



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

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

(11)



1-0035833

(51)⁷ C07K 16/24; C12N 15/13; A61K
39/395; C07K 16/18

(13) B

(21) 1-2016-02668

(22) 23/03/2015

(86) PCT/RU2015/000163 23/03/2015

(87) WO2016/048188 31/03/2016

(30) 2014138740 26/09/2014 RU

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/07/2017 352A

(73) CLOSED JOINT-STOCK COMPANY "BIOCAD" (RU)

Russia 198515, Saint Petersburg, Petrodvortsovy district, Strelna, Svyazi st., bld. 34, liter A

(72) ULITIN, Andrey Borisovich (RU); EVDOKIMOV, Stanislav Rudolfovich (RU); SOLOVIEV, Valeriy Vladimirovich (RU); CHERNYH, Yulia Sergeevna (RU); GONCHAROVA, Olga Vladimirovna (RU); KORZHAVIN, Dmitriy Valerievich (RU); CHERNOVSKAYA, Tatyana Veniaminovna (RU); NEMANKIN, Timofey Aleksandrovich (RU); IVANOV, Roman Alexeevich (RU); MOROZOV, Dmitriy Valentinovich (RU); EKIMOVA, Victoria Mikhailovna (RU); SOFRONOVA, Ekaterina Vladimirovna (RU); USTYUGOV, Yakov Yurevich (RU).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) KHÁNG THỂ IGG ĐƠN DÒNG ĐƯỢC LÀM GIỐNG NHƯ Ở NGƯỜI, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng loại IgG có chứa miền biến đổi được biểu thị bằng sự kết hợp của dẫn xuất VHH với miền biến đổi của chuỗi nhẹ V_L. Kháng thể này có thể chứa sự thể axit amin ở các vị trí 44 và 45 (đánh số Kabat) hoặc dạng kết hợp của chúng. Kháng thể theo sáng chế có ái lực tăng và độ ổn định kết tập được cải thiện. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh của nó, phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng được làm giống như ở người hoặc mảnh của nó, dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Kháng thể, còn được gọi là immunoglobulin (Ig), là glycoprotein hòa tan trong máu hoặc dịch kẽ đóng vai trò then chốt trong miễn dịch thể dịch của động vật có xương sống. Kháng thể được sản xuất bởi tế bào B trong đáp ứng với chất hóa học hoặc sinh học lạ (kháng nguyên) có cấu trúc khác nhau. Do tính đặc hiệu cao và ái lực cao với kháng nguyên nhất định, và do khả năng sản xuất kháng thể chống lại kho kháng nguyên không giới hạn, kháng thể và dẫn xuất của chúng là một trong số các chất phản ứng quan trọng nhất được sử dụng trong cả nghiên cứu y học cơ bản và ứng dụng.

Kháng thể cổ điển [1, 2] được biểu thị bằng protein đa phân lớn (IgG ~150 KDa) mà chứa hai chuỗi nặng H giống nhau (một miền biến đổi VH, ba miền không đổi CH1, CH2 và CH3, và miền bản lề ở giữa CH1 và CH2) và hai chuỗi nhẹ L giống nhau (bao gồm miền biến đổi VL và miền không đổi CL). Phân tử có bốn chuỗi có các liên kết không cộng hóa trị và cộng hóa trị (disulfua) để nối các chuỗi. Papain proteaza có thể được sử dụng để phá vỡ phân tử kháng thể thành hai mảnh: Fab (Mảnh liên kết kháng nguyên) và Fc (Mảnh có thể kết tinh). Do đó, một vùng của phân tử (Fab) xác định tính đặc hiệu với kháng nguyên của nó, và vùng kia (Fc) thực hiện chức năng tác động nhằm loại bỏ kháng nguyên [3, 4]. Các miền CH1 và CH2 của chuỗi H cách nhau bởi vùng bản lề mà đảm bảo cho tính linh động của vùng Fab và sự tương tác của phân tử IgG với thụ thể tác động Ig lộ ra trên các tế bào. Miền CH2 có chứa các vùng liên kết với thụ thể Fc γ mà làm trung gian cho sự hoạt hóa tế bào (ADCC và ADCP) và với phân tử hệ thống bổ thể (CDC). Ngoài ra, miền này có chứa vị trí mà là điểm gắn cho cacbohydrat đối với tất cả các isotyp immunoglobulin. Miền CH3 gần như xác định độ ổn định của dime IgG và tương tác với thụ thể FcRn trên bề mặt tế bào để thiết lập các tính chất được động học của kháng thể cũng như là sự chuyển hóa và phân bố của chúng trong cơ thể. Sự kết hợp của vùng xác định bổ sung (CDR) của miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) và

miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) tạo thành mảnh liên kết kháng nguyên, trong khi đó vùng khung của miền biến đổi và miền không đổi không trực tiếp tham gia vào sự nhận diện kháng nguyên. Dẫn xuất Fab được tối thiểu hóa đối với kháng thể cổ điển là cấu trúc chuỗi đơn trong đó miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nối với trình tự liên kết (scFv).

Việc phát hiện ra hàm lượng đáng kể của kháng thể không cổ điển đặc hiệu có cấu trúc được làm đơn giản hóa trong máu của động vật Camelidae (lạc đà một bướu, lạc đà không bướu, vicuna) là phát hiện có giá trị [5]. Kháng thể (chuỗi nặng kháng thể, HCAb) này bao gồm chuỗi nặng đã cắt ngắn đơn lẻ dạng dime (không có miền CH1) hoàn toàn không có chuỗi nhẹ. Mảnh liên kết kháng nguyên của HCAb được tạo thành chỉ bằng một miền biến đổi chuỗi nặng (VHH), mà được nối qua vùng bản lề với miền Fc. Thông thường hơn, VHH được gọi là kháng thể đơn miền, “nanobody”, “kháng thể cỡ nhỏ (mini-antibody)” hoặc “kháng thể nano (nano-antibody)”. Dường như là ngoài kích thước nhỏ (12-15 KDa), cấu trúc đơn miền được phân lập này có số ưu điểm có thể so sánh được với kháng thể IgG cổ điển, cụ thể là sự kết tập, độ ổn định hóa học và độ ổn định nhiệt. Kháng thể VHH có thể được tách dòng và được biểu hiện thành công ở tế bào vi khuẩn và tế bào nấm men. Nhờ có các tính chất này, kháng thể này đã được phát triển theo hướng trị liệu bởi Ablynx Company và theo hướng sắc ký trong phòng thí nghiệm và công nghiệp (sản phẩm ái lực CaptureSelect).

Kháng thể chuỗi nặng có chứa dime của chuỗi nặng Ig đơn lẻ được phát hiện lần đầu bằng phân tích điện di đối với immunoglobulin trong huyết thanh thu được từ các đại diện khác nhau của họ Camelidae [5]. Tỷ lệ tương ứng của HCAb thay đổi từ khoảng 15–25% (của tất cả các IgG) ở lạc đà không bướu và vicuna đến khoảng 60–80% ở lạc đà một bướu [6].

Giả định rằng HCAb không cổ điển, ít nhất là trong trường hợp Camelidae, dẫn đến sự tiến hóa tương đối gần của các gen của kháng thể cổ điển. Hai miền không đổi chuỗi nặng, CH2 và CH3, trong trường hợp của HCAb và kháng thể cổ điển, được bảo

toàn cao. Trong HCAb không có miền nào tương ứng với miền không đổi thứ nhất CH1 của kháng thể cổ điển. Hệ gen lạc đà một bướu có chứa cụm gồm khoảng năm mươi gen có khả năng sinh ra VH và bốn mươi gen có khả năng sinh ra VHH sau đó là nhiều gen của mảnh D, mảnh J và các gen mã hóa cho vùng không biến đổi ($C\mu$, $C\gamma$, $C\epsilon$ và $C\alpha$). Rõ ràng rằng một số gen $C\gamma$ phù hợp để tạo thành HCAb (sự đột biến dẫn đến sự mất đi của miền CH1), và các gen khác – để tạo thành kháng thể cổ điển (với miền CH1 còn lại). Các gen giống nhau của mảnh D và mảnh J có thể nối ngẫu nhiên với một trong số các gen VH hoặc một trong số các gen VHH. Điều này chỉ ra rằng các gen VH và VHH nằm ở cùng locut gen [7-10].

Sự tổ chức của các miền biến đổi của kháng thể không cổ điển (VHH) và các miền biến đổi của kháng thể cổ điển (VH) là rất tương tự nhau, như miền VH ở người của lớp phụ IgG3 có độ tương đồng cao với VH và VHH của Camelidae. Trong cả hai trường hợp, miền V chứa bốn vùng khung bảo toàn FR bao xung quanh ba vùng xác định bổ sung siêu biến (CDR). Ngoài ra, trong cả hai trường hợp cấu trúc 3-D thông thường đối với miền V immunoglobulin được tạo thành gồm hai lớp β , một lớp chứa 4 trình tự axit amin và lớp kia chứa 5 trình tự axit amin [11, 12]. Cả ba CDR trong cấu trúc này tạo thành cụm trên một mặt của miền V, tại đó chúng tham gia vào sự nhận diện kháng nguyên và nằm ở các vòng nối các cấu trúc β . Tuy nhiên, có một vài khác biệt quan trọng về sự hoạt động của miền đơn lẻ VHH. Do đó, CDR1 và CDR3 của VHH được mở rộng một cách đáng kể. Vùng xác định bổ sung của VHH thường chứa các gốc xystein cùng lúc ở hai mảnh (thường là ở CDR1 và CDR3, ít thường xuyên hơn là ở CDR2 và CDR3). Nghiên cứu về cấu trúc tinh thể VHH đã cho thấy rằng các gốc xystein này tạo thành liên kết disulfua và mang lại độ ổn định thêm cho cấu trúc vòng của các kháng thể này [12]. Đặc điểm đặc trưng mạnh và có thể tái sinh nhất của VHH được thể hiện bởi bốn sự thế của gốc axit amin kỵ nước bằng gốc ưa nước vùng khung thứ hai (Val37Phe, Gly44Glu, Leu45Arg, Trp47Gly theo phương pháp đánh số Kabat [13]). Vùng khung này của miền VH bảo toàn cao được làm giàu bằng các gốc axit amin kỵ

nước và thiết yếu để liên kết với miền biến đổi chuỗi nhẹ VL. Miền VHH khác biệt lớn ở khía cạnh này: sự thế của axit amin kỵ nước bằng axit amin ưa nước làm cho không thể có sự kết hợp của VHH và VL. Các sự thế này cũng giải thích cho khả năng hòa tan cao của VHH (kháng thể nano (nano-antibody)) khi thu được nó dưới dạng protein tái tổ hợp [14].

Dường như danh mục của các paratop (phần liên kết kháng nguyên của kháng thể) có thể có đối với HCAb và kháng thể cổ điển có thể khác nhau một cách đáng kể. Vì hai loại kháng thể này đồng tồn tại trong cùng một sinh vật, có thể giả định rằng chúng không cạnh tranh mà bổ sung cho nhau. Ví dụ, đã lưu ý lặp đi lặp lại rằng cả hai loại kháng thể có thể cùng có mặt song song, một cách riêng biệt hoặc ở tỷ lệ khác nhau đối với các epitop khác nhau của nguyên liệu kháng nguyên khi gây miễn dịch động vật rất giống nhau. Mặc dù nghi ngờ là có thể có độ đa dạng thấp hơn của paratop đối với kháng thể đơn miền so với kháng thể hai miền cổ điển, nhiều tài liệu công bố đã chứng minh rõ ràng rằng có thể thu được HCAb chống lại epitop đa dạng nhất của phạm vi khá rộng của kháng nguyên [15]. Hiển nhiên là, điều này là do các vùng CDR1 và CDR3 được mở rộng. Chúng tôi cũng chú ý đến số lượng lớn đáng ngạc nhiên (so với miền V của kháng thể cổ điển) của siêu đột biến soma ở VHH mà dường như tích lũy trong quá trình trưởng thành afin của kháng thể trong quá trình gây miễn dịch [16]. Phân tích nhiễu xạ tia X bộc lộ ra rằng vùng vòng liên kết kháng nguyên của VHH có thể tạo thành cấu trúc khác thường đối với miền V cổ điển [12, 16]. Trong trường hợp miền VH và miền VL của kháng thể cổ điển, cả sáu CDR đóng góp gần như giống nhau đối với việc liên kết kháng nguyên; trong khi đó trong trường hợp VHH, CDR3 thường là quan trọng nhất đối với sự tạo thành của paratop. Đã thấy rằng CDR3 trong VHH (chứ không phải là trong VH hay VL) có khả năng tạo thành cấu trúc dạng ngón tay dài khác thường mà có thể đi sâu vào trong cấu trúc kháng nguyên và, cụ thể là, phát hiện ra các vị trí hoạt tính của enzym [12]. Kích thước nhỏ của vùng liên kết kháng nguyên của VHH và khả năng tạo thành paratop nổi trội khác thường của nó giải thích cho việc làm thế nào có thể thu

được HCAb có thể nhận diện epitop không thể tiếp cận được đối với kháng thể cổ điển (ví dụ, sự sản xuất của kháng thể mà ức chế enzym một cách hiệu quả) [17].

Đối với tất cả tiềm năng cao của tính đặc hiệu duy nhất được so với kháng thể IgG cổ điển, việc sử dụng để điều trị của VHH đơn miền đôi khi bị giới hạn do sự bài tiết nhanh của nó ra khỏi sinh vật. Có một vài dung dịch được thiết kế để cải thiện được động học của cấu trúc VHH, bao gồm sự liên hợp hóa học với PEG và liên kết cộng hóa trị với polypeptit làm trung gian cho sự thanh thải giảm (chẳng hạn như HSA hoặc protein dung hợp Fc có thời gian bán thải lên đến ba tuần) [18,19,20]. Peptit nhỏ mà được gắn vào VHH bằng công nghệ tái tổ hợp và có khả năng tương tác không cộng hóa trị ái lực cao với các thành phần đã nêu (HSA và IgG) trong máu người đã được sử dụng thành công [21]. Tuy nhiên, hiệu quả công nghệ và khả năng sinh miễn dịch của các nghiên cứu này vẫn còn nghi vấn, và tính khả thi của việc sử dụng chúng trong giai đoạn nghiên cứu lâm sàng hoặc sớm hơn hiện nay đang được nghiên cứu.

Ngoài ra, hạn chế lớn nhất của việc sử dụng kháng thể làm thuốc là do ái lực kết tập và ổn định hóa học và khả năng sinh miễn dịch của chúng. Vì phần lớn kháng thể đơn dòng thu được trên cơ sở kháng thể chuột, việc sử dụng thường xuyên kháng thể này ở người gây ra sự phát triển của đáp ứng miễn dịch đối với liệu pháp kháng thể (ví dụ, phản ứng dị ứng). Cuối cùng các kiểu đáp ứng miễn dịch này dẫn đến ít nhất là sự thiếu hiệu quả, và xấu nhất là có khả năng có phản ứng phản vệ. Mặt khác, kháng thể trị liệu không ổn định về mặt hóa học hoặc kết tập làm giảm các tính chất trị liệu của sản phẩm thuốc theo thời gian và có thể làm tăng khả năng sinh miễn dịch của nó khi dùng cho người bệnh.

Theo những điều nêu trên, điều quan trọng là phải phát triển kháng thể dựa trên VHH có chức năng và các tính chất trị liệu được cải thiện (so với các kháng thể đã biết từ trước), cụ thể là sự ổn định kết tập, hóa học và nhiệt tăng lên và ái lực được cải thiện, cùng lúc đó có thể thu được dễ dàng trên quy mô công nghiệp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế cung cấp thông tin về các kháng thể cấu trúc khác nhau chứa miền VHH.

Công bố PCT/EP2008/066368 mô tả kháng thể mà chứa các miền biến đổi riêng rẽ được liên kết với mảnh Fc. Nanobody có thể được dùng làm miền biến đổi với Fc thu được từ kháng thể typ IgE. Miền nêu trên và mảnh Fc có thể được nối qua cầu nối nằm ở miền bản lề.

Đơn sáng chế US 2009/0202979 bộc lộ kháng thể có chứa kháng thể VHH hoàn chỉnh hoặc phần của chúng được nối trực tiếp vào vùng không biến đổi của kháng thể người.

Ngoài ra, đã biết rằng sự thế axit amin ảnh hưởng đến các tính chất lý-hóa và sinh học của kháng thể.

Ví dụ, đơn US 20110028348 mô tả miền biến đổi chuỗi nặng trong đó sự thế axit amin được đưa vào ở các vị trí 35, 45, 47, 93- 100 và 100a để cải thiện tính chất ưa nước của kháng thể thu được.

Hiện nay, các phương pháp đã được phát triển để tối ưu hóa cấu trúc của miền đơn VHH và VH được phân lập để làm giảm khả năng sinh miễn dịch và cải thiện độ ổn định kết tập của chúng.

Do đó, Vincke và cộng sự [22] đã phát hiện ra rằng sự thế Glu-49→Gly và Arg-50→Leu ở các axit amin đặc trưng giúp thu được miền mới mà dẫn đến ổn định hơn mà vẫn ít tan. Các sự thế khác trong vùng khung FR-2 Phe-42→Val và Gly/Ala-52→Trp có tính quyết định đối với ái lực của kháng thể với kháng nguyên do sự tái định hướng của vòng H3, do đó hằng số phân ly tăng 6-10 lần ($6,85 \cdot 10^{-3}$ 1/giây). Sự thế Phe-42→Val làm cho độ ổn định của kháng thể thu được giảm đi. Các sự thế Gly-49 và Leu-50 trong trình tự VH dẫn độ ổn định của miền thấp hơn, trong khi đó việc làm cho giống người Glu-49 và Arg-50 ở VHH cho phép thu được miền biến đổi ổn định.

Như đã biết trong tài liệu, trong sự có mặt của các vùng HCDR3 ngăn làm trung hòa hiệu ứng che khuất của hình dạng ngoài của VHH cổ điển, và khi đưa sự thế Trp-47→Gly-47 đặc trưng VH cũng như là Tyr-37→Val-37, Glu-4→Gly-44 và Arg-45→Leu-45 vào, miền VHH được phân lập có thể tái tạo khả năng liên kết với miền VJ [24].

Mối quan hệ giữa độ ổn định kết tập tăng của kháng thể điều trị của cấu trúc IgG cổ điển và khả năng sinh miễn dịch giảm của chúng đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu và được tổng kết tổng quan bởi Hermeling và cộng sự, 2004 [25]. Vẫn chưa có kháng thể nào được phát hiện rằng có chứa miền VHH nhưng được liên kết với miền biến đổi của chuỗi nhẹ ở trong IgG ở người kích thước đầy đủ.

Do đó, cần phải phát triển dạng mới của kháng thể mà sẽ có độ ổn định và ái lực được cải thiện, sự biểu hiện tốt và khả năng sinh miễn dịch thấp.

Ngoài ra, chưa có nghiên cứu nào từng được mô tả về sự phát triển của các phân tử mà thu được dễ dàng, có độ ổn định kết tập được cải thiện, ái lực tăng và mức độ biểu hiện cao trong môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Như đã đề cập, sáng chế lần đầu tiên mô tả kháng thể có chứa dẫn xuất VHH có thể liên kết với miền biến đổi của chuỗi nhẹ của IgG ở người kích thước đầy đủ, mà dẫn đến sự tạo thành của cấu trúc tương tự với cấu trúc tự nhiên (và, do đó, có khả năng sinh miễn dịch thấp) nhưng có độ ổn định kết tập được cải thiện, ái lực tăng, và có cấu trúc của kháng thể đơn dòng điều trị.

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được làm cho giống người, tốt hơn là typ IgG, mà có ái lực tăng và độ ổn định kết tập được cải thiện, trong đó miền biến đổi được biểu thị bằng sự kết hợp của dẫn xuất VHH với miền biến đổi của chuỗi nhẹ V_L.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất mảnh kháng thể. Mảnh kháng thể này có thể được thể hiện bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng mà là

một phần của kháng thể trình tự, mà bao gồm biến thể kháng thể đặc hiệu sinh học. Phương án khác của sáng chế bao gồm mảnh kháng thể that được biểu thị bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng mà là một phần của Fab. Mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được biểu thị bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng mà là một phần của scFv.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể. Phương pháp sản xuất kháng thể này có thể bao gồm các pha được chọn từ các pha sau đây: gây đột biến định hướng, phương pháp hiển thị, thiết kế di truyền, phương pháp hóa sinh và công nghệ sinh học hiệu suất cao đã biết rõ trong lĩnh vực, mà có thể bao gồm phương pháp gây đột biến định hướng ở các vị trí khác nhau của miền VHH của kháng thể Camelidae.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất cấu trúc ADN mã hóa cho kháng thể được yêu cầu bảo hộ hoặc mảnh của chúng, và vật truyền biểu hiện có chứa một hoặc một vài cấu trúc ADN theo sáng chế.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất dòng tế bào có chứa vật truyền biểu hiện hoặc cấu trúc ADN này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng được làm cho giống người hoặc mảnh của chúng, mà bao gồm dòng tế bào nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện đủ để thu được kháng thể này hoặc mảnh của chúng, sau đó là phân lập và tinh chế kháng thể thu được hoặc mảnh hoạt tính của nó.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất được phẩm mà có chứa kháng thể hoặc mảnh của chúng kết hợp với một hoặc một vài tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người, khác biệt ở chỗ nuôi cấy tế bào chủ có chứa cấu trúc ADN trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện thích hợp để thu được kháng thể này hoặc mảnh của chúng, và sau đó phân lập và tinh chế kháng thể này hoặc mảnh hoạt tính của chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Biểu đồ tiến trình đối với sự phát triển và sự tối ưu hóa của kháng thể cản trở kết tập dựa trên VHH.

Fig.2, Fig.3, Fig.4: SDS-PAGE với kháng thể VHHIgG1 có chứa nhiều lần thể axit amin khác nhau.

Fig.5: Biểu đồ tiến trình của sự tổng hợp của thư viện Fab tổ hợp lạc đà không bướu.

Fig.6: Phagemid để tách dòng thư viện Fab hiển thị phago.

Fig.5A-C: Các đồ thị đáp ứng trong nghiên cứu cộng hưởng plasmon bề mặt thu được đối với việc thử nghiệm các tham số động học so sánh của các dòng Fab VHH về việc liên kết với IL-17A:

Fig.7: A.) Trình tự của miền biến đổi VHH lạc đà không bướu ở trong Fab chống lại đặc hiệu IL-17A ở người. B). Trình tự của miền biến đổi chuỗi nhẹ lạc đà không bướu ở trong 3VHHFab chống lại đặc hiệu IL-17A ở người.

Fig.8: Các đồ thị đáp ứng trong nghiên cứu cộng hưởng plasmon bề mặt thu được đối với việc thử nghiệm các tham số động học so sánh của các dòng Fab VHH về việc liên kết với IL-17A.

Fig.9: Trình tự axit amin đối với 3 thể đột biến VHH khác nhau.

Fig.10, Fig.11: Độ ổn định kết tập của ba thể đột biến VHH.

Fig.12, Fig.13: Ái lực của ba thể đột biến VHH.

Fig.14: Thử nghiệm tế bào để ức chế sự sản xuất IL-6 bằng cách ức chế IL-17A bằng các chất đối kháng VHHIgG1VK4B11, mut1VHHIgG1 và mut4VHHIgG1.

Fig.15, Fig.16: Phân lập biến thể khảm của mut4 VHHFab có chứa chuỗi nhẹ ở người.

Fig.17: Thử nghiệm tế bào để ức chế sự sản xuất IL-6 bằng cách ức chế IL-17A bằng các chất đối kháng mut4 VHHLgG1VK3c8, mut4 VHHLgG1VK1A7 và mut4 VHHLgG1VK4E12.

Fig.18, Fig.19: Điện di protein trong điều kiện biến tính được thực hiện đối với các sản phẩm có chứa kháng thể có sự đột biến ở các vị trí 44 và 45 của m4 VHHc8.

Fig.20: Thử nghiệm tế bào so sánh đối với sự ức chế sản xuất IL-6 bằng cách ức chế IL-17A bằng chất đối kháng m4VHHc8 có chứa sự đột biến trong FR2 ở các vị trí 44 và 45.

Fig.21: Sơ đồ thể hiện các tính chất độ ổn định và chức năng của các đột biến khác nhau ở các vị trí 44 và 45 trong FR2 của m4VHHc8 mà xác định sự tương tác của miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

Fig.22: Xác định các tham số động học của tương tác BCD109 với IL-17A có nguồn gốc khác nhau (tiến hành thử nghiệm bằng cách sử dụng thiết bị Octet RED 96).

Fig.23: Kết quả thu được đối với các tham số động học của sự tương tác BCD109 với IL17A có nguồn gốc khác nhau (tiến hành thử nghiệm bằng cách sử dụng thiết bị Octet RED 96).

Fig.24: Biểu đồ sắc ký thu được với kháng thể BCD109 trước và sau khi chịu ứng suất nhiệt.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

"Kháng thể đơn dòng" như được dùng trong bản mô tả này đề cập đến kháng thể thu được từ lạc đà không bướu, kháng thể khảm, kháng thể được làm cho giống người hoặc là kháng thể người đầy đủ, trừ khi có chỉ dẫn khác trong đơn này. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách sử dụng, ví dụ, công nghệ tái tổ hợp, công nghệ hiển thị phagơ, công nghệ tổng hợp hoặc dạng kết hợp của các công nghệ này hoặc các công nghệ khác đã biết rõ trong tình trạng kỹ thuật.

“Kháng thể đơn dòng” dùng để chỉ kháng thể thu được từ bản sao hoặc dòng đơn lẻ bao gồm, ví dụ, dòng sinh vật nhân chuẩn, sinh vật nhân sơ hoặc phage bất kỳ, chứ không phải là phương pháp sản xuất của chúng. “Kháng thể đơn dòng” có thể là kháng thể nguyên vẹn (có vùng Fc đầy đủ hoặc chiều dài đầy đủ), kháng thể thực sự nguyên vẹn, phần hoặc mảnh kháng thể có chứa vùng liên kết kháng nguyên, ví dụ, mảnh Fab, mảnh Fab' hoặc mảnh F(ab')₂ từ kháng thể lạc đà không bướu hoặc kháng thể khảm, kháng thể được làm cho giống người hoặc là kháng thể người. Mảnh “Fab” chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền không biến đổi chuỗi nhẹ cũng như là miền biến đổi chuỗi nặng và miền không biến đổi chuỗi nặng thứ nhất (CH1). Mảnh kháng thể “F(ab')₂” có chứa một cặp mảnh Fab mà chủ yếu là được liên kết cộng hóa trị bằng gốc xystein bản lề ở vùng đầu tận cùng C. Các liên kết hóa học khác giữa các mảnh kháng thể cũng đã được biết rõ trong tình trạng kỹ thuật.

Ngoài ra, “kháng thể đơn dòng” như được dùng trong bản mô tả này có thể là Fv chuỗi đơn mà có thể thu được bằng cách liên kết ADN mã hóa cho VHH và VL với trình tự liên kết. Miễn là protein còn giữ được khả năng liên kết đặc hiệu hoặc ưu tiên của nó với đích (ví dụ như epitop hoặc kháng nguyên), thì nó còn được bao hàm trong thuật ngữ “kháng thể”. Kháng thể có thể được glycosyl hóa hoặc không và nằm trong khung theo sáng chế.

Thuật ngữ "dẫn xuất" hoặc “biến thể” kháng thể, như được dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ trình tự axit amin phân tử của mà khác so với trình tự bố mẹ bằng cách thêm, làm khuyết và/hoặc thế một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự của kháng thể bố mẹ. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể có chứa ít nhất là một (ví dụ, từ một đến khoảng mười tốt hơn là 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8) lần thế axit amin trong vùng FR hoặc vùng CDR của kháng thể bố mẹ. Đơn này xác định độ tương đồng hoặc độ đồng nhất về trình tự của biến thể kháng thể dưới dạng tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin trong trình tự biến thể kháng thể mà tương đồng với các gốc trong kháng thể bố mẹ sau

khi sắp thẳng hàng các trình tự và, nếu cần, cắt để đạt được trình tự tương đồng có tỷ lệ phần trăm lớn nhất.

Dẫn xuất kháng thể (từ kháng thể bố mẹ) giữ được khả năng để liên kết cùng kháng nguyên hoặc, tốt hơn là, cùng epitop như kháng thể hoặc epitop mà kháng thể bố mẹ liên kết với, hoặc, tốt hơn là, thể hiện ít nhất là một tính chất hoặc hoạt tính sinh học vượt quá tính chất hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể bố mẹ. Ví dụ, kháng thể tốt hơn là có độ ổn định kết tập tốt hơn, ái lực mạnh hơn, được động học được cải thiện hoặc khả năng để ức chế hoạt tính sinh học kháng nguyên tăng lên, so với kháng thể bố mẹ.

Thuật ngữ "dẫn xuất VHH", như được dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ dẫn xuất của kháng thể VHH mà trình tự axit amin của nó khác với trình tự của kháng thể VHH bố mẹ bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự của kháng thể bố mẹ. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể VHH có chứa ít nhất là một (ví dụ, từ một đến khoảng mười tốt hơn là 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8) lần thế axit amin trong vùng FR hoặc vùng CDR của kháng thể bố mẹ.

Dẫn xuất kháng thể giữ được khả năng để liên kết cùng kháng nguyên hoặc, tốt hơn là, cùng epitop như kháng thể hoặc epitop mà kháng thể bố mẹ liên kết với, hoặc, tốt hơn là, thể hiện ít nhất là một tính chất hoặc hoạt tính sinh học vượt quá tính chất hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể bố mẹ. Ví dụ, kháng thể tốt hơn là có độ ổn định kết tập tốt hơn, ái lực mạnh hơn, được động học được cải thiện hoặc khả năng để ức chế hoạt tính sinh học kháng nguyên tăng lên, so với kháng thể bố mẹ.

“Kháng thể VHH bố mẹ” hoặc “kháng thể VHH ban đầu”, hoặc “kháng thể VHH đại” như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể VHH được phân lập từ động vật Camelidae đã được gây miễn dịch hoặc không được gây miễn dịch được mã hóa bằng trình tự axit amin mà được dùng để sản xuất biến thể VHH. Kháng thể bố mẹ có thể có trình tự khung có nguồn gốc từ Camelidae (đối với miền biến đổi VHH),

nhưng tốt hơn là trình tự khung của miền biến đổi chuỗi nhẹ hoàn toàn hoặc về cơ bản có nguồn gốc từ người.

Kháng thể "bố mẹ", "ban đầu", hoặc "dại" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể được mã hóa bằng trình tự axit amin mà được dùng để sản xuất biến thể. Kháng thể bố mẹ có thể có trình tự khung có nguồn gốc từ Camelidae (đối với miền biến đổi VHH), nhưng tốt hơn là trình tự khung của miền biến đổi chuỗi nhẹ hoàn toàn hoặc về cơ bản có nguồn gốc từ người.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" dùng để chỉ tình trạng trong đó một bên tham gia vào quy trình liên kết đặc hiệu không liên kết đáng kể với phân tử không phải là đối tác (các đối tác) liên kết đặc hiệu của nó. Thuật ngữ này cũng áp dụng nếu, ví dụ, vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế là đặc hiệu đối với epitop cụ thể được mang bởi một số lượng các kháng nguyên; trong trường hợp này kháng thể đặc hiệu với vị trí liên kết kháng nguyên sẽ có thể liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên mang epitop khác nhau. Do đó, kháng thể đơn dòng theo sáng chế liên kết đặc hiệu với IL-17 ở người (IL-17A), trong khi đó nó không liên kết đặc hiệu IL-17B, IL-17C, IL-17D hoặc IL-17E ở người. Hơn nữa, kháng thể đơn theo sáng chế liên kết đặc hiệu IL-17 ở người và IL-17 từ khỉ cynomolgus, nhưng không liên kết đặc hiệu với IL-17 chuột nhắt hay IL-17 ở chuột.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "liên kết ưu tiên" dùng để chỉ tình trạng trong đó kháng thể liên kết kháng nguyên cụ thể ít nhất là cao hơn 20%, tốt hơn là cao hơn khoảng 50%, hoặc 2 lần, 20 lần, 50 lần hoặc 100 lần so với khi nó liên kết kháng nguyên khác bất kỳ, như đo được theo các quy trình đã biết trong tình trạng kỹ thuật (ví dụ, các phép đo ELISA cạnh tranh hoặc K_D thực hiện được bằng cách sử dụng thiết bị Octet). Kháng thể có thể liên kết ưu tiên với một epitop ở trong kháng nguyên nhưng không liên kết với epitop khác của cùng kháng nguyên đó. Do đó, kháng thể theo sáng chế liên kết ưu tiên với IL-17 ở người nhưng không liên kết với IL-17 ở thỏ.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ “epitop” dùng để chỉ phần phân tử mà có thể được nhận diện bởi và liên kết kháng thể thông qua một hoặc một vài vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể. Epitop thường chứa các nhóm có hoạt tính bề mặt về mặt hóa học của các phân tử chẳng hạn như axit amin hoặc chuỗi bên của đường, và có đặc điểm cấu trúc 3-D đặc trưng. “Epitop ức chế” và/hoặc “epitop trung hòa” dùng để chỉ epitop mà, như trong trường hợp của phân tử kháng nguyên nguyên vẹn và liên kết kháng thể đặc hiệu với epitop này, làm mất hoặc làm giảm *in vivo* hoặc *in vitro* hoạt tính của phân tử hoặc sinh vật có chứa phân tử này.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ “epitop” cũng dùng để chỉ mảnh polypeptit có hoạt tính kháng nguyên và/hoặc gây miễn dịch ở động vật, tốt hơn là ở động vật có vú chẳng hạn như chuột và người. Thuật ngữ “epitop có tính kháng nguyên” như được dùng trong bản mô tả này là mảnh polypeptit mà có thể liên kết đặc hiệu kháng thể và có thể được phát hiện bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết rõ trong tình trạng kỹ thuật (ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch tiêu chuẩn). Epitop kháng nguyên không cần phải gây miễn dịch, nhưng chúng có thể có khả năng gây miễn dịch. “Epitop gây miễn dịch” như được dùng trong bản mô tả này được xác định là mảnh polypeptit mà gây ra đáp ứng kháng thể ở động vật, như được xác định bằng phương pháp bất kỳ của tình trạng kỹ thuật. “Epitop không thẳng” hoặc “epitop thích nghi” có chứa các polypeptit (các axit amin) không liên kết ở trong protein kháng nguyên, mà liên kết với kháng thể đặc hiệu epitop.

“Hoạt tính chức năng”, “đặc điểm chức năng” được biểu hiện hoặc các thuật ngữ “hoạt tính sinh học” hoặc “hoạt tính” khi đề cập đến kháng thể theo sáng chế được dùng thay thế lẫn nhau như được dùng trong bản mô tả này, và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: ái lực và tính đặc hiệu epitop/kháng nguyên; khả năng làm trung hòa hoặc làm chất chủ vận đối với IL-17 *in vivo* hoặc *in vitro*; IC₅₀; khả năng làm ổn định kháng thể và khả năng gây miễn dịch *in vivo* của kháng thể. Các tính chất sinh học hoặc đặc điểm kháng thể khác được xác định trong tình trạng kỹ thuật bao gồm, ví dụ, khả năng

phản ứng chéo (tức là phản ứng với chất tương đồng không ở người của peptit đích hoặc với các protein hoặc đích khác) và khả năng để duy trì mức độ biểu hiện protein cao ở tế bào động vật có vú. Các tính chất hoặc đặc điểm nêu trên có thể được quan sát, được đo hoặc được đánh giá bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong tình trạng kỹ thuật, bao gồm nhưng chỉ giới hạn ở ELISA, ELISA cạnh tranh, phân tích Octet, thử nghiệm trung hòa *in vitro* hoặc *in vivo* không giới hạn, liên kết thụ thể, sản xuất và/hoặc giải phóng xytokin hoặc yếu tố sinh trưởng, nghiên cứu sự truyền tín hiệu và hóa mô miễn dịch của các phần mô thu được từ các nguồn khác nhau bao gồm người, động vật linh trưởng hoặc nguồn khác bất kỳ.

Quần thể “kháng thể đơn dòng” như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ quần thể kháng thể đồng nhất hoặc về cơ bản đồng nhất (tức là ít nhất là 96%, nhưng tốt hơn là không ít hơn khoảng 97 hoặc 98%, hoặc tốt hơn nữa là ít nhất là 99% của kháng thể trong quần thể sẽ cạnh tranh đối với cùng kháng nguyên/epitop trong ELISA, hoặc tốt hơn nữa là các kháng thể giống nhau về trình tự axit amin của chúng).

Kháng thể kích thước đầy đủ tự nhiên được biểu thị bằng phân tử immunoglobulin có chứa bốn chuỗi polypeptit (hai chuỗi H nặng có khối lượng bằng khoảng 50-70 KDa đối với chiều dài đầy đủ, và hai chuỗi L nhẹ có khối lượng bằng khoảng 25 KDa đối với chiều dài đầy đủ) được liên kết thông qua liên kết disulfua. Phần đầu tận cùng amino của mỗi chuỗi chứa miền biến đổi có khoảng 100-110 hoặc nhiều hơn axit amin mà chịu trách nhiệm về việc liên kết kháng nguyên. Miền đầu tận cùng carboxyl của mỗi chuỗi xác định vùng không biến đổi mà chủ yếu chịu trách nhiệm về chức năng tác động. Chuỗi nhẹ được phân loại thành kappa và lambda và có các vùng không biến đổi đặc hiệu. Mỗi chuỗi nhẹ đặc trưng ở chỗ có chứa vùng biến đổi đầu tận cùng N chuỗi nhẹ (sau đây được gọi là VL hoặc VK) và vùng không biến đổi chuỗi nhẹ mà có chứa miền đơn lẻ (CL hoặc CK). Chuỗi nặng được phân loại thành γ , δ , α , μ và ϵ và xác định các lớp immunoglobulin: lần lượt là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE; một số có thể tiếp tục được chia thành các phân lớp (các isotyp) chẳng hạn như

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2. Mỗi loại chuỗi nặng đặc trưng ở vùng không biến đổi đặc hiệu Fc. Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi đầu tận cùng N (sau đây được gọi là VH) và vùng không biến đổi CH. Vùng không biến đổi chuỗi nặng có chứa ba miền (CH1, CH2 và CH3) ở IgG, IgD và IgA, và 4 miền (CH1, CH2, CH3 và CH4) ở IgM và IgE. VH, VHH và VL cũng có thể được chia thành các vùng được gọi là vùng siêu biến (vùng xác định bổ sung, CDR) đặt rải rác với nhiều vùng khung bảo toàn (FR). Mỗi miền biến đổi chứa ba CDR và FR nằm theo thứ tự sau đây từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4.

Trong bản mô tả sáng chế này, 3 chuỗi nặng CDR được gọi là "HCDR1, HCDR2 và HCDR3", trong khi đó 3 chuỗi nhẹ CDR được gọi là "LCDR1, LCDR2 và LCDR3". CDR chứa phần lớn là các gốc axit amin tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Các gốc CDR được đánh số và được xác định vị trí theo Hệ thống Đánh số Kabat.

Thuật ngữ “kháng nguyên” dùng để chỉ đích kháng nguyên mà kháng thể có thể phản ứng chống lại; nó được dùng trong bản mô tả này theo cùng cách như khi người có hiểu biết trung bình sử dụng nó trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, polypeptit, peptit, polysacarit, glycoprotein, polynucleotit (ví dụ, ADN), hoặc kháng nguyên hóa học, thụ thể hoặc interleukin. Interleukin có thể bao gồm interleukin thuộc nhiều nhóm khác nhau, chẳng hạn như interleukin 1 (alfa và beta), interleukin 2, interleukin 3, interleukin 4, interleukin 5, interleukin 6, interleukin 7, interleukin 8, interleukin 9, interleukin 10, interleukin 11, interleukin 17, interleukin 18 và interleukin 33.

Thuật ngữ “kháng nguyên” cũng có thể được dùng để mô tả nguyên liệu mà được dùng để gây miễn dịch động vật (ví dụ, lạc đà không bướu) nhằm mục đích sản xuất kháng thể theo sáng chế. Trong ngữ cảnh đó, “kháng nguyên” có thể có nghĩa rộng hơn và có thể bao hàm các dạng được tinh chế của kháng nguyên cũng như là các sản phẩm kháng nguyên không được tinh chế hoặc không được phân lập hoàn toàn, hoặc được tinh chế chẳng hạn như tế bào, dịch tan tế bào, hoặc dịch nổi bề mặt, phân đoạn tế

bào, ví dụ, màng tế bào v.v. có hapten bổ sung được kết hợp với chất mang protein. Kháng nguyên dùng để gây miễn dịch không cần phải có nghĩa là kháng nguyên giống về mặt cấu trúc với đích kháng nguyên mà, cuối cùng, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với. Thông thường, kháng nguyên dùng để gây miễn dịch là phiên bản giảm kích thước của đích kháng nguyên, ví dụ, mảnh có chứa epitop gây miễn dịch. Chi tiết hơn về kháng nguyên dùng để gây miễn dịch được mô tả trong tài liệu và có thể là quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể. Do đó, kháng thể IgG nguyên vẹn có hai vị trí liên kết. Ngoài trừ các kháng thể chức năng kép hoặc đặc hiệu kép, hai vị trí liên kết này là giống nhau. Theo đơn sáng chế này, “vùng liên kết kháng nguyên” hoặc “vị trí liên kết kháng nguyên”, hoặc “miền liên kết kháng nguyên”, được dùng thay thế lẫn nhau, như được dùng trong bản mô tả này, để chỉ vùng kháng thể có chứa các gốc axit amin tương tác với kháng nguyên và mang lại cho kháng thể tính đặc hiệu và ái lực đối với kháng nguyên. Mảnh kháng thể bao gồm các gốc axit amin khung cần để duy trì hình dạng thích hợp của các gốc liên kết kháng nguyên.

Tốt hơn là, CDR của vùng liên kết kháng nguyên VHH hoặc toàn bộ vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế hoàn toàn có nguồn gốc từ họ Camelidae hoặc về cơ bản có nguồn gốc Camelidae, và chứa các gốc axit amin cụ thể được thay đổi, ví dụ, được thế bằng các gốc axit amin khác nhau (ví dụ, tham chiếu đến Bảng 6) để cải thiện các tính chất cụ thể của kháng thể (ví dụ, K_D , k_{off} hoặc IC_{50}). Tốt hơn là, vùng khung kháng thể theo sáng chế có nguồn gốc từ Camelidae hoặc có nguồn gốc từ người hoặc về cơ bản có nguồn gốc từ người (có nguồn gốc từ người ít nhất là 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 hoặc 99%) và tuân theo phương pháp đánh số Kabat.

“Mảnh kháng thể” có thể được biểu thị bằng mảnh kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà có hoạt tính của kháng thể kích thích đầy đủ. Mảnh kháng thể có thể được biểu thị bằng $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab Fv và scFv.

"Interleukin 17", còn được gọi là "IL-17" hoặc "IL-17A", là glycoprotein homo-dimer 20-30 kD. Gen của IL-17 ở người mã hóa cho protein chứa 155 axit amin và có trình tự tín hiệu có 19 axit amin và mảnh trưởng thành có 136 axit amin. Trình tự axit amin của IL-17A ở người tương tự lần lượt là 80%, 63% và 58% với trình tự axit amin của thỏ, chuột nhắt và chuột. Trình tự axit amin của IL-17A ở người giống 97% với IL-17A của khỉ cynomolgus.

Thuật ngữ "kháng thể" khi được dùng liên quan đến kháng thể đơn dòng kháng IL-17 theo sáng chế (sau đây gọi là "kháng thể theo sáng chế"), như được dùng trong bản mô tả này, có nghĩa là kháng thể đơn dòng.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ức chế" hoặc "trung hòa" liên quan đến hoạt tính của kháng thể theo sáng chế dùng để chỉ khả năng để phong bế, ngăn ngừa, hạn chế, làm chậm, làm ngừng, làm giảm hoặc làm đảo ngược một cách đáng kể, ví dụ, sự phát triển hoặc độ nghiêm trọng của đối tượng ức chế, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở hoạt tính sinh học (chẳng hạn như hoạt tính của IL-17) hoặc thuộc tính, bệnh hoặc tình trạng bệnh. Liên kết của kháng thể theo sáng chế với IL-17 dẫn đến sự ức chế hoặc sự trung hòa của hoạt tính IL-17 tốt hơn là bằng ít nhất là 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% hoặc cao hơn.

Thuật ngữ "được tách" hoặc "được phân lập" đối với axit nucleic hoặc sản phẩm protein (chẳng hạn như kháng thể) dùng để chỉ phân tử axit nucleic hoặc phân tử protein mà được nhận dạng và được tách khỏi ít nhất là một trong số các chất tạp nhiễm mà nó thường được kết hợp với trong nguồn tự nhiên. Tốt hơn là, "kháng thể được phân lập" là kháng thể về cơ bản không chứa kháng thể khác mà có tính đặc hiệu kháng nguyên cụ thể (ví dụ, được phân lập theo sáng chế chứa kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu IL-17A và về cơ bản không chứa kháng thể mà liên kết đặc hiệu kháng nguyên không phải là IL-17A).

Thuật ngữ "hệ thống đánh số Kabat" hoặc "đánh số theo Kabat" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ hệ thống để đánh số các gốc axit amin có thể biến đổi

nhều hơn (tức là siêu biến) so với các gốc axit amin khác trong vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể (Kabat et al. Ann. NY Acad. Sci., 190:382-93 (1971); Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

Polynucleotit “được liên kết về mặt chức năng” nếu nó có liên kết chức năng với polynucleotit khác. Ví dụ, vùng khởi động hoặc vùng tăng cường được liên kết về mặt chức năng với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự. Polypeptit “được liên kết về mặt chức năng” với polypeptit khác nếu các polynucleotit mã hóa cho chúng được liên kết về mặt chức năng, tốt hơn là nếu chúng nằm trong cùng khung đọc mở.

Thuật ngữ “cấu trúc ADN”, như được dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ ADN hoặc mảnh của nó mã hóa cho kháng thể theo sáng chế. Nhìn chung, ADN hoặc mảnh của nó mà mã hóa cho kháng thể (ví dụ, kháng thể theo sáng chế) được liên kết về mặt chức năng (về mặt hoạt động), ở trong khung đọc mở, với ít nhất là một mảnh ADN khác mà mã hóa cho polypeptit khác (ví dụ, miền hoặc vùng của thụ thể đối với xytokin khác, chẳng hạn như thụ thể IL-2), và sau đó được cài xen vào vật truyền biểu hiện thích hợp. Thông thường, cấu trúc ADN được tạo thành theo cách mà một vài mảnh ADN mã hóa cho vị trí kháng thể nhất định được kết hợp về mặt chức năng ở trong khung đọc để thu được cấu trúc liên khối mà mã hóa cho kháng thể nguyên vẹn hoặc mảnh chức năng của nó. Ví dụ, cấu trúc ADN sẽ mã hóa cho kháng thể từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C. Kháng thể này có thể được biểu hiện, được phân lập và được đánh giá về hoạt tính của chúng.

Thuật ngữ “vật truyền” dùng để chỉ axit nucleic thu được bằng cách tổng hợp và thông qua công nghệ sinh học và chứa tập hợp các yếu tố chức năng trình tự nhất định và đã biết trong lĩnh vực này. Các vật truyền nhất định có thể tự sao chép ở tế bào chủ mà chúng được đưa vào, trong khi vật truyền khác có thể hợp nhất vào hệ gen tế bào chủ và sao chép cùng với hệ gen vật chủ. Ngoài ra, một số vật truyền có thể làm trung

gian cho sự biểu hiện của gen mà chúng được liên kết về mặt chức năng với. Trong đơn này, vật truyền được gọi là “vật truyền biểu hiện tái tổ hợp” (hoặc “vật truyền biểu hiện”); các vật truyền ví dụ đã được biết rõ trong tình trạng kỹ thuật.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào”, “tế bào chủ”, “dòng tế bào” và “môi trường nuôi cấy tế bào” được dùng thay thế lẫn nhau và dùng để chỉ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào cụ thể mà là thể nhận của polynucleotit được phân lập bất kỳ theo sáng chế hoặc vật truyền tái tổ hợp (các vật truyền tái tổ hợp) bất kỳ mà chứa trình tự của kháng thể theo sáng chế. Tế bào chủ bao gồm các thể hệ thu được từ tế bào chủ cụ thể; các thể hệ này có thể không cần phải giống hoàn toàn (về hình thái hoặc phần bổ sung ADN đầy đủ) với tế bào chủ gốc do đột biến và/hoặc biến đổi tự nhiên, ngẫu nhiên hoặc có chủ ý. Tế bào chủ bao gồm tế bào mà được biến nạp, được chuyển nạp hoặc được gây nhiễm bằng vật truyền tái tổ hợp, hoặc kháng thể đơn dòng mà biểu hiện polynucleotit theo sáng chế hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của nó. Tế bào chủ mà có chứa vật truyền tái tổ hợp theo sáng chế (được kết hợp vào nhiễm sắc thể vật chủ hoặc không) có thể còn được gọi là “tế bào chủ tái tổ hợp”. Tế bào chủ được ưu tiên dùng trong sáng chế là tế bào CHO (ví dụ, ATCC CRL-9096), tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào COS (ATCC, ví dụ, CRL-1650, CRL-1651) và tế bào HeLa (ATCC CCL-2). Tế bào chủ khác được dùng trong sáng chế bao gồm tế bào thực vật, tế bào nấm men, tế bào động vật có vú và tế bào sinh vật nhân sơ khác.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” giữa kháng thể và đích kháng nguyên (kháng nguyên) dùng để chỉ tính đặc hiệu miễn dịch. Kháng thể có thể liên kết đặc hiệu với đích kháng nguyên nếu nó liên kết với epitop kháng nguyên này mạnh hơn so với epitop kháng nguyên khác. Liên kết đặc hiệu không loại trừ khả năng phản ứng chéo với kháng nguyên khác mang epitop kháng nguyên tương tự.

Miền VL trong kháng thể theo sáng chế có thể là loại VL lambda hoặc loại VL kappa. Thuật ngữ “miền VL” bao hàm cả isotyp VL lambda và isotyp VL kappa mà chứa một hoặc nhiều sự thế, sự cài xen hoặc sự làm khuyết axit amin.

Thuật ngữ “dược phẩm” bao hàm chế phẩm và/hoặc hợp phần chứa lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể theo sáng chế cùng với tá dược (chẳng hạn như chất mang, chất pha loãng, tá dược lỏng, dung môi và tá dược khác).

Thuật ngữ “sử dụng” hoặc “điều trị” dùng để chỉ khả năng sử dụng kháng thể theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa chúng để điều trị, làm giảm nhẹ tiến trình của bệnh, thúc đẩy sự thuyên giảm hoặc làm giảm tốc độ tái phát của bệnh hoặc rối loạn qua trung gian thụ thể mà kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được làm cho giống người, tốt hơn là typ IgG, mà có ái lực tăng và độ ổn định kết tập được cải thiện, trong đó miền biến đổi được biểu thị bằng sự kết hợp của dẫn xuất VHH với miền biến đổi của chuỗi nhẹ V_L .

Theo một phương án, dẫn xuất VHH của kháng thể theo sáng chế có thể chứa sự thể axit amin ở các vị trí $44X_245X_3$, trong đó $X_2 = G, A, V, S, T$; $X_3 = A, V, T, H$; hoặc dạng kết hợp của chúng (44 và 45 biểu thị các vị trí cho sự thể axit amin). Sau đây vị trí của sự thể axit amin được chỉ ra bằng cách sử dụng hệ thống đánh số Kabat (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Phương án khác bao gồm kháng thể theo sáng chế mà có độ ổn định kết tập được cải thiện của dẫn xuất VHH so với kháng thể IgG ban đầu có chứa VHH được phân lập từ con vật được gây miễn dịch, trong đó con vật được gây miễn dịch có thể là từ Camelidae.

Phương án khác của sáng chế bao gồm kháng thể mà chứa dẫn xuất VHH that là miền biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể được phân lập từ con vật được gây miễn dịch thuộc họ Camelidae. Trong bản mô tả này dẫn xuất VHH có thể có sự thể axit amin bổ sung thường là đối với người ở vị trí bất kỳ, ngoại trừ các lần thể sau đây ở các vị trí 44 và 45:

- a) $44X_2$, trong đó $X_2 = G, A, V, S, T$;

b) $45X_3$, trong đó $X_3 = A, V, T, H$;

hoặc dạng kết hợp của chúng.

Phương án khác bao gồm kháng thể theo sáng chế mà chứa dẫn xuất VHH mà có thể được thể hiện bằng miền biến đổi chuỗi nặng được phân lập từ con vật không được gây miễn dịch thuộc họ Camelidae. Trong bản mô tả này dẫn xuất VHH có thể có sự thể axit amin bổ sung thường là đối với người ở vị trí bất kỳ, ngoại trừ các lần thể sau đây ở các vị trí 44 và 45:

a) $44X_2$, trong đó $X_2 = G, A, V, S, T$;

b) $45X_3$, trong đó $X_3 = A, V, T, H$;

hoặc dạng kết hợp của chúng.

Phương án khác bao gồm kháng thể theo sáng chế mà chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ V_L mà là dẫn xuất của kháng thể người. Theo phương án khác của sáng chế, miền biến đổi chuỗi nhẹ V_L là mảnh được làm cho giống người của kháng thể động vật.

Phương án khác bao gồm kháng thể theo sáng chế mà chứa dẫn xuất V_{HH} mà có chứa xystein-44 (hệ thống đánh số Kabat), và miền biến đổi chuỗi nhẹ V_L mà có chứa xystein-100 (hệ thống đánh số Kabat).

Phương án khác của sáng chế bao gồm kháng thể thuộc isotyp bất kỳ trong các isotyp sau đây: IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

Phương án khác bao gồm kháng thể theo sáng chế mà chứa Fc được cải biến không tự nhiên làm một phần của IgG.

Phương án khác bao gồm kháng thể theo sáng chế mà có độ ổn định kết tập mà khi được dùng ở nồng độ trên 10 mg/ml và lưu trữ trong thời gian >6 tháng ở nhiệt độ 4°C hàm lượng của khối kết tụ tăng không lớn hơn 5% của hàm lượng ban đầu của chúng trong dung dịch. Theo phương án khác của sáng chế, kháng thể có độ ổn định kết tập mà khi được dùng ở nồng độ trên 10 mg/ml và lưu trữ trong thời gian >2 tuần ở nhiệt độ 37°C hàm lượng của khối kết tụ tăng không lớn hơn 5% của hàm lượng ban

đầu của chúng trong dung dịch. Phương án khác nữa của sáng chế bao gồm kháng thể mà có độ ổn định kết tập mà khi được dùng ở nồng độ trên 10 mg/ml và lưu trữ trong thời gian >48 giờ ở nhiệt độ 42°C hàm lượng của khối kết tụ tăng không lớn hơn 5% của hàm lượng ban đầu của chúng trong dung dịch. Một phương án khác nữa của sáng chế bao gồm kháng thể mà có độ ổn định kết tập mà khi được dùng ở nồng độ trên 10 mg/ml và lưu trữ trong thời gian > 6 giờ ở nhiệt độ 50°C hàm lượng của khối kết tụ tăng không lớn hơn 5% của hàm lượng ban đầu của chúng trong dung dịch.

Một phương án bao gồm kháng thể có hằng số phân ly $K_D \leq 10^{-9}$ M. Phương án khác bao gồm kháng thể theo sáng chế mà có hằng số kết hợp tương tác kháng thể-kháng nguyên $kon(1/mili\ gi\ddot{a}y) \geq 10^5$ 1/mili giây. Một phương án khác của sáng chế bao gồm kháng thể mà có hằng số phân ly kháng nguyên-kháng thể $dis(1/gi\ddot{a}y) \leq 10^{-4}$ 1/giây.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất mảnh kháng thể. Mảnh kháng thể này có thể được thể hiện bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng mà là một phần của kháng thể trình tự, mà bao gồm biến thể kháng thể đặc hiệu sinh học. Phương án khác của sáng chế bao gồm mảnh kháng thể that được biểu thị bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng mà là một phần của Fab. Mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được biểu thị bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng mà là một phần của scFv.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế. Phương pháp sản xuất kháng thể này có thể bao gồm các pha được chọn từ các pha sau đây: gây đột biến định hướng, phương pháp hiển thị, thiết kế di truyền, phương pháp hóa sinh và công nghệ sinh học hiệu suất cao đã biết rõ trong lĩnh vực, mà có thể bao gồm phương pháp gây đột biến định hướng ở các vị trí khác nhau của miền VHH của kháng thể Camelidae.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất cấu trúc ADN mã hóa cho kháng thể được yêu cầu bảo hộ hoặc mảnh của chúng, và vật truyền biểu hiện có chứa một hoặc một vài cấu trúc ADN theo sáng chế.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất dòng tế bào có chứa vật truyền biểu hiện hoặc cấu trúc ADN này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng được làm cho giống người hoặc mảnh của chúng, mà bao gồm dòng tế bào nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện đủ để thu được kháng thể này hoặc mảnh của chúng, sau đó là phân lập và tinh chế kháng thể thu được hoặc mảnh hoạt tính của nó.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất được phẩm mà có chứa kháng thể hoặc mảnh của chúng kết hợp với một hoặc một vài tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng. Chi tiết về các kỹ thuật để thu được được phẩm được mô tả trong tài liệu hướng dẫn công nghệ sinh học chuyên ngành, ví dụ trong tài liệu [25].

Phương án khác của sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh của chúng ở trong phân tử hoạt tính mà liên kết đặc hiệu với IL-17A ở người, trong đó kháng thể này hoặc mảnh của chúng chứa dẫn xuất của miền biến đổi chuỗi nặng (V_{HH}) Camelidae mà chứa 3 vùng siêu biến HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó:

HCDR1 có chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1:

G-T-F-A-T-X32-X33-X34 - X35 (đánh số theo chỉ số Kabat), trong đó

X32 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có S, N, K, R, E, W, Q, D, A, V và F;

X33 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có P và S;

X34 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có M và I;

X35 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có G, N, S, A, L, I, R, V và Q;

HCDR2 có chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 2:

X50-I-X52-X52a-S-G-X55-D-R-I-Y-A-D-S-V-K-G, trong đó

X50 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có A, G và L;

X52 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có S, D và E;

X52a là axit amin được chọn từ nhóm gồm có P và A;

X55 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có G, S, T, L, R, D, E, K, A và W;

HCDR3 có chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 3:

C-A- X94-X95- X96- X97-F-X99-X100-X100a- X100b - X100c - X100d -
X100e - X100f – D- Y – D-S, trong đó

X94 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có K, S, T, V, D và G;

X95 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có R và K;

X96 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có G, R, Y, H, D, W và K;

X97 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có R, A, V, S, L và H;

X99 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có D, E, G, A, R, V, K và Q;

X100 là axit amin được chọn từ nhóm gồm có G, S và N;

X100a là axit amin được chọn từ nhóm gồm có là axit amin được chọn từ nhóm
gồm có G, T, P, V, R, N và K;

X100b là axit amin được chọn từ nhóm gồm có V, S, T, L, Y, A, H, G và I;

X100c là axit amin được chọn từ nhóm gồm có Y, W và S;

X100d là axit amin được chọn từ nhóm gồm có R, V, L, Y, A, W, K, G, Q và I;

X100e là axit amin được chọn từ nhóm gồm có T, L, A và S;

X100f là axit amin được chọn từ nhóm gồm có T, L, G, P, N, A, Q, F, I và D;

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể người hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm cho giống người.

Phương án khác bao gồm kháng thể hoặc mảnh của chúng mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và chứa dẫn xuất của miền biến đổi chuỗi nặng (V_{HH}) có chứa 3 vùng siêu biến, trong đó:

HCDR1 có chứa trình tự axit amin là G-T-F-A-T-S-P-M-G (SEQIDNO: 4);

HCDR2, có chứa trình tự axit amin là A-I-S-P-S-G-G- D-R-I-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID NO: 5);

HCDR3 có chứa trình tự axit amin là C-A-V-R-R-R-F-D-G-T-S-Y-Y-T-G-D-Y-D-S (SEQIDNO: 6);

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể người hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm cho giống người.

Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và chứa dẫn xuất của miền biến đổi chuỗi nặng (V_{HH}) có chứa trình tự axit amin là SEQIDNO: 7 và

Miền biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể người hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm cho giống người.

Phương án khác bao gồm kháng thể hoặc mảnh của chúng mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và chứa dẫn xuất VHH, trong đó miền biến đổi này chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% so với SEQ ID NO: 7.

Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và có chứa dẫn xuất VHH có chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; và miền biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể người có chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8.

Phương án khác bao gồm kháng thể hoặc mảnh của chúng mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và chứa dẫn xuất VHH và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể người trong đó miền biến đổi này chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% so với SEQ ID NO: 8.

Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và có chứa chuỗi nặng có chứa SEQ ID NO: 9 trình tự axit amin, và miền biến đổi của kháng thể người chuỗi nhẹ (V_L) có chứa trình tự SEQ ID NO: 10. Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và có chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó các chuỗi này chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% so với SEQ ID NO: 9 và/hoặc SEQ ID NO:10.

Phương án khác bao gồm kháng thể theo sáng chế mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người, trong đó kháng thể này có ái lực liên kết với IL-17A ở người đặc trưng bởi $K_D \leq 10^{-10}$ M. Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người, trong đó hằng số kết hợp động học k_{on} (1/mili giây) đối với IL-17A ở người ít nhất là 10^5 1/mili giây. Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người, trong đó hằng số phân ly động học k_{dis} (1/c) đối với IL-17A ở người không lớn hơn 10^{-5} 1/giây. Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và ức chế hoạt tính của IL-17A ở người không nhỏ hơn 50% đối với tham số bất kỳ được đánh giá bằng thử nghiệm hoạt tính cụ thể bất kỳ.

Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người, trong đó kháng thể này được sản xuất bởi tế bào động vật có vú, tế bào nấm men hoặc tế bào vi khuẩn.

Phương án khác bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người và có chứa một hoặc nhiều sự thể axit amin bổ sung trong vùng Fc so với Fc tự nhiên, trong đó sự thể này cải thiện lý-hóa và dược động học các tính chất của kháng thể, khi so với kháng thể có Fc tự nhiên, và không dẫn đến sự mất khả năng liên kết IL-17A của kháng thể.

Phương án khác đề xuất cấu trúc ADN mã hóa cho kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người. Hơn nữa, sáng chế đề xuất vật truyền biểu hiện có chứa một hoặc nhiều cấu trúc ADN mã hóa cho kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người. Ngoài

ra, tế bào chủ được đề xuất có chứa vật truyền để thu được kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người, khác biệt ở chỗ nuôi cấy tế bào chủ có chứa cấu trúc ADN trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện thích hợp để thu được kháng thể này hoặc mảnh của chúng, và sau đó phân lập và tinh chế kháng thể này hoặc mảnh hoạt tính của chúng.

Hơn nữa, dược phẩm được đề xuất có chứa kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người, và một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Dược phẩm này có thể còn chứa các thành phần có hoạt tính dược được chọn từ các chất ức chế TNF- α . Dược phẩm này có thể được sử dụng trong điều trị bệnh hoặc rối loạn qua trung gian IL-17A. Bệnh hoặc rối loạn qua trung gian IL-17A được chọn từ: viêm đa khớp dạng thấp, viêm xương-khớp, viêm khớp mạn thiếu niên, viêm khớp nhiễm khuẩn, viêm khớp Lyme, viêm khớp vảy nến, viêm khớp phản ứng, viêm đốt sống, luput ban đỏ hệ thống, bệnh Crohn, viêm ruột kết mạn loét, bệnh viêm ruột, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin, viêm tuyến giáp, hen, rối loạn dị ứng, bệnh vảy nến, viêm da, xơ cứng toàn thân, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, sự từ chối mảnh ghép, bệnh miễn dịch cấp hoặc mãn tính kết hợp với sự ghép cơ quan, bệnh saccoit, bệnh saccoit, đông máu nội mạch rải rác, bệnh Kawasaki, bệnh Graves, hội chứng thận hư, hội chứng mệt mỏi mãn tính, bệnh Wegener, ban xuất huyết Henoch-Schonlein, viêm đa vi mạch có sự tham gia của thận, viêm gan mãn tính hoạt động, viêm màng mạch nhỏ, sốc nhiễm trùng huyết, hội chứng sốc nhiễm độc, hội chứng nhiễm khuẩn, chứng suy mòn, sự nhiễm khuẩn, sự xâm lấn, hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải, viêm tủy ngang cấp tính, chứng múa giật Huntington, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, đột quỵ, xơ gan mật nguyên phát, thiếu máu huyết tán, khối u ác tính, chứng suy tim, chứng nhồi máu cơ tim, bệnh Addison, hội chứng tự miễn đa tuyến typ I và typ II, hội chứng Schmidt, hội chứng suy hô hấp cấp tính, chứng rụng tóc, chứng rụng tóc từng vùng, bệnh khớp

huyết thanh âm tính, bệnh khớp, hội chứng Reiter, bệnh khớp vảy nến, bệnh khớp kết hợp với viêm ruột kết mạn loét, viêm màng hoạt dịch đường ruột, bệnh khớp kết hợp với Chlamydia, Yersinia và Salmonella, viêm đốt sống, bệnh vữa động mạch/xơ vữa động mạch vành, dị ứng cơ địa, bệnh mụn rộp tự miễn, bệnh pemphigut, bệnh pemphigut tróc, dạng pemphigut, bệnh IgA dải, thiếu máu huyết tán tự miễn, thiếu máu huyết tán Coombs dương tính, thiếu máu ác tính mắc phải, thiếu máu ác tính thiếu niên, viêm não tủy Myalgic/hội chứng mệt mỏi mãn tính, viêm gan mạn hoạt động, viêm động mạch tế bào khổng lồ sọ, viêm gan hóa xơ nguyên phát, viêm gan tự miễn không rõ nguyên nhân, hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS), các bệnh kết hợp với AIDS, viêm gan B, viêm gan C, thiếu hụt miễn dịch biến đổi thường gặp (giảm gamma globulin-huyết biến đổi thường gặp), bệnh cơ tim giãn, vô sinh ở nữ giới, thiếu năng buồng trứng, suy buồng trứng sớm, xơ hóa phổi, viêm phế nang xơ hóa không rõ nguyên nhân, bệnh lý phổi mô kẽ sau viêm, viêm thành phế nang mô kẽ, bệnh mô liên kết kết hợp với bệnh phổi mô kẽ, bệnh mô liên kết hỗn hợp kết hợp với bệnh phổi mô kẽ, bệnh xơ cứng toàn thân kết hợp với bệnh phổi mô kẽ, viêm khớp dạng thấp kết hợp với bệnh phổi mô kẽ, luput ban đỏ hệ thống kết hợp với bệnh phổi, viêm da cơ/viêm đa cơ kết hợp với bệnh phổi, bệnh Sjogren kết hợp với bệnh phổi, viêm cứng khớp đốt sống kết hợp với bệnh phổi, viêm mạch phổi lan tỏa, chứng nhiễm hemosiderin kết hợp với bệnh phổi, bệnh phổi mô kẽ do thuốc gây ra, chứng xơ hóa, chứng xơ hóa do bức xạ gây ra, viêm tiểu phế quản tắc nghẽn, viêm phổi tăng eosin mạn tính, bệnh phổi có sự thâm nhập của tế bào lympho, bệnh lý phổi mô kẽ sau nhiễm khuẩn, viêm khớp thống phong, viêm gan tự miễn, viêm gan tự miễn typ I (tự miễn cổ điển hoặc viêm gan dạng luput), viêm gan tự miễn typ II (kết hợp với kháng thể kháng LKM), chứng giảm glucoza huyết tự miễn, chứng kháng insulin typ B với chứng tăng sừng, sự giảm năng tuyến cận giáp, bệnh miễn dịch kết hợp mảnh ghép cấp tính, bệnh miễn dịch kết hợp mảnh ghép mãn tính, bệnh thoái hóa xương khớp, viêm xơ chai đường mật nguyên phát, bệnh vảy nến typ I, bệnh vảy nến typ II, sự giảm bạch cầu tự phát, sự giảm bạch cầu trung tính tự miễn, bệnh thận NOS, viêm thận tiểu cầu, viêm đa mạch thận vi thể,

bệnh Lyme, luput ban đỏ hình đĩa, vô sinh ở nam giới NOS tự phát, miễn dịch kháng tinh dịch, bệnh xơ cứng rải rác (tất cả các loại), viêm mắt đồng cảm, tăng huyết áp phổi thứ phát đối với bệnh mô liên kết, hội chứng Goodpasture, sự biểu hiện ở phổi của viêm đa động mạch kết nôt, sốt thấp khớp cấp tính, viêm đốt sống dạng thấp, bệnh Still, bệnh xơ cứng toàn thân, hội chứng Sjogren, bệnh/viêm khớp Takayasu, sự giảm lượng tiểu cầu tự miễn, sự giảm lượng tiểu cầu tự phát, rối loạn tuyến giáp tự miễn, tình trạng cường giáp, chứng cường tuyến giáp tự miễn (bệnh Hashimoto), chứng cường tuyến giáp tự miễn teo, chứng phù niêm nguyên phát, viêm màng mạch nho phát sinh từ thủy tinh thể, viêm mạch nguyên phát, bệnh bạch biến, bệnh gan cấp tính, bệnh gan mãn tính, xơ gan nghiện rượu, hư hỏng gan do rượu, ứ mật, bệnh gan đặc ứng, viêm gan do thuốc gây ra, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, dị ứng và hen, sự nhiễm liên cầu khuẩn nhóm B (GBS), rối loạn tâm thần (bao gồm trầm cảm và bệnh tâm thần phân liệt), bệnh qua trung gian Th1 và Th2, chứng đau cấp và mãn tính (các dạng khác nhau), khối u ác tính chẳng hạn như bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và khối u ác tính tạo máu (bệnh bạch cầu và u lympho), chứng thiếu beta-lipoprotein-huyết, chứng xanh tím đầu chi, sự nhiễm khuẩn và sự nhiễm ký sinh cấp và mãn tính, bệnh bạch cầu cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính, sự nhiễm khuẩn cấp hoặc mãn tính, viêm tụy cấp, suy thận cấp, ung thư tuyến, lệch tâm nhĩ, phức hệ sa sút trí tuệ AIDS, viêm gan do rượu, viêm màng kết dị ứng, viêm da tiếp xúc dị ứng, viêm mũi dị ứng, sự từ chối mảnh ghép cùng loại, sự thiếu hụt kháng trypsin alpha-I, xơ cứng teo cơ một bên, chứng thiếu máu, bệnh viêm họng, thoái hóa tế bào sừng phía trước, liệu pháp kháng CD3, hội chứng kháng phospholipit, phản ứng quá mẫn chống lại thụ thể, phình động mạch chủ và mạch ngoại biên, giải phẫu động mạch chủ, tăng huyết áp động mạch, xơ vữa động mạch vành, rò động-tĩnh mạch, mất điều hòa, rung tâm nhĩ (liên miên hoặc bộc phát), cuồng động tâm nhĩ, block nhĩ thất, u lympho tế bào B, sự từ chối mảnh ghép xương, sự từ chối mảnh ghép tủy xương (BMT), phong bế bó nhánh, u

lympho Burkitt, bông, chứng loạn nhịp tim, hội chứng choáng cơ tim, khối u tim, bệnh cơ tim, đáp ứng viêm đối với đường tắt, sự từ chối mảnh ghép sụn, thoái hóa vỏ não, rối loạn tiểu não, nhịp tim nhanh nhĩ hỗn loạn hoặc nhiều ổ, rối loạn do hóa trị liệu, bệnh bạch cầu tủy bào mãn tính (CML), chứng nghiện rượu mãn tính, bệnh lý viêm mãn tính, bệnh bạch cầu lympho mãn tính (CLL), bệnh truyền tắc phổi mạn tính, nhiễm độc salixylat mãn tính, caxinom đại-trực tràng, suy tim xung huyết, viêm màng kết, viêm da tiếp xúc, bệnh tim phổi, bệnh động mạch vành, bệnh Creutzfeldt-Jakob, nhiễm khuẩn huyết nuôi cấy âm tính, chứng xơ hóa nang, rối loạn do liệu pháp xytokin gây ra, bệnh não của võ sĩ quyền anh, bệnh hủy myelin, sốt xuất huyết dengue, viêm da, tình trạng bệnh ngoài da, bệnh tiểu đường, bệnh đái tháo đường, bệnh xơ vữa động mạch liên quan đến bệnh tiểu đường, bệnh thể Lewy lan tỏa, bệnh cơ tim giãn xung huyết, basal ganglia bệnh, hội chứng Down ở tuổi trung niên, rối loạn vận động do chất phong bế dopamin CNS gây ra, chứng nhạy cảm thuốc, eczema, viêm não tủy, viêm màng trong tim, bệnh nội tiết, viêm nắp thanh quản, sự nhiễm virus Epstein-Barr, chứng đau đỏ da, hội chứng ngoài bó tháp và tiểu não, hội chứng thực bào máu thể gia đình, sự từ chối mảnh ghép tuyến ức thai, mất điều hòa Friedreich, bệnh động mạch ngoại biên, sự nhiễm nấm, viêm tấy sinh hơi, loét dạ dày, viêm thận tiểu cầu, sự từ chối mảnh ghép cơ quan hoặc mô bất kỳ, nhiễm khuẩn gram âm, nhiễm khuẩn gram dương, u hạt do sinh vật nội bào, bệnh bạch cầu tế bào lông, bệnh Hallervorden-Spatz, viêm tuyến giáp Hashimoto, bệnh sốt mùa cỏ khô, sự từ chối mảnh ghép tim, bệnh nhiễm sắc tố sắt mô, sự thâm tách máu, hội chứng tan máu-tăng urê máu / ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, sự chảy máu, viêm gan (A), chứng loạn nhịp tim nhánh bó, sự nhiễm HIV/bệnh thần kinh HIV, bệnh Hodgkin, rối loạn vận động tăng động, phản ứng quá mẫn, viêm thành phế nang kết hợp với quá mẫn, chứng tăng huyết áp, rối loạn vận động giảm vận động, khảo sát trực dưới đồi-tuyến yên-thượng thận, bệnh Addison tự phát, xơ hóa phổi tự phát, sự gây độc tế bào qua trung gian kháng thể, chứng suy nhược, bệnh teo cơ trẻ em, viêm động mạch chủ, virus cúm A, phơi nhiễm với bức xạ ion hóa, viêm móng mắt-thể mi /viêm màng mạch nho/viêm thần kinh thị giác, rối loạn do thiếu máu

cục bộ/tái tưới máu gây ra, đột quỵ do thiếu máu cục bộ, viêm đa khớp dạng thấp thiếu niên, teo cơ tủy thiếu niên, xacôm Kaposi, sự từ chối mảnh ghép thận, bệnh nhiễm khuẩn legionella, bệnh leishmania, bệnh phong, tổn hại vỏ não-tủy sống, hội chứng phù mỡ, sự từ chối mảnh ghép gan, chứng phù nề bạch huyết, bệnh sốt rét, u lympho ác tính, chứng mô bào huyết ác tính, u melanin ác tính, viêm màng não, màng não cầu-huyết, bệnh chuyển hóa/tự phát, chứng đau nửa đầu, rối loạn ty thể đa hệ thống, bệnh mô liên kết hỗn hợp, bệnh lý gamma đơn dòng, đa u tủy, thoái hóa đa hệ thống (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager và Machado-Joseph), chứng nhược cơ năng, Mycobacterium avium nội bào, Mycobacterium tuberculosis, hội chứng loạn sản tủy, chứng nhồi máu cơ tim, bệnh thiếu máu cục bộ cơ tim, bệnh ung thư mũi-họng, bệnh phổi mãn tính sơ sinh, viêm thận, thận hư, rối loạn thoái hóa thần kinh, teo cơ do nguyên nhân thần kinh I, sốt giảm bạch cầu trung tính, u lympho không Hodgkin, tắc nghẽn nhánh động mạch chủ bụng, bệnh tắc nghẽn động mạch, điều trị OKT3®, viêm tinh hoàn/viêm mào tinh hoàn, viêm tinh hoàn/phẫu thuật nối lại ống dẫn tinh, chứng to cơ quan, chứng loãng xương, sự từ chối mảnh ghép tuyến tụy, caxinom tuyến tụy, bệnh cận ung thư /chứng tăng canxi huyết liên quan đến khối u, sự từ chối mảnh ghép tuyến cận giáp, bệnh viêm khung xương chậu, viêm mũi quanh năm, bệnh màng ngoài tim, bệnh vữa xơ động mạch (atherlosclerotic) ngoại biên, bệnh mạch ngoại biên, chứng viêm màng bụng, thiếu máu ác tính, viêm phổi Pneumocystis carinii, hội chứng POEMS (bệnh đa dây thần kinh, chứng to cơ quan, bệnh nội tiết, rối loạn tăng sinh tương bào đơn dòng và sự thay đổi da), hội chứng sau ngập máu, hội chứng cột bơm áp, hội chứng sau nhồi máu sau thủ thuật mở tim, tiền sản giật, bệnh bại liệt trên nhân tiến triển, tăng huyết áp phổi nguyên phát, xạ trị, hiện tượng và bệnh Raynaud, bệnh Raynoud, bệnh Refsum, chứng tim đập nhanh QRS hẹp đều, chứng tăng huyết áp mạch thận, tổn thương tái tưới máu, bệnh cơ tim hạn chế, xacôm, bệnh cứng bì bệnh, chứng múa giật tuổi già, sa sút trí tuệ với thể Lewy, viêm khớp huyết thanh âm tính, sốc, bệnh tế bào hình liềm, sự từ chối mảnh ghép cùng loại da, sự thay đổi da, sự từ chối mảnh ghép ruột non, khối u rắn, chứng loạn nhịp tim cụ thể, mất điều hòa tủy sống, thoái hóa

đây sống tiểu não, viêm cơ do liên cầu khuẩn, hư hỏng cấu trúc tiểu não, viêm não xơ hóa bán cấp tiến triển, ngất, bệnh giang mai tim mạch, phản vệ toàn thân, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân hỗn hợp, viêm đa khớp dạng thấp thiếu niên khởi phát toàn thân, tế bào T hoặc FAB ALL, chứng giãn mao mạch, viêm mạch huyết khối, sự giảm lượng tiểu cầu, độc tính, ghép, chấn thương/sự chảy máu, phản ứng quá mẫn typ III, phản ứng quá mẫn typ IV, bệnh viêm họng không ổn định, urê huyết, nhiễm trùng tiết niệu, chứng mày đay, bệnh van tim, căng giãn tĩnh mạch, viêm mạch, bệnh tĩnh mạch, huyết khối tĩnh mạch, fibrin hóa tâm thất, sự nhiễm virus và nấm, viêm não do virus / viêm màng não vô khuẩn, hội chứng thực bào tế bào máu sống, hội chứng Wernicke-Korsakoff, bệnh Wilson, sự từ chối mảnh ghép khác loại đối với cơ quan hoặc mô bất kỳ, hội chứng động mạch vành cấp tính, viêm nhiều dây thần kinh tự phát cấp tính, bệnh thần kinh-rễ hủy myelin viêm cấp tính, chứng thiếu máu cục bộ cấp tính, bệnh Stills khởi phát ở tuổi trưởng thành, chứng rụng tóc từng vùng, phản vệ, hội chứng kháng thể kháng phospholipid, chứng thiếu máu không tái tạo, xơ vữa động mạch vành, eczema lạc chỗ dị ứng, viêm da lạc chỗ dị ứng, viêm da tự miễn, rối loạn tự miễn kết hợp với sự nhiễm liên cầu khuẩn, bệnh ruột tự miễn, sự giảm thính lực tự miễn, hội chứng tăng sinh lympho tự miễn (ALPS), viêm cơ tim tự miễn, suy buồng trứng sớm tự miễn, bệnh viêm mí mắt, chứng giãn phế quản, dạng pemphigut bong, bệnh tim mạch, hội chứng kháng phospholipid dạng ức chế, bệnh Celiac, thoái hóa cột sống cổ, chứng thiếu máu cục bộ mãn tính, dạng pemphigut có sẹo, hội chứng lâm sàng cô lập (cis) có nguy cơ về bệnh xơ cứng rải rác, viêm màng kết, rối loạn tâm thần khởi phát ở tuổi trẻ em, bệnh thuyên tắc phổi mạn tính (COPD), viêm túi lệ, viêm da cơ, bệnh màng lưới do đái tháo đường, bệnh đái tháo đường, thoát vị đĩa đệm, sa đĩa liên sống, thiếu máu tan máu miễn dịch do thuốc gây ra, viêm màng trong tim, lạc nội mạc tử cung, viêm nội nhãn, viêm thượng củng mạc, hồng ban đa dạng, hồng ban đa dạng nặng, dạng pemphigut thai nghén, hội chứng Guillain-Barre (GBS), bệnh sốt mùa cỏ khô, hội chứng Hughes, bệnh Parkinson tự phát, viêm phổi mô kẽ tự phát, dị ứng qua trung gian IgE, thiếu máu huyết tán tự miễn, viêm cơ thể vùi, bệnh viêm mắt lây nhiễm, viêm bệnh

hủy myelin, bệnh viêm tim, bệnh viêm thận, xơ hóa phổi tự phát/ viêm phổi mô kẽ thông thường, viêm móng mắt, viêm giác mạc, viêm giác kết mạc khô, bệnh Kussmaul hoặc bệnh Kussmaul-Meier, chứng tê liệt Landry, chứng mô bào huyết tế bào Langerhans, da lẫn mỡ, thoái hóa điểm vàng, viêm đa vi mạch, bệnh Bechterew, bệnh neuron vận động, dạng pemphigut niêm mạc, suy đa cơ quan, chứng nhược cơ năng, hội chứng loạn sản dây sống, viêm cơ tim, rối loạn rãnh thần kinh, bệnh thần kinh, viêm gan không A, không B, viêm thần kinh thị giác, tiêu cốt, bệnh ung thư buồng trứng, viêm ít khớp JIA, bệnh tắc nghẽn động mạch ngoại biên, bệnh mạch ngoại biên, bệnh động mạch ngoại biên (PAD), viêm tĩnh mạch, viêm đa động mạch kết nốt, viêm đa sụn, đau cơ dạng thấp, chứng bạc tóc, viêm khớp tự phát thiếu niên thể viêm đa khớp, thiếu hụt đa tuyến nội tiết, viêm đa cơ, đau cơ dạng thấp (PMR), hội chứng sau bơm, hội chứng Parkinson nguyên phát, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và trực tràng và khối u ác tính tạo máu (bệnh bạch cầu và u lympho), viêm tuyến tiền liệt, hội chứng bất sản hồng cầu đơn thuần, thiếu năng tuyến thượng thận nguyên phát, viêm tủy thị thần kinh tái phát, tái phát hẹp van tim, bệnh thấp tim, SAPHO (viêm màng hoạt dịch, mụn trứng cá, bệnh mụn mủ, chứng tăng sinh xương và viêm xương), bệnh cứng bì, chứng thoái hóa dạng tinh bột thứ phát, sốc phổi, viêm màng cứng, đau thần kinh hông, suy tuyến thượng thận thứ phát, bệnh mô liên kết kết hợp silicon, bệnh Sneddon-Wilkinson, viêm cứng khớp đốt sống, hội chứng Stevens-Johnson, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân, viêm động mạch sọ, viêm mũi Toxoplasma, hoại tử thượng bì nhiễm độc, viêm tủy ngang, TRAPS (hội chứng sốt theo chu kỳ có liên quan đến thụ thể yếu tố hoại tử khối u), phản ứng dị ứng typ I, bệnh tiểu đường typ II, chứng mày đay, viêm phổi mô kẽ thông thường, viêm mạch, viêm màng kết mùa xuân, viêm màng lưới virus, hội chứng Vogt-Koyanagi-Harada (hội chứng VKH), thoái hóa điểm vàng ướt, quá trình lành vết thương, và bệnh khớp liên quan đến Yersinia hoặc Salmonella.

Dược phẩm có chứa kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người có thể được dùng ở lượng hữu hiệu để điều trị để điều trị bệnh hoặc rối loạn qua trung gian IL-17A.

Sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh hoặc rối loạn qua trung gian IL-17A bằng cách sử dụng kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-17A ở người. Phương pháp điều trị có thể còn bao gồm việc dùng chất ức chế TNF- α .

Thực chất, các ví dụ khác nhằm để chứng minh sáng chế, chứ không nhằm làm giới hạn sáng chế ở các ví dụ này.

Phần mô tả của đơn này bao gồm viện dẫn đến tất cả các nguồn thông tin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Biểu đồ tiến trình để thu được kháng thể dựa trên VHH

Fig.1 thể hiện biểu đồ tiến trình để thu được và tối ưu hóa kháng thể dựa trên VHH.

Ví dụ 2: Sản xuất kháng nguyên và kháng thể tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú dạng huyền phù

Kháng thể và kháng nguyên được tạo ra trong dòng tế bào đã được thiết lập thu được từ tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO-K1) theo quy trình đã được công bố [26; 27]. Sử dụng các tế bào chủ yếu biểu hiện gen của protein EBNA1 (kháng nguyên nhân virus Epstein-Barr 1). Tiến hành nuôi cấy huyền phù trong bình thót cổ trên máy lắc quỹ đạo bằng cách sử dụng môi trường không huyết thanh của hãng Life Technologies Corporation và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để biểu hiện tạm thời, các tế bào ở nồng độ 2×10^6 /ml được chuyển nạp bằng polyetylenimin thẳng (PEI MAX, Polysciences). Tỷ lệ ADN/PEI là 1:3-1:10. Trong 5-7 ngày sau khi chuyển nạp, ly tâm môi trường nuôi cấy tế bào ở 2000g trong thời gian 20 phút và lọc qua bộ lọc 0,22 μ m. Phân lập protein đích từ dịch lỏng nuôi cấy bằng HPLC afin.

Phân lập và tinh chế protein IL-17A tái tổ hợp chứa 6 axit amin His ở vùng đầu tận cùng C từ dịch lỏng nuôi cấy trên nhựa Ni tích điện Profinity IMAC (Bio-Rad). Trước quy trình tinh chế, bổ sung NiCl_2 vào dịch lỏng nuôi cấy đến nồng độ 1mM. Sau đó bổ sung 5 ml Ni tích điện Profinity IMAC vào dịch lỏng nuôi cấy và trộn trên máy

lắc trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Chuyển chất hấp thụ vào cột Polypropylen Thermo scientific dung tích 5 ml và rửa bằng 5 thể tích cột của PBS để loại bỏ các thành phần liên kết không đặc hiệu. Rửa giải kháng nguyên đã liên kết bằng imidazol 0,3 M (độ pH = 8) và NaCl 150 mM. Sau đó thẩm tách protein vào PBS (độ pH = 7,4) bằng kỹ thuật SnakeSkin Dialysis Tubing, lọc (0,22 μ m), chuyển vào ống nghiệm và lưu trữ ở nhiệt độ -70°C. Đánh giá độ tinh khiết của protein thu được bằng SDS-PAGE (Fig.2).

Tinh chế các kháng thể IgG1 thử nghiệm và đối chứng trên cột Hi Trap rProteinA FF dung tích 1 ml (GE Healthcare) theo quy trình nêu trên đối với IL-17A-Fc. Đánh giá độ tinh khiết của protein thu được bằng SDS-PAGE (Fig.2).

Ví dụ 3: Gây miễn dịch lạc đà không bướu bằng IL-17A ở người và tạo ra thư viện Fab của kháng thể lạc đà không bướu được biểu hiện trên phagơ

Gây miễn dịch Lama Glama 5 lần liên tiếp bằng cách dùng dưới da nguyên liệu kháng nguyên được trộn với thể tích tương đương của tá dược Freund hoàn chỉnh (tiêm lần thứ nhất) hoặc không hoàn chỉnh (tất cả các lần tiêm ngoại trừ lần tiêm thứ nhất). Dùng hỗn hợp của các protein tái tổ hợp (0,2 mg của mỗi protein mỗi lần tiêm) mà một trong số đó là IL-17A ở người (bộ kit của hãng R&D Systems) làm kháng nguyên. Thực hiện tiêm lần thứ hai (giai đoạn gây miễn dịch) 3 tuần sau lần thứ nhất; thực hiện ba lần gây miễn dịch nữa với khoảng cách 2 tuần. Lấy mẫu máu (50 ml) 5 sau mỗi lần tiêm bắt đầu từ lần thứ ba.

Pha loãng máu đã được lấy ra 2 lần bằng PBS chứa EDTA 1 mM. Sau đó tạo lớp 35 ml máu đã pha loãng trên 15 ml môi trường Histopaque® -1077 (Sigma, tỷ trọng bằng 1,077 g/ml) và ly tâm trong thời gian 20 phút dưới 800g. Chọn lọc các tế bào đơn nhân (tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân to) từ khu vực chia pha huyết tương/môi trường Histopaque và rửa bằng PBS chứa EDTA 1 mM.

Phân lập ARN tổng số từ các tế bào đơn nhân lạc đà không bướu bằng cách sử dụng bộ Kit RNeasy Mini theo quy trình (QIAGEN). Thực hiện thử nghiệm nồng độ

ARN bằng cách sử dụng Nanovue (GE Healthcare); kiểm tra chất lượng của ARN đã được phân lập bằng điện di trên gel agarosa 1,5%.

Thực hiện phản ứng phiên mã ngược bằng cách sử dụng bộ kit MMLV RT (Evrogen) theo quy trình được khuyến nghị với enzym phiên mã ngược MMuLV và các đoạn mồi hexame ngẫu nhiên.

Sử dụng sản phẩm phiên mã ngược làm chất nền trong phản ứng chuỗi polymeraza hai giai đoạn để thu được các gen của miền biến thể có ở rìa là các vị trí giới hạn; phản ứng được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit oligonucleotit và quy trình theo [27; 28; 29]. Ngoài ra, các gen mã hóa cho miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được đặt cùng nhau trong một mảnh bằng các phản ứng tuần tự gồm có giới hạn, nối và khuếch đại như được thể hiện trên Fig.3. Các gen chuỗi nặng được gắn riêng rẽ vào các gen chuỗi nhẹ kappa và lambda. Trong trường hợp này, số đếm ước lượng của các phân tử chất nền trong tất cả các phản ứng không nhỏ hơn 10^{11} . Xử lý sản phẩm ADN thu được (VL-CK-VH) bằng các enzym giới hạn NheI /Eco91I và nối vào phagemid gốc độ pH = 5. Cấu trúc phagemid được thể hiện trên Fig.4. Biến nạp sản phẩm nối vào các tế bào có khả năng điện biến nạp SS320 được điều chế theo quy trình [30]. Danh mục của thư viện Fab kappa và lambda được tạo cấu trúc lần lượt là $5,1 \cdot 10^8$ và $3,7 \cdot 10^8$. Sản phẩm của thư viện biểu hiện trên phagơ chưa quen thí nghiệm được điều chế theo quy trình đã được mô tả từ trước [31].

Ví dụ 4: Chọn lọc thư viện Fab của kháng thể biểu hiện trên phagơ

Chọn lọc các kháng thể Fab biểu hiện trên phagơ kháng IL17A cụ thể từ thư viện biểu hiện Fab trên phagơ bằng cách sử dụng IL-17A ở người tái tổ hợp (bộ kit của hãng R&D Systems); dãy các chu trình chọn lọc được thực hiện như được mô tả ở trên [27; 31; 32]. Để thực hiện quy trình chọn lọc bằng phương pháp phân tích trọng lượng, IL-17A ở người trong chất đệm cacbonat 50 mM (độ pH = 9,5) được hấp thụ qua đêm ở nhiệt độ 4°C trên bề mặt của ống HighSorb (Nunc). Ngoài ra, rửa ống bằng PBS (độ pH = 7,4) và sau đó phong bế bằng dung dịch chứa PBS (độ pH = 7,4) – sữa không chứa

chất béo (0,5% khối lượng/thể tích) trong thời gian 1 giờ. Sau đó, chuyển 2-4 ml dung dịch phagơ (10^{12} hạt phagơ trong mỗi ml) trong PBS (độ pH = 7,4) – sữa không chứa chất béo (0,5% khối lượng/thể tích) vào ống có kháng nguyên, và ủ hệ này trong thời gian 1 giờ có khuấy. Loại bỏ phagơ không liên kết bằng chuỗi các chu trình rửa bằng PBS (độ pH = 7,4) - Tween 20 (0,1% thể tích/thể tích). Số lượng chu trình rửa được tăng lên từ chu kỳ thứ nhất đến chu kỳ thứ ba – lần lượt là 20-30-40 lần. Rửa giải hạt phagơ mà vẫn còn được liên kết bằng dung dịch Gly-HCl 100 mM (độ pH = 2,5) trong thời gian 15 phút có khuấy, và sau đó trung hòa bằng TRIS-HCl 1 M (độ pH = 7.6). Gây nhiễm vi khuẩn E. coli TG1 bằng phagơ thu được; phân lập thêm phagơ và sử dụng trong chu kỳ tiếp theo.

Sau vòng chọn lọc thứ hai và thứ ba, thực hiện ELISA đối với sản phẩm phagơ đa dòng cho thấy sự làm giàu đáng kể. Tách dòng lại các dòng gộp chung đã được làm giàu bằng Fab ở người vào plasmit biểu hiện LL có chứa myctag và đuôi His6 trên đầu tận cùng C của gen CH1 của chuỗi nặng.

Ví dụ 5: Phân tích Fab liên kết đặc hiệu với IL-17A ở người

ELISA được dùng để đo liên kết của mảnh Fab được nghiên cứu với IL-17A ở người. Fab có trình tự AIN457 đã được công bố (Novartis) được dùng làm đối chứng dương. Phủ các giếng của đĩa ELISA (Nunc ImmunoMaxisorp) bằng 50 μ l (0,5 μ g/ml trong 1X chất đệm cacbonat phủ) IL-17A-Fc, đậy kín khí và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Tất cả các giai đoạn khác được thực hiện theo quy trình ELISA tiêu chuẩn với hệ thống năng suất cao chẳng hạn như GenetixQ-pix2xt (Molecular Devices) và Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). Phong bế liên kết không đặc hiệu bằng cách bổ sung chất đệm phong bế BB (200 μ l sữa không chứa chất béo 0,5% trong PBS). Ủ đĩa trên máy lắc trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng PBS-Tween, phủ từng tế bào bằng 50 μ l dịch nổi bề mặt tế bào chứa Fab thử nghiệm được trộn với thể tích tương đương của BB. Ủ đĩa trên máy lắc trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng; tiếp theo, rửa từng giếng của đĩa 5 lần bằng chất đệm PBS-Tween. Sau khi rửa, phủ

từng giếng (50 μ l/giếng) bằng kháng thể thứ cấp liên hợp HRP Fab kháng người (Pierce-ThermoScientific) trong PBS-Tween (1:5000). Chuyển đĩa vào máy lắc quay (50 phút ở nhiệt độ trong phòng) và sau đó rửa 5 lần bằng chất đệm PBS-Tween như được mô tả ở trên. Thu lấy tín hiệu đo màu bằng cách bổ sung TMB (100 μ l/giếng) đến khi bão hòa (trung bình là 3-5 phút); sự hiện màu thêm bị phong bế bằng cách bổ sung dung dịch làm ngừng (100 μ l/giếng, axit sulfuric 10%). Đo độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Tecan-Sunrise (Tecan) thích hợp. Liên kết kháng thể tỷ lệ với tín hiệu được tạo ra. Các dòng mà tín hiệu màu sắc đối với nó vượt quá đường cơ sở tín hiệu hơn 5 lần được thử nghiệm trong ELISA cạnh tranh để phát hiện việc phong bế Fab đối kháng sự tương tác giữa phối tử IL-17A và thụ thể.

Ví dụ 6: ELISA cạnh tranh để phong bế sự tương tác của phối tử IL17A và thụ thể IL17R

Sử dụng kỹ thuật ELISA cạnh tranh để kiểm tra khả năng đối kháng của Fab được chọn từ trước chống lại đặc hiệu IL-17A ở người. Fab có trình tự AIN457 đã được công bố (Novartis) được dùng làm đối chứng đối kháng dương. Phủ các giếng của đĩa ELISA (Nunc Immuno Maxisorp) bằng 50 μ l/giếng thụ thể IL-17RA-Fc (R&D Systems; dung dịch 1 μ g/ml trong 1X chất đệm cacbonat phủ) và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Tất cả các giai đoạn khác được thực hiện theo quy trình ELISA tiêu chuẩn với hệ thống năng suất cao chẳng hạn như GenetixQ-pix2xt (Molecular Devices) và Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). Phong bế liên kết không đặc hiệu bằng cách bổ sung chất đệm phong bế BB (200 μ l sữa không chứa chất béo 0,5% trong PBS). Ủ đĩa trong thời gian 1 giờ trên máy lắc ở nhiệt độ trong phòng.

Song song với đó, 50 μ l dịch nổi bề mặt tế bào chứa Fab thử nghiệm trong đĩa 96 giếng không liên kết được trộn với 50 μ l IL-17A-His6-Flag (0,4 μ g/ml trong sữa 1% được pha loãng bằng PBS-Tween). Ủ đĩa trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trên máy lắc ở tốc độ 500 vòng/phút.

Sau khi rửa đĩa chứa thụ thể IL-17RA-Fc bằng dung dịch BB, phủ nó bằng hỗn hợp phản ứng của Fab và IL-17A-His6-Flag với lượng bằng 90 μ l trong mỗi giếng. Ủ đĩa trong điều kiện có lắc trong thời gian 45 phút ở nhiệt độ trong phòng, và rửa mỗi giếng 5 lần bằng chất đệm PBS-Tween. Tiếp theo, bổ sung 50 μ l /giếng của kháng thể M2 kháng FLAG ở chuột 1 μ g/ml (Sigma) và ủ đĩa trong thời gian 45 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi ủ, rửa mỗi giếng của đĩa 5 lần bằng PBS-Tween, và sau đó phủ bằng 50 μ l/giếng của kháng thể thứ cấp liên hợp HRP IgG kháng chuột (Pierce-ThermoScientific) được pha loãng 1:5000 bằng PBS-Tween. Ủ đĩa trên máy lắc quay trong thời gian 45 phút ở nhiệt độ trong phòng và rửa 5 lần bằng PBS-Tween, như nêu trên. Thu lấy tín hiệu đo màu bằng cách bổ sung TMB (100 μ l/giếng) đến khi bão hòa (trung bình là 3-5 phút); sự hiện màu thêm bị phong bế bằng cách bổ sung dung dịch làm ngừng (100 μ l/giếng, axit sulfuric 10%). Đo độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Tecan-Sunrise (Tecan) thích hợp. Liên kết kháng thể tỷ lệ với tín hiệu được tạo ra.

Các dòng mà chứng tỏ việc phong bế ở mức độ tương ứng với mức độ của kháng thể Fab đối chứng AIN457 được đánh dấu là dương tính và được dùng ở các thử nghiệm tiếp theo. Các gen của miền biến đổi của dòng dương tính được đưa đi đọc trình tự theo quy trình tiêu chuẩn trên Thiết Bị Phân Tích Di Truyền *Applied Biosystems 3130 (Applied Biosystems)* sau đó là sự phân tích thích hợp. Các dòng có chứa 3 miền biến đổi VHHFab được chọn lọc cho các nghiên cứu tiếp theo (Fig.5B). Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng dòng 3VHHFab được biểu thị kết hợp với 23 miền chuỗi nhẹ có các trình tự khác nhau, ba trong số đó được thể hiện trên Fig.5B. Điều này chỉ ra sự cản trở cấu trúc tương đối của nó và thực tế bằng cụ thể là miền VHH, chứ không phải là chuỗi nhẹ, góp phần vào việc liên kết IL-17A.

Ví dụ 7: Sàng lọc $k_{off}(k_{diss})$ so sánh của các ứng viên VHHFab kháng IL-17A

Thực hiện sàng lọc K_{off} so sánh đối với các ứng viên Fab kháng IL-17A bằng cách sử dụng hệ thống Pall Forte Bio Octet Red 96. Tái hydrat hóa cảm biến sinh học

kháng FABCH1 trong thời gian 30 phút trong chất đệm hoạt động có chứa PBS 10 mM (độ pH = 7,2-7,4), Tween-20 0,1% và BSA 0,1%. Bổ sung 10x chất đệm hoạt động vào mẫu thử nghiệm của dịch nổi bề mặt E.coli đến 1x nồng độ cuối cùng. Sau đó ngâm cảm biến sinh học kháng FABCH1 vào dịch nổi bề mặt E.coli chứa mảnh Fab của kháng thể ứng viên và ủ trong thời gian 12 giờ ở nhiệt độ 4°C. Chuyển cảm biến đã được phủ bằng mảnh Fab vào các giếng có chất đệm hoạt động, và ghi lại đường cơ sở (60 giây). Sau đó chuyển cảm biến vào các giếng có dung dịch chất phân tích (IL-17A, 30 µg/ml) để đạt được sự kết hợp kháng nguyên-kháng thể (300 giây). Sau đó, đưa cảm biến trở lại vào các giếng có chất đệm hoạt động để phân ly tiếp (300 giây). Đưa cảm biến đã được sử dụng đi phục hồi sau mỗi thử nghiệm: chúng được đặt ba lần vào chất đệm phục hồi (Gly-HCl, độ pH = 1,7) và sau đó có thể sử dụng được trong các thí nghiệm tiếp theo. Phân tích các đường cong thu được bằng cách sử dụng Phân Tích Dữ Liệu Octet (Octet Data Analysis) (phiên bản 7.0) theo quy trình tiêu chuẩn với mô hình tương tác 1:1.

Kết quả thu được đối với sàng lọc k_{off} của các ứng viên Fab kháng IL-17A được thể hiện trên Fig.5C và Bảng 1. Liên kết đặc hiệu và affin cao của tất cả các VHHPab duy nhất với IL-17A ở người đã được chứng minh, trong đó 3VHHFab thể hiện k_{on} rất nhanh và $k_{\text{dis}}(1/c)$ rất chậm mà vượt ra khỏi giới hạn phát hiện của thiết bị.

Bảng 1. Ái lực VHHPab với IL-17A ở người

	K_D (M)	$k_{\text{on}}(1/\text{Mc})$	$k_{\text{dis}}(1/c)$
1VHH	2,485E-08	2,498E04	6,206E-04
2VHH	1,352E-08	1,628E05	2,201E-03
3VHHVK4B11	-	-	<2,272E-06

Do đó, dựa trên kết quả phân tích thu được, ứng viên 3VHHVK4B11 được chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Ví dụ 8: Tạo ra kháng thể VHHIgG1 có đột biến ở FR1 và FR2 của miền biến đổi VHH

Tách dòng các gen của miền biến đổi của chuỗi VHH nặng và nhẹ của ứng viên 3VHHVK4B11 trong plasmid pEE-Hc và pEE-Lc để biểu hiện tạm thời chung ở tế bào CHO-EBNA như được mô tả trong Ví dụ 3. Ngoài ra, sự thể ở các vị trí 44 và 45 (hệ thống đánh số Kabat) được đưa vào bằng cách gây đột biến định hướng oligonucleotit bằng cách sử dụng PfuUltraHS polymeraza (Stratagene) theo quy trình [bộ kit gây đột biến định hướng vị trí Q5® (NEB)] và quy trình được mô tả trong [34]. Plasmid pEE-3VHH được dùng làm chất nền. Phân đoạn sản phẩm PCR trên agarosa để nóng chảy và tinh chế trên cột thích hợp. Sau khi nối, biến nạp ADN vào *E.coli*. Sau khi chọn lọc các dòng đột biến có trình tự đúng, plasmid có đột biến ở 3VHH được đồng biến nạp với pEE-LcVK4B11 (tham chiếu đến Fig.6Aa và Bảng 2).

Bảng 2. Các mẫu của các dòng đột biến 3VHHFabVK4B11

Tên	Sự đột biến so với 3VHHFabVK4B11 ban đầu
mut1	E44G, R45L
mut2	S11L, E44G, R45L
mut3	R45L
mut4	S11L, E44G

Ví dụ 9: Phân tích so sánh các tham số động học của kháng thể VHHFab có chứa sự đột biến ở FR1 và FR2 của miền biến đổi VHH

Thực hiện sàng lọc Koff so sánh đối với ứng viên VHHFab kháng IL-17A theo quy trình tiêu chuẩn bằng cách sử dụng hệ thống Pall Forte Bio Octet Red 96 (tham chiếu đến Ví dụ 8). Phát hiện thấy sự giảm đáng kể của k_{off} đối với mut1, mut2 và mut4, và sự giảm ít đáng kể hơn đối với mut3, khi so với 3VHHFab tự nhiên (Fig.6B).

Ví dụ 10: Phân tích so sánh đặc điểm nhiệt-kết tập của kháng thể 3VHHIgG1VK4B11 kích thước đầy đủ có chứa đột biến ở FR1 và FR2 của miền biến đổi VHH

Thực hiện phân tích so sánh đặc điểm kết tập đối với ứng viên VHHIgG1 kháng IL-17A bằng cách sử dụng quy trình sau đây. Gia nhiệt chế phẩm của kháng thể VHHIgG1 (10 mg/ml) trong chất đệm PBS trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 50°C. Đánh giá sự kết tập gây ra bởi ứng suất nhiệt bằng HPLC loại trừ kích thước. Tiến hành thử

nghiệm trên hệ thống 1100 HPLC (Agilent) bằng cách sử dụng cột Tosoh TSK-Gel G3000SWXL, 7,8 mm x 30 cm, Cat. No. 08541 với cột phụ kiện Tosoh TSKgel Guard SWXL 6,0 mm x 4,0 cm, cm (hạt có kích thước 7 μ m, Cat. No. 08543). Thực hiện rửa giải đẳng dòng với pha động chứa chất đệm natri phosphat 50 mM và NaCl 0,3 M (độ pH = 7,0) dưới tốc độ dòng chảy 0,5 ml/phút với sự phát hiện ở bước sóng 214 nm và 280 nm. Pha loãng mẫu kháng thể bằng PBS (độ pH = 7,5) đến nồng độ ~1 mg/ml. Thể tích tiêm là 10 μ l. Sử dụng hỗn hợp tiêu chuẩn lọc gel (Bio-Rad, Cat. No. 151-1901) để định cỡ cột trước khi thử nghiệm.

Biểu đồ sắc ký được thể hiện trên Fig.6C và Bảng tổng kết 3 chứng tỏ rằng tất cả các thể đột biến kết tụ đến các mức độ khác nhau dưới ứng suất nhiệt, trong đó quan sát thấy độ ổn định tối nhỏ nhất đối với biến thể tự nhiên và phát hiện thấy độ ổn định lớn nhất đối với mut1 có chứa sự thể E44G+R45L thông thường đối với cấu trúc VH cổ điển.

Ngoài ra, nghiên cứu so sánh về độ ổn định nhiệt của chế phẩm thu được được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình Thermofluor (sau đây gọi là Thử nghiệm dịch chuyển nhiệt) mà xác định điểm nóng chảy protein đo sự thay đổi của huỳnh quang của thuốc nhuộm cụ thể SYPROOrange mà liên kết với bề mặt kỵ nước của protein không cuộn gập [35]. Sử dụng thiết bị StepOneReal-TimePCRSYSTEM (Applied Biosystems) và quy trình được khuyến nghị để nghiên cứu sản phẩm đột biến. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên Bảng 3. Chúng khá tương quan với kết quả thu được trong thử nghiệm ứng suất nhiệt, mà xác nhận độ ổn định của mut1 và mut4 so với 3VHHIgG1VK4B11 đại.

Bảng 3. Nghiên cứu độ ổn định nhiệt của thể đột biến

Sản phẩm	Tỷ lệ phần trăm monome (%) trước khi chịu ứng suất nhiệt	Tỷ lệ phần trăm monome (%) sau khi chịu ứng suất nhiệt	Độ khác biệt $\sim \Delta\%$	Điểm nóng chảy (Thermofluor), $^{\circ}\text{C}$
3VHHIgG1 đại	60	13	47	46 $\pm$ 1

VK4B11				
mut1	95	95	0	64 ±1
mut2	65	13	52	42 ±1
mut3	40	32	8	Không xác định
mut4	89	80	9	53 ±1

Ví dụ 11: Thử nghiệm tế bào của thể đột biến 3VHHIgG1VK4B11 kháng IL17A phong bế khả năng gây ra sự sản xuất IL-6 của IL-17A

Khả năng của IL-17 để gây ra sự sản xuất của IL-6 bằng các tế bào HT1080 ở người (ATCC:CCL-121) được dùng để phân tích hoạt tính làm trung hòa của các ứng viên VHHIgG1 mut1 và mut4 về IL-17A tái tổ hợp ở người. Nuôi cấy tế bào trên môi trường nuôi cấy DMEM có bổ sung huyết thanh thai bất hoạt 10%, gentamycin và glutamin. Các phần phân ước gồm 5×10^4 tế bào/giếng được cấy trong đĩa nuôi cấy 96 giếng. Để tế bào dính lại trong thời gian 5 giờ. Ủ hỗn hợp của IL-17 tái tổ hợp 40 ng/ml và TNF- α 20 ng/ml với dịch pha loãng VHHIgG1 trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó bổ sung hỗn hợp xytokin/kháng thể vào tế bào và để qua đêm. Sự sản xuất của IL-6 bằng môi trường nuôi cấy tế bào HT1080 tỷ lệ với hàm lượng của IL-17 được bổ sung. Hàm lượng của IL-6 được giải phóng trong mẫu dịch nổi bề mặt tế bào được đánh giá bằng kỹ thuật ELISA bằng cách sử dụng DuoSet ELISA Development System Human IL6 (RD System, Cat. No. DY206). Kết quả thu được từ sự đánh giá các tính chất đối kháng của ứng viên VHHIgG1 được thể hiện trên Fig.7 trong sự so sánh với AIN457 (kháng thể kháng IL-17A của Novartis). Giá trị IC₅₀ đối với mut1 cao hơn gần 30 lần so với giá trị IC₅₀ đối với biến thể tự nhiên, trong khi đó biến thể mut4 duy trì gần như hoàn toàn năng lực ức chế của nó. Giá trị IC₅₀ đối với ứng viên mut4 là 30±10 pM. Dựa trên the kết quả thu được trong nghiên cứu này và đặc điểm lý-hóa và sinh học chung, ứng viên này được chọn để phát triển và tối ưu hóa tiếp.

Ví dụ 12: Thiết kế kháng thể mut4VHHFab có chứa chuỗi nhẹ ở người

Phân lập ARN tổng số của tế bào lympho B được lấy từ 55 người cho bằng cách sử dụng bộ Kit RNeasy Mini theo quy trình thích hợp (QIAGEN). Đo nồng độ ARN

bằng cách sử dụng bộ kit Nanovue (GE Healthcare), và kiểm tra chất lượng của ARN đã được phân lập bằng điện di trên gel agarosa 1,5%.

Thực hiện phản ứng phiên mã ngược bằng cách sử dụng bộ kit MMLV RT (Evrogen) theo quy trình được khuyến nghị với enzym phiên mã ngược MMuLV và các đoạn môi hexame ngẫu nhiên.

Sử dụng sản phẩm phiên mã ngược làm chất nền trong phản ứng chuỗi polymeraza hai giai đoạn để thu được các gen của miền biến thể có ở rìa là các vị trí giới hạn; phản ứng được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit oligonucleotit và quy trình được mô tả trong [27]. Tạo ra Fab khảm chống lại đặc hiệu IL-17A theo quy trình được mô tả trong WO93/06213 dựa trên phagemid pH5, như xác định ở trên. Đặt các gen mã hóa cho miền biến đổi của chuỗi nhẹ ở người và các gen mã hóa cho miền biến đổi của mut4VHH cùng nhau trong một mảnh bằng các phản ứng tuần tự gồm có giới hạn, nối và khuếch đại như được thể hiện trên Fig.8. Trong trường hợp này, số đếm ước lượng của các phân tử chất nền trong tất cả các phản ứng không nhỏ hơn 10^{12} . Xử lý sản phẩm ADN thu được (VL-CK-VH) bằng các enzym giới hạn NheI /Eco91I và nối vào phagemid gốc độ pH = 5. Biến nạp sản phẩm nối vào các tế bào SS320 có khả năng điện biến nạp được điều chế theo quy trình được mô tả trong [30]. Danh mục của thư viện Fab VHH mut4 khảm dựa trên các chuỗi ở người kappa và lambda hỗn hợp là $2,8 \cdot 10^9$ thể biến nạp. Thư viện Fab được hiển thị trên phago khảm được điều chế theo quy trình được mô tả ở trên [27].

Tiến hành chọn lọc các thư viện Fab khảm được hiển thị trên phago trong điều kiện được mô tả ở trên (tham chiếu đến Ví dụ 5), ngoại trừ ủ thêm kháng thể phago liên kết IL17A trong sự có mặt của 20 $\mu\text{g/ml}$ IL-17A hòa tan ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 12 giờ.

Sau vòng chọn lọc thứ hai trên IL-17A, quan sát thấy sự làm giàu đáng kể của thư viện này. Sử dụng các dòng được gộp chung thu được của thư viện Fab VHH mut4 khảm đã được làm giàu trong việc sàng lọc đối với IL-17A theo quy trình tiêu chuẩn

(tham chiếu đến Ví dụ 6). Dòng dương tính cuối cùng được đưa đi đọc trình tự. Fig.8B thể hiện bốn trình tự của miền biến đổi của chuỗi nhẹ ở người VK1A7, VK3c18, VK3c118 và VK4c1E12 từ VHhFab mut4 ái lực cao. Các trình tự này thuộc về các dòng tế bào mầm ở người kappa khác nhau VK1, VK3 và VK4 có chứa số lượng tối thiểu của các đột biến soma. Cần lưu ý rằng trình tự ở người VK4c1E12 thể hiện độ tương đồng cao với chuỗi nhẹ lạc đà không bướu VK4B1 được chọn lọc trước đây, vẫn có sự khác biệt đặc trưng.

Ví dụ 13: Phân tích so sánh đặc điểm nhiệt-kết tập của kháng thể mut4VHHIgG1 kích thước đầy đủ có chứa các biến thể chuỗi nhẹ khác nhau

Tách dòng các gen của miền biến đổi của chuỗi VHH nặng của ứng viên mut4 VHH trong plasmit pEE-Hc, và tách dòng các gen của miền biến đổi của chuỗi nhẹ ở người VK1A7, VK3c18, VK3c118, VK3A4 và VK4E12 trong plasmit pEE-Lc để biểu hiện tạm thời chung trong tế bào CHO-EBNA, như được mô tả trong Ví dụ 3. Ngoài ra, để kháng thể thu được lộ ra với ứng suất nhiệt và đánh giá biên dạng kết tập của chúng như được thể hiện trong Ví dụ 9. Kết quả thu được được thể hiện trên bảng tổng kết (Bảng 4).

Bảng 4. Độ ổn định nhiệt của kháng thể kích thước đầy đủ mut4 VHHIgG1

Tên mẫu	Họ cấu trúc của chuỗi nhẹ	% Monome trước khi chịu ứng suất nhiệt	% Monome sau khi chịu ứng suất nhiệt	Độ khác biệt ~Δ%	Sự tạo thành của khối kết tụ nhìn thấy được trong quá trình tinh chế	Điểm nóng chảy (Thermofluor)
mut4VHHIgG1VK3c8	VK3	96	82	14	+	58C
mut4VHHIgG1VK3c18	VK3	91	81	10	++	61C
mut4VHHIgG1VK3A4	VK3	71	69	2	+	61C

mut4VHHIgG1VK1A7	VK1	95	88	7	-	63C
mut4VHHIgG1VK4E12	VK4	90	49	41	++	59C

Ngoài ra, tiến hành nghiên độ ổn định nhiệt so sánh của sản phẩm thu được bằng cách sử dụng quy trình Thermofluor tương tự với quy trình được mô tả trong Ví dụ 11. Dựa trên dữ liệu thu được, có thể kết luận rằng các cặp mut4VHH được chọn có chứa chuỗi nhẹ ở người ổn định hơn so với biến thể tự nhiên có chứa chuỗi nhẹ lạc đà không bướu VVK4B11. Do đó, trong nghiên cứu so sánh các tham số độ ổn định kết tập tốt nhất được chứng minh là đối với các dạng kết hợp mut4 VHHIgG1VK1A7 và mut4 VHHIgG1VK3c18.

Ví dụ 14: Thử nghiệm tế bào về việc phong bế khả năng của IL-17A để gây ra sự sản xuất IL-6 bằng cách sử dụng mut4 VHHIgG1VK3c8 và mut4 VHHIgG1VK1A7

Khả năng của IL-17 để gây ra sự sản xuất của IL-6 bằng các tế bào HT1080 ở người (ATCC:CCL-121) được dùng để phân tích năng lực trung hòa của các ứng viên VHHIgG1 mut4 VHHIgG1VK3c8 và mut4 VHHIgG1VK1A7 liên quan đến IL-17 tái tổ hợp ở người (tham chiếu đến Ví dụ 12). Fig.9 thể hiện kết quả thu được đối với thử nghiệm phong bế. Cần lưu ý rằng biến thể mut4 VHHIgG1VK1A7 (đặc trưng bởi độ ổn định) đã chứng tỏ sự sụt giảm đáng kể của giá trị IC_{50} , trong khi đó biến thể mut4 VHHIgG1VK3c8 (độ ổn định trung bình) đã chứng tỏ sự ức chế vượt quá một vài lần sự ức chế quan sát được đối với biến thể mut4 VHHIgG1VK1A7 ổn định hơn.

Ví dụ 15: Thiết kế kháng thể kích thước đầy đủ mut4 VHHIgG1 có chứa các đột biến khác nhau ở các vị trí 44 và 45 trong FR2 của miền biến đổi VHH, và phân tích so sánh các đặc điểm kết tập và chức năng của chúng

Nhằm mục đích cải thiện hơn nữa độ ổn định kết tập, phương pháp gây đột biến định hướng oligonucleotit được dùng để đưa sự thay đổi ở các vị trí 44 và 45 trong vùng FR2 của VHH vào cho ứng viên mut4 VHHIgG1VK3c8 (sau đây gọi là m4VHHc8). Nghiên cứu này không bao gồm các biến thể có các axit amin thơm, béo hoặc dương ở vị trí 44,

vì chúng có khả năng gây miễn dịch và ngăn cản về mặt cấu trúc. Thẻ đột biến được biểu hiện tạm thời như được mô tả trong Ví dụ 3 (Fig.8). Tuy hàm lượng của sản phẩm đối với các thẻ đột biến khác nhau thay đổi giữa các thí nghiệm, cần lưu ý rằng hiệu suất ở trong cùng thí nghiệm có độ lớn có thể so sánh được đối với tất cả các sự thể. Để biến thẻ đột biến thu được tiếp xúc với ứng suất nhiệt. Bảng 5 thể hiện kết quả thu được đối với các thẻ đột biến khác nhau. Có thể thấy rằng thẻ đột biến ít ổn định hơn là 44G45G và 44G45D độ ổn định của chúng thấp hơn độ ổn định của dạng kết hợp 44G45R ban đầu ở trong m4VHHc8. Các biến thể như 44G45N, 44V45T, 44D45T, 44T45T và 44D45V vẫn giữ được độ ổn định của chúng một cách đáng kể. Tất cả các dạng kết hợp khác chứng tỏ hiệu quả cộng dẫn đến độ ổn định kết tập của m4VHHc8 tăng lên, và ổn định nhất là các biến thể có chứa nhóm thơm hoặc béo ở vị trí 45. Tuy nhiên, các biến thể có chứa axit amin ưa nước và kỵ nước nhờ ở cả hai vị trí, chẳng hạn như 44G45V, 44G45T, 44V45V, 44A45V, 44T45V, 44A45T và 44S45T, cũng đã chứng tỏ độ ổn định đáng kể.

Bảng 5. Kết quả thu được đối với nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời và ứng suất nhiệt của thẻ đột biến có chứa sự thể ở các vị trí 44 và 45 của vùng FR2 của m4VHHc8.

Số	Thẻ đột biến ở vị trí 44+45 của vùng FR2 của m4VHHc8		% Monome, ban đầu*	% Monome, đã gia nhiệt*	~Δ%	Hiệu suất sản xuất đối với sản phẩm ** (số thí nghiệm) ≈, mg/l	IC50, picomol***như xác định được bằng thử nghiệm IL6 tế bào
1	44G	45R	96	81	15	41 (1)	50
2	44G	45F	98	98	0	22 (3)	1100
3	44G	45W	97	97	0	57 (2)	1200
4	44G	45Y	97	97	0	33 (2)	650
5	44G	45P	98	98	0	41 (1)	800
6	44G	45I	97	97	0	20 (3)	950
7	44G	45 L	97	97	0	25 (3)	1000
8	44G	45G	96	50	46	21 (3)	Không xác định
9	44G	45N	90	77	13	26 (2)	Không xác định
10	44G	45S	93	85	8	45 (2)	100

11	44G	45D	90	40	50	23 (3)	Không xác định
12	44G	45A	93	89	4	27 (3)	100
13	44G	45H	93	93	2	25 (3)	150
14	44G	45V	93	93	0	35 (1)	250
15	44G	45Q	91	84	7	36 (1)	Không xác định
16	44G	45T	93	93	0	46 (1)	100
17	44V	45T	95	84	11	64 (4)	Không xác định
18	44D	45T	95	83	12	72 (4)	Không xác định
19	44T	45T	96	86	10	75 (4)	150
20	44A	45T	95	93	2	74 (4)	150
21	44S	45T	96	94	2	63 (4)	150
22	44V	45V	95	95	0	71 (4)	150
23	44D	45V	96	88	12	28 (4)	150
24	44A	45V	95	95	0	72 (4)	100
25	44T	45V	96	95	1	73 (4)	150
26	AIN457		95	95	0	0	1100

*Sai số trong các mẻ khác nhau lên đến 5%

** Thay đổi một cách đáng kể tùy thuộc vào thí nghiệm; sự so sánh chính xác hơn được cung cấp cho sản phẩm ở trong cùng một mẻ

*** Sai số trong các mẻ khác nhau lên đến 50 %

Để đánh giá hoạt tính làm trung hòa trong thử nghiệm tế bào như được mô tả trong Ví dụ 12, các thí nghiệm được thực hiện với các thể đột biến khác nhau (Fig.11). Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 5. Đã thấy rằng axit amin nhỏ ở các vị trí VHH FR2 44 và 45 đã chứng tỏ hoạt tính đối kháng cao, trong khi đó các axit amin lớn (béo và thơm) được đưa vào vị trí 45 dẫn đến làm giảm IC_{50} đi 10 lần. Fig.12 thể hiện sơ đồ của các tính chất độ ổn định và chức năng đối với các thể đột biến có chứa nhiều lần thể axit amin khác nhau mà xác định sự tương tác của miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Ví dụ 16: Gây đột biến quét miền 3VHH kháng IL17A CDR

Sự đột biến vào các vị trí cụ thể của CDR của ứng viên được cài xen bằng kỹ thuật ngẫu nhiên hóa NNK [26] bằng cách sử dụng Bộ Kit Gây Đột Biến Định Hướng Vị Trí Q5® (NEB) theo quy trình. Plasmid pLL-Fab được dùng làm chất nền. Phân đoạn sản phẩm PCR trên agarosa để nóng chảy và tinh chế trên cột thích hợp. Sau khi nối, biến nạp ADN vào chủng biểu hiện E.coli BL21gold (Stratagene). Sau đó, làm tăng các dòng cụ thể thu được bằng cách biểu hiện Fab trong đĩa 96 giếng, như được mô tả ở trên. Phân tích dịch nổi bề mặt chứa nhánh Fab đột biến bằng ELISA trong điều kiện được mô tả ở trên và bằng cách sử dụng các hệ thống hiệu suất cao Genetix Q-pix2xt và Tecan Freedom EVO200. Nồng độ của IL-17A cố định là 0,2 µg/ml. Nhuộm màu các nhánh Fab đã được liên kết bằng thể liên hợp (HRP) (Fab')₂ IgG kháng Người ở Dê được pha loãng 1:5000 (Pierce) và thuốc nhuộm TMB+H₂O₂/ H₂SO₄; đo độ hấp thụ ở chiều dài bước sóng 450 nm.

Kết quả thu được bằng cách gây đột biến quét được thể hiện trong Bảng 6. Bảng này thể hiện sự thể ở trong CDR mà tương ứng với sự giảm $\leq 30\%$ của tín hiệu liên kết Fab đột biến/IL-17A ở người khi so với trình tự kiểu dại. Do đó, các thể đột biến cụ thể này hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng thuộc phạm vi của sáng chế.

Bảng 6. Gây đột biến quét

Vị trí đột biến.	Các axit amin dương tính trong thể đột biến
HCDR3	
V94	S, T, A, K, D, G
R95	K
R96	Y, H, W, K, D, G
R97	A, L, M, S, H, V
F98	-
D99	E, G, A, R, V, K, Q
G100	N, S
T100a	G, P, V, R, S, N, K
S100b	V, M, T, L, T, A, H, G, I, C
Y100c	W, S
Y100d	R, L, W, K, A, G, Q, I, V
T100e	A, L, S
G100f	A, L, T, P, N, Q, F, I, D
D107	-

HCDR2	
A50	G,L
S52	-
P52a	A
S53	-
G54	-
G55	S, R, P, D, I, T, E, K, A, L
D56	-
R57	-
I58	-
HCDR1	
S32	N, K, R, E, W, M, Q, D, F, V, L, A
P33	S
M34	I
G35	L, A, I, S, R, V, N, Q, M

Do đó, thực hiện việc sàng lọc đối với các vị trí axit amin CDR kháng thể BCD109 mà có thể dung chịu được sự thế axit amin. Đã chứng minh được rằng bằng hiện nay của sự thế axit amin không làm thay đổi một cách đáng kể ái lực kháng thể với IL-17A ở người. Bảng thế này có thể được sử dụng để cải thiện các tính chất khác nhau của ứng viên.

Ví dụ 17: Thiết kế ứng viên BCD109 và đánh giá ái lực của nó với IL-17A có nguồn gốc khác nhau

Kháng thể **BCD109** thu được từ biến thể m4VHHc8 có chứa sự thế 44G45T (được mô tả trong Ví dụ 16) bằng cách đưa sự đột biến làm cho giống người Q5V và R89V vào VHH mà không làm thay đổi độ ổn định hoặc IC₅₀ (không có dữ liệu), và ba sự đột biến bổ sung trong miền CH2 FcIgG1, 232Y/234T/236E, nhằm cải thiện được động học kháng thể. Kháng thể được biểu hiện tạm thời.

Ái lực của BCD109 liên kết với IL-17A ở người, khỉ và chuột nhắt được nghiên cứu trên hệ thống OctetRed 96 (ForteBio). BCD109 được cố định không đặc hiệu trên bề mặt của cảm biến thể hệ thứ hai phản ứng amin (AR2G) theo quy trình tiêu chuẩn được mô tả trong sách hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiến hành thử nghiệm ở nhiệt độ 30°C và sử dụng PBS với Tween-20 0,1% và BSA 0,1% làm chất đệm hoạt động.

Chuẩn độ IL-17A ở người, khỉ và chuột nhất bằng chất đệm hoạt động từ nồng độ 126 nM đến nồng độ 2 nM với gia lượng bằng 2.

Phân tích đường cong liên kết (sau khi trừ tín hiệu tham chiếu) bằng cách sử dụng phần mềm Octet Data Analysis (phiên bản 7.0) theo quy trình tiêu chuẩn và sử dụng mô hình tương tác 1:1. Kết quả được thể hiện trên Fig.13A.

Có thể thấy rằng BCD109 liên kết với IL-17A ở người và ở khỉ với ái lực picomol (Fig.13B). Hơn nữa, ứng viên này không tương tác với IL-17A chuột nhất (không có đường cong nào được thể hiện).

Ví dụ 18: Xác định độ ổn định kết tập của BCD109 dưới ứng suất nhiệt

Gia nhiệt chế phẩm BCD109 10 mg/ml trong PBS trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 50°C theo quy trình được mô tả trong Ví dụ 9.

Kết quả được thể hiện trên Fig.14 cho thấy rằng kháng thể BCD109 vẫn ổn định dưới ứng suất nhiệt: hàm lượng khối kết tụ nhỏ hơn 5%.

Ví dụ 19: Thu lấy dược phẩm có chứa kháng thể theo sáng chế

Hòa tan kháng thể BCD109 ở nồng độ 50 mg/ml trong lượng đủ nước để tiêm và đưa độ pH về 5,5 bằng axit xitric. Lọc (lọc tiệt trùng) dung dịch và bịt kín trong ống thuốc tiêm.

Sản phẩm thu được ổn định trong thời gian 6 tháng không đóng cặn.

Theo cách khác, hòa tan BCD109 trong nước chứa manitol dưới dạng chất làm ổn định kết đông (lyoprotectant), lọc (lọc tiệt trùng) và sau đó đưa đi sấy đông. Làm phân tán bột thu được vào lọ vô trùng. Đóng nút lọ bằng nút cao su và bịt kín bằng mũ nhôm. Sản phẩm kháng thể có thể được hoàn nguyên từ trạng thái khô lạnh bằng nước để tiêm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng IgG được làm giống như ở người hoặc mảnh của nó gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người, chứa miền biến đổi chuỗi nặng V_{HH} và miền biến đổi chuỗi nhẹ V_L , trong đó

a) miền biến đổi chuỗi nặng (V_{HH}) bao gồm 3 vùng siêu biến HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó:

vùng HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1:

G-T-F-A-T-X32-X33-X34-X35, trong đó

X32 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm S, N, K, R, E, W, Q, D, A, V và F;

X33 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm P hoặc S;

X34 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm M và I;

X35 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm G, N, S, A, L, I, R, V và Q;

vùng HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2:

X50-I-X52-X52a-S-G-X55-D-R-I-Y-A-D-S-V-K-G, trong đó

X50 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A, G và L;

X52 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm S, D và E;

X52a là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm P và A;

X55 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm G, S, T, L, R, D, E, K, A và W;

vùng HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3:

C-A-X94-X95-X96-X97-F-X99-X100-X100a-X100b-X100c-X100d- X100e - X100f - D-Y- D-S, trong đó

X94 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K, S, T, V, D và G;

X95 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm R và K;

X96 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm G, R, Y, H, D, W và K;

X97 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm R, A, V, S, L và H;

X99 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm D, E, G, A, R, V, K và Q;

X100 là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm G, S và N;

X100a là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm G, T, P, V, R, N và K;

X100b là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm V, S, T, L, Y, A, H, G và I;

X100c là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Y, W và S;

X100d là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm R, V, L, Y, A, W, K, G, Q và I;

X100e là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm T, L, A và S;

X100f là axit amin được chọn từ nhóm bao gồm T, L, G, P, N, A, Q, F, I và D;

b) miễn biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể của người hoặc miễn biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống như ở người.

2. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, tính ổn định kết tụ của dẫn xuất VHH tăng lên so với kháng thể VHH tự nhiên được phân lập từ động vật được gây miễn dịch thuộc họ *Camelidae*.
3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể thuộc isotyp bất kỳ trong các isotyp sau đây: IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.
4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng Fc không được cải biến tự nhiên làm một phần của IgG.
5. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, tính ổn định kết tụ mà khi được sử dụng với nồng độ cao hơn 10 mg/ml và được bảo quản trong thời gian lớn hơn 6 tháng ở nhiệt độ 4°C, hàm lượng chất kết tụ tăng lên không quá 5% so với hàm lượng ban đầu của chúng trong dung dịch.

6. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, tính ổn định kết tụ mà khi được sử dụng với nồng độ cao hơn 10 mg/ml và được bảo quản trong thời gian lớn hơn 2 tuần ở nhiệt độ 37°C, hàm lượng chất kết tụ tăng lên không quá 5% so với hàm lượng ban đầu của chúng trong dung dịch.
7. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, tính ổn định kết tụ mà khi được sử dụng với nồng độ cao hơn 10 mg/ml và được bảo quản trong thời gian lớn hơn 48 giờ ở nhiệt độ 42°C, hàm lượng chất kết tụ tăng lên không quá 5% so với hàm lượng ban đầu của chúng trong dung dịch.
8. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, tính ổn định kết tụ mà khi được sử dụng với nồng độ cao hơn 10 mg/ml và được bảo quản trong thời gian lớn hơn 6 giờ ở nhiệt độ 50°C, hàm lượng chất kết tụ tăng lên không quá 5% so với hàm lượng ban đầu của chúng trong dung dịch.
9. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó có hằng số phân ly K_D nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-9} M.
10. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó hằng số kết hợp động học của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên $k_{on}(1/Ms)$ bằng ít nhất là 10^5 1/Ms hoặc cao hơn.
11. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó hằng số phân ly động học của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên $dis(1/s)$ nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-4} 1/s.
12. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1 gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người, trong đó kháng thể này chứa:
 - a) miền biến đổi chuỗi nặng (V_{HH}) bao gồm 3 vùng siêu biến HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó:

vùng HCDR1 chứa trình tự axit amin là G-T-F-A-T-S-P-M-G (SEQ ID NO: 4);

vùng HCDR2 chứa trình tự axit amin là A-I-S-P-S-G-G- D-R-I-Y-A-D-S-V-

K-G (SEQ ID NO: 5);

vùng HCDR3 chứa trình tự axit amin là C-A-V-R-R-R-F-D-G-T-S-Y-Y-T-G-D-Y-D-S (SEQ ID NO: 6);

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể của người hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống như ở người.

13. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1 gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người, trong đó kháng thể này chứa:

a) miền biến đổi chuỗi nặng (V_{HH}) chứa trình tự axit amin

QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGT
EFVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTAVYYCA
VRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 7);

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể của người hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống như ở người.

14. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1 gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng VHH, trong đó miền biến đổi này chứa trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 90% so với trình tự SEQ ID NO: 7.

15. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1 gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người chứa:

a) miền biến đổi chuỗi nặng VHH chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7;

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể của người chứa trình tự axit amin là

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLL
IYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSYSPVTFGQ
GTKVEIKR (SEQ ID NO: 8).

16. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1 gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người và chứa miền biến đổi chuỗi nặng VHH và miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể của người, trong đó các miền biến đổi này chứa trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 90% so với trình tự SEQ ID NO: 8.

17. Kháng thể theo điểm 1 gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người và chứa:

a) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin sau đây:

QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGT
EFVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTAVYYCA
VRRRFDGTSYYTG DYDSWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO: 9).

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể của người (V_L) chứa trình tự axit amin sau đây:

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLL
IYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSYSPVTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10).

18. Kháng thể theo điểm 1 gắn kết đặc hiệu với IL-17A của người và chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó các chuỗi này chứa trình tự axit amin có tính tương đồng ít nhất 90% so với trình tự SEQ ID NO: 9 và/hoặc SEQ ID NO:10.

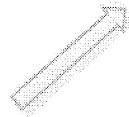
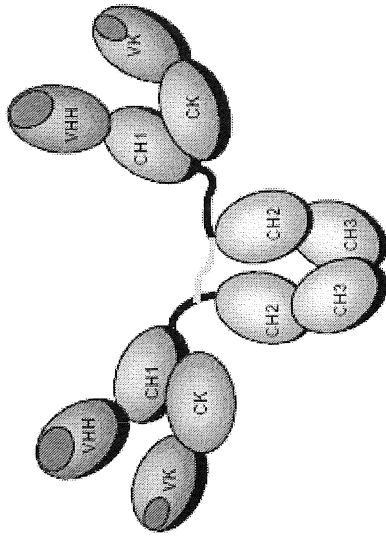
19. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó có ái lực gắn kết với IL-17A của người được đặc trưng bởi hằng số K_D nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-10} M.
20. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó hằng số kết hợp động học $k_{on}(1/Ms)$ đối với IL-17A của người không nhỏ hơn 10^5 1/Ms.
21. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó hằng số phân ly động học $dis(1/s)$ đối với IL-17A của người không lớn hơn 10^{-5} 1/s.
22. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó ức chế hoạt tính của IL-17A của người không nhỏ hơn 50%.
23. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó được sản sinh bởi tế bào động vật có vú, tế bào nấm men hoặc tế bào vi khuẩn.
24. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung trong vùng Fc so với vùng Fc tự nhiên, trong đó sự thay thế này cải thiện các tính chất lý-hóa và dược động học của kháng thể, so với kháng thể có vùng Fc tự nhiên, và không làm mất khả năng gắn kết của kháng thể với IL-17A.
25. Mảnh của kháng thể theo điểm 1, trong đó mảnh này được thể hiện bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng là một phần của trình tự kháng thể, bao gồm cả biến thể kháng thể đặc hiệu sinh học.
26. Mảnh của kháng thể theo điểm 1, trong đó mảnh này được thể hiện bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng là các phần của mảnh Fab.
27. Mảnh của kháng thể theo điểm 1, trong đó mảnh này được thể hiện bằng chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, và các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng là các phần của mảnh scFv.
28. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27, bao gồm các pha được chọn từ các pha sau đây: phương pháp gây

đột biến định hướng, phương pháp biểu hiện, phương pháp kỹ thuật di truyền, phương pháp hóa sinh và công nghệ sinh học có tính năng cao đã được biết rõ trong lĩnh vực này, có thể bao gồm cả phương pháp gây đột biến định hướng ở các vị trí khác nhau của miền VHH của kháng thể *Camelidae*.

29. Cấu trúc ADN mã hóa kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27.
30. Vector biểu hiện chứa một hoặc nhiều cấu trúc ADN theo điểm 29.
31. Dòng tế bào chứa vector biểu hiện theo điểm 30 hoặc cấu trúc ADN theo điểm 29.
32. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng được làm giống như ở người hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27 bao gồm bước ủ dòng tế bào theo điểm 31 trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện đủ để thu được kháng thể hoặc mảnh của nó, sau đó phân lập và tinh chế kháng thể thu được hoặc mảnh có hoạt tính của nó.
33. Tế bào chủ được phân lập chứa vector theo điểm 30.
34. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27 bao gồm bước ủ dòng tế bào được phân lập theo điểm 33 trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện đủ để thu được kháng thể hoặc mảnh của nó, sau đó phân lập và tinh chế kháng thể thu được hoặc mảnh có hoạt tính của nó.
35. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27 kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.
36. Dược phẩm theo điểm 35, trong đó dược phẩm này còn chứa các thành phần có hoạt tính dược lý được chọn từ các chất ức chế TNF- α .

Cao kháng thể dễ bay hơi tất cả phức
tạp dựa trên đột biến VHH

4

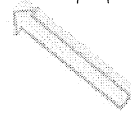
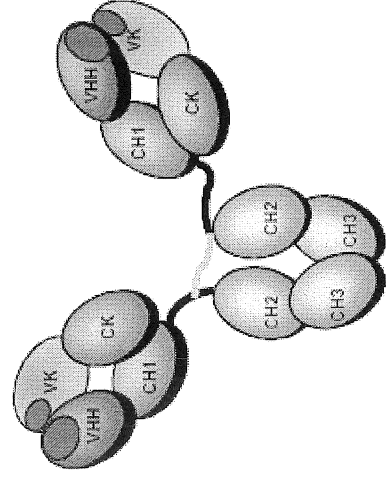


Đột biến di truyền
học 44 +45 VHH
vị trí và kết hợp với
các phiên bản khác
nhau của ánh sáng

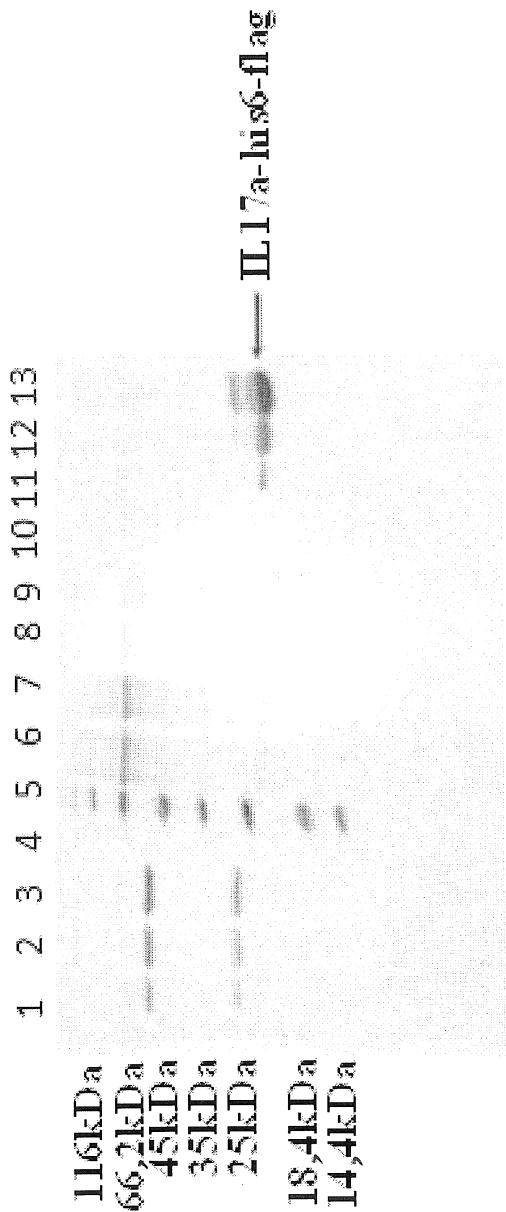
VHH



VL

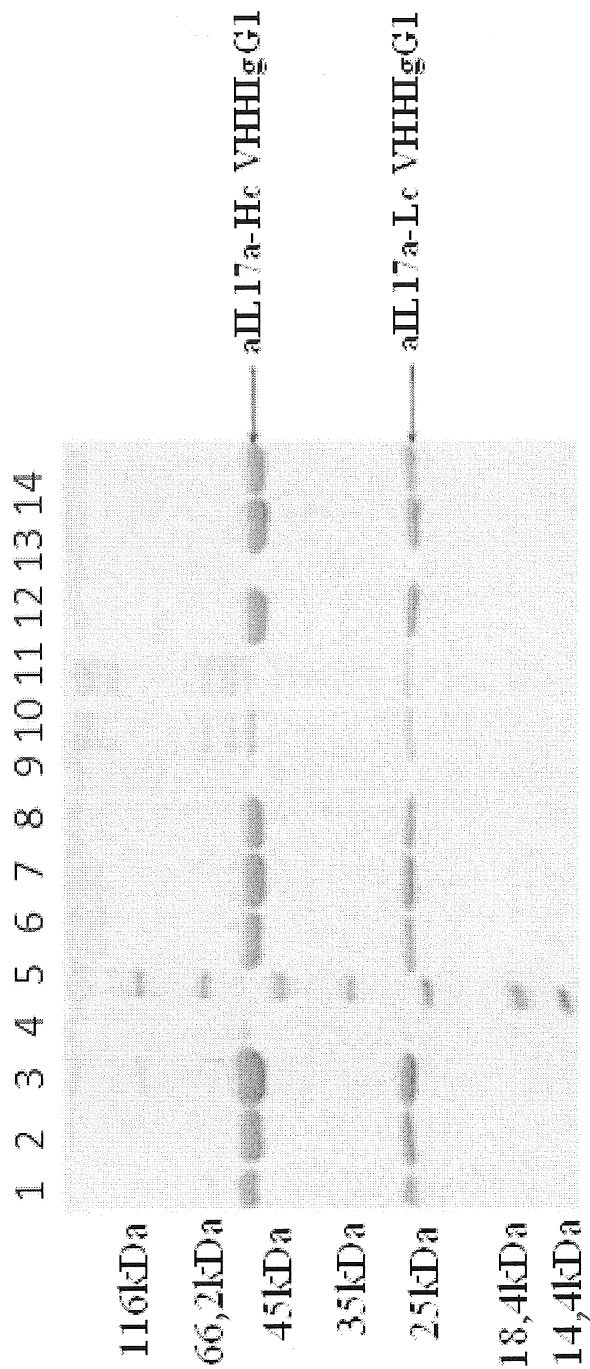


Hiện thị các thư viện và chăn nuôi
trong điều kiện khắc nghiệt và kiểm
tra kỹ thuật hiệu suất cao, bao gồm cả
kiểm tra kết nối và sự ổn định tổng
thể



A- chuẩn bị tái tổ hợp IL17A-His6-FLAG người đàn ông (15% PAGE+ β -ME).

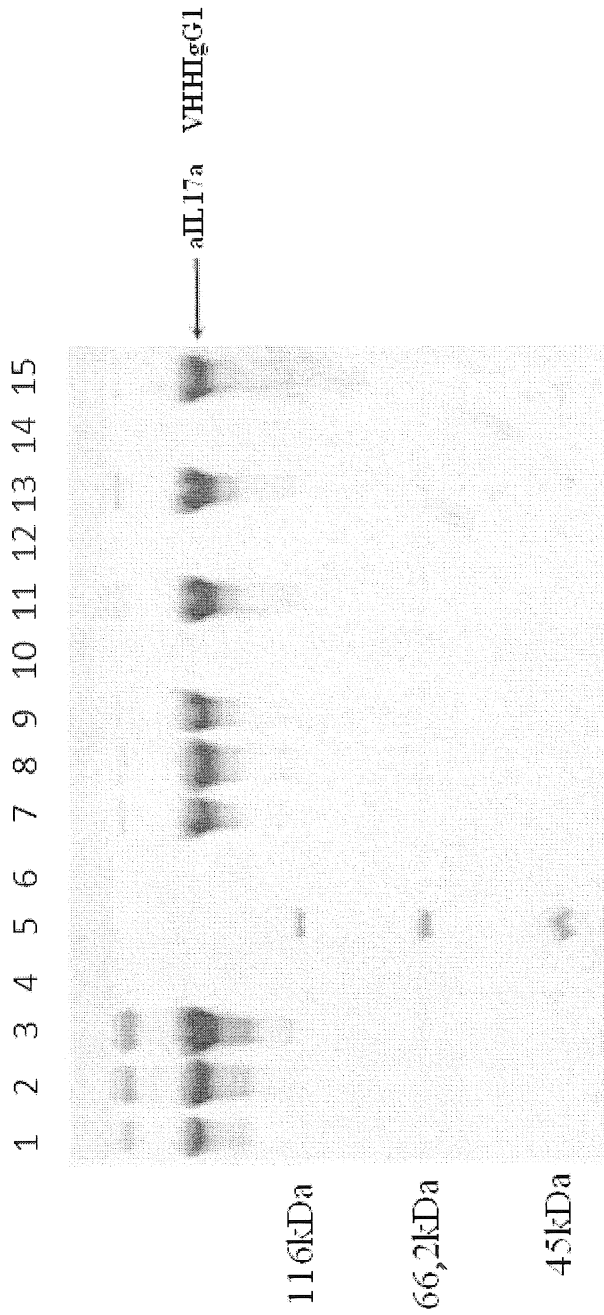
- | | |
|--|---------------------|
| 1) 9E10 0,25 mkl + β -ME | 8) Làm sạch 1 |
| 2) 9E10 0,5 mkl + β -ME | 9) Làm sạch 2 |
| 3) 9E10 1 mkl + β -ME | 10) Làm sạch 3 |
| 4) --- | 11) Kết nối 2,5 mkl |
| 5) Trích xuất các chỉ số có sản phẩm nào | 12) Kết nối 5 mkl |
| 6) Môi trường trước khi áp dụng | 13) Kết nối 10 mkl |
| IMACBioRad | |
| 7) Môi trường sau khi về IMACBioRad | |



B - ma túy VHHIgG1 với các thay thế axit amin khác nhau ở vị trí 45 VHH tên miền (12% PAGE+ β -ME).

as

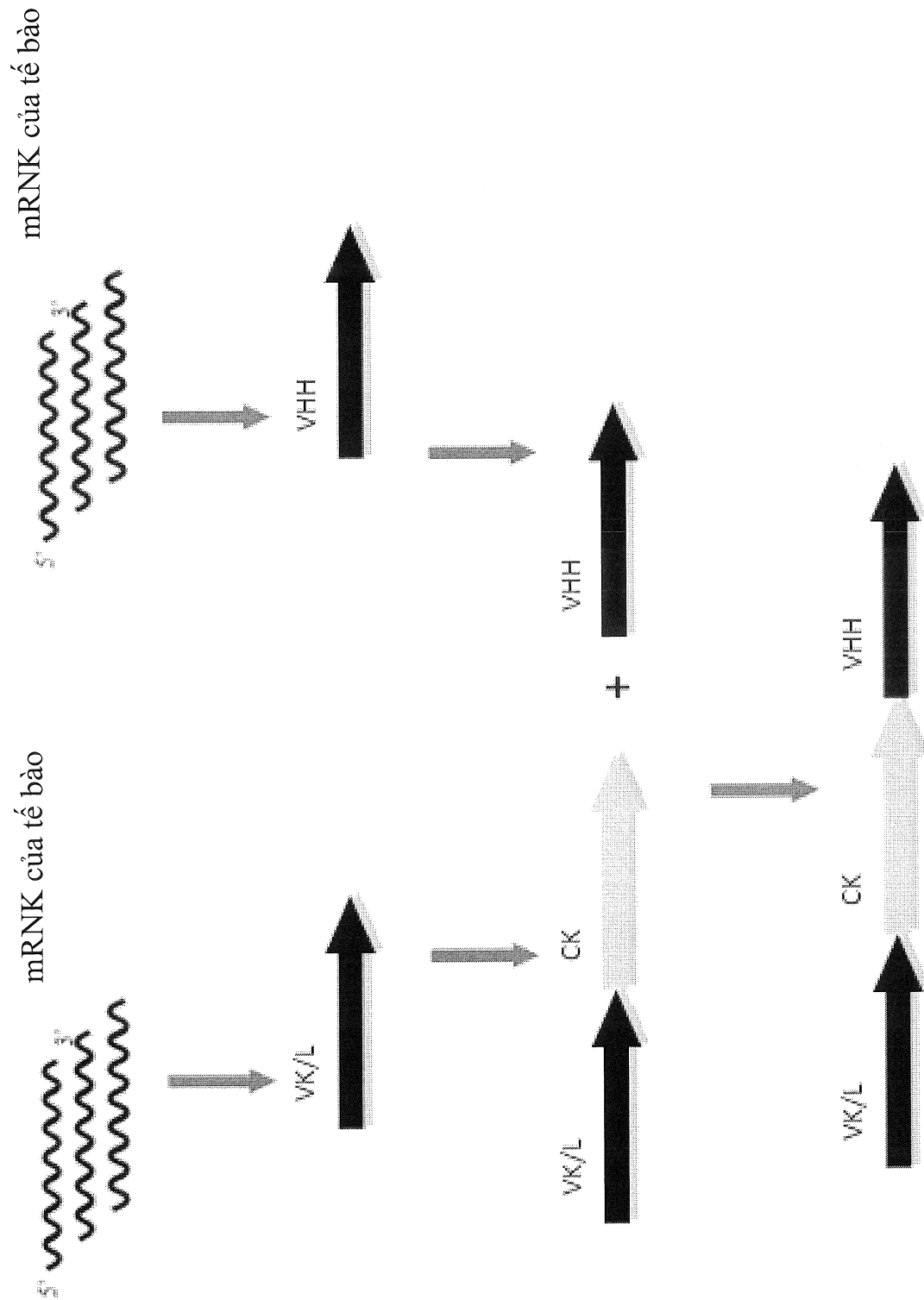
- | | |
|---|---|
| 1) Kiểm tra IgG1 2,5 mkl | 9) - |
| 2) Kiểm tra IgG1 5 mkl | 10) VHHIgG1 aLL17 G45/K8 kj trước khi 5 mkl |
| 3) Kiểm tra IgG1 10 mkl | 11) VHHIgG1 aLL17 G45/K8 kj sau khi 5 mkl |
| 4) - | 12) VHHIgG1 aLL17 G45/K85 mkl |
| 5) <u>Fermentas Marker PW không màu (không nhuộm)</u> | 13) - |
| 6) VHHIgG1 aLL17 A45/K8 5 mkl | 14) VHHIgG1 aLL17 H45/K8 5 mkl |
| 7) VHHIgG1 aLL17 D45/K8 5 mkl | 15) VHHIgG1 aLL17 I45/K8 5 mkl |
| 8) VHHIgG1 aLL17 F45/K8 5 mkl | |

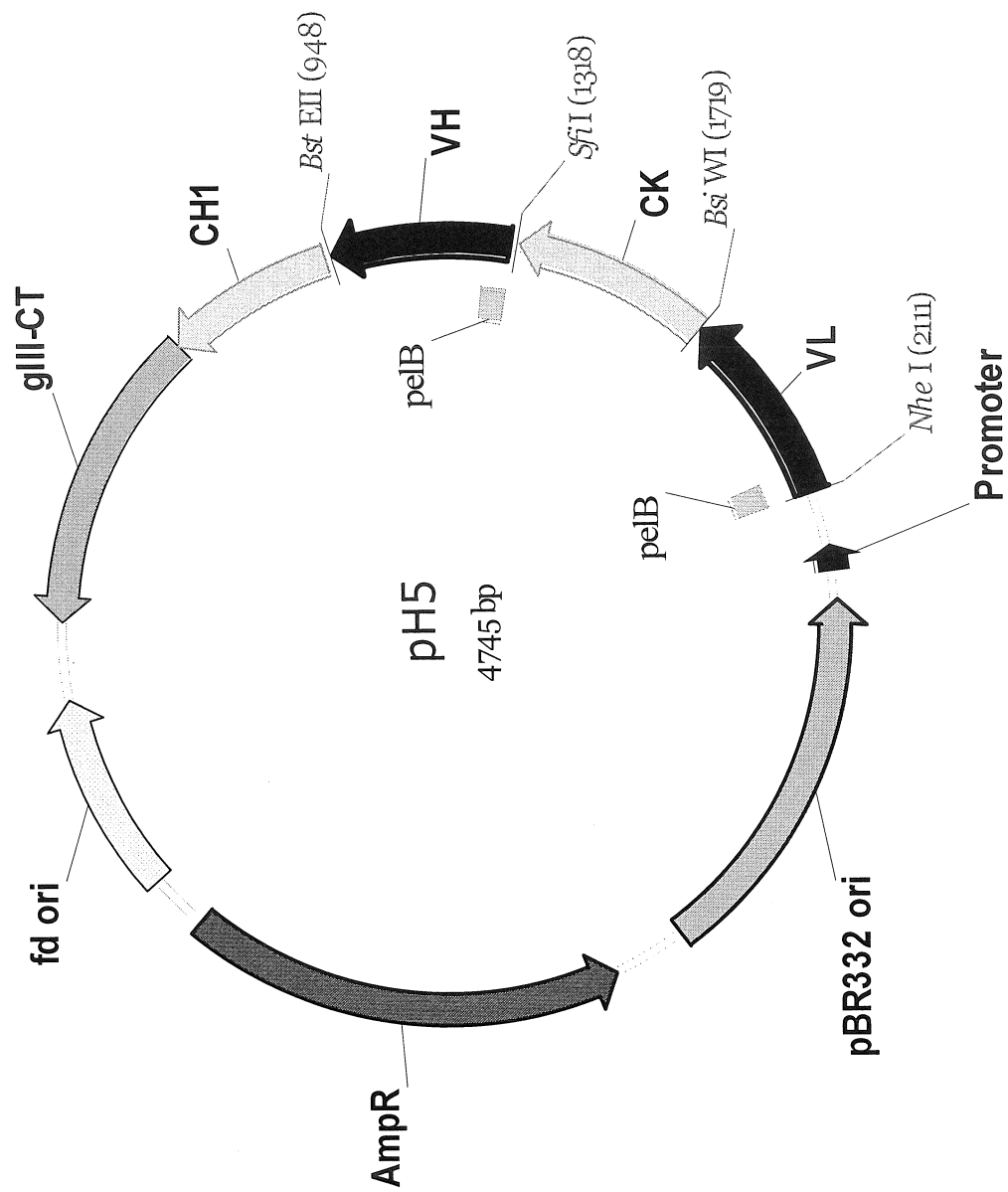


C - ma túy VHHIgG1 với các thay thế axit amin khác nhau ở vị trí

45 VHH tên miền (8% PAGE 6e3 β-ME)

- | | | | |
|---|---------|--------------------------|--------------------|
| 1) Kiểm tra IgG1 | 2,5 mkl | 9) VHHIgG1 aLL17 F45/K8 | 5 mkl |
| 2) Kiểm tra IgG1 | 5 mkl | 10) - | |
| 3) Kiểm tra IgG1 | 10 mkl | 11) VHHIgG1 aLL17 G45/K8 | kj trước khi 5 mkl |
| 4) - | | 12) - | |
| 5) <u>Fermentas Marker PW không màu</u> | | 13) VHHIgG1 aLL17 H45/K8 | kj sau khi 5 mkl |
| 6) - | | 14) - | |
| 7) VHHIgG1 aLL17 A45/K8 | 5 mkl | 15) VHHIgG1 aLL17 I45/K8 | 5 mkl |
| 8) VHHIgG1 aLL17 D45/K8 | 5 mkl | | |





A**1VHH**

QVQLQQSGGGSVQTGGSLTLTCAASGLTFEANS LGWFRQSPGKEREFVA AVSFTKRIDYADS
 VKGRFTISRDNMTMNTVY LQMNSLKPEDTGIYTCAADPLLI SNKRANI-----
 WGQGTMTVTVSS

2VHH

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASPRVISIHDMAWYRQAPGKERELVAGITTRGITDYGYS
 VKGRFTISRDDAKNTLFLQMNDLKPEDTAVYYCNLRHYEV-----
 WGQGT LVTVSS

3VHH

QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWFRQAPGKEREGVAAISP SGGDRIYDD
 SVKGRFTISRDNAGYFIYLQMNSLKPEDTARYYCAVRRRFDGTSYYTG DYDSWGQGT LVTVS
 S

B

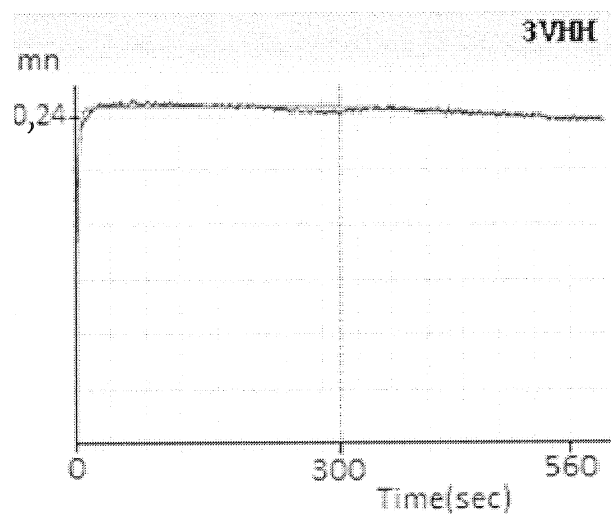
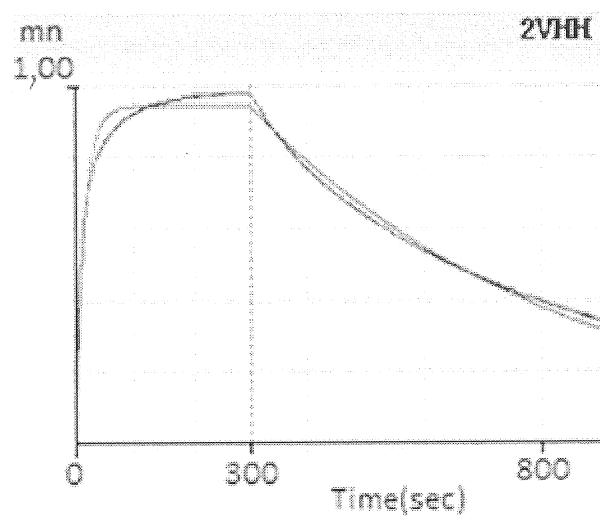
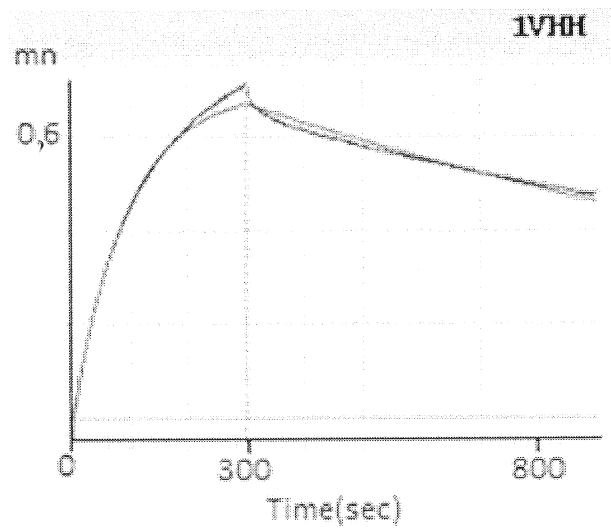
VK4B11 DVVMTQSPSSVTASAGETVTINCKSSQSVAYKSNQKNYLAWYQORPGQSPRLLIYY
 ASTRTSGVPDRFSGSGSTTDFTLTIS SFQPEDAAVYYCQOGYSAPYSFGSGTKLEIK

VLB5

AVLTQLSSMSGSPGQTVTITCTGSITNIGQYRVNWYQHLPGTAPKLLIYSNANRVSGVPDRF
 SGSKSGSTASLT IAGVQAED EADYYCSAWDGSLNGYVFGGGTKVTVLQR

VL F4 QAVLTQPPSVSGSPGQTVTISCTGTSDDVGSGNYVSWYQQVPGMAPKLLIYNAGTRRA
 GITGRFSASKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCASYRKINKYVFGGGTKLTVLQR

C



Wild 3VHHFab

QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKERE
 FVAAISPSGGDRIYDDSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARYY
 CAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLLTVSS

mut1

QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGLE
 FVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARYY
 CAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLLTVSS

mut2

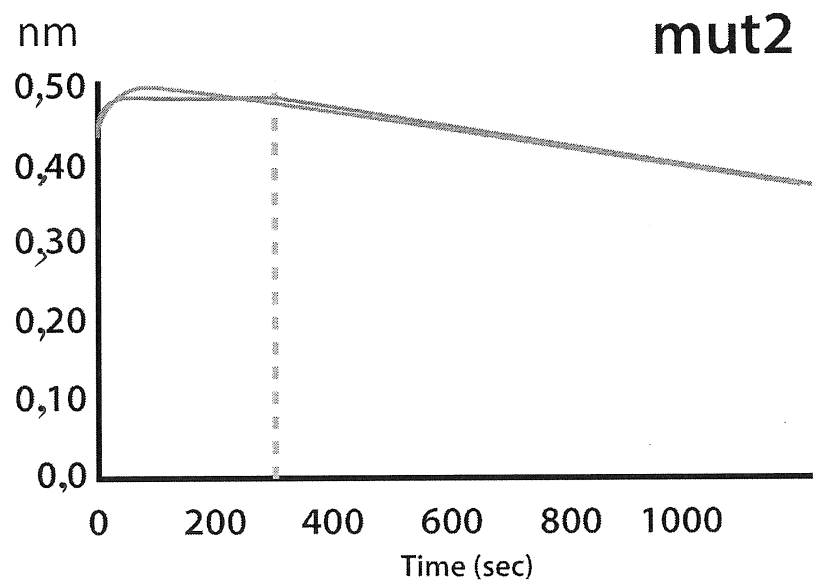
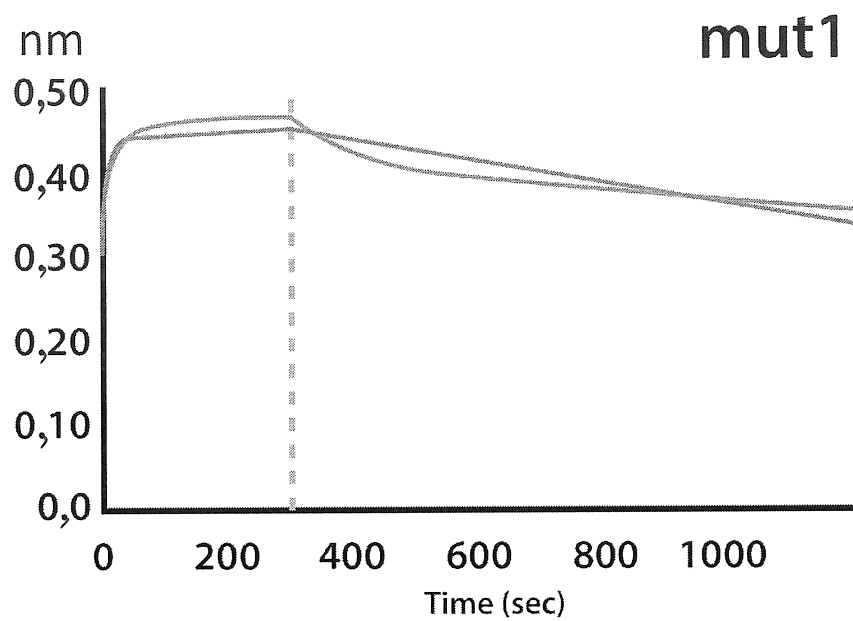
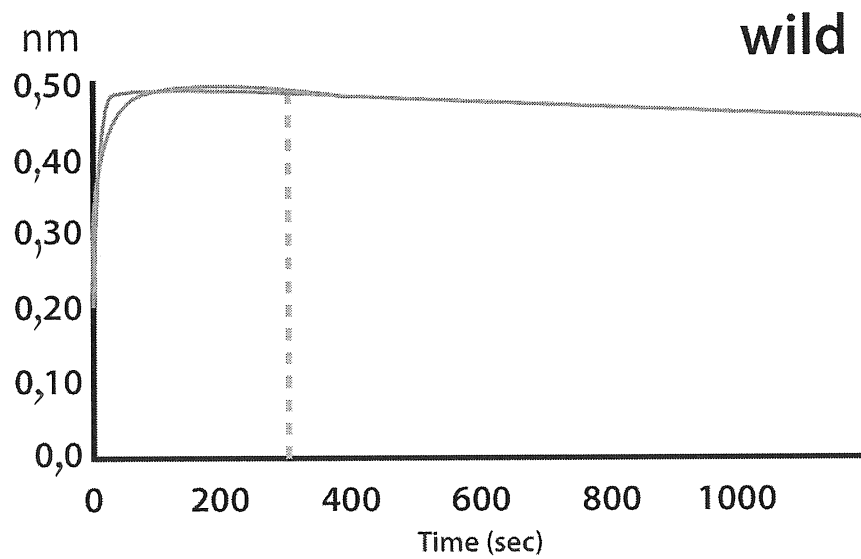
QVQLQQSGGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGRE
WVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARY
 YCAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLLTVSS

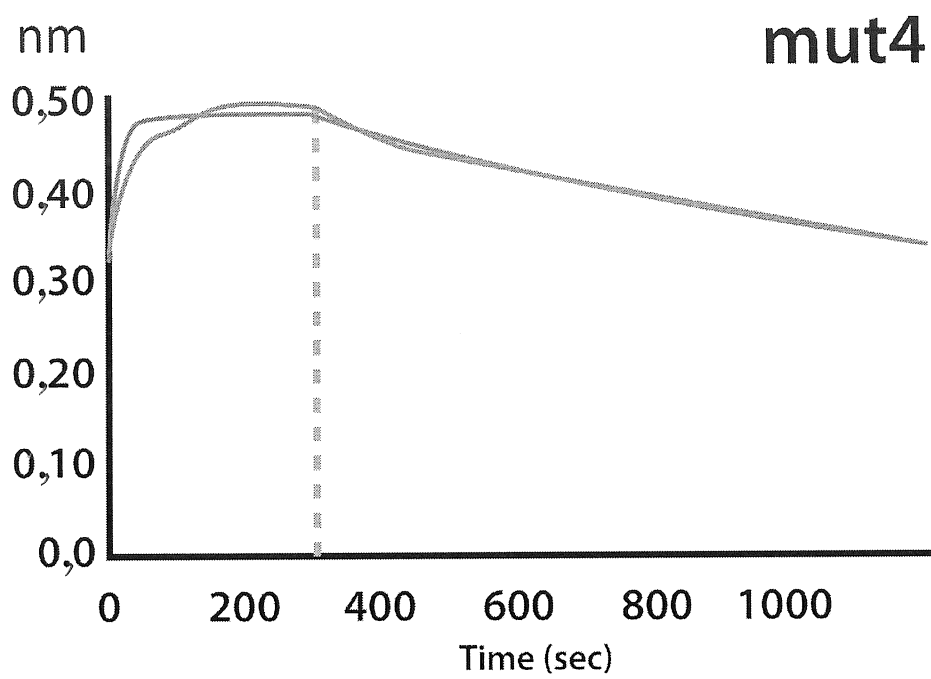
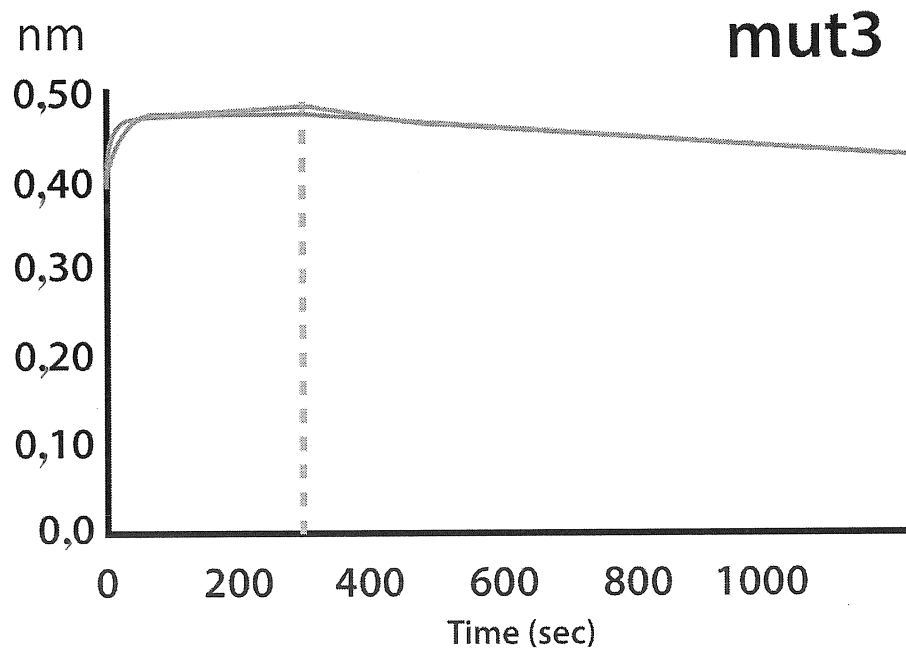
mut3

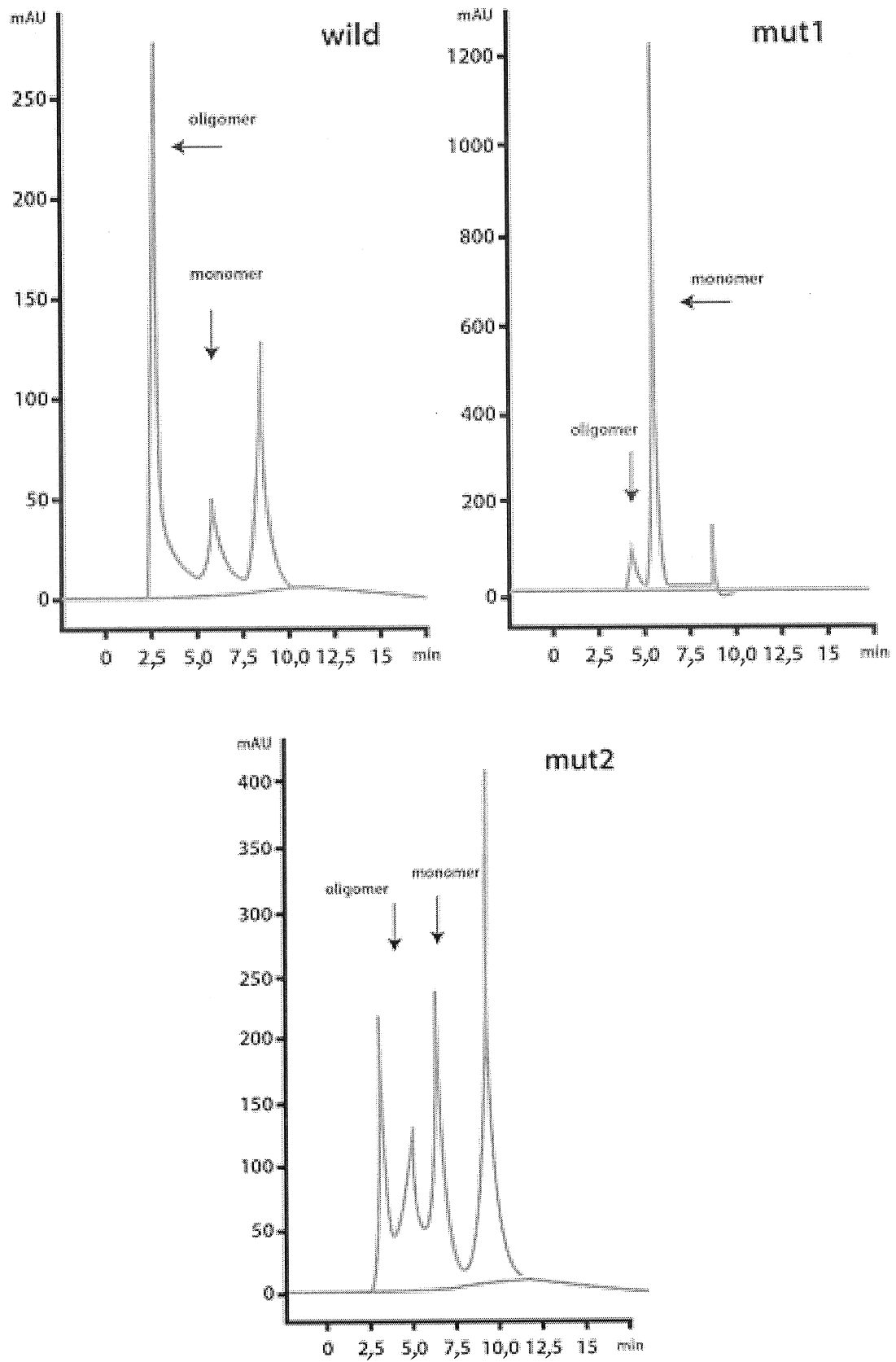
QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKLEF
 VAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARYY
 CAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLLTVSS

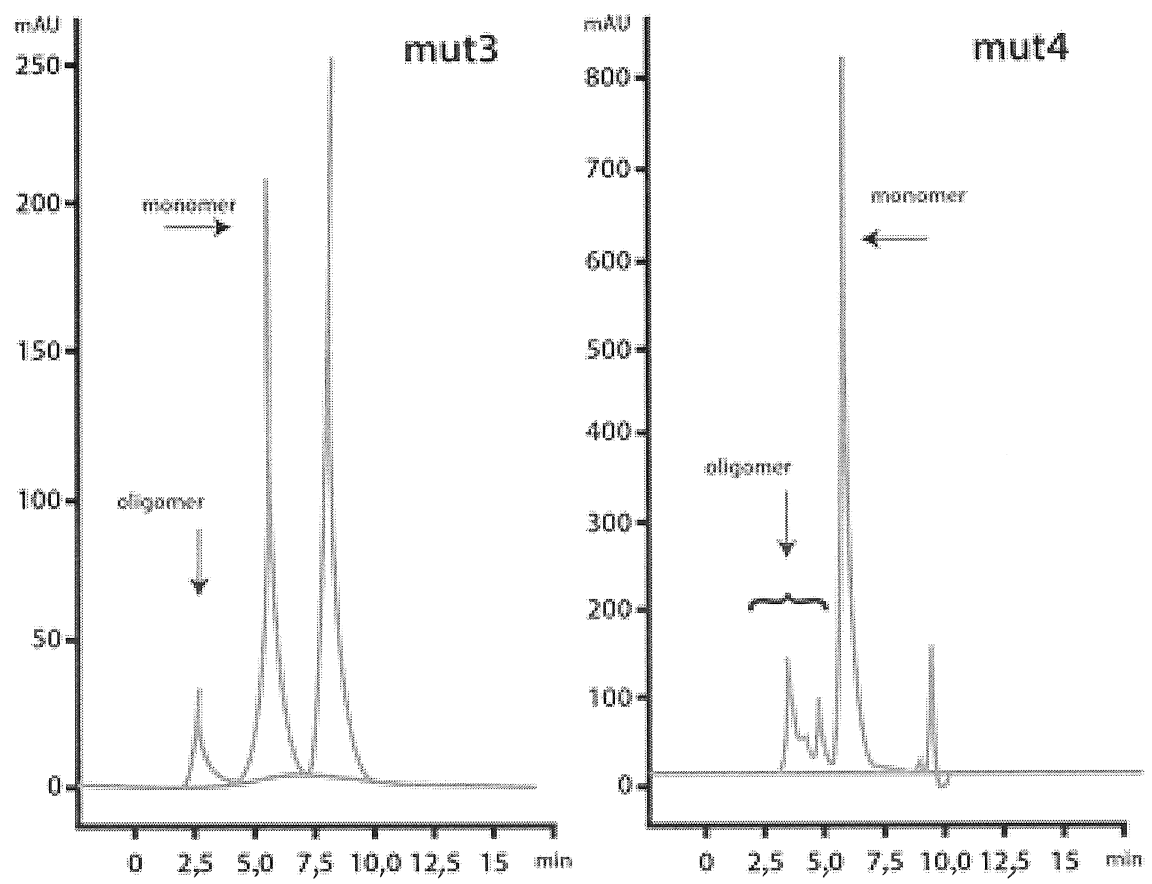
mut4

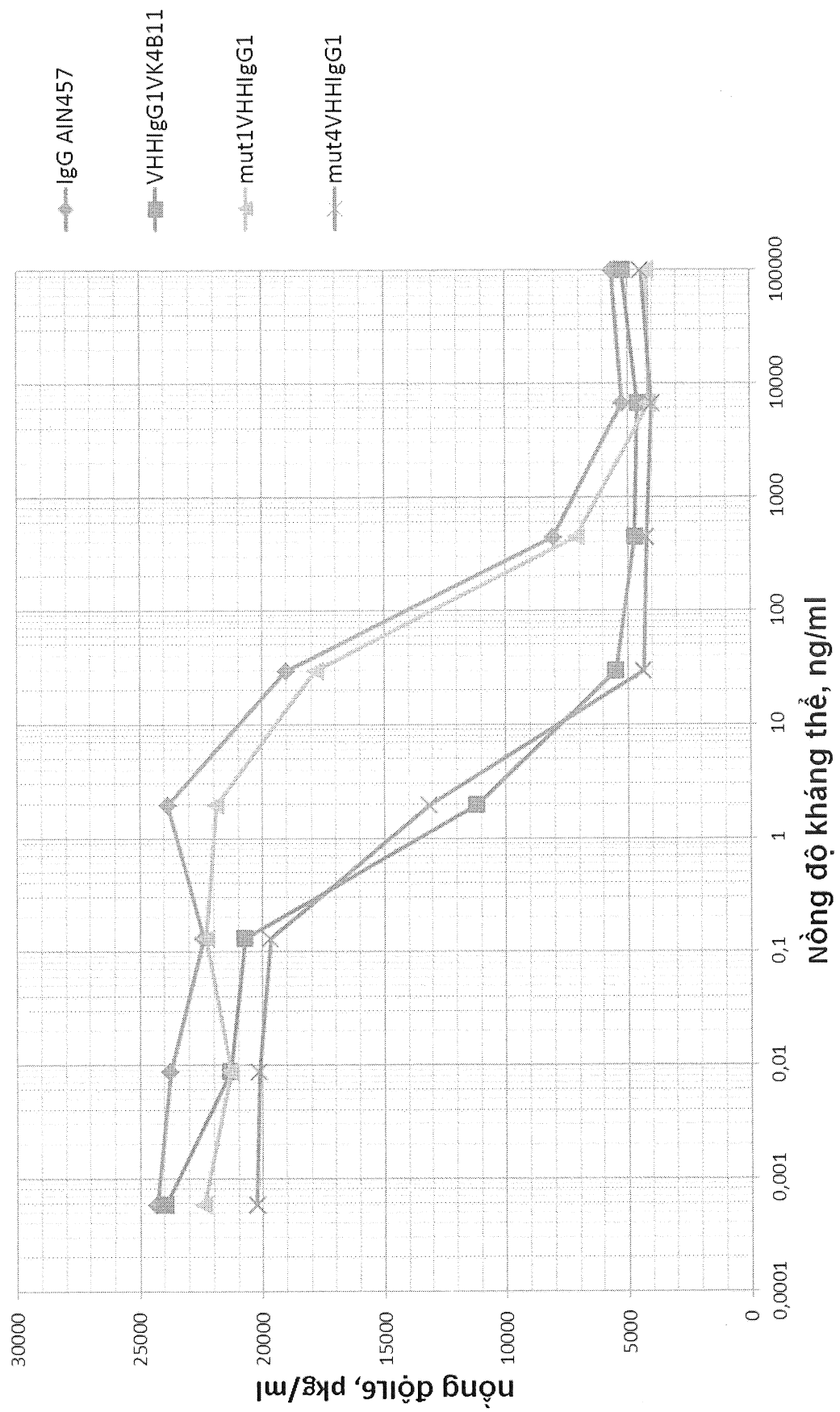
QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGRE
 FVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLMNSLKPEDTARYY
 CAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLLTVSS

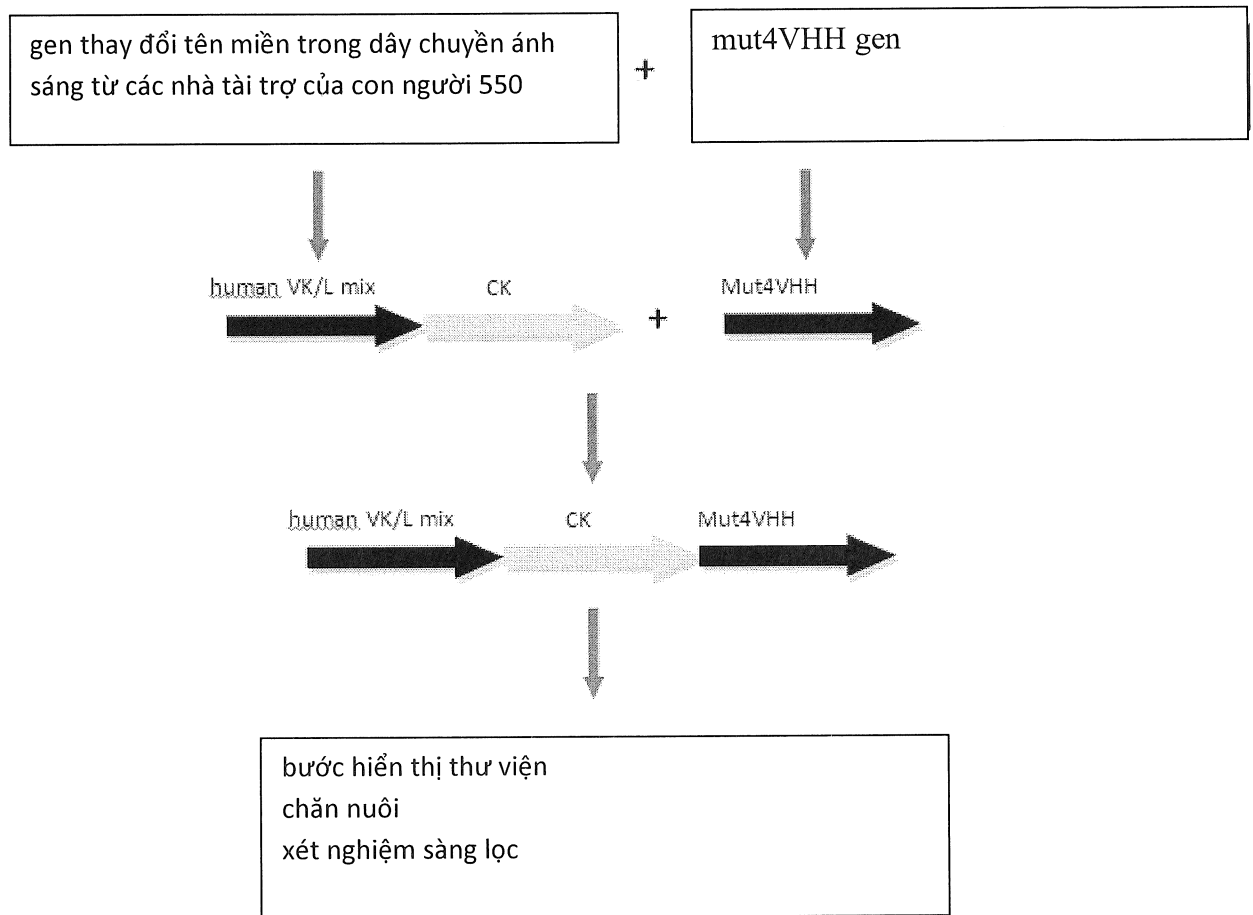












B

VK1A7

EIVLTQSPASLSASVGDRVDITCQASQSINNKIAWYQQKPGKPPKVLIYAASKLP
 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYYCLQDYNWPWTFGAGTKLEIK

VK3c18

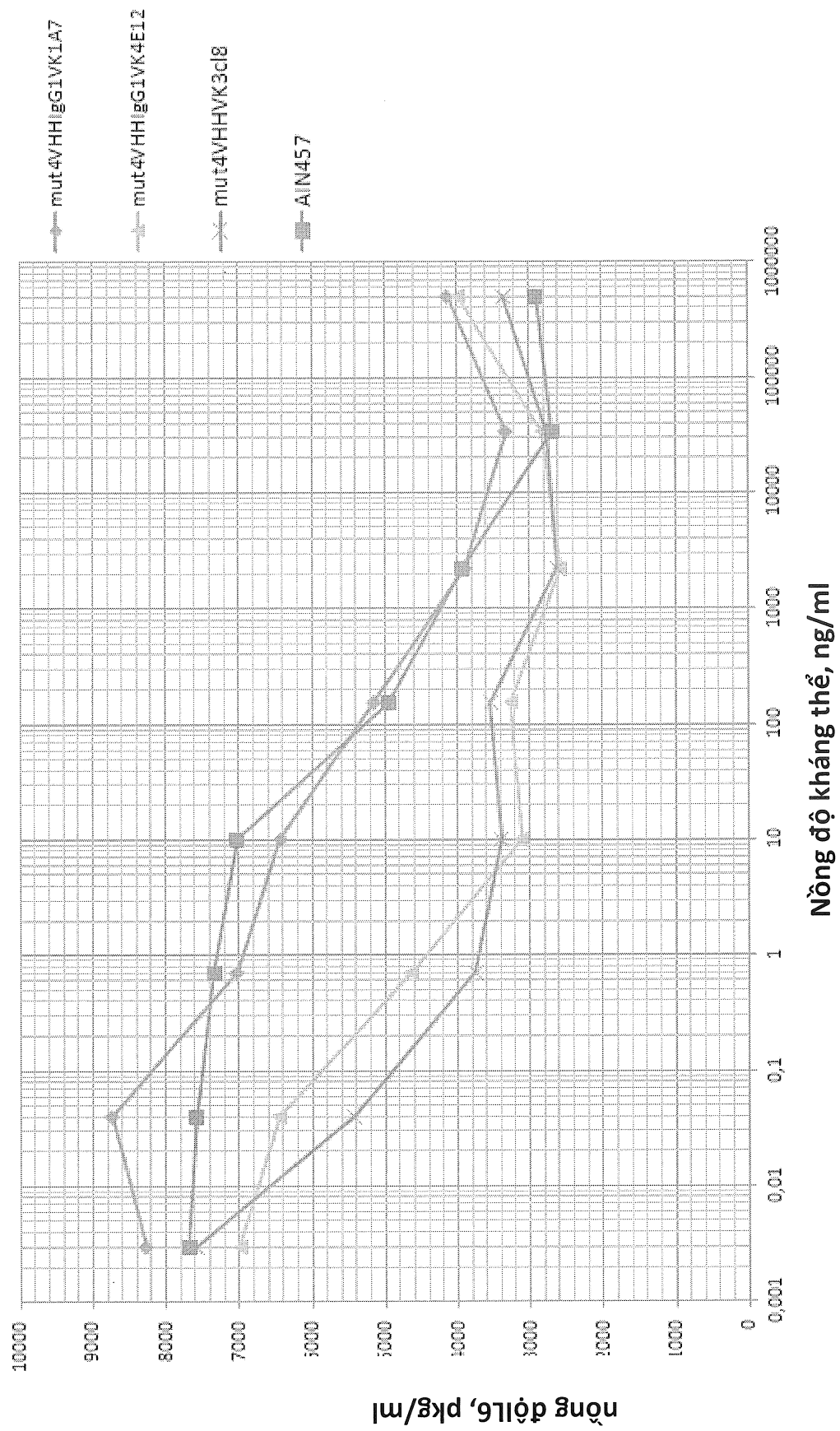
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSR
 ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSYSPVTFGQGTKVEIK

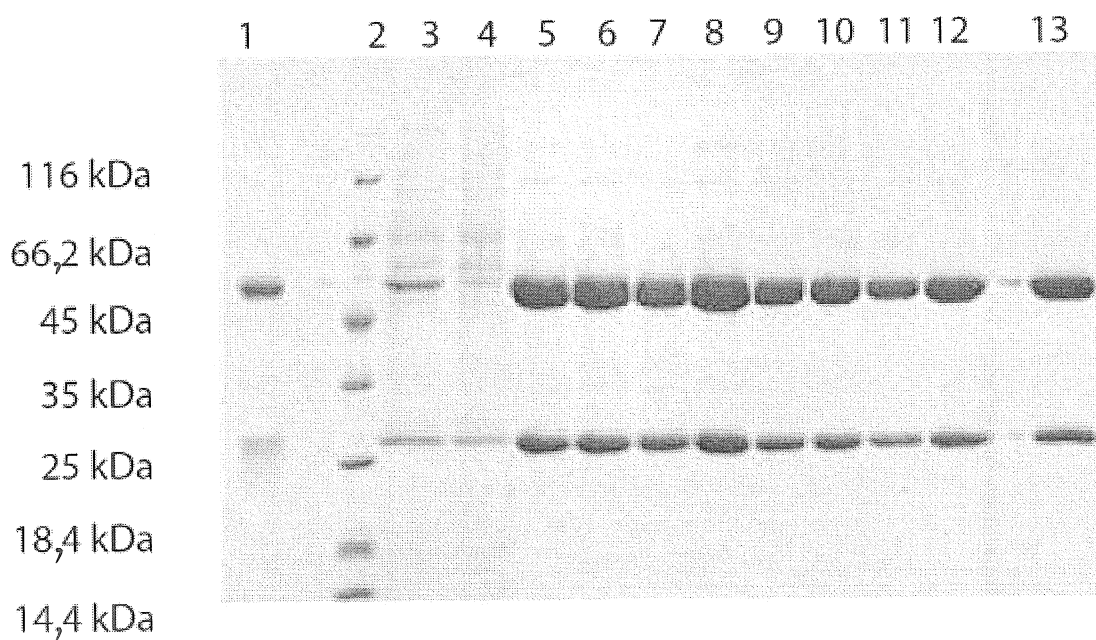
VK3c118

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
 ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSYYPVTFGQGTKVEIK

VK4E12

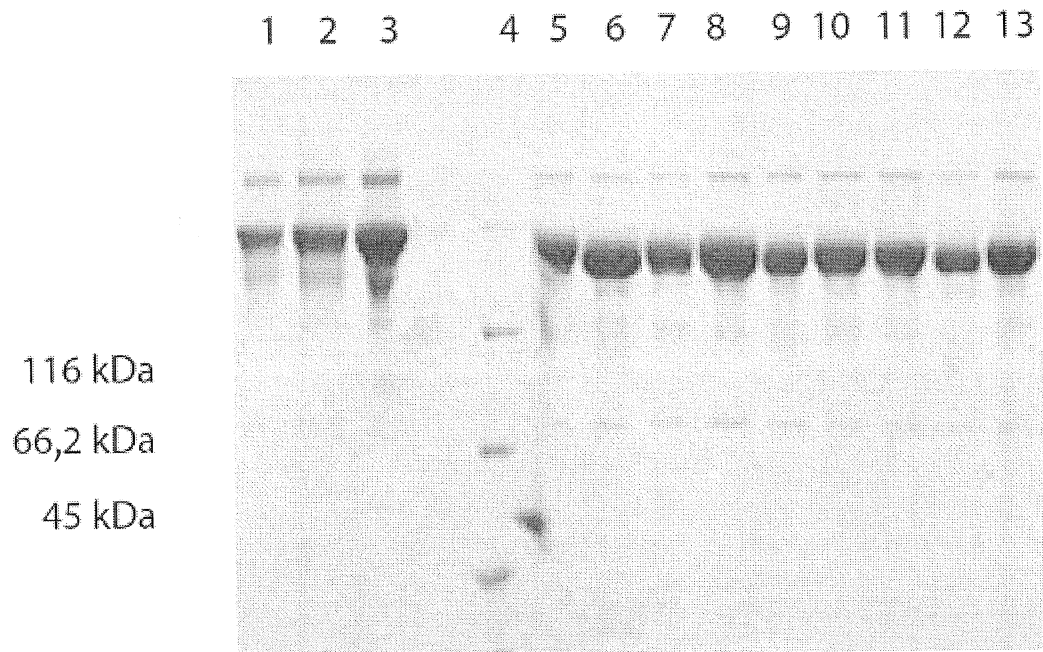
DIQLTQSPSSLSASAGETASINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
 WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDAAVYYCQQGYSTPHTFGQGTKV
 EIK





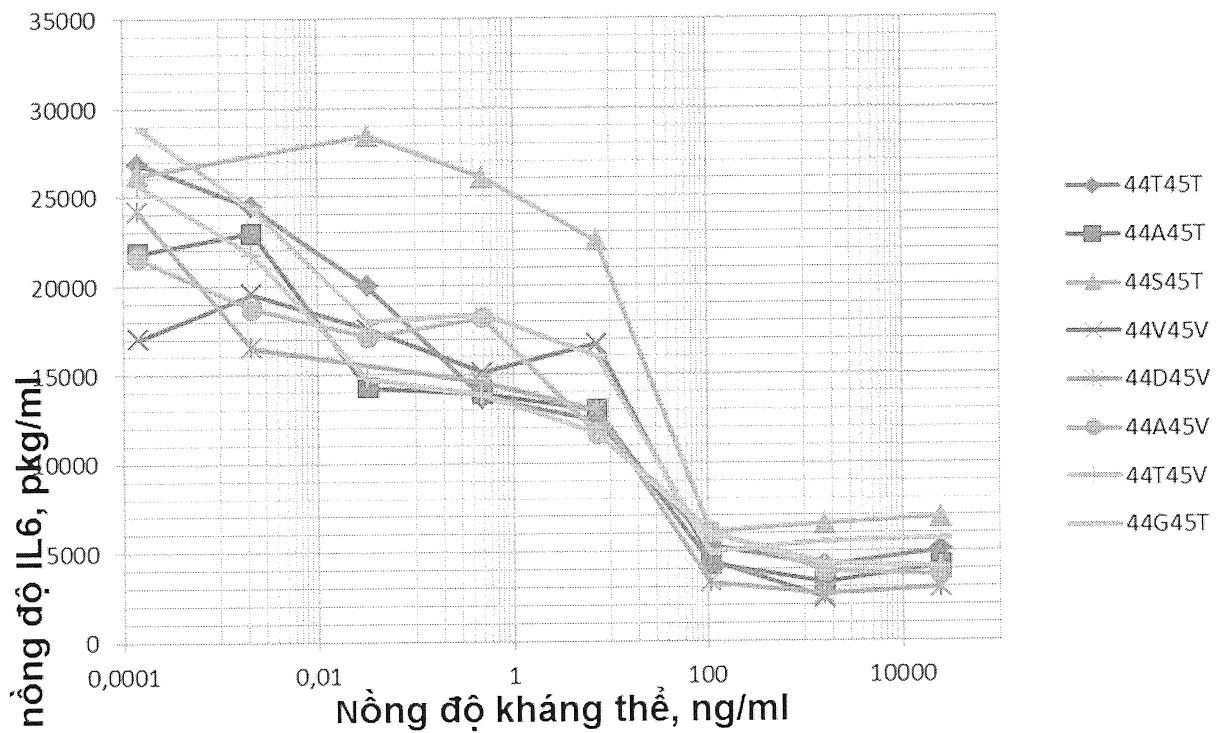
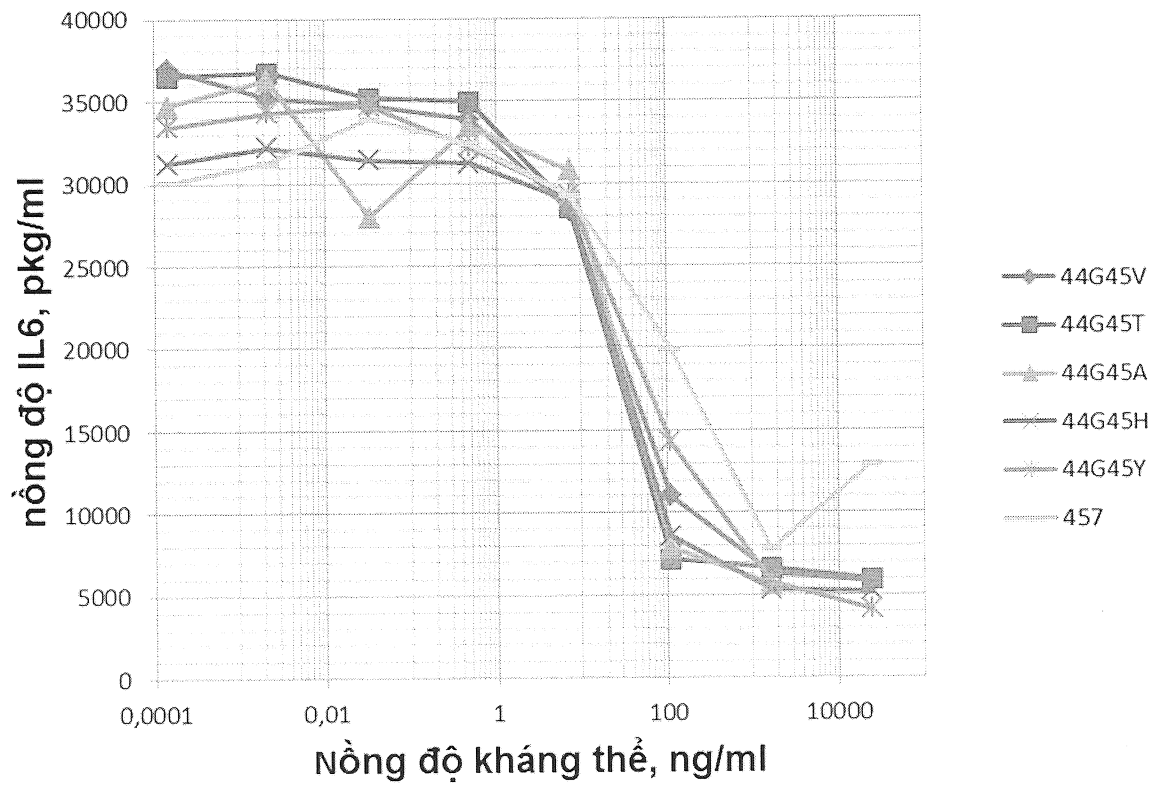
Chất lỏng điện 12% PAGE+ β -ME

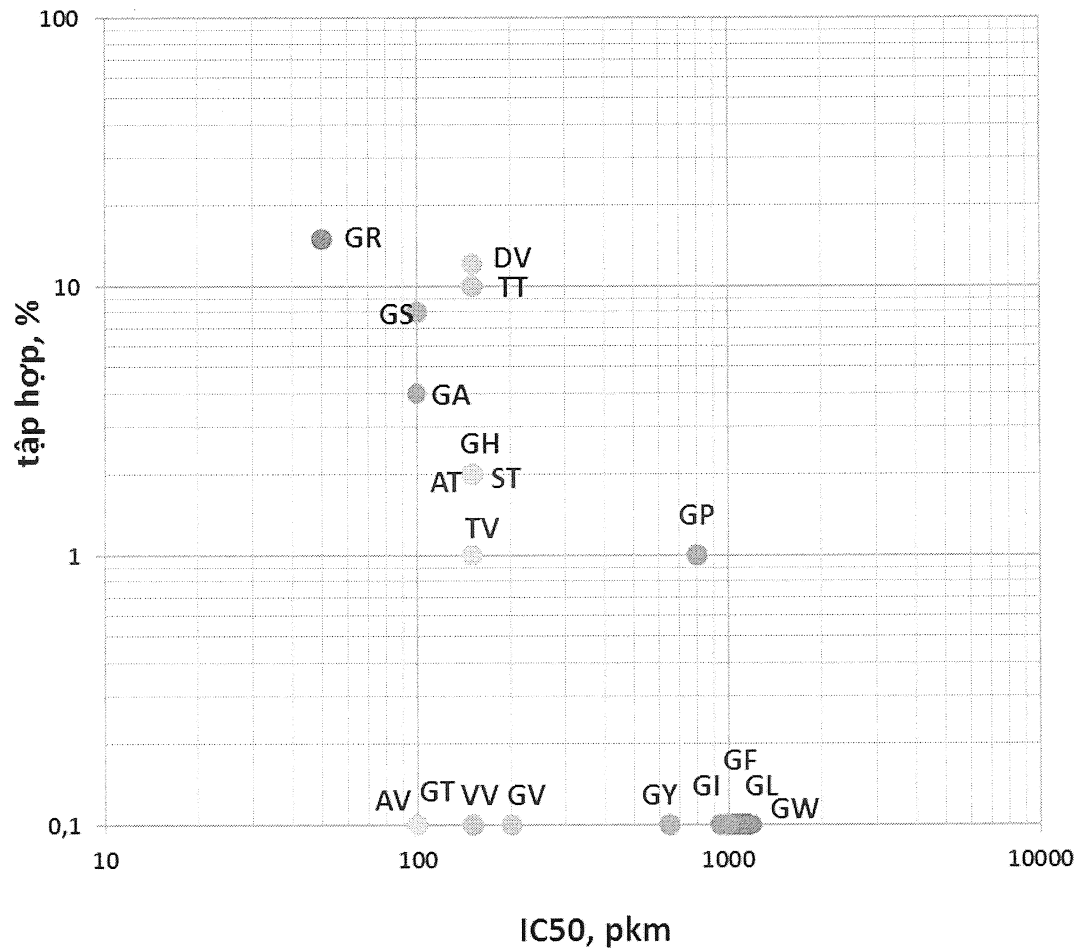
- | | |
|---|----------------------------------|
| 1) Kiểm soát IgC1 | 2,5 mkg |
| 2) <i>Fermentas Marker PW không màu (không nhuộm)</i> | |
| 3) 44V45TVHHIgG1c8 | lên đến 10 hấp mkl |
| 4) 4V4STVHHIgG1c8 | Sau khi thanh toán bù trừ 10 mkl |
| 5) 4V45TVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 6) 44D45TVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 7) 44T45TVHHIgG1cS | 5 mkl |
| 8) 44A45TVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 9) 44S45TVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 10) 44V45VVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 11) 44D45VVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 12) 44A45VVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 13) 44T45VVHHIgG1c8 | 5 mkl |



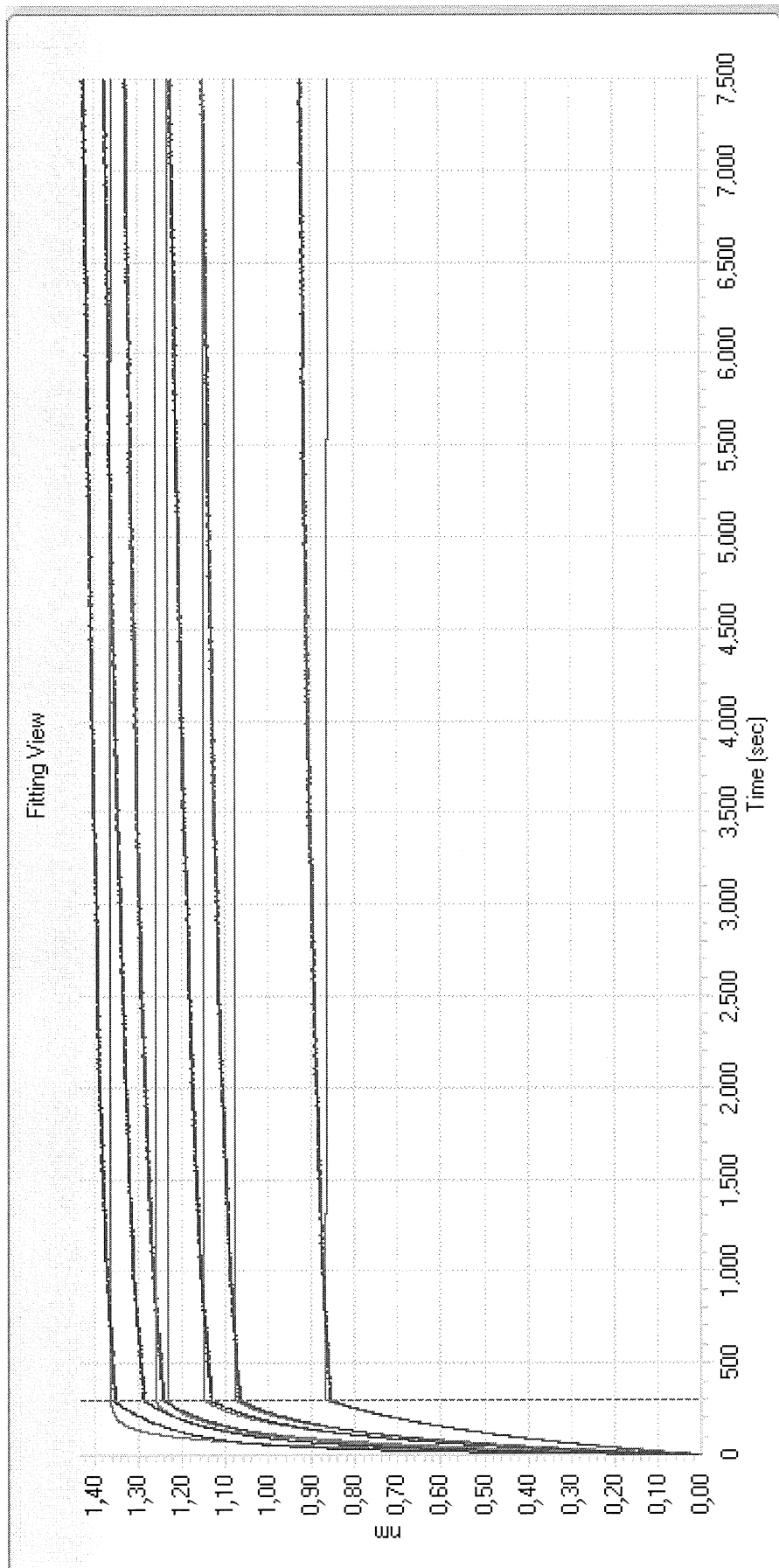
Chất lỏng điện 12% PAGE+ β -ME

- | | |
|---|---------|
| 1) Kiểm soát IgC1 | 2,5 mkl |
| 2) Kiểm soát IgC1 | 5 mkl |
| 3) Kiểm soát IgC1 | 10 mkl |
| 4) <u>Fermentas Marker PW không màu (không nhuộm)</u> | |
| 5) 44V45TVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 6) 44D45TVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 7) 44T45TVHHIgG1cS | 5 mkl |
| 8) 44A45TVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 9) 44S45TVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 10) 44V45VVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 11) 44D45VVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 12) 44A45VVHHIgG1c8 | 5 mkl |
| 13) 44T45VVHHIgG1c8 | 5 mkl |





Đậm tiêu tan dòng đánh dấu sự kết hợp lái xe ổn định giá trị tối đa tiêu cầu cân bằng và chức năng hoạt động. Một dòng tiêu tan nhạt là đạt yêu cầu tiêu cầu giá trị ổn định trong khi duy trì khả năng tương thích cao.

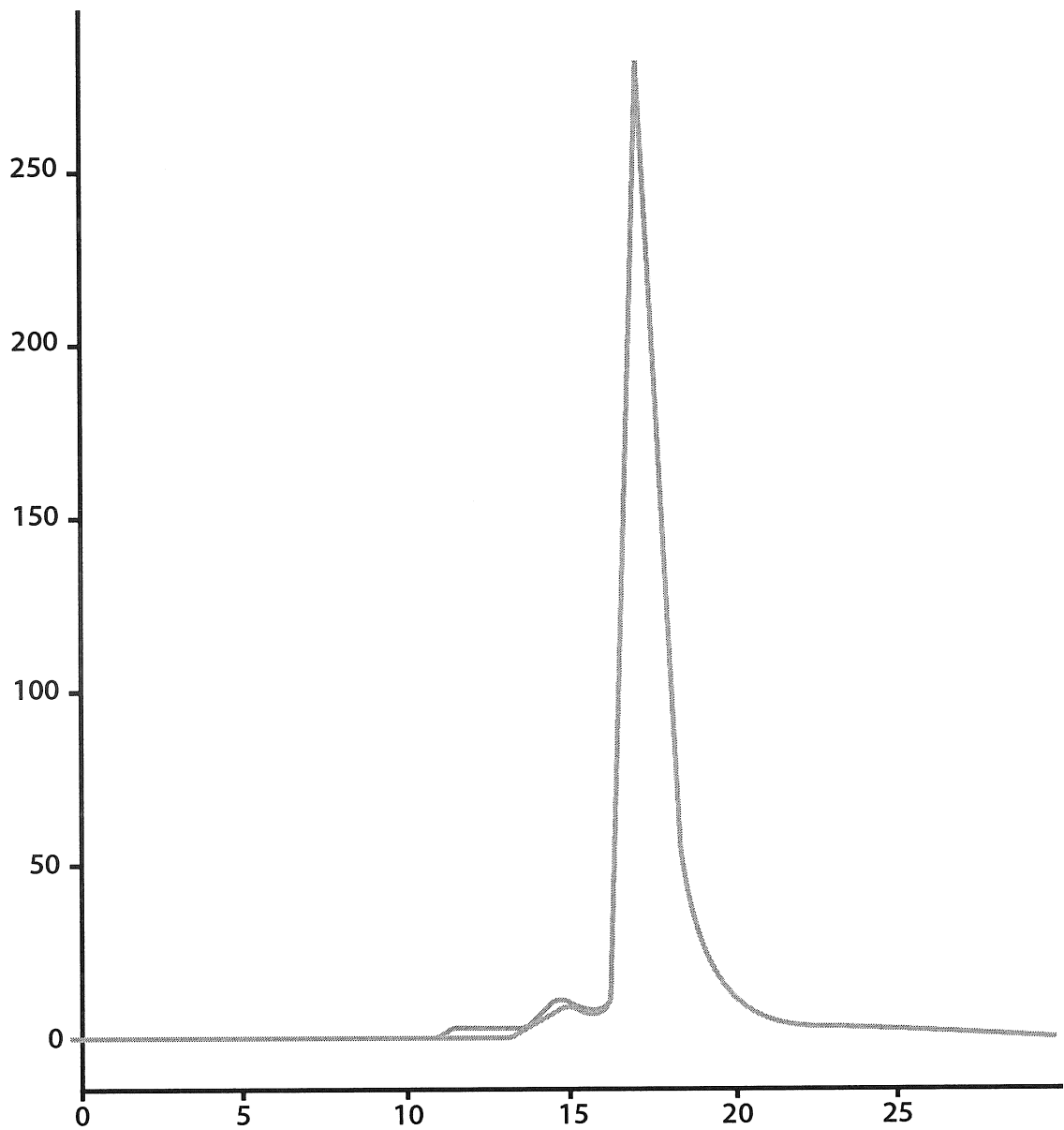


chống -IL17ABCD-109 cIL17 F người

Conc. (nM)	Đáp ứng	KD (M)	kon(1/Mc)	konError	kdis(1/c)	kdisError	Full R^2
68,6	1,2363	<1,0E-12	2,00E+05	3,28E+03	<1,0E-07		0,383582
34,3	1,06	<1,0E-12	2,61E+05	3,72E+03	<1,0E-07		0,744563
17,1	0,845	4,40E-12	2,82E+05	6,65E+03	1,24E-06	2,61E-07	0,775434

chống -IL17A BCD-109 c IL17 F với khi

Conc. (nM)	Đáp ứng	KD (M)	kon(1/Mc)	konError	kdis(1/c)	kdisError	Full R^2
68,7	1,3497	<1,0E-12	3,24E+05	3,22E+03	2,36E-07	1,71E-07	0,672159
34,4	1,2814	<1,0E-12	4,26E+05	8,35E+03	<1,0E-07		0,061979
17,2	1,127	<1,0E-12	5,71E+05	7,48E+03	<1,0E-07		0,753773



----- Các hồ sơ đồ hòa của kháng thể kháng nhiệt

----- Các hồ sơ đồ hòa của các kháng thể sau khi hệ thống sưởi

Nồng độ kết nối liên kết khoảng 10 mg/ml của PBS.