại bào của CCL17 người, sau đó là dung hợp các tế bào lá lách từ các động vật được tạo miễn dịch bằng các tế bào u tủy, sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn để hình thành các tế bào lai (Gooding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (Kháng thể đơn dòng: Nguyên lý và thực hành), tr.59-103 (Academic Press, 1986)). Các dòng tế bào vô tính phát sinh từ các tế bào lai bất tử đơn được sàng lọc để tạo ra các kháng thể có các đặc tính mong muốn, như tính đặc hiệu của liên kết, có hoặc không có phản ứng chéo, và ái lực đối với kháng nguyên.

Có thể sử dụng các động vật chủ khác nhau để tạo các kháng thể kháng lại CCL17 người. Ví dụ, có thể sử dụng chuột Balb/c để tạo kháng thể kháng CCL17 người của chuột. Kháng thể tạo ở chuột Blab/c và các động vật không phải là người khác có thể được nhân hóa bằng các công nghệ khác nhau để tạo nhiều trình tự giống người hơn. Các kỹ thuật nhân hóa ví dụ bao gồm việc chọn khung chất nhận của người đã được các chuyên gia trong ngành biết tới và bao gồm ghép CDR (Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 5,225,539), ghép SDR (Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 6,818,749), Tái tạo bề mặt (Palin, *Mol Immunol (Miễn dịch học phân tử)* 28:489-499, 1991), Specificity Determining Residues Resurfacing (Tái tạo bề mặt bằng các gốc quyết định đặc hiệu)(Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố 2010/0261620), thích ứng với con người (hay thích ứng với khung của người) (Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2009/0118127), Siêu nhân hóa (Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 7,709, 226) và hướng dẫn chọn lọc (Osborn và cộng sự, *Methods (Các phương pháp)* 36:61-68, 2005; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,565,332).

Các kháng thể nhân hóa có thể được tối ưu hóa hơn nữa để cải thiện tính chọn lọc hoặc ái lực đối với kháng nguyên mong muốn bằng cách hợp nhất các gốc đỡ

khung thay đổi để bảo toàn ái lực liên kết (đột biến ngược) bằng các kỹ thuật như các kỹ thuật đã công bố trong Công bố đơn quốc tế số WO1990/007861 và trong Công bố đơn quốc tế số WO1992/22653.

Có thể sử dụng chuột biến đổi gen mang lôcut globulin miễn dịch người trong bộ gen của chúng để tạo các kháng thể người kháng lại protein đích, và đã được trình bày trong, ví dụ, Công bố đơn quốc tế số WO1990/04036, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,150,584, Công bố đơn quốc tế số WO1999/45962, Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2002/066630, Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2002/43478, Loner và cộng sự, *Nature (Tự nhiên)* 368:856-9, 1994; Green và cộng sự, *Nature Genet. (Di truyền học tự nhiên)* 7:13-21, 1994; Green & Jakobovits *Exp Med (Tập chí y học thực nghiệm)*, 188:483-95, 1998; Lonberg và Huszar *Int Rev Immunol (Tập chí miễn dịch học quốc tế)* 13:65-93, 1995; Bruggemann và cộng sự, *Eur J Immunol (Tập chí miễn dịch học châu Âu)*, 21:1323-1326, 1991; Fishwild và cộng sự, *Nat Biotechnol (Công nghệ sinh học tự nhiên)* 14:845-851, 1996; Mendez và cộng sự, *Nat Biotechnol (Công nghệ sinh học tự nhiên)* 15:146-156, 1997; Green, *J Immunol Methods (Tập chí Phương pháp miễn dịch học)*, 231:11-23, 1999; Yang và cộng sự, *Cancer Res (Nghiên cứu bệnh ung thư)* 59:1236-1243, 1999; Bruggemann và Taussig *Curr Opin Biotechnol (Quan niệm hiện nay về công nghệ sinh học)* 8:455-458, 1997; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2002/043478). Lôcut globulin miễn dịch nội sinh trong các con chuột này có thể bị phá vỡ hoặc xóa bỏ, và ít nhất một phần hoặc toàn bộ lôcut globulin miễn dịch người có thể được đưa vào bộ gen chuột sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng hoặc không tương đồng, sử dụng nhiễm sắc thể chuyển đoạn, hoặc sử dụng gen nhỏ. Các công ty như Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) và Ablexis (http://_www_ablexis_com) có thể cam kết cung cấp kháng thể người được định hướng kháng lại kháng nguyên chọn lọc sử dụng công nghệ như mô tả ở phần trên.

Có thể chọn kháng thể người từ thư viện biểu hiện trên thực khuẩn, trong đó thực khuẩn được kiến tạo để biểu hiện globulin miễn dịch người hoặc các phần của chúng như Fab, kháng thể đơn chuỗi (scFv), hoặc các vùng biến đổi kháng thể tạo thành cặp hoặc không tạo cặp (Knappik và cộng sự, *J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử)* 296:57-86, 2000; Krebs và cộng sự, *J Immunol Meth (Tập chí Phương pháp miễn dịch học)* 254:67-84, 2001; Vaughan và cộng sự, *Nature Biotechnology (Công nghệ sinh học tự nhiên)* 14:309-314, 1996; Yang và cộng sự, *PITAS (HOA KỲ)* 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom và Winter, *J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử)* 227:381, 1991; Marks và cộng sự, *J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử)* 222:581, 1991). Các kháng thể của sáng chế có thể được phân lập, ví dụ, từ thư viện biểu hiện trên thực khuẩn biểu hiện vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể là protein dung hợp với protein vỏ pIX của thực khuẩn như được mô tả trong Shi và cộng sự, *J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử)* 397:385-96, 2010 và Công bố đơn quốc tế số WO2009/085462). Các thư viện kháng thể được sàng lọc để liên kết với miễn ngoại bào CCL17 người và các dòng tế bào dương tính thu được có tính đặc trưng hơn, các Fab phân lập từ dung dịch thủy phân dòng tế bào, và được biểu hiện là IgG với toàn bộ chiều dài. Phương pháp biểu hiện trên thực khuẩn này để phân lập kháng thể người đã được thiết lập trong ngành. Tham khảo, ví dụ: Bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 5,223,409; 5,403,484; và 5,571,698 đến Ladner và cộng sự; Bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 5,427,908 và 5,580,717 đến Dower và cộng sự; Bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 5,969,108 và 6,172,197 đến McCafferty và cộng sự; và Bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 và 6,593,081 đến Griffiths và cộng sự;

Có thể thực hiện điều chế kháng nguyên gây miễn dịch và sản xuất kháng thể đơn dòng bằng kỹ thuật phù hợp bất kỳ, như sản xuất protein tái tổ hợp. Có thể cho động vật sử dụng kháng nguyên gây miễn dịch dưới dạng protein tinh chế, hoặc hỗn hợp protein bao gồm toàn bộ tế bào hoặc chiết xuất mô hoặc tế bào, hoặc kháng nguyên có thể được tạo *de novo* (mới) trong cơ thể động vật từ các axit nucleic mã hóa kháng nguyên nói trên hoặc một phần của nó.

Kháng thể của sáng chế được mô tả trong tài liệu này có thể là kháng thể người hoặc kháng thể nhân hóa.

Kháng thể của sáng chế được mô tả trong tài liệu này có thể là kháng thể tổng hợp hoặc tái tổ hợp.

Kháng thể của sáng chế được mô tả trong tài liệu này có thể là loại IgD, IgE, IgG hoặc IgM. Kháng thể của sáng chế được mô tả trong tài liệu này có thể là lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Đặc tính của chất tác động miễn dịch của kháng thể của sáng chế có thể được tăng cường hoặc bị làm cân bằng cách điều hòa Fc bằng các kỹ thuật mà các chuyên gia trong ngành đã biết. Ví dụ, các chức năng của chất tác động Fc như liên kết C1q, độc tính đối với tế bào phụ thuộc bổ sung (CDC), độc tính đối với tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào (phagocytosis), giảm biểu hiện thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR), v.v.. có thể được điều chỉnh bằng cách điều hòa các gốc trong Fc chịu trách nhiệm cho các hoạt tính này. Các đặc tính được động học cũng có thể được tăng cường bằng cách gây đột biến các gốc trong miền Fc có thể kéo dài thêm tới nửa tuổi thọ kháng thể. Các ví dụ về điều hòa Fc là IgG4 S228P/L234A/L235A, IgG2 M252Y/S254T/T256E (Dall'Acqua và cộng sự, *J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học)* 281:23514–24, 2006; hoặc IgG2 V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 hoặc V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S trên IgG2 (Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2011/066501), hoặc các loại được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,737,056 (đánh số theo cách đánh số châu Âu).

Trong một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 người bao gồm sự thể trong vùng Fc.

Trong một số phương án, sự thay thế bao gồm thay thế V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S hoặc thay thế P331S lên IgG2, hoặc thay thế S228P, L234A hoặc thay thế L235A lên IgG4, trong đó việc đánh số các gốc theo hệ thống chỉ mục châu Âu.

Ngoài ra, các kháng thể của sáng chế có thể được điều hòa sau khi dịch mã bằng các quy trình như glycosyl hóa, isome hóa, khử đường ra khỏi glycogen hoặc điều hòa

cộng hóa trị xảy ra phi tự nhiên như bổ sung các gốc polyetylen glycol (pegylation) và điều hòa bằng cách liên kết với chất béo (lipidation). Các điều hòa này có thể xảy ra *trong cơ thể sống* hoặc *trong ống nghiệm*. Ví dụ, các kháng thể của sáng chế có thể được tiếp hợp vào polyetylen glycol (tiếp hợp với PEG) để tăng mức được động học của chúng. Có thể thực hiện tiếp hợp bằng các kỹ thuật mà các chuyên gia trong ngành đã biết. Việc tiếp hợp các kháng thể điều trị với PEG đã được chứng tỏ là làm tăng cường được lực học trong khi không làm ảnh hưởng đến chức năng (Knight và cộng sự, *Plateles* 15:409-418, 2004; Leong và cộng sự, *Cytokine (Cytokin)* 16:106-119, 2001; Yang và cộng sự, *Protein Eng (Tạo dựng protein)* 16:761-770, 2003;

Các kháng thể hoặc mảnh kháng thể của sáng chế trong bản mô tả này có thể được điều hòa để tăng tính bền, tính chọn lọc, phản ứng chéo, ái lực, tính sinh miễn dịch hoặc các đặc tính sinh học hoặc lý sinh mong muốn khác đều thuộc phạm vi của sáng chế. Độ bền của kháng thể chịu sự ảnh hưởng bởi một số yếu tố, bao gồm (1) sự bao bọc từ lõi từng miền riêng biệt ảnh hưởng đến độ bền từ bên trong của chúng, (2) tương tác giao diện protein/protein tác động lên sự tạo thành cặp HC và LC, (3) hủy bỏ các gốc phân cực và tích điện, (4) mạng liên kết H đối với các gốc phân cực và tích điện; và (5) phân bố gốc phân cực và tích điện trên bề mặt giữa các lực liên phân tử và bên trong phân tử khác (Worn và Pluckthun, *J Mol Biol (Tạp chí sinh học phân tử)* 305:989-1010, 2001). Có thể nhận dạng các gốc gây bất ổn cấu trúc tiềm năng dựa trên cấu trúc tinh thể của kháng thể hoặc bằng cách tạo mô hình phân tử trong một số trường hợp nhất định, và có thể kiểm tra tác động của các gốc này đối với độ bền của kháng thể bằng cách tạo và đánh giá biến thể mang đột biến trong các gốc được nhận dạng. Một trong các cách làm tăng độ bền kháng thể là nâng điểm giữa chuyển hóa nhiệt (T_m) được đo bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (Differential scanning calorimetry, DSC). Nhìn chung, T_m protein tương quan với độ bền của nó và tương quan nghịch với độ nhạy của nó đối với sự bộc lộ và biến tính trong dung dịch và các quy trình phân hủy tùy thuộc vào xu hướng của protein sẽ bộc lộ (Remmele và cộng sự, *Pharm Res (Nghiên cứu dược)* 15:200-208, 1997). Một số nghiên cứu phát hiện mối tương quan giữa sự xếp hạng độ bền vật lý của các chế phẩm được đo khi độ bền nhiệt được đo bằng DSC và độ bền vật lý được đo bằng các phương pháp khác (Bedu-Addo và

cộng sự, *Pharm Res (Nghiên cứu dược)* 21:1353-1361, 2004; Gupta và Kaisheva, *AAPS PharSci*, 5E8, 2003; Maa và Hsu, *Int J Pharm (Tạp chí dược quốc tế)* 140:155-168, 1996; Remmele và cộng sự, *Pharm Res (Nghiên cứu dược)* 15:200-208, 1997; Zhang và cộng sự, *J Pharm Sci (Tạp chí Khoa học dược)* 93:3076-3089, 2004). Các nghiên cứu chế phẩm cho rằng Tm của Fab có bao hàm về độ bền vật lý dài hạn của mAb tương ứng. Các khác biệt trong các axit amin trong khung hoặc trong CDR có thể có tác động đáng kể đối với độ bền nhiệt của miền Fab (Yasui và cộng sự, *FEBS Lett* 353:143-146, 1994).

Các kháng thể CCL17 của sáng chế trong bản mô tả này có thể được kiến tạo thành các kháng thể đặc hiệu đôi, cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Các vùng VL và/hoặc VH của kháng thể của sáng chế có thể được kiến tạo bằng các phương pháp đã công bố thành các kháng thể đặc hiệu đôi đơn chuỗi, là các cấu trúc như thiết kế TandAb® (Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO1999/57150; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2011/0206672) hoặc thành các scFV đặc hiệu đôi, là các cấu trúc như các cấu trúc công bố trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,869,620; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO1995/15388, Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO1997/14719, hoặc Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2011/036460.

Các vùng VL và/hoặc VH của kháng thể của sáng chế trong tài liệu này có thể được kiến tạo thành kháng thể đặc hiệu đôi đầy đủ chiều dài, trong đó mỗi nhánh của kháng thể liên kết với một kháng nguyên hoặc epitope khác nhau. Các kháng thể đặc hiệu đôi này thường được tạo bằng cách điều hòa các tương tác CH3 giữa hai chuỗi nặng của kháng thể để tạo các kháng thể đặc hiệu đôi, sử dụng các công nghệ như công nghệ mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 7,695,936; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2004/111233; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/0015133; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2007/0287170; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2008/119353; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2009/0182127; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/0286374; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2011/0123532; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2011/131746; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2011/143545; hoặc Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/0149876. Các cấu trúc đặc hiệu đôi bổ thể mà các vùng VL và/hoặc VH của

kháng thể của sáng chế có thể hợp nhất vào, ví dụ, là các globulin miễn dịch của miền biến đổi kép (Công bố đơn quốc tế số WO2009/134776), hoặc các cấu trúc bao gồm các miền nhị trùng hóa khác nhau để kết nối với hai nhánh của kháng thể có tính đặc hiệu khác nhau, như cấu trúc leuxin zipper hoặc các miền nhị trùng hóa collagen (Công bố đơn quốc tế số WO2012/022811, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,932,448; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,833,441).

Phương án khác của sáng chế là polynucleotit phân lập mã hóa vùng bất kỳ trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể của sáng chế. Trong bản mô tả này có trình bày một số ví dụ nhất định về polynucleotit, tuy nhiên, trong trường hợp có suy biến mã di truyền hoặc ưu tiên codon trong hệ biểu hiện đã cho, các polynucleotit khác mã hóa các kháng thể của sáng chế cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các trình tự polynucleotit mã hóa VH hoặc VL hoặc mảnh của chúng của kháng thể có thể liên kết được với một hoặc nhiều phần tử điều hòa, như các vùng khởi động và vùng tăng cường, cho phép biểu hiện trình tự nucleotit lên tế bào chủ dự định. Polynucleotit có thể là ADN bổ sung.

Phương án khác của sáng chế là vector bao gồm polynucleotit của sáng chế. Các vector này có thể là vector plasmit, vector vi rút, vector để biểu hiện vi rút Baculo, các vector nền gen nhảy hoặc vector bất kỳ phù hợp để đưa polynucleotit của sáng chế vào sinh vật hoặc nền di truyền đã cho bằng phương tiện bất kỳ. Ví dụ, các polynucleotit mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể của sáng chế, có thể liên kết với miền hằng định, sẽ được đưa vào các vector biểu hiện. Các chuỗi nặng và nhẹ có thể được tách dòng trong các vector biểu hiện giống nhau hoặc khác nhau. Các đoạn ADN mã hóa các chuỗi globulin miễn dịch có thể liên kết với các trình tự kiểm soát trong (các) vector biểu hiện, đảm bảo biểu hiện của các polypeptit globulin miễn dịch. Các trình tự kiểm soát bao gồm trình tự tín hiệu, vùng khởi động (ví dụ, các vùng khởi động không tương đồng hoặc liên kết tự nhiên), các phần tử vùng tăng cường, các trình tự kết thúc phiên mã, được chọn để tương thích với tế bào chủ được chọn để biểu hiện kháng thể. Khi vector đã được hợp nhất vào vật chủ phù hợp, vật chủ được giữ trong các điều kiện phù hợp với biểu hiện mức cao của protein được mã hóa bởi polynucleotit hợp nhất.

Các vector biểu hiện phù hợp thông thường được nhân đôi trong sinh vật chủ dưới dạng thể bổ sung hoặc dưới dạng một phần tích hợp của ADN nhiễm sắc thể của vật chủ. Nhìn chung, các vector biểu hiện chứa các dấu ấn chọn lọc như kháng ampixilin, kháng hygromyxin, kháng tetracyclin, kháng kanamycin hoặc kháng neomycin để cho phép phát hiện các tế bào này biến nạp bằng các trình tự ADN mong muốn.

Các phần tử vùng tăng cường và vùng khởi động phù hợp đã được biết đến trong ngành. Đối với biểu hiện trong tế bào vi khuẩn, các vùng khởi động ví dụ bao gồm lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P và trc. Đối với biểu hiện trong tế bào nhân thực, các vùng khởi động ví dụ bao gồm các phần tử vùng tăng cường và vùng khởi động gen globulin miễn dịch chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng; vùng khởi động sớm tức thì của vi rút cytomegalo ở người; vùng khởi động thymidine kinase của vi rút herpes đơn dạng; vùng khởi động sớm và trễ SV40; vùng khởi động có mặt trong các lặp lại đoạn cuối dài hạn từ vi rút retro; vùng khởi động metallothionein-I của chuột; và các vùng khởi động đặc hiệu mô khác nhau đã biết trong ngành. Đối với các biểu hiện trong tế bào men, vùng khởi động ví dụ là vùng khởi động cơ định như vùng khởi động ADH1, vùng khởi động PGK1, vùng khởi động ENO, vùng khởi động PYK1, v.v.; hoặc vùng khởi động điều hòa như vùng khởi động GAL1, vùng khởi động GAL10, vùng khởi động ADH2, vùng khởi động PHO5, vùng khởi động CUP1, vùng khởi động GAL7, vùng khởi động MET25, vùng khởi động MET3, vùng khởi động CYC1, vùng khởi động HIS3, vùng khởi động ADH1, vùng khởi động PGK, vùng khởi động GAPDH, vùng khởi động ADC1, vùng khởi động TRP1, vùng khởi động URA3, vùng khởi động LEU2, vùng khởi động ENO, vùng khởi động TP1, và AOX1 (ví dụ, để dùng trong *Pichia*). Các chuyên gia trong ngành biết rõ cách lựa chọn vector và vùng khởi động phù hợp.

Các chuyên gia trong ngành cũng biết rõ một số lượng lớn các vector và vùng khởi động phù hợp; nhiều loại đã có bán trên thị trường để tạo các cấu trúc tái tổ hợp chủ đề. Sau đây là các ví dụ về vector. Vi khuẩn: pBs, thể thực khuẩn, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, và pRIT5 (Pharmacia,

Uppsala, Sweden). Nhân thực: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG và pSVL (Pharmacia).

Phương án khác của sáng chế là tế bào chủ bao gồm vector của sáng chế. Thuật ngữ "tế bào chủ" chỉ tế bào mà vector được đưa vào. Cần hiểu rằng thuật ngữ tế bào chủ không những chỉ tế bào chủ thể cụ thể mà còn chỉ thể hệ con của tế bào. Do có thể xảy ra các điều hoà nhất định trong các thể hệ tiếp theo do các ảnh hưởng từ đột biến hoặc môi trường, thể hệ con có thể không đồng nhất với tế bào mẹ, nhưng vẫn trong phạm vi của thuật ngữ "tế bào chủ" sử dụng trong bản mô tả này. Các tế bào chủ có thể là tế bào nhân thực, tế bào nhân sơ, tế bào thực vật hoặc tế bào cổ khuẩn.

Escherichia coli, trực khuẩn, như *Bacillus subtilis*, và các vi khuẩn đường ruột (*enterobacteriaceae*) khác, như *Salmonella*, *Serratia*, và các loại *Pseudomonas* khác nhau là các ví dụ về tế bào chủ nhân sơ. Các vi trùng khác, như men, cũng hữu ích cho việc biểu hiện. Nấm men *Saccharomyces* (ví dụ *S. cerevisiae*) và *Pichia* là các ví dụ về tế bào chủ men phù hợp. Các tế bào nhân thực, ví dụ, có thể có nguồn gốc là động vật có vú, côn trùng, gia cầm, hoặc các loại động vật khác. Các tế bào nhân thực nguồn gốc động vật có vú bao gồm các dòng tế bào bất tử như các dòng tế bào như dòng tế bào lai hoặc dòng tế bào u tủy như các dòng tế bào chuột SP2/0 (Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (Bộ sưu tập châu Âu về nuôi cấy tế bào (European Collection of Cell Cultures, ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) và Ag653 (ATCC CRL-1580). Ví dụ về dòng tế bào u tủy người là U266 (ATTC CRL-TIB-196). Các dòng tế bào hữu ích khác bao gồm các dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (CHO) như CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) hoặc DG44.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp tạo kháng thể của sáng chế, bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ của sáng chế và thu hồi kháng thể được sản sinh từ tế bào chủ. Các phương pháp tạo kháng thể và tinh chế chúng được biết đến rộng rãi trong ngành. Khi đã được tổng hợp (bằng cách hóa học hoặc tái tổ hợp), toàn bộ kháng thể, các dime của chúng, các chuỗi nặng và nhẹ riêng biệt, hoặc các mảnh

kháng thể khác như VH hoặc VL, có thể được tinh chế theo các quy trình tiêu chuẩn trong ngành, bao gồm kết tủa nhôm sulfat, cột ái lực, sắc ký cột, tinh chế sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), điện di trên gel, v.v. (xem khái quát Scopes, Protein Purification (Phạm vi, tinh chế protein) (Springer- Verlag, N.Y., (1982))). Kháng thể chủ đề có thể hầu như là tinh khiết, ví dụ, tinh khiết ở mức ít nhất khoảng 80 % đến 85 %, ít nhất khoảng 85 % đến 90 %, ít nhất khoảng 90 % đến 95 %, hoặc ít nhất khoảng 98 % đến 99 %, hoặc tinh khiết hơn nữa, ví dụ, không có các chất nhiễm bẩn như mảnh vụn tế bào, các đại phân tử không phải là kháng thể chủ đề, v.v.

Các polynucleotit mã hóa các trình tự VH hoặc VL nhất định của sáng chế được hợp nhất vào các vectơ, bằng các phương pháp sinh học phân tử tiêu chuẩn. Thực hiện biến nạp, nuôi cấy, biểu hiện kháng thể và tinh chế tế bào chủ bằng các phương pháp đã được biết đến rộng rãi.

Phương pháp điều trị

Kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 người có thể phù hợp với việc điều trị hoặc ngăn chặn quang phổ của các tình trạng qua trung gian CCL17.

Trong tài liệu này, thuật ngữ "tình trạng qua trung gian CCL17" bao gồm tất cả căn bệnh và tình trạng y khoa trong đó CCL17 đóng vai trò, trực tiếp hay gián tiếp, trong căn bệnh hoặc tình trạng y khoa, bao gồm nguyên nhân, sự phát triển, sự diễn tiến, tính trường diễn hoặc bệnh lý của bệnh hoặc tình trạng.

Trong tài liệu này, thuật ngữ "tình trạng viêm qua trung gian CCL17" đề cập đến tình trạng viêm có nguyên do ít nhất một phần từ hoạt tính sinh học của CCL17. Tình trạng viêm qua trung gian CCL17, ví dụ, là hen suyễn và dị ứng.

Các phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh nhân là động vật thuộc mọi phân loại. Các ví dụ về các động vật này bao gồm động vật có vú như con người, loài gặm nhấm, chó, mèo và động vật nông trại. Ví dụ, các kháng thể của sáng chế có hiệu quả trong việc phòng ngừa và điều trị các tình trạng qua trung gian CCL17, như hen suyễn và các bệnh dị ứng đường hô hấp như hen suyễn dị ứng, viêm mũi dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), xơ hóa phổi tự phát/vô căn

(IPF), các bệnh phổi quá mẫn và tương tự, các bệnh dị ứng như phản vệ toàn thân hoặc phản ứng quá mẫn, dị ứng thuốc, viêm phế quản phổi dị ứng do nhiễm nấm aspergillus (ABPA), dị ứng do côn trùng đốt và dị ứng thức ăn, bệnh viêm ruột như bệnh Crohn, viêm loét đại tràng, viêm hồi tràng và viêm ruột non, viêm âm đạo, bệnh vẩy nến và bệnh da viêm như chứng viêm da, chàm, viêm da dị ứng, viêm da tiếp xúc dị ứng, chứng mày đay và bệnh ngứa, viêm mạch, bệnh lý khớp cột sống, xơ cứng bì, bệnh tự miễn, viêm khớp (bao gồm dạng thấp khớp và bệnh vẩy nến), đa xơ cứng, lupus ban đỏ toàn thân, tiểu đường loại I, viêm cầu thận và tương tự, thái ghép (bao gồm thái ghép đồng loại và mảnh ghép chống lại vật chủ), và các bệnh khác trong đó phản ứng viêm bị ức chế như xơ vữa động mạch, viêm cơ, bệnh thoái hóa thần kinh qua trung gian tế bào T, đa xơ cứng, viêm não, viêm màng não, viêm gan, viêm thận, nhiễm khuẩn huyết, bệnh sarcoid, viêm kết mạc dị ứng, viêm tai, bệnh Castleman, viêm xoang, sốc nội độc tố do LPS gây ra, hội chứng Behcet và bệnh gút.

Các kháng thể của sáng chế được mô tả trong tài liệu này và cũng hữu ích trong việc điều chế dược phẩm cho việc điều trị này, trong đó dược phẩm được điều chế để sử dụng theo liều lượng được xác định trong bản mô tả này.

Phương pháp và cách sử dụng của sáng chế có thể nhằm để sử dụng cho động vật và các bệnh nhân có nguy cơ phát triển bất kỳ căn bệnh hay tình trạng nào liên quan đến biểu hiện hoặc hoạt tính sinh học của CCL17 hoặc trong đó CCL17 đóng vai trò sinh học.

Không bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào, các kháng thể của sáng chế có thể cung cấp tác dụng hiệu quả trong các chứng bệnh viêm khác nhau bằng cách ức chế trực tiếp việc tăng tế bào Th2 và vì thế ức chế đồng thời nhiều cytokin Th2. Các kháng thể của sáng chế có thể cải thiện độ an toàn so với các kháng thể kháng CCR4 bằng cách chặn chọn lọc chỉ CCL17. Các kháng thể sẽ không tương tác với các tiểu cầu biểu hiện CCR4. Ngoài ra, các kháng thể sẽ không ngăn chặn các tác dụng miễn dịch bẩm sinh có lợi của CCL22 trên CCR4 (Matsukawa và cộng sự, *I. Immunol* 164:5382-8, 2000).

Trong tài liệu này, "tình trạng viêm" đề cập đến phản ứng cục bộ hoặc toàn thân cấp tính hoặc mạn tính với những kích thích có hại như mầm bệnh, tế bào hư tổn, tổn thương hoặc kích ứng thể chất, một phần do hoạt tính của cytokin, chemokin,

hoặc các tế bào viêm (ví dụ, bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân, lympho bào, đại thực bào, dưỡng bào, tế bào tua, bạch cầu trung tính) và có đặc trưng trong hầu hết các trường hợp là bị đau, tấy đỏ, sưng và suy giảm chức năng mô.

Tình trạng viêm phổi là ví dụ về tình trạng viêm qua trung gian CCL17. Tình trạng viêm phổi ví dụ bao gồm tình trạng phổi bị nhiễm trùng bao gồm tình trạng liên quan đến nhiễm vi rút, vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng hoặc prion (protein bị nhiễm độc); tình trạng viêm phổi do dị ứng nguyên gây ra; tình trạng viêm phổi do chất gây ô nhiễm gây ra như bệnh bụi asbet, bệnh silico, hay bệnh ngộ độc beryllium; tình trạng viêm phổi do hít dịch dạ dày, mất điều hòa miễn dịch, tình trạng viêm do bẩm chất di truyền như xơ nang, và tình trạng viêm phổi do tổn thương vật lý, như tổn thương do máy thở. Các tình trạng viêm này cũng bao gồm hen suyễn, tràn khí, viêm phế quản, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh sarcoid, bệnh mô bào, u cơ bạch huyết, tổn thương phổi cấp, hội chứng suy hô hấp cấp, bệnh phổi mạn tính, loạn sản phế quản phổi, viêm phổi mắc phải trong cộng đồng, viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan đến máy thở, nhiễm khuẩn huyết, viêm phổi do vi rút, nhiễm cúm, nhiễm vi rút parainfluenza, nhiễm rotavirus, nhiễm metapneumovirus ở người, nhiễm vi rút hợp bào hô hấp và nhiễm nấm *Aspergillus* (nấm cúc) hay nấm khác. Các bệnh viêm liên quan đến nhiễm trùng ví dụ có thể bao gồm viêm phổi do vi khuẩn hoặc vi rút, bao gồm viêm phổi nghiêm trọng, xơ nang, viêm phế quản, nhiễm trùng đường hô hấp trầm trọng và hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS). Các tình trạng liên quan đến nhiễm trùng có thể bao gồm nhiều dạng nhiễm trùng như nhiễm vi rút nguyên phát và nhiễm khuẩn thứ phát.

Hen suyễn là bệnh viêm phổi có đặc trưng là tăng phản ứng đường thở ("AHR"), co thắt phế quản, thở khò khè, viêm bạch cầu ái toan hoặc bạch cầu trung tính, tăng tiết nhầy, xơ dưới biểu mô, và mức IgE cao. Các bệnh nhân bị hen suyễn "trầm trọng", các triệu chứng trở nên xấu đi phần lớn là do nhiễm khuẩn đường hô hấp (ví dụ, rhinovirus, vi rút cúm, vi rút cúm *Haemophilus*, v.v.). Các cơn hen suyễn có thể do yếu tố môi trường (ví dụ, giun đũa, côn trùng, động vật (ví dụ, mèo, chó, thỏ, chuột, chuột hamster, chuột lang và chim), nấm, ô nhiễm không khí (ví dụ, khói thuốc lá), khí kích ứng, khói, hơi nước, sol khí, hóa chất, phấn hoa, tập luyện, hoặc không khí lạnh.

Ngoài bệnh hen suyễn, một số bệnh viêm mạn tính ảnh hưởng đến phổi có đặc trưng là bạch cầu trung tính xâm nhập vào đường thở, ví dụ bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), viêm phổi do vi khuẩn và xơ nang (Linden và cộng sự, *Eur Respir J (Tập chí hô hấp châu Âu)* 15:973-7, 2000; Rahman và cộng sự, *Clin Immunol (Miễn dịch học lâm sàng)* 115:268-76, 2005), và các bệnh như COPD, viêm mũi dị ứng, và xơ nang có đặc trưng là tăng phản ứng đường thở (Fahy và O'Byrne *Am J Respir Crit Care Med (Tập chí Hô hấp và Hồi sức cấp cứu Hoa Kỳ)* 163:822-3, 2001).

Hen suyễn dị ứng, sự hiện diện của IgE đặc hiệu đối với dị ứng nguyên ở mức cao phản ánh đáp ứng miễn dịch của tế bào Th2 khác thường đối với các dị ứng nguyên trong môi trường thường hít phải. Các dị ứng nguyên có trong tế bào T do tế bào tua (DC) liên tục lấy mẫu kháng nguyên ngoại lai đến. Ngay khi hoạt hóa phù hợp bởi DC, lympho bào đặc hiệu dị ứng nguyên có trong đường thở bị bệnh sản sinh interleukin (IL)-4, IL-5 và IL-13 trong cytokine Th2 sẽ tăng cường điều khiển sự thoát mạch bạch cầu, sự tăng sản tế bào hình đài và phản ứng quá mức của phế quản (BHR). CCL17 do DC sản sinh gây ra sự di chuyển chọn lọc các tế bào Th2 chứ không phải tế bào Th1 thông qua việc kích hoạt CCR4. Trong các mẫu chuột bị hen suyễn, việc điều trị bằng kháng thể kháng CCL17 đã làm giảm số lượng tế bào T CD4+ và bạch cầu ái toan trong dịch rửa phế quản phế nang (BAL), sự sản sinh cytokin Th2 và tăng phản ứng đường thở sau khi thử nghiệm dị ứng nguyên, cho thấy sự trung hòa CCL17 là chiến lược khả thi để ức chế viêm dị ứng ở người.

Các mẫu động vật thường được sử dụng đối với bệnh hen suyễn và viêm đường thở bao gồm mẫu thử nghiệm albumin trứng, mẫu gây nhạy cảm methacholine và gây nhạy cảm với *Aspergillus fumigatus* (Hessel và cộng sự, *Eur J Pharmacol (Tập chí Dược lý học châu Âu)* 293:401-12, 1995). Ức chế sản sinh cytokin và chemokin từ tế bào biểu mô phế quản ở người được nuôi cấy, nguyên bào sợi phế quản hoặc tế bào cơ trơn đường thở cũng có thể được sử dụng làm các mẫu *trong ống nghiệm*. Việc sử dụng kháng thể của sáng chế cho các mẫu bất kỳ trong các mẫu này có thể được sử dụng để đánh giá tính hiệu quả nhằm cải thiện các triệu chứng và thay đổi quá trình diễn biến bệnh hen suyễn, viêm đường thở, COPD, v.v.

Viêm da dị ứng là ví dụ về tình trạng viêm qua trung gian CCL17.

Một phương án của sáng chế là phương pháp điều trị căn bệnh qua trung gian CCL17, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể của sáng chế trong khoảng thời gian đủ để điều trị căn bệnh qua trung gian CCL17.

Trong một số phương án được mô tả trong tài liệu này, căn bệnh qua trung gian CCL17 là bệnh viêm.

Trong một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, bệnh viêm là bệnh hen suyễn, viêm loét đại tràng (UC), viêm da dị ứng (AD) hoặc xơ hóa phổi tự phát/vô căn (IPF).

Một phương án của sáng chế là phương pháp điều trị bệnh hen suyễn, bao gồm cho đối tượng sử dụng kháng thể của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh hen suyễn.

Dược phẩm/Phương thức sử dụng

Sáng chế cung cấp các dược phẩm bao gồm các kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế và chất mang dược dụng. Đối với mục đích điều trị, kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế có thể được điều chế làm dược phẩm chứa lượng hữu hiệu các miễn, phân tử hoặc kháng thể làm hoạt chất trong chất mang dược dụng. Thuật ngữ "chất mang" chỉ chất pha loãng, tá chất, tá dược, hoặc chất mang mà hoạt chất được sử dụng với nó. Các chất mang này có thể là chất lỏng, như nước và dầu, bao gồm chất lỏng của dầu hỏa, động vật, rau củ hoặc nguồn gốc tổng hợp, như dầu đậu phộng, dầu nành, dầu khoáng, dầu mè, v.v. Ví dụ, có thể sử dụng dung dịch muối đẳng trương 0,4 % và glyxin 0,3 %. Các dung dịch này vô trùng và thường không có vật chất dạng hạt. Chúng có thể được khử trùng bằng kỹ thuật khử trùng thông thường đã biết (*ví dụ*, lọc). Các chế phẩm có thể chứa chất phụ trợ dược dụng theo yêu cầu đối với các tình trạng sinh lý học liên quan như chất đệm và điều chỉnh pH, chất ổn định, chất làm dày, chất bôi trơn và chất tạo màu, v.v. Nồng độ phân tử hoặc kháng thể của sáng chế được mô tả tại đây trong dược phẩm này có thể thay đổi trong phạm vi rộng, tức là, từ nhỏ hơn khoảng 0,5 %, thường bằng hoặc ít nhất bằng khoảng 1 % lên đến mức 15 hoặc 20 % trọng lượng và sẽ được lựa

chọn chủ yếu theo liều lượng, thể tích chất lỏng, độ nhớt theo yêu cầu, v.v., theo phương thức sử dụng cụ thể đã chọn. Các chất mang và chế phẩm phù hợp, bao gồm các protein ở người khác, ví dụ, albumin huyết thanh người, được mô tả, ví dụ, trong, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Khoa học và Thực hành về Dược), Ấn bản thứ 21, btv Troy, D.B., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Phần 5, Pharmaceutical Manufacturing (Sản xuất dược) tr. 691-1092, xem trang cụ thể 958-989.

Phương thức sử dụng các kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế được mô tả trong tài liệu này để điều trị bệnh có thể là đường truyền thuốc phù hợp bất kỳ nhằm đưa thuốc đến chủ thể, như sử dụng qua đường tiêm, ví dụ, tiêm trong da, tiêm bắp, tiêm màng bụng, tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, phổi; sử dụng qua niêm mạc (miệng, trong mũi, trong âm đạo, trực tràng); sử dụng chế phẩm ở dạng viên nén, viên nang, dung dịch, bột, gel, hạt; và được chứa trong xi lanh, thiết bị được cấy ghép, bơm thẩm thấu, ống, bơm nhỏ; hoặc các phương tiện khác được chuyên gia trong lĩnh vực đã biết và chấp nhận trong ngành. Có thể thực hiện sử dụng thuốc theo vị trí cụ thể bằng cách, ví dụ, tiêm trong khớp, trong phế quản, trong bụng, trong bao, trong sụn, trong hô, trong khoang, trong tiểu não, trong não thất, trong kết tràng, trong cổ tử cung, trong dạ dày, trong gan, trong tim, trong xương, trong chậu hông, trong màng ngoài tim, trong màng bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong phổi, trong trực tràng, trong thận, trong võng mạc, trong cột sống, trong bao hoạt dịch, trong ngực, trong tử cung, trong mạch, trong bàng quang, trong thương tổn, âm đạo, trực tràng, miệng/má, dưới lưỡi, trong mũi, hoặc qua da.

Vì vậy, dược phẩm của sáng chế được mô tả trong tài liệu này dùng để tiêm bắp có thể được bào chế chứa 1 ml nước có chất đệm vô trùng, và trong khoảng 1 ng đến khoảng 100 mg/kg, ví dụ, khoảng 50 ng đến khoảng 30 mg/kg hoặc tốt nhất là bằng khoảng 5 mg đến khoảng 25 mg/kg kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế.

Liều lượng dành cho bệnh nhân có tình trạng qua trung gian CCL17 ở mức đủ để làm giảm bớt các triệu chứng hoặc điều trị tình trạng qua trung gian CCL17 ("lượng điều trị hữu hiệu") và thông thường bằng 0,1 đến 10 mg/kg trọng lượng cơ thể, ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 mg/kg, nhưng có thể cao hơn, ví dụ bằng 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 mg/kg. Cũng có thể cho liều đơn vị cố định, ví dụ, 50, 100, 200, 500

hoặc 1000 mg, hoặc liều lượng có thể dựa trên diện tích bề mặt của bệnh nhân, ví dụ, 400, 300, 250, 200, hoặc 10 mg/m². Thường dùng trong khoảng 1 đến 8 liều, (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8), nhưng cũng có thể dùng 10, 12, 20 hoặc nhiều liều hơn. Có thể lặp lại việc sử dụng kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế được mô tả trong tài liệu này sau một ngày, hai ngày, ba ngày, bốn ngày, năm ngày, sáu ngày, một tuần, hai tuần, ba tuần, một tháng, năm tuần, sáu tuần, bảy tuần, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng hoặc lâu hơn. Cũng có thể lặp lại quá trình điều trị dưới dạng dùng thuốc mạn tính. Việc dùng thuốc lặp lại có thể cùng liều hoặc khác liều.

Có thể xác định liều lượng kháng thể CCL17 của sáng chế được mô tả ở đây để điều trị hiệu quả các bệnh viêm như hen suyễn bằng cách cho các mẫu động vật liên quan được biết trong ngành và theo mô tả trong tài liệu này sử dụng kháng thể CCL17.

Các xét nghiệm *trong ống nghiệm* có thể được sử dụng để giúp xác định phạm vi liều lượng tối ưu. Các chuyên gia trong ngành có thể xác định việc lựa chọn liều hữu hiệu cụ thể (ví dụ, thông qua thử nghiệm lâm sàng) dựa trên việc xem xét một số yếu tố. Các yếu tố này bao gồm căn bệnh được điều trị hoặc ngăn ngừa, các triệu chứng liên quan, khối lượng cơ thể của bệnh nhân, tình trạng miễn dịch của bệnh nhân và các yếu tố khác mà chuyên gia trong lĩnh vực đã biết. Liều chính xác được sử dụng trong chế phẩm cũng sẽ phụ thuộc vào đường truyền thuốc, và mức độ nghiêm trọng của bệnh, và phải được quyết định theo đánh giá của chuyên gia và từng hoàn cảnh của bệnh nhân. Có thể ngoại suy liều hữu hiệu từ đường cong liều lượng đáp ứng được truy xuất từ hệ thống thử nghiệm mẫu động vật hoặc *trong ống nghiệm*. Các kháng thể của sáng chế có thể được thử nghiệm về tính hiệu quả và liều hữu hiệu bằng cách sử dụng bất kỳ các mẫu nào được mô tả trong tài liệu này.

Ví dụ, dược phẩm bao gồm các kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế dành cho truyền tĩnh mạch có thể được điều chế chứa khoảng 200 ml dung dịch Ringer vô trùng, và khoảng 8 mg đến khoảng 2400 mg, khoảng 400 mg đến khoảng 1600 mg, hoặc khoảng 400 mg đến khoảng 800 mg kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế để sử dụng cho bệnh nhân 80 kg. Phương pháp điều chế chế phẩm được sử dụng qua đường tiêm đã được biết và được mô tả chi tiết hơn

trong, ví dụ, "Remington's Pharmaceutical Science" (Khoa học dược của Remington), ấn bản thứ 15, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Các kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế được mô tả trong tài liệu này có thể được đông khô để lưu trữ và được tái tạo trong chất mang phù hợp trước khi sử dụng. Kỹ thuật này đã cho thấy hiệu quả với các chế phẩm protein thông thường và có thể sử dụng kỹ thuật đông khô và tái tạo được biết đến trong ngành.

Các kháng thể liên kết đặc hiệu với CCL17 của sáng chế được mô tả trong tài liệu này có thể được sử dụng kết hợp đồng thời với thuốc điều trị thứ hai, một cách tuần tự hoặc riêng biệt.

Sáng chế sẽ được mô tả theo các ví dụ cụ thể, không giới hạn sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Tạo kháng thể trung hòa CCL17

Các Fab liên kết CCL17 người được chọn từ thư viện biểu hiện trên thực khuẩn pIX *de novo* (mới) được mô tả trong Shi và cộng sự, J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử) 397:385-396, 2010; Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2009/085462; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/0021477; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/0108795. Tóm lại, các thư viện đã được tạo bằng cách đa dạng hóa giàn giáo sinh học ở người, trong đó gen VH dòng mầm (germline) IGHV1-69*01, IGHV3-23*01, và IGHV5-51*01 đã được tái tổ hợp với gen nhỏ IGJ-4 người *qua* vòng H3, và gen kappa VL dòng mầm người O12 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01), và B3 (IGKV4-1*01) đã được tái tổ hợp với gen nhỏ IGKJ-1 để tổng hợp thành các miền VH và VL hoàn chỉnh. Các vị trí trong các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ xung quanh các vòng H1, H2, L1, L2 và L3 tương ứng với các vị trí được xác định là thường xuyên tiếp xúc với các kháng nguyên peptit và protein đã được chọn để đa dạng hóa. Tính đa dạng trình tự ở các vị trí được chọn đã được giới hạn trong các gốc xuất hiện tại mỗi vị trí trong họ gen dòng mầm IGHV hoặc TGLV của các gen IGHV hoặc IGLV tương ứng. Tính đa dạng ở vòng H3 đã được tạo bằng cách sử dụng các vòng tổng hợp cố ngắn đến cố

trung có chiều dài 7-14 axit amin. Phân bố axit amin tại H3 đã được thiết kế để mô phỏng biến thể axit amin quan sát được ở kháng thể người. Thiết kế thư viện được mô tả chi tiết trong Shi và cộng sự, *J Mol Biol* (Tập chí sinh học phân tử) 397:385-96, 2010. Giàn giáo sinh học được sử dụng để tạo thư viện được đặt tên theo gốc gen dòng mầm VH và VL người của chúng. Ba thư viện chuỗi nặng đã được kết hợp với bốn chuỗi nhẹ dòng mầm hoặc thư viện chuỗi nhẹ dòng mầm để tạo 24 tổ hợp VH:VL duy nhất để sàng lọc. Tất cả 24 tổ hợp thư viện VH:VL đã được sử dụng trong thí nghiệm sàng lọc thực khuẩn đối với CCL17 người.

Thư viện đã được sàng lọc bằng cách sử dụng CCL17 người có SỐ ID TRÌNH TỰ: 1. Tóm lại, CCL17 người đã được biotin hóa bằng các phương pháp tiêu chuẩn và đã thu được CCL17 người được biotin hóa (Bt-huCCL17) trên các hạt từ tính phủ streptavidin (Dyna, M280), và cho các thư viện thực khuẩn Fab-pIX vào các hạt. Nồng độ Bt-huCCL17 sử dụng là 100 nM cho các vòng 1 và 2 và 10 mM cho các vòng 3 và 4). Thực hiện sàng lọc bằng ELISA đối với Fab liên kết với protein CCL17 người. Để sàng lọc, hạt từ tính phủ bt-huCCL17 được rửa và bị phong bế bằng PBST-M (BPS với Tween-20 (chất nhũ hóa) 0,05 % và sữa bột không béo 3 %). Thực khuẩn bị phong bế từ thư viện được cho vào hạt và được quay ở nhiệt độ phòng trong vòng 1. Hạt được rửa và sau đó được ủ trong môi trường nuôi cấy *E. coli* trong giai đoạn lôgarit, các tế bào (MC1061F') và *E coli* bị nhiễm đã tăng trưởng trên đĩa thạch LB qua đêm ở 37 °C. Môi trường nuôi cấy vào sáng hôm sau được nạo khỏi đĩa trong 2 mL 2xYT (20 % glycerol) mỗi đĩa, 50 µL huyền phù vi khuẩn được thêm vào 50 mL 2xYT (Carb) và tăng trưởng khi lắc ở 37 °C trong 2 giờ. Thực khuẩn tế bào hỗ trợ được thêm vào môi trường nuôi cấy ở giai đoạn giữa pha lôgarit và môi trường nuôi cấy được ủ ở 37 °C trong 30 phút. Bổ sung Kanamycin và IPTG vào mỗi môi trường nuôi cấy đến nồng độ cuối cùng lần lượt bằng 35 µg/mL và 1 mM, và tăng trưởng qua đêm khi lắc ở 30 °C. Thực khuẩn được khuếch đại từ môi trường vi khuẩn được kết tủa bằng cách sử dụng PEG/NaCl và được tái huyền phù trong 1 mL PBS. 200 µL được sử dụng cho vòng sàng lọc tiếp theo.

Sau ba vòng sàng lọc, ADN phagemid đã được tách ra khỏi các tế bào MC1061F' bị nhiễm và được xử lý bằng enzym giới hạn để loại bỏ trình tự mã hóa pIX, và ADN

plasmid tuyến tính đã được cắt ra và được tinh chế trên gel agarosa. ADN này sau đó đã tự thất lại bằng ligaza ADN của T4. ADN thất lại được xung điện vào trong tế bào MC1061F' và đổ lên đĩa thạch LB (Carb/Glucose). Các dòng tế bào từ xung điện này đã được chọn để sàng lọc ELISA và đánh giá biểu hiện Fab. Các Fab chứa His tag trong khung ở đầu C của chuỗi nặng. Từ sàng lọc ban đầu, 24 Fab đã được tinh chế từng phần qua His tag ở đầu C bằng các phương pháp tiêu chuẩn và được biểu thị đặc trưng hơn.

Các Fab đặc trưng bởi liên kết của chúng với CCL17 người (SỐ ID TRÌNH TỰ: 1), CCL17 khỉ (SEQ ID NO: 2) CCL22 khỉ (SEQ ID NO: 3) trong xét nghiệm ELISA. Tóm lại, các đĩa 96 lỗ Maxisorp đã được phủ kháng thể kháng Kappa người ở nồng độ 1 µg/ml (Southern Biotech). Fab bán tinh chế đã được bổ sung vào mỗi đĩa. HuCCL17, cCCL17 hoặc cCCL22 được biotin hóa được thêm vào mỗi lỗ thu giữ Fab. Phát hiện các protein liên kết với các Fab thu được bằng cách sử dụng Streptavidin:HRP. Năm Fab (F21, F24, F34, F43 và F44) liên kết với cả CCL17 người và khỉ nhưng không liên kết với CCL22 khỉ đã được chọn cho trường thành ái lực.

Ví dụ 2. Sự trưởng thành ái lực của các kháng thể kháng CCL17

Năm Fab đã được chọn cho trường thành ái lực dựa trên mức đặc trưng ban đầu của chúng. Các Fab được trưởng thành ái lực bằng cách đa dạng hóa chuỗi nhẹ bằng công nghệ trưởng thành nội dòng được mô tả trong Shi và cộng sự. (Shi và cộng sự, *J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử)* 397:385-396, 2010) và giữ cho chuỗi nặng bất biến. Chuỗi nặng trong các Fab là VH3-23 hoặc VH5-51. Thư viện trưởng thành ái lực F24 được tạo đã cải thiện chất gắn kết của CCL17.

Tóm lại, F24 đã được trưởng thành ái lực bằng cách sử dụng thư viện chuỗi nhẹ B3. Phương án đa dạng hóa thư viện B3 được trình bày trong Bảng 2. Các vị trí được biểu thị theo cách đánh số Kabat.

Bảng 2.

Vị trí gốc (Kabat)	Gốc dòng mầm	Thành phần thư viện
27d	Y	S, Y, H, F, hoặc A
30	K	K, T, N, hoặc E

32	Y	Y, F, H, N, W, D, A, hoặc S
50	W	Y, W, S, R, D, Y, hoặc A
91	Y	Y, S, H, hoặc A
92	Y	Y, N, D, S, H, I, F, hoặc K
93	S	S, N, T, D, G, H, hoặc R
94	T	T, Y, L, V, F, A, hoặc S
96	L	W, Y, F, L, I, hoặc R

Các vùng VH của Fab đã được tách dòng thành phagemid thư viện LC dẫn đến sự tái đa dạng hóa LC hoàn chỉnh cho mỗi Fab. Các vùng VH đã được phân lập bằng cách xử lý bằng enzym giới hạn quy trình phân lập ADN nhanh, quy mô nhỏ (miniprep), sử dụng NcoI và ApaI. Các vùng VH đã được phân lập trên gel và thất buộc thành ADN của thư viện LC được xử lý tương tự. Sự thất buộc được tinh chế và biến nạp thành các tế bào MC1061F'. Các tế bào được tăng trưởng trong 2xYT (Carb) cho đến khi đạt được sự tăng trưởng ở giai đoạn lôgarit ($OD_{600\text{ nm}} \approx 0,6$). Thực khuẩn tế bào hỗ trợ được bổ sung và môi trường nuôi cấy được ủ ở 37 °C trong 30 phút. Kanamycin và IPTG được bổ sung vào từng môi trường nuôi cấy đến nồng độ cuối cùng lần lượt là 35ug/mL và 1 mM, và tăng trưởng qua đêm khi lắc ở 30 °C. Thực khuẩn từ môi trường vi khuẩn được kết tủa bằng cách sử dụng PEG/NaCl và được tái huyền phù trong PBS.

Đối với việc sàng lọc trưởng thành ái lực, Bt-CCL17 được thu giữ trên 50 μ l hạt từ tính phủ SA. Nồng độ kháng nguyên là 100nM cho vòng 1, 10nM cho vòng 2, và 10 nM cho vòng 3. Các hạt đã trải qua 6 lần rửa bằng PBST và một lần rửa bằng PBS, tiếp theo là cho nhiễm E. coli như đã mô tả ở trên. Thực hiện phân lập plasmit biểu hiện Fab và biểu hiện của Fab như đã trình bày.

Fab đã trưởng thành ái lực được sàng lọc trong xét nghiệm ELISA về việc liên kết với huCCL17 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 1), cCCL17 (SEQ ID NO: 2) và cCCL22 (SEQ ID NO: 3) như đã mô tả bên trên về việc liên kết với huCCL17. Các dòng vô tính xác định được xếp theo trình tự, được chuyển hóa thành kháng thể IgG1 hoàn chỉnh và sự

liên kết với huCCL17, cCCL17 và cCCL22 của chúng được xác nhận bằng cách sử dụng MSD-SEA.

Các trình tự CDR của các kháng thể mẹ và kháng thể trưởng thành ái lực được trình bày trong Bảng 3 và Bảng 4 lần lượt cho CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Bảng 3.

ID mAb	HDCR1		HCDR2		HCDR3	
	trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:	trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:	trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:
C17F24 (mẹ)	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B234	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B235	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B236	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B237	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B238	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B239	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B240	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B241	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B242	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B243	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B244	SYWIG	4	IIDPSDSDTRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6

Bảng 4.

ID mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:	trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:	trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:
C17F24 (mẹ)	KSSQSVLYSSNNKNYLA	7	WASTRES	19	QQYYSTPLT	27
C17B234	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	NASTRES	20	QQFYVPST	28
C17B235	KSSQSVLYSFYNFNALA	9	HASTRES	21	QQFYATPFT	29
C17B236	KSSQSVLLSPWNSNQLA	10	GASTRES	22	QQYYLIPST	30

C17B237	KSSQSVLTSYNNNSNYLA	11	LASTRES	23	QYLSPPST	31
C17B238	KSSQSVLISAFNQNPPLA	12	DASTRES	24	QYQFIPFT	32
C17B239	KSSQSVLSSFTNTNTLA	13	HASTRES	21	QYLIYPST	33
C17B240	KSSQSVLYSHVNYNALA	14	NASTRES	20	QYYTLPAT	34
C17B241	KSSQSVLNSFTNNNALA	15	EASTRES	25	QQTNSIPLT	35
C17B242	KSSQSVLFSDNLNTLA	16	HASTRES	21	QYYAVPQT	36
C17B243	KSSQSVLNSFDNKNDLA	17	EASTRES	25	QHWQTPLT	37
C17B244	KSSQSVLSSITNVNDLA	18	TASTRES	26	QYYHDPFT	38

Ví dụ 3. Sự liên kết của kháng thể kháng CCL17 trưởng thành ái lực với CCL17 người và khỉ

Các kháng thể được đánh giá về sự liên kết của chúng với CCL17 người và CCL17 khỉ bằng ái lực cân bằng trong dung dịch (SEA). Quy trình dành cho các thử nghiệm này tương tự với quy trình mà Haenel và cộng sự (Haenel và cộng sự, *Anal Biochem* (Hóa sinh phân tích) 339:182-184, 2005) sử dụng. Để điều chế phức hợp kháng thể kháng nguyên, CCL17 người hoặc CCL17 khỉ được pha loãng tuần tự trong dung dịch đệm là dung dịch muối đẳng trương gốc tris chứa 0,05 % Tween-20, TBST, (Thermo Scientific) ở tỷ lệ 1:6 bắt đầu ở nồng độ 2.000.000 pM trong các đĩa polypropylen 96 lỗ sâu. Các khối lượng mAb kháng hCCL17 bằng nhau tại 40 pM hoặc 200 pM được bổ sung cho mỗi lần pha loãng chemokine để thu được các hỗn hợp chứa dung dịch chemokine loãng theo trình tự bắt đầu ở nồng độ cuối cùng là 1 μ M và nồng độ không đổi (20 pM hoặc 100 pM) của kháng thể kháng CCL17. Các hỗn hợp được điều chế lặp lại và được ủ ở 4 °C trong 48 giờ để đạt được sự cân bằng. Phát hiện kháng thể tự do bằng cách sử dụng thiết bị SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Điều chỉnh phù hợp đường cong liên kết đạt được để có được hằng số cân bằng phân ly (K_D) bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism (phiên bản 5.01) bằng cách sử dụng mẫu liên kết 1:1 để thực hiện phân tích hồi quy bình phương nhỏ nhất phi tuyến tính về dữ liệu. Bảng 5 trình bày ái lực của các kháng thể đối với CCL17 người và khỉ. Các ái lực nằm trong khoảng từ khoảng 2 pM đến khoảng 700 pM đối với CCL17 người và từ khoảng 200 pM đến khoảng 9500 pM đối với

CCL17 khi. Các kháng thể đã tạo liên kết với CCL17 người có ái lực cao hơn gấp khoảng 2 đến khoảng 150 lần khi so sánh với liên kết với CCL17 khi.

Bảng 5.

ID mAb	Ái lực (pM)		Liên kết với CCL17 người/khi
	CCL17 người	CCL17 khi	
C17F24 (mẹ)	1000	ND*	
C17B234	2	230	115,0
C17B235	72	9497	131,9
C17B236	39	297	7,6
C17B237	657	3066	4,7
C17B238	115	1456	12,7
C17B239	92	630	6,8
C17B240	83	4596	55,4
C17B241	50	583	11,7
C17B242	167	384	2,3
C17B243	28	677	24,2
C17B244	33	565	17,1

*Không xác định

Ví dụ 4. Tối ưu hóa kháng thể CCL17

Các kháng thể C17B234 và C17B240 kháng CCL17 chứa vị trí glycosyl hóa liên kết với N tiềm năng tại phần bắt đầu LCDR2 ("NAS"). Gốc asparagin (N) tại vị trí gốc 50 (đánh số Kabat) của C17B234 bị đột biến thành sáu axit amin khác nhau (A, D, G, S, T và I).

Loại isome hóa axit aspartic tiềm ẩn "DS" được nhận dạng trong HCDR3 trong C17F24 mẹ và tất cả biến thể trưởng thành ái lực của nó. Để kiểm tra tính hiệu quả của việc thay thế tại vị trí này, gốc serin ở vị trí 100c (đánh số Kabat) bị đột biến thành A, T hoặc S hoặc D ở vị trí 100b bị đột biến thành E trong chuỗi nặng của mAb C17B234. Chuỗi nặng thu được được kết hợp với chuỗi nhẹ của mAb C17B258.

Các kháng thể được biểu hiện là IgG1 và ái lực của chúng đối với CCL17 người và khi được đo. Bảng 6 và Bảng 7 trình bày các trình tự CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể tối ưu. Bảng 8 trình bày ái lực của các kháng thể đối với CCL17 người và khi. Việc gây đột biến N50 trong chuỗi nhẹ dẫn đến cải thiện liên kết gấp 2 đến 100 lần.

Bảng 6.

	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
ID mAb	Trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:
C17B257	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B258	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B260	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B262	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B263	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B264	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWDSFDY	6
C17B293	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWDAFDY	42
C17B294	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWDTFDY	43
C17B295	SYWIG	4	IIDPSDS TRYSPSFQG	5	VGPADVWESFDY	44

Bảng 7.

ID mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự	SỐ ID TRÌNH TỰ:
C17B257	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	AASTRES	39	QQFYSPVST	28
C17B258	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYSPVST	28
C17B260	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	GASTRES	22	QQFYSPVST	28
C17B262	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	SASTRES	40	QQFYSPVST	28
C17B263	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	TASTRES	26	QQFYSPVST	28
C17B264	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	IASTRES	41	QQFYSPVST	28
C17B293	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYSPVST	28
C17B294	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYSPVST	28

C17B295	KSSQSVLLSFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYSPST	28
---------	-------------------	---	---------	----	----------	----

Bảng 8.

ID mAb	Ái lực (pM)		Liên kết với CCL17 người/khỉ
	CCL17 người	CCL17 khỉ	
c17B257	0,1	65,6	656,0
C17B258	0,1	41,6	416,0
C17B260	0,5	36,4	72,8
C17B262	0,3	55,5	185,0
C17B263	0,1	75,59	755,9
C17B264	0,4	71,83	179,6
C17B293	<0,1	39	
C17B294	1	22	22,0
C17B295	175	29892	170,8

Gốc tryptophan trong HCDR3 ở vị trí 100a (đánh số Kabat) trong mAb của C17B236 được xác định là vị trí giả định cho sự oxy hóa sau dịch mã không mong muốn. Gốc này đã bị đột biến thành 17 axit amin khác (tất cả ngoại trừ C và M) trong Fab mẹ của C17B236, C17F319 mà mAb là nó. Phương pháp gây đột biến Kunkel được thực hiện với "NNK" hoặc oligonucleotit của codon xác định để tạo ra bảng này. Sau đó các Fab này được sàng lọc bằng phương pháp ELISA xếp hạng về việc liên kết với cả CCL17 bt-người và bt-khỉ. Năm biến thể (W → R, Y, F, T, I) cho thấy một số liên kết trong ELISA về liên kết Fab (Bảng 5). Ba biến thể tốt nhất được chuyển hóa thành mAb (M17B288, C17B289, C17B290) dành cho biểu hiện và MSD-SEA (Bảng 6). Hầu hết các biến thể biểu hiện đã được giảm ái lực đối với CCL17 người và khỉ.

Các trình tự VH và VL của kháng thể được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9.

mAb	SỐ ID TRÌNH TỰ VH:	SỐ ID TRÌNH TỰ VL:
C17F24 (mẹ)	45	49
C17B234	45	50
C17B235	45	51
C17B236	45	52
C17B237	45	53
C17B238	45	54
C17B239	45	55
C17B240	45	56
C17B241	45	57
C17B242	45	58
C17B243	45	59
C17B244	45	60
C17B257	45	61
C17B258	45	62
C17B260	45	63
C17B262	45	64
C17B263	45	65
C17B264	45	66
C17B293	46	62
C17B294	47	62
C17B295	48	62

Ví dụ 5. Lựa chọn vùng hằng định

Các kháng thể được chọn được tách dòng như IgG2 hoặc IgG4 với các thay thế sau: IgG4 S228P/L234A/L235A hoặc IgG2

V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S bằng phương pháp tiêu chuẩn.

Bảng 10 trình bày các kháng thể thu được

Bảng 10.

tên mAb	lớp kháng thể	Các vùng biến đổi từ mAb
C17B302	IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S	C17B293
C17B311	IgG4 S228P/L234A/L235A	C17B293
C17B301	IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S	C17B294
C17B312	IgG4 S228P/L234A/L235A	C17B294

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một số kháng thể nhất định được trình bày dưới đây:

CB302 HC (SEQ ID NO: 67)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIID
 PSDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGPADV
 WDAFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDHK
 PSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

CB302 LC (SEQ ID NO: 68)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIY
 DASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYSPSTFGQGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNS
 QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CB301 HC (SEQ ID NO: 69)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIID
 PSDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARVGPADV
 WDTFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHK
 PSNTKVDKTVERKCCVECPAPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

CB301 LC (SEQ ID NO: 70)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIY
 DASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYSPSTFGQGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNS
 QESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Ví dụ 6. Sự đặc trưng của các kháng thể kháng CCL17

Các kháng thể kháng CCL17 được chọn đặc trưng ở dòng canxi, các xét nghiệm gen chỉ thị β -arrestin và trong xét nghiệm hướng hóa chất để đánh giá khả năng ức chế hoạt tính sinh học của CCL17.

Xét nghiệm dòng canxi. Xét nghiệm sự huy động canxi được sử dụng để kiểm tra khả năng trung hòa việc truyền tín hiệu CCL17 của tế bào lai mAb. Các tế bào CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) được nuôi cấy trong RPMI với GlutaMAX; 10 % FBS; 10 mM Hepes, 1 mM natri pyruvat, 4500 mg/L glucoza, và 1500 mg/ml natri bicacbonat ở tủ ấm 37 °C với 5 % CO₂ bão hòa. Các tế bào được gắn nhãn bằng thuốc nhuộm sử dụng Bộ công cụ Xét nghiệm canxi Fluo-8 NW không rửa (#36315) từ ABD Bioquest, Inc. Các kháng thể thử nghiệm và CCL17 người 10 ng/mL hoặc CCL17 khỉ 5 ng/mL được ủ trước với các kháng thể thử nghiệm và hỗn hợp được cho

vào tế bào. Phát hiện tín hiệu huỳnh quang bằng cách sử dụng FDSS 6000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) đến sử dụng kích thích 490 nm và phát xạ 525 nm.

Xét nghiệm gen chỉ thị β -Arrestin. Xét nghiệm β -arrestin được sử dụng để đánh giá khả năng trung hòa chức năng CCL17 của các kháng thể kháng CCL17. Xét nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng Xét nghiệm PathHunter eXpress β -arrestin (DiscoverRx). Tóm lại, khả năng ức chế việc tăng β -arresting do CCL17 gây ra của các kháng thể kháng CCL17 được đánh giá trong các tế bào Hek293 đồng biểu hiện CCR4 được hợp nhất trong khung với đoạn enzym nhỏ ProLink™ và protein dung hợp của β -Arrestin và đột biến xóa bỏ đầu N của β -gal (được gọi là chất nhận enzym hoặc EA). Các kháng thể kháng CCL17 ở các nồng độ khác nhau (0,15 nM – 1 μ M) được kết hợp với 20 nM CCL17 và hỗn hợp được ủ ở 37 °C trong 20-30 phút trước khi bổ sung phức hợp CCL17-kháng thể vào tế bào. Sau đó hỗn hợp được cho lên các tế bào và được ủ ở 37 °C (95 % O₂/5 % CO₂) trong 90 phút. 55 μ l thuốc thử phát hiện được bổ sung cho mỗi lỗ và được ủ trong 60 phút ở nhiệt độ phòng. Các mẫu được đọc trên máy đọc đĩa phát quang tiêu chuẩn, và các giá trị IC₅₀ được tính toán.

Xét nghiệm hướng hóa chất. Xét nghiệm hướng hóa chất được sử dụng để chứng minh rằng các kháng thể kháng CCL17 ức chế chức năng CCL17. Việc di chuyển các tế bào HSC-F (các tế bào HSC-F thu được qua Nguồn thuốc thử động vật linh trưởng không phải con người NIH) hoặc các tế bào CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) được đánh giá bằng cách sử dụng buồng hướng hóa chất 96 lỗ sử dụng bộ lọc polycarbonat 5 μ m theo quy trình được mô tả trong Imai và cộng sự 1997; Imai và cộng sự 1999. Tóm lại, các buồng bên dưới chứa 320 μ l RPMI/BSA 0,1 % và 1 nM CCL17 người hoặc khi mà không có các kháng thể hoặc có các kháng thể với nồng độ khác nhau (0,125, 0,25, 0,5 1 và 10 μ g/ml) và sau đó được phủ màng polycarbonat cẩn thận. Các tế bào được rửa với PBS và ở trạng thái huyền phù trong RPMI/BSA 0,1 % ở 0,5x10⁶ tế bào/ml, và huyền phù tế bào được cho vào các buồng bên trên. Các buồng được ủ trong 60 phút trong tủ ấm CO₂ 5 % được làm ẩm ở 37 °C, và các tế bào di chuyển qua màng xuống buồng bên dưới được xác định bằng cách sử dụng thí nghiệm The Cell Titer-Glo Luminescence Cell Viability (Khả năng sống của tế bào phát quang Cell Titer-Glo).

Bảng 11 trình bày các giá trị IC₅₀ cho Xét nghiệm dòng canxi. Dữ liệu là giá trị trung bình của ba thí nghiệm độc lập. Mỗi mAb đã trung hòa hoàn toàn dòng canxi do CCL17 người hoặc khỉ tạo ra bằng cách sử dụng CCL17 người 10 ng/ml (1,25nM) hoặc CCL17 khỉ 5 ng/ml (0,625 nM) và như đã trình bày trong Bảng 11, các giá trị IC₅₀ gần như tương đương cho mỗi kháng thể kháng cả protein người và khỉ.

Bảng 11.

mAb	IC ₅₀ (nM)	
	CCL17 người	CCL17 khỉ
C17B302	0,593	0,238
C17B311	0,553	0,239
C17B318	0,275	0,237
C17B319	0,753	0,289
C17B234	0,421	0,369
C17B235	0,558	0,919
C17B236	0,385	0,349
C17B237	0,882	0,549
C17B238	0,387	0,348
C17B239	0,427	0,430
C17B240	0,405	0,308
C17B241	0,456	0,339
C17B242	0,483	0,340
C17B243	0,231	0,310
C17B244		0,311

Bảng 12 trình bày các giá trị IC₅₀ cho Xét nghiệm β -arrestin. Dữ liệu là giá trị trung bình của ba thí nghiệm độc lập. Tất cả mAb đều có thể ức chế hoàn toàn việc tăng β -arrestin do CCL17 người hoặc khỉ gây ra ở 20 nM và ức chế phụ thuộc liều lượng việc tăng β -arrestin do CCL17 người hoặc khỉ gây ra với hiệu lực tương đương.

Bảng 12.

	CCL17 người		CCL17 khỉ	
	IC ₅₀ (nM)	STD	IC ₅₀ (nM)	STD
C17B302	13,94	9,56	13,412	6,403
C17B311	10,65	2,89	10,324	2,569
C17B318	11,006	2,886	12,141	2,294
C17B319	14,225	4,133	17,51	6,605
C17B234	8,42	5,525	5,391	0,0431
C17B236	6,98	3,33	9,502	0,073

Hình 1 và Hình 2 trình bày sự ức chế hướng hóa chất bằng các kháng thể được chọn lần lượt trong các tế bào người và khỉ. Tất cả kháng thể được kiểm tra đã ức chế sự hướng hóa chất của tế bào CCRF-CEM do CCL17 người gây ra ở mức độ ức chế khoảng 50 % ở nồng độ kháng thể bằng 0,5 µg/ml. C17B302 và C17B311 đã ức chế sự hướng hóa chất của tế bào HSC-F khỉ do CCL17 khỉ gây ra ở mức độ ức chế khoảng 50 % ở nồng độ kháng thể bằng 0,5 µg/ml.

Ví dụ 7. Ánh xạ epitope của kháng thể C17B236 kháng CCL17

Epitope liên kết của kháng thể C17B236 (VH: SỐ ID TRÌNH TỰ: 45; VL: SỐ ID TRÌNH TỰ: 52) được xác định bằng tinh thể học tia X.

CCL17 người được biểu hiện trong *E. coli*, được phân lập từ thể vùi và được tái gấp cuộn. Phần Fab của mAb C17B236 được biểu hiện trong các tế bào HEK293F.

CCL17: Phức hợp C17B236 được điều chế bằng cách pha trộn ở tỷ lệ mol là 1,6:1 với CCL17 dư. Sau đó phức hợp được tinh chế bằng phép sắc ký loại cỡ. Phức hợp được kết tinh bằng phương pháp khuếch tán hơi nước từ dung dịch chứa 20 % PEG 3350 và 0,2 M K/Na tartrat. Dữ liệu nhiễu xạ tia X được thu thập đến độ phân giải 1,9 Å. Cấu trúc được xác định bằng cách thay thế phân tử và được tinh luyện đến hệ số R bằng 18,0 %.

Epitope C17B236 có cấu hình riêng và trải dài trên 3 đoạn phân tử CCL17, là hai vòng (các gốc 21-23 và 44-45) và vòng xoắn đầu C (các gốc 60-68). Các tương tác chính bao gồm các gốc có tính bazơ Arg22 và Lys23 của CCL17 và nhóm các gốc có tính axit trong HCDR2 bao gồm Asp52, Asp55 và Asp57. Ngoài các tương tác tĩnh điện này, các tiếp xúc van-der-Waals ở tâm epitope xuất hiện giữa Trp33 và Trp105 của VH và Arg22 của CCL17. Với số lượng tiếp xúc đã cho, gốc chính của epitope là Arg22, xếp dựa vào Trp33 của VH và tạo nhiều tiếp xúc với HCDR3. Các gốc paratope và epitope được trình bày trong Hình 7.

Paratope (các gốc kháng thể có liên quan trong liên kết với CCL17) bao gồm 18 gốc thuộc 5 trong 6 CDR (tất cả ngoại trừ LCDR2).

Epitope C17B236 ở phía đối diện đơn thể CCL17 từ bề mặt nhị trùng hóa của nó. Vì vậy C17B236 không phong bế sự nhị trùng hóa CCL17. Hiệu quả trung hòa của C17B236 là kết quả từ sự cạnh tranh với CCR4 đối với các epitope trùng lặp.

Trình tự:

SỐ ID TRÌNH TỰ:	Loại	Loài	Mô tả	Trình tự
1	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	CCL17	argtnvgreccleyfkgaiprlklktw yqtsedcsrdaivfvtvqgraicdpn nkrvknvskylqslers
2	PRT	Khỉ	CCL17	margtnvgrecclekyfkgaiprlklkt wyqtsedcsrdaivfvtvqnkaicsd pndkkvkkalkylqslers
3	PRT	khỉ	CCL22	gpyganmedsvccrdyvryrmplr vvkhfywtsdscrpgvlltsrdke icadprvpwvkmilnklslq
4	PRT	Trình tự nhân tạo	HCDR1 của C17F24	SYWIG
5	PRT	Trình tự nhân tạo	HCDR2 của C17F24	IIDPSDSDTRYSPSFQG
6	PRT	Trình tự nhân tạo	HCDR2 của C17F24	VGPADVWDSFDY
7	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17F24	KSSQSVLYSSNNKNYLA

			(mẹ)	
8	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B234	KSSQSVLLSFDNINKLA
9	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B235	KSSQSVLYSFYNFNALA
10	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B236	KSSQSVLLSPWNSNQLA
11	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B237	KSSQSVLTSYNNSNYLA
12	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B238	KSSQSVLISAFNQNPALA
13	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B239	KSSQSVLSSFTNTNTLA
14	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B240	KSSQSVLYSHVNYNALA
15	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B241	KSSQSVLNSFTNNNALA
16	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B242	KSSQSVLFSDNLNTLA
17	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B243	KSSQSVLNSFDNKNDLA
18	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR1 của C17B244	KSSQSVLSSITNVNDLA
19	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR2 của C17F24 (mẹ)	WASTRES
20	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR2 của C17B234	NASTRES
21	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR2 của C17B235	HASTRES
22	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR2 của C17B236	GASTRES
23	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR2 của C17B237	LASTRES
24	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR2 của C17B238	DASTRES
25	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR2 của C17B241	EASTRES
26	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR2 của C17B244	TASTRES
27	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17F24 (mẹ)	QQYYSTPLT
28	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B234	QQFYSPST
29	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B235	QQFYATPFT
30	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B236	QQYYLIPST
31	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B237	QQYLSPST
32	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B238	QQYQFIPFT
33	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B238	QQYLIYPST
34	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B240	QQYYTLPAT
35	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B241	QQTNSIPLT

36	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B242	QQYYAVPQT
37	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B243	QQHWQTPLT
38	PRT	Trình tự nhân tạo	LCDR3 của C17B244	QQYYHDPFT
39	PRT		LCDR2 của C17B257	AASTRES
40	PRT		LCDR2 của C17B262	SASTRES
41	PRT		LCDR2 của C17B264	IASTRES
42	PRT		HCDR3 của C17B293	VGPADVWDAFDY
43	PRT		HCDR3 của C17B294	VGPADVWDTFDY
44	PRT		<i>HCDR3 của C17B295</i>	<i>VGPADVWESFDY</i>
45	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VH của C17F24, C17B234, C17B235, C17B236, C17B237, C17B238, C17B239, C17B240, C17B241, C17B242, C17B243, C17B244, C17B257, C17B258, C17B260, C17B262, C17B266, C17B264	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGII DPSDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARVGPA DVWDSFDYWGQGTLVT VSS
46	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VH của C17M293	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGII DPSDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARVGPA DVWDAFDYWGQGTLV TVSS
47	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VH của C17B294	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGII DPSDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARVGPA DVWDTFDYWGQGTLVT VSS

48	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VH của C17B295	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGII DPSDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARVGPA DVWESFDYWGQGTLVT VSS
49	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17F24 (mẹ)	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSSNN KNYLAWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQYYSTPLTF GQGTKVEIK
50	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B234	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPKL LIYNASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAE VAVYYCQQFYSPSTFG QGTKVEIK
51	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B235	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSFYN FNALAWYQQKPGQPPK LLIYHASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQFYATPFTF GQGTKVEIK
52	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B236	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSPW NSNQLAWYQQKPGQPP KLLIYGASTRESGVPDRF SGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQYYLIPST FGQGTKVEIK
53	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B237	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLTSYNN SNYLAWYQQKPGQPPK

				LLIYLASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYLSPSTF GQGTKVEIK
54	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B238	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLISAFN QNPLAWYQQKPGQPPK LLIYDASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYQFIPFTF GQGTKVEIK
55	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B239	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLSSFTN TNTLAWYQQKPGQPPK LLIYHASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYLIYPSTF GQGTKVEIK
56	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B240	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSHV NYNALAWYQQKPGQPP KLLIYNASTRESGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQYYTLPA TFGQGTKVEIK
57	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B241	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLNSFTN NNALAWYQQKPGQPPK LLIYEASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQTNSIPLTF GQGTKVEIK
58	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B242	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLFSDN LNTLAWYQQKPGQPPK LLIYHASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYAVPQT FGQGTKVEIK
59	PRT	Homo sapiens	VL của C17B243	DIVMTQSPDSLAVSLGE

		(Người thông minh)		RATINCKSSQSVLNSFDN KNDLAWYQQKPGQPPK LLIYEASTRESGVPDRFS SGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQHWQTPLT FGQGTKVEIK
60	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B244	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLSSITN VNDLAWYQQKPGQPPK LLIYTASTRESGVPDRFS SGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYHDPFT FGQGTKVEIK
61	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B257	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPKL LIYAASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYSPSTFG QGTKVEIK
62	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B258	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPKL LIYDASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYSPSTFG QGTKVEIK
63	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B260	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPKL LIYGASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYSPSTFG QGTKVEIK
64	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B262	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPKL LIYSASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYSPSTFG QGTKVEIK

65	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B263	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPKL LIYTASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYSPSTFG QGTKVEIK
66	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	VL của C17B264	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPKL LIYIASTRESGVPDRFSGS SGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQQFYSPSTFGQ GTKVEIK
67	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	CB302 HC	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGII DPSDSDTRYSPSFQGGQVT ISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARVGPAD VWDAFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVV TVTSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPAAASSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSAEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

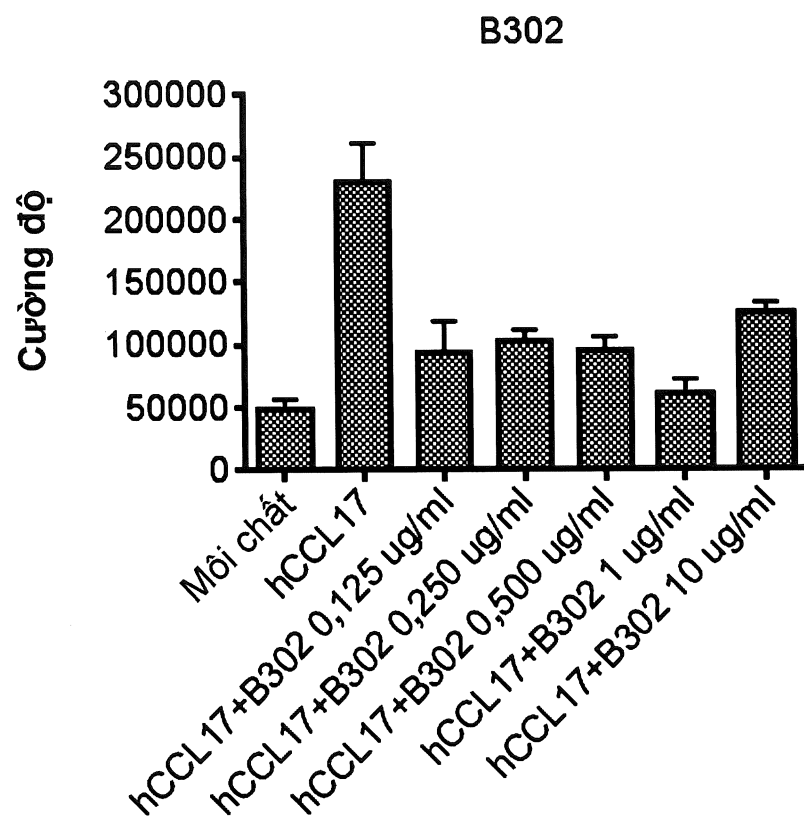
68	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	CB302 LC	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPKL LIYDASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYSPSTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVA DNLQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
69	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	CB301 HC	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGII DPSDS DTRYSPSFQGGQVT ISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARVGPAD VWDTFDYWGGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVV TVTSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPAAASSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSAEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPM LDS DGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNV FSCSV MHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

70	PRT	Homo sapiens (Người thông minh)	CB301 LC	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLLSFDN INKLAWYQQKPGQPPK LLIYDASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQFYSPSTF GQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWK VADNLQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
----	-----	------------------------------------	----------	--

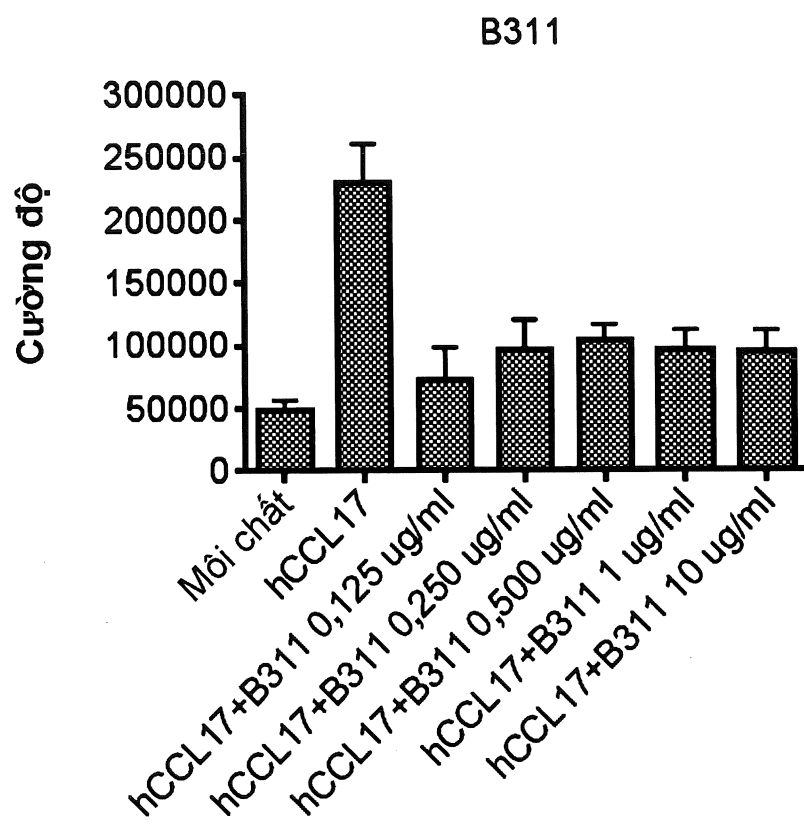
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với CCL17 của người bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) 1, HCDR2 và HCDR3 và vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) 1, LCDR2 và LCDR3 của lần lượt các SEQ ID NO: 4, 5, 42, 8, 24 và 28.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 62.
3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể là của người hoặc được nhân hóa.
4. Kháng thể theo điểm 3, trong đó kháng thể là của lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.
5. Kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể bao gồm sự thay thế trong vùng Fc.
6. Kháng thể theo điểm 5, trong đó sự thay thế bao gồm sự thay thế V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S hoặc P331S trên IgG2, hoặc sự thay thế S228P, L234A hoặc L235A trên IgG4, trong đó việc đánh số các gốc là theo Chỉ số EU.
7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó sự thay thế bao gồm sự thay thế V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S trên IgG2 hoặc sự thay thế S228P/L234A/L235A trên IgG4, trong đó việc đánh số các gốc là theo Chỉ số EU.
8. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

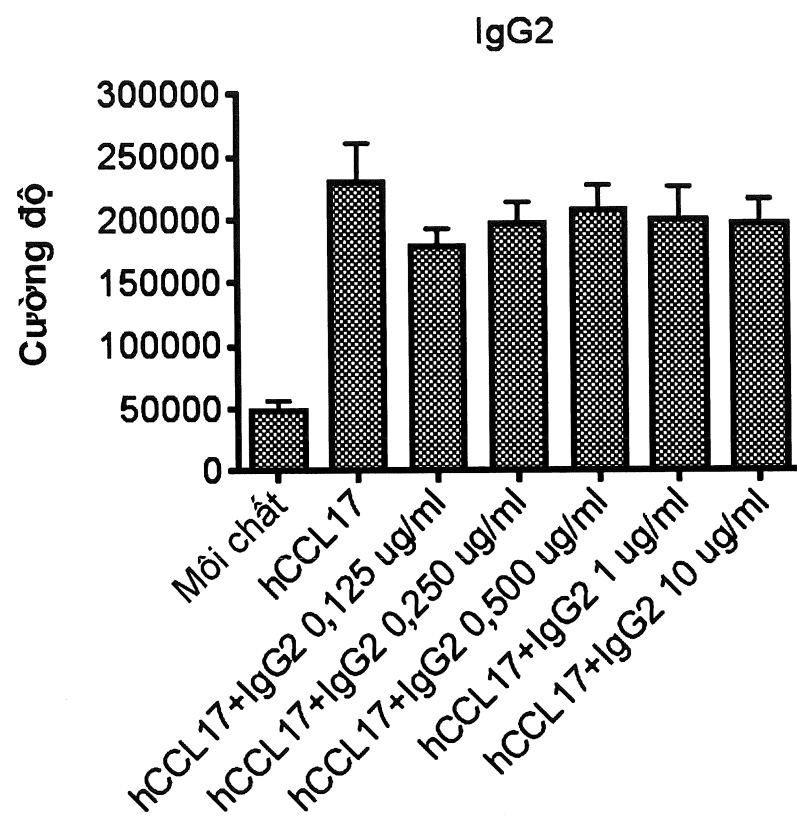
Hình 1A.



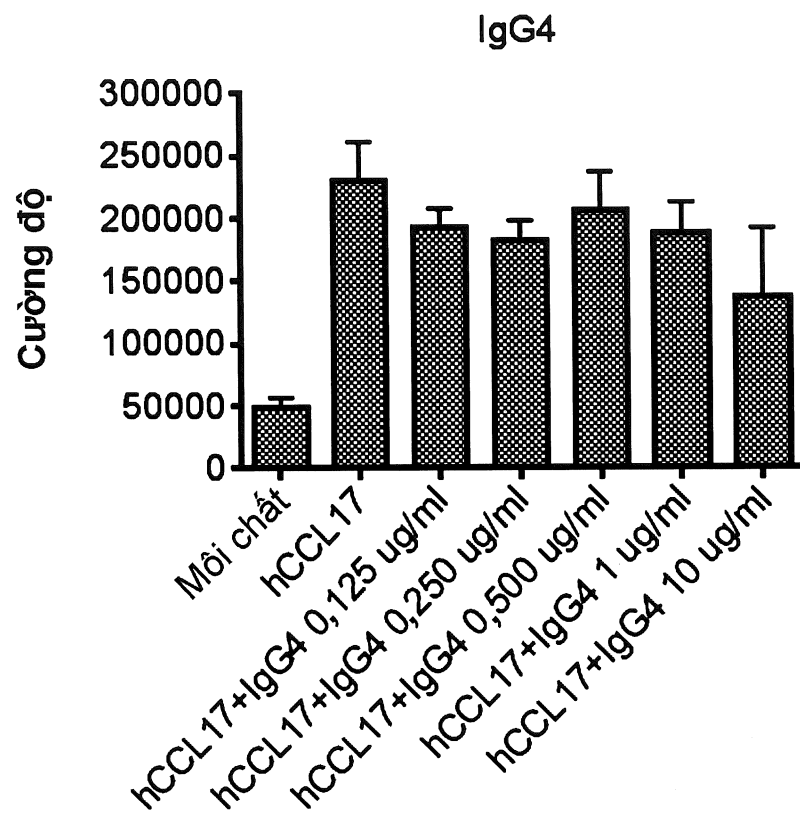
Hình 1B.



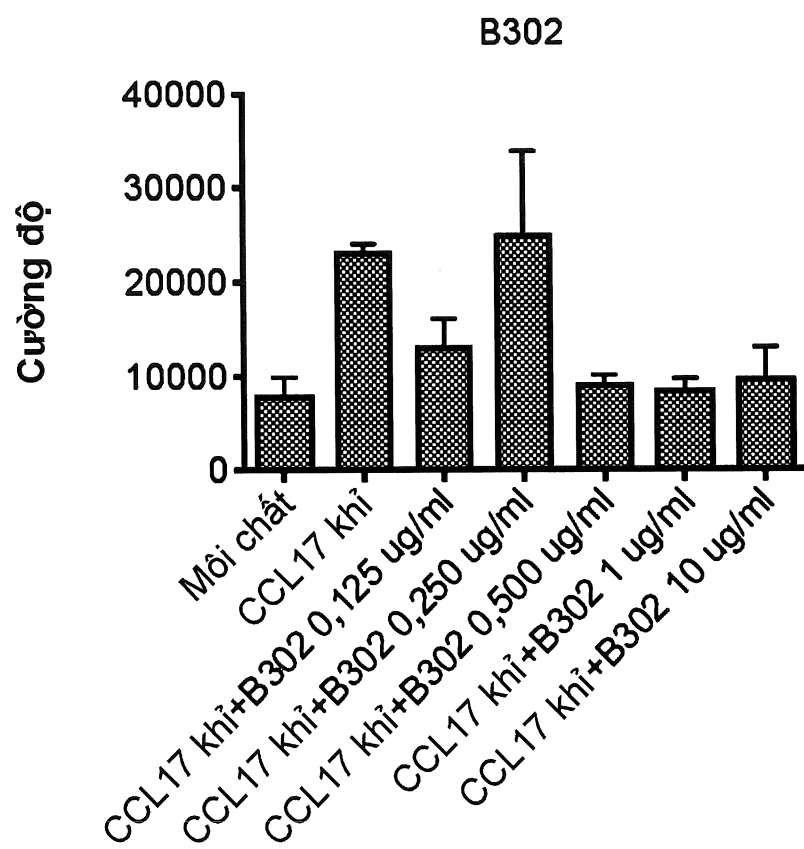
Hình 1C.



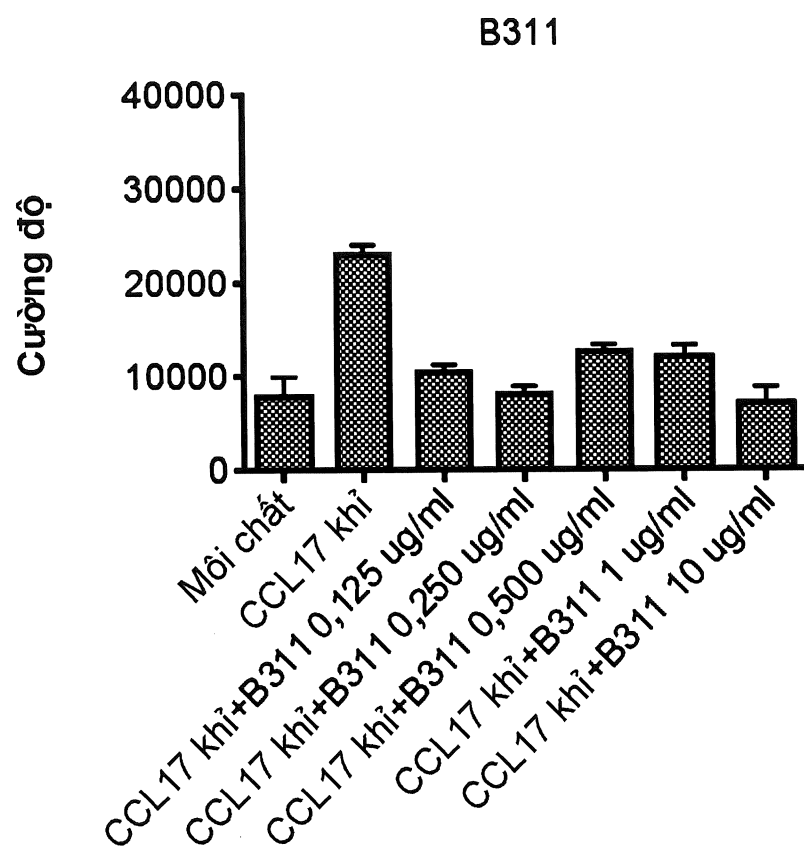
Hình 1D.



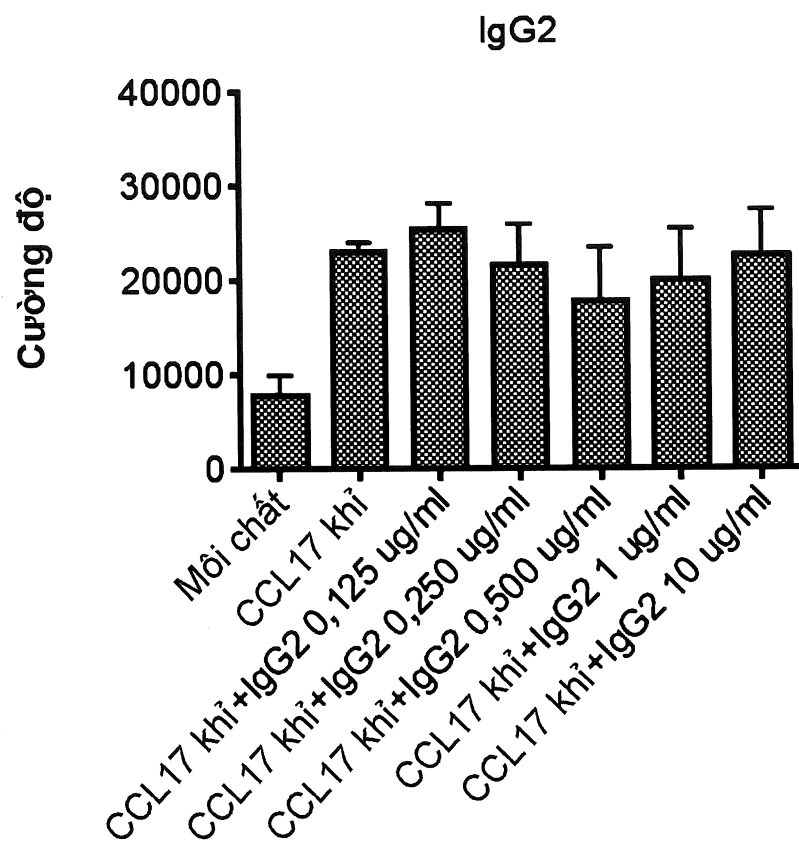
Hình 2A.



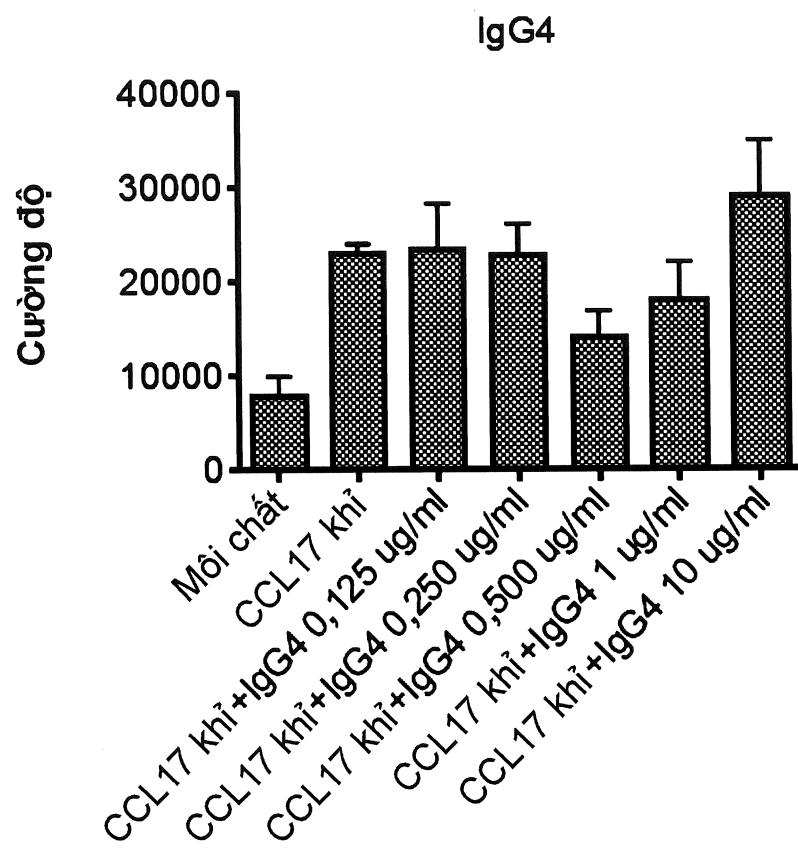
Hình 2B.



Hình 2C.



Hình 2D.



Hình 3.

	1	30
C17B234_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B235_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B236_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B239_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B240_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B241_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B243_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B244_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B293_VH_46	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B294_VH_47	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	

	31	60
C17B234_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B235_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B236_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B239_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B240_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B241_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B243_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B244_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B293_VH_46	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B294_VH_47	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	

Hình 3 Tiếp

	61	90
C17B234_VH_45	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B235_VH_45	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B236_VH_45	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B239_VH_45	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B240_VH_45	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B241_VH_45	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B243_VH_45	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B244_VH_45	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B293_VH_46	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	
C17B294_VH_47	<u>SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD</u>	

	91	121
C17B234_VH_45	<u>TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B235_VH_45	<u>TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B236_VH_45	<u>TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B239_VH_45	<u>TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B240_VH_45	<u>TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B241_VH_45	<u>TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B243_VH_45	<u>TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B244_VH_45	<u>TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B293_VH_46	<u>TAMYYCARVGPADVWDAFDYWGQGLVTVSS</u>	
C17B294_VH_47	<u>TAMYYCARVGPADVWDTFDYWGQGLVTVSS</u>	
	*****:	

Hình 4.

Trình tự liên ứng VH (SỐ ID TRÌNH TỰ: 75)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDT
 RYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARVGPADVWDX₁FDYWGQGT
 LVTVSS

trong đó

X₁ là S, A hoặc T

Trình tự HCDR1

SYWIG (SỐ ID TRÌNH TỰ: 4)

Trình tự HCDR2

IIDPSDSDDTRYSPSFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ: 5)

Trình tự liên ứng HCDR3

VGPADVWDX₁FDY (SỐ ID TRÌNH TỰ: 71),

trong đó

X₁ là S, A hoặc T

Hình 5.

	1	30
C17B234_VL_50	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B235_VL_51	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B236_VL_52	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B239_VL_55	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B240_VL_56	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B241_VL_57	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B243_VL_59	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B244_VL_60	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B293_VL_62	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B294_VL_62	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	

	31	60
C17B234_VL_50	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYNASTR	
C17B235_VL_51	YSFYNFNALAWYQQKPGQPPKLLIYHASTR	
C17B236_VL_52	LSPWNSNQLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR	
C17B239_VL_55	SSFTNTNTLAWYQQKPGQPPKLLIYHASTR	
C17B240_VL_56	YSHVNYNALAWYQQKPGQPPKLLIYNASTR	
C17B241_VL_57	NSFTNNNALAWYQQKPGQPPKLLIYEASTR	
C17B243_VL_59	NSFDNKNDLAWYQQKPGQPPKLLIYEASTR	
C17B244_VL_60	SSITNVNDLAWYQQKPGQPPKLLIYTASTR	
C17B293_VL_62	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDASTR	
C17B294_VL_62	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDASTR	
	* * * ***** *	

Hình 5 Tiếp

	61	90
C17B234_VL_50	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B235_VL_51	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B236_VL_52	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B239_VL_55	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B240_VL_56	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B241_VL_57	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B243_VL_59	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B244_VL_60	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B293_VL_62	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	
C17B294_VL_62	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA	

	91	113
C17B234_VL_50	VYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIK	
C17B235_VL_51	VYYCQQFYATPFTFGQGTKVEIK	
C17B236_VL_52	VYYCQQYYLIPSTFGQGTKVEIK	
C17B239_VL_55	VYYCQQYLIYPSTFGQGTKVEIK	
C17B240_VL_56	VYYCQQYYTLPATFGQGTKVEIK	
C17B241_VL_57	VYYCQQTNSIPLTFGQGTKVEIK	
C17B243_VL_59	VYYCQQHWQTPLTFGQGTKVEIK	
C17B244_VL_60	VYYCQQYYHDPFTFGQGTKVEIK	
C17B293_VL_62	VYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIK	
C17B294_VL_62	VYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIK	
	***** * *****	

Hình 6A.

Trình tự liên ứng VL (SỐ ID TRÌNH TỰ: 76):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LAWYQQKPGQPPKLLIY
X₆ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQXX₇X₈X₉X₁₀PX₁₁TFGQGT
KVEIK; trong đó

X₁ là L, Y, S hoặc N;

X₂ là F, P, H hoặc I;

X₃ là D, Y, W, T hoặc V;

X₄ là I, F, S, T, Y, N, K hoặc V;

X₅ là K, A, Q, T hoặc D;

X₆ là N, H, G, E, T hoặc D;

X₇ là F, Y, T hoặc H;

X₈ là Y, L, N hoặc W;

X₉ là S, A, L, I, T, Q hoặc H;

X₁₀ là V, T, I, Y, L hoặc D; và

X₁₁ là S, F, A hoặc L.

Hình 6B.

Trình tự liên ứng LCDR1:

KSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LA (SỐ ID TRÌNH TỰ:72),

trong đó

X₁ là L, Y, S hoặc N;

X₂ là F, P, H hoặc I;

X₃ là D, Y, W, T hoặc V;

X₄ là I, F, S, T, Y, N, K hoặc V; và

X₅ là K, A, Q, T hoặc D;

Trình tự liên ứng LCDR2:

X₁ASTRE (SỐ ID TRÌNH TỰ:73),

trong đó

X₁ là N, H, G, E, T hoặc D.

Trình tự liên ứng LCDR3

QQX₁X₂X₃X₄PX₅T (SỐ ID TRÌNH TỰ:74);

trong đó

X₁ là F, Y, T hoặc H;

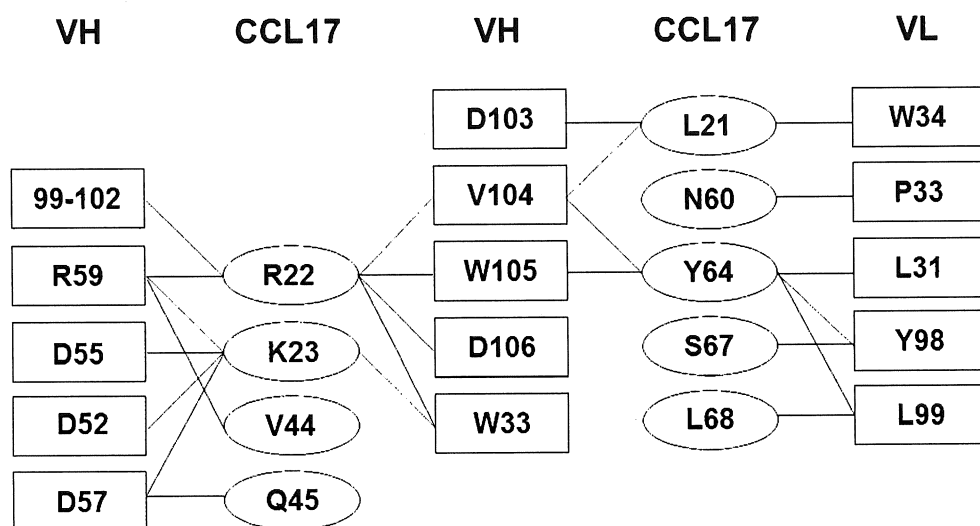
X₂ là Y, L, N hoặc W;

X₃ là S, A, L, I, T, Q hoặc H;

X₄ là V, T, I, Y, L hoặc D; và

X₅ là S, F, A hoặc L.

Hình 7.



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Janssen Biotech, Inc.
Boakye, Ken
Del Vecchio, Alfred
Kehoe, John
Lacy, Eilyn
Murray, Lynne
Ryan, Mary
Santulli-Marotto, Sandra
Teplyakov, Alexey
Wheeler, John
Whitaker, Brian
- <120> Các kháng thể kháng CCL17
- <130> JBI5040WOPCT
- <140> Được phân
- <141> 2014-11-06
- <150> 61/900,596
- <151> 2013-11-06
- <160> 76
- <170> Phiên bản sáng chế 3.5
- <210> 1
- <211> 71
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens (Người thông minh)
- <400> 1

Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Glu Tyr Phe Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Ser Glu
 20 25 30

Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala
 35 40 45

Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asn Lys Arg Val Lys Asn Ala Val Lys Tyr
 50 55 60

Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser
 65 70

<210> 2

<211> 72

<212> PRT

<213> Khỉ đuôi dài *Macaca fascicularis*

<400> 2

Met Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Lys Tyr Phe
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Ser
 20 25 30

Glu Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Asn Lys
 35 40 45

Ala Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asp Lys Lys Val Lys Lys Ala Leu Lys
 50 55 60

Tyr Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser
 65 70

<210> 3

<211> 69

<212> PRT

<213> Khỉ đuôi dài *Macaca fascicularis*

<400> 3

Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Met Glu Asp Ser Val Cys Cys Arg Asp Tyr
 1 5 10 15

Val Arg Tyr Arg Met Pro Leu Arg Val Val Lys His Phe Tyr Trp Thr
 20 25 30

Ser Asp Ser Cys Pro Arg Pro Gly Val Val Leu Leu Thr Ser Arg Asp
 35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Arg Val Pro Trp Val Lys Met Ile Leu
 50 55 60

Asn Lys Leu Ser Gln

65

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 của C17F24

<400> 4

Ser Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 của C17F24

<400> 5

Ile Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 của C17F24

<400> 6

Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ser Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 của C17F24

<400> 7

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

Ala

<210> 8

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

<220>
<223> LCDR1 của C17B234

<400> 8

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Leu	Ser	Phe	Asp	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu
1				5					10					15	

Ala

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 của C17B235

<400> 9

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Asn	Phe	Asn	Ala	Leu
1				5					10					15	

Ala

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 của C17B236

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser Pro Trp Asn Ser Asn Gln Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 của C17B237

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asn Asn Ser Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 của C17B238

<400> 12

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Ile	Ser	Ala	Phe	Asn	Gln	Asn	Pro	Leu
1				5					10					15	

Ala

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 của C17B239

<400> 13

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Thr	Asn	Thr	Asn	Thr	Leu
1					5					10				15	

Ala

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 của C17B240

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser His Val Asn Tyr Asn Ala Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 của C17B241

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser Phe Thr Asn Asn Asn Ala Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 của C17B242

<400> 16

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Phe	Ser	His	Asp	Asn	Leu	Asn	Thr	Leu
1				5					10					15	

Ala

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

<220>
 <223> LCDR1 của C17B243

<400> 17

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Asn	Ser	Phe	Asp	Asn	Lys	Asn	Asp	Leu
1				5					10					15	

Ala

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1 của C17B244

<400> 18

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Ser Ile Thr Asn Val Asn Asp Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2 của C17F24

<400> 19

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 của C17B234

<400> 20

Asn Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 của C17B235

<400> 21

His Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

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

<220>

<223> LCDR2 của C17B236

<400> 22

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2 của C17B237

<400> 23

Leu Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2 của C17B238

<400> 24

Asp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 của C17B241

<400> 25

Glu Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 của C17B244

<400> 26

Thr Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của C17F24

<400> 27

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của C17B234

<400> 28

Gln Gln Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của C17B235

<400> 29

Gln Gln Phe Tyr Ala Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 của C17B236

<400> 30

Gln Gln Tyr Tyr Leu Ile Pro Ser Thr
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 của C17B237

<400> 31

Gln Gln Tyr Leu Ser Pro Pro Ser Thr
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của C17B238

<400> 32

Gln Gln Tyr Gln Phe Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của C17B239

<400> 33

Gln Gln Tyr Leu Ile Tyr Pro Ser Thr
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của C17B240

<400> 34

Gln Gln Tyr Tyr Thr Leu Pro Ala Thr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 của C17B241

<400> 35

Gln Gln Thr Asn Ser Ile Pro Leu Thr
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 của C17B242

<400> 36

Gln Gln Tyr Tyr Ala Val Pro Gln Thr
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của C17B243

<400> 37

Gln Gln His Trp Gln Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của C17B244

<400> 38

Gln Gln Tyr Tyr His Asp Pro Phe Thr
1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2 của C17B257

<400> 39

Ala Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 của C17B262

<400> 40

Ser Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 của C17B264

<400> 41

Ile Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 của C17B293

<400> 42

Val	Gly	Pro	Ala	Asp	Val	Trp	Asp	Ala	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 của C17B294

<400> 43

Val	Gly	Pro	Ala	Asp	Val	Trp	Asp	Thr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 của C17B295

<400> 44

Val	Gly	Pro	Ala	Asp	Val	Trp	Glu	Ser	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 45
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C17F24, C17B234, C17B235, C17B236,
 C17B237, C17B238, C17B239, C17B240, C17B241,
 C17B242, C17B243, C17B244, C17B257, C17B258,
 C17B260, C17B262, C17B266, C17B264

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

32006

85

90

95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C17M293

<400> 46

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C17B294

<400> 47

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

32006

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 48

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C17B295

<400> 48

32006

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Glu Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17F24

<400> 49

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

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

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

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

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

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

Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				100				105					110		

Lys

<210> 50

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B234

<400> 50

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

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

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

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

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

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

32006

85

90

95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 51

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B235

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 52

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B236

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Leu Ile Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 53

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B237

<400> 53

32006

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

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

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

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

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

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

Tyr Leu Ser Pro Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 54
<211> 113
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B238

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Tyr	Gln	Phe	Ile	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				100				105					110		

Lys

<210> 55

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B239

<400> 55

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

32006

85

90

95

Tyr Leu Ile Tyr Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 56

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B240

<400> 56

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Thr Leu Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 57

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B241

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Thr Asn Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 58

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B242

<400> 58

32006

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Lys

<210> 59
<211> 113
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B243

<400> 59

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

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

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

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

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

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

His	Trp	Gln	Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				100				105					110		

Lys

<210> 60

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B244

<400> 60

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

32006

85

90

95

Tyr Tyr His Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 61

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B257

<400> 61

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

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

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

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

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

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

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 62

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B258

<400> 62

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

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

32006

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

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

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

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

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 63
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL của C17B260

<400> 63

32006

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

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

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

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

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

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

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 64
<211> 113
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B262

<400> 64

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

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

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

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

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

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

Phe	Tyr	Ser	Val	Pro	Ser	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				100				105					110		

Lys

<210> 65

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B263

<400> 65

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

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

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

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

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

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

32006

85

90

95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 66

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C17B264

<400> 66

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

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

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

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

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

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

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 67

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CB302 HC

<400> 67

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

32006

305

310

315

320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 68
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CB302 LC

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

32006

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

<210> 69
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CB301 HC

<400> 69

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

115

120

125

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

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

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

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

Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

32006

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 70

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CB301 LC

<400> 70

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

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

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

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

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

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

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng HCDR3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa có thể là Ser, Ala hoặc Thr

<400> 71

Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Xaa Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng LCDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa có thể là Leu, Tyr, Ser hoặc Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa có thể là Phe, Pro, His hoặc Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa có thể là Asp, Tyr, Trp, Thr hoặc Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa có thể là Ile, Phe, Ser, Thr, Tyr, Asn, Lys hoặc Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa có thể là Lys, Ala, Qln, Thr hoặc Asp

<400> 72

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Asn	Xaa	Leu
1				5				10					15		

Ala

<210> 73
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng LCDR2:

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là Asn, His, Gly, Glu, Thr hoặc Asp

<400> 73

Xaa Ala Ser Thr Arg Glu
 1 5

<210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng LCDR3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)

<223> Xaa có thể là Phe, Tyr, Thr hoặc His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa có thể là Tyr, Leu, Asn hoặc Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa có thể là Ser, Ala, Leu, Ile, Thr, Qln hoặc His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa có thể là Val, Thr, Ile, Tyr, Leu hoặc Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa có thể là Ser, Phe, Ala hoặc Leu

<400> 74

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1

5

<210> 75

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng VH

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(107)

<223> Xaa có thể là Ser, Ala hoặc Thr

<400> 75

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

Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

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

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

Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
						85				90				95	

Ala	Arg	Val	Gly	Pro	Ala	Asp	Val	Trp	Asp	Xaa	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
						100				105				110	

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 76

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng VL

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa có thể là Leu, Tyr, Ser hoặc Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa có thể là Phe,Pro, His hoặc Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa có thể là Asp, Tyr, Trp, Thr hoặc Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa có thể là Ile, Phe, Ser, Thr, Tyr, Asn, Lys hoặc Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa có thể là Lys, Ala, Qln, Thr hoặc Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa có thể là Asn, His, Gly, Glu, Thr hoặc Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(97)

<223> Xaa có thể là Phe, Tyr, Thr hoặc His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (98)..(98)

<223> Xaa có thể là Tyr, Leu, Asn hoặc Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(99)

<223> Xaa có thể là Ser, Ala, Leu, Ile, Thr, Qln hoặc His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(100)

<223> Xaa có thể là Val, Thr, Ile, Tyr, Leu hoặc Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> Xaa có thể là Ser, Phe, Ala hoặc Leu

<400> 76

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Xaa Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys