



(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)



1-0036406

(51)^{2017.01} A61K 39/395; A61K 49/00; A61K 49/16; A61K 49/22; A61K 51/10; A61P 1/04; A61P 1/12; A61P 11/00; A61P 11/06; A61P 17/00; A61P 17/06; A61P 17/14; A61P 19/02; A61P 19/08; A61P 25/00; A61P 27/02; A61P 29/00; A61P 31/04; A61P 37/06; A61P 37/08; A61P 7/06; C07K 16/24; A61K 47/68 (13) B

(21) 1-2019-01775

(22) 08/09/2017

(86) PCT/CN2017/101083 08/09/2017

(87) WO 2018/050028 A1 22/03/2018

(30) 201610827097.2 14/09/2016 CN

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/06/2019 375A

(73) BEIJING HANMI PHARM. CO., LTD. (CN)

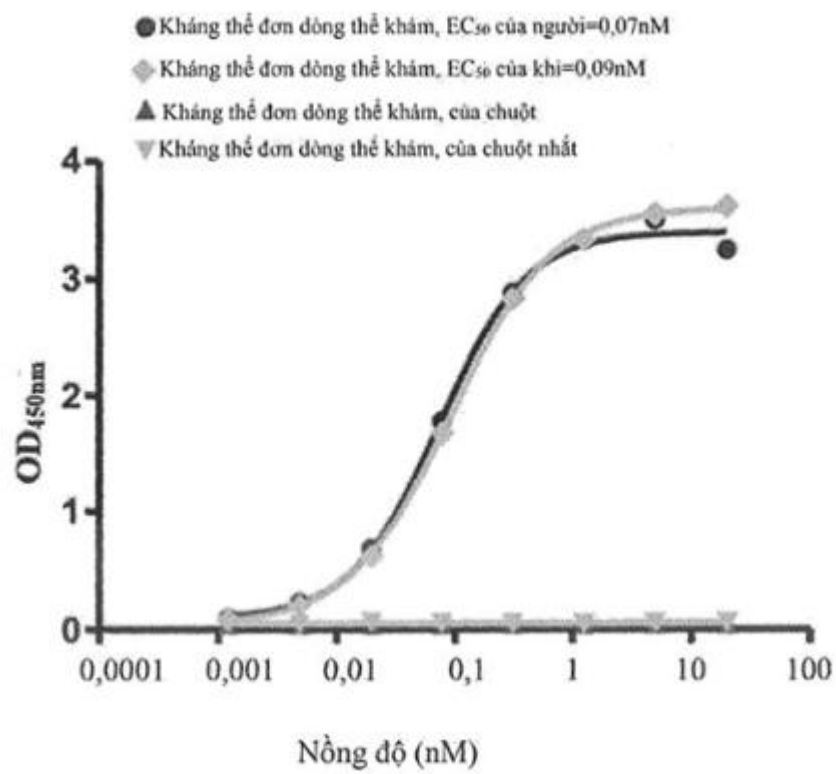
No. 10 Tianzhu West Road, Tianzhu Airport Industrial Zone A, Shunyi District, Beijing 101312, China

(72) SONG, Nanmeng (CN); LIU, Jiawang (CN); YANG, Yaping (CN); YANG, Yang (CN); YANG, Dongge (CN); ZHANG, Hongjuan (CN); JIN, Mengxie (KR).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI IL-17A HOẶC ĐOẠN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ, CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC ĐƯỢC PHÂN LẬP

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với IL-17A hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó. Kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó bao gồm kháng thể thể khảm IL-17A và đoạn liên kết kháng nguyên của nó, và kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn liên kết kháng nguyên của nó. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể này và phân tử axit nucleic được phân lập.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ y sinh học và nghiên cứu thiết kế kháng thể nhân hóa, và cụ thể là kháng thể liên kết đặc hiệu với IL-17A và đoạn chức năng của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin-17A (IL-17 hoặc IL-17A) là một xytokin tiền viêm chủ yếu được tạo ra bởi tế bào Th17 và là thành viên tiêu biểu nhất của họ IL-17 (Miossec P, Kolls JK. Nat. Rev. Drug. Discov., 2012,11: 763-776). Sau khi liên kết với thụ thể IL-17A (IL-17RA), IL-17A có thể cảm ứng sự biểu hiện của các xytokin và chemokin gây viêm trong các tế bào khác nhau (như nguyên bào sợi, tế bào biểu mô, và tế bào nội mô), đóng vai trò quan trọng trong hệ thống bảo vệ miễn dịch của cơ thể (Lin Y, Ritchea S, Logar A. Immunity, 2009, 31:799-810).

Tuy nhiên, IL-17A được biểu hiện quá mức có thể gây ra nhiều bệnh viêm. Ví dụ, IL-17A có ảnh hưởng đến các đại thực bào và tế bào DC, gây ra sự biểu hiện IL-1, IL-6, TNF và CRP ở mức cao, dẫn đến phản ứng viêm, và tham gia vào các quá trình bệnh lý bao gồm bệnh vẩy nến và bệnh thải ghép. IL-17A có ảnh hưởng đối với các tế bào nội mô, gây ra sự biểu hiện IL-6, MMP và yếu tố đông máu ở mức cao, dẫn đến sự hoạt hóa mạch, và tham gia vào các quá trình bệnh lý bao gồm tổn thương do tái tưới máu, huyết khối và vỡ xơ động mạch. IL-17A có ảnh hưởng đối với nguyên bào sợi, gây ra sự biểu hiện ở mức cao của IL-6, chemokin, yếu tố sinh trưởng và MMP, dẫn đến sự phá hủy nền, và tham gia vào các quá trình bệnh lý bao gồm xơ cứng rải rác và bệnh Crohn. IL-17A có ảnh hưởng đối với tế bào tạo xương và tế bào sụn, gây cảm ứng RANKL, MMP và quá trình tạo tế bào hủy xương, dẫn đến hiện tượng ăn mòn xương và tổn thương sụn, và tham gia vào quá trình bệnh lý bao gồm bệnh viêm đa khớp dạng thấp và bệnh nha chu (N Engl J Med. 27.8.2009; 361(9):888-98. Nat Rev Drug Discov. 2012 Oct; 11(10):763-76. Semin Arthritis Rheum. tháng 10.2013;

43(2):158-70. Trends Mol Med. tháng 3.2016; 22(3):230-41).

Kháng thể trung hòa IL-17A có thể ức chế sự biểu hiện ở mức cao của IL-17A trong mô hoạt dịch của bệnh nhân bị bệnh viêm đa khớp dạng thấp và làm giảm mức độ sản sinh yếu tố gây viêm quan trọng IL-6 (Chabaud M, Durand JM, Buchs N, et al. Arthritis Rheum. 1999,42: 963-70). Bằng nhiều thử nghiệm trên mô hình động vật về bệnh tự miễn, đã chứng minh được rằng việc sử dụng các kháng thể để trung hòa IL-17A có thể ức chế hữu hiệu tình trạng viêm bệnh lý (Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, et al. Arthritis Rheum.2004, 50: 650-659).

Hiện nay, các thuốc kháng thể liên quan đến IL-17A là Secukinumab (kháng thể hướng đích IL-17A) và Ixekizumab (kháng thể hướng đích IL-17A), đã được chấp thuận đưa ra thị trường, chúng đều được sử dụng để điều trị bệnh vẩy nến. Tuy nhiên, kết quả của thử nghiệm thuốc trên lâm sàng đã chứng minh rằng các thuốc này không có hiệu quả điều trị mong đợi đối với một số bệnh viêm mạn tính như bệnh viêm đa khớp dạng thấp (Kellner H, Ther Adv Musculoskelet Dis., 2013, 5: 141-152).

Do đó, sáng chế đã được đề xuất một cách cụ thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên kháng thể đơn dòng gốc của chuột nhắt kháng IL-17A của người có khả năng liên kết đặc hiệu với protein IL-17A của người thu được bằng cách tạo dòng, xác định và phân tích cấu trúc gen để xác định vùng CDR của nó, thiết kế kháng thể thể khảm và kháng thể nhân hóa tương ứng, thiết lập hệ biểu hiện tế bào có nhân điển hình tương ứng và tạo ra và tinh chế kháng thể thể khảm và kháng thể nhân hóa.

Để đạt được mục đích nêu trên của sáng chế, các giải pháp kỹ thuật sau đây được thực hiện.

Kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với IL-17A và đoạn chức năng của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn chức năng của nó chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng;

chuỗi nhẹ chứa vùng CDR chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3; chuỗi nặng chứa vùng CDR chuỗi nặng bao gồm vùng CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3;

trình tự axit amin của các vùng CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 được nêu tương

ứng trong SEQ ID NO: 1, 2 và 3; trình tự axit amin của các vùng CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 4, 5 và 6.

Tốt hơn nếu kháng thể này hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm kháng thể thể khảm IL-17A và đoạn chức năng của nó, và kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó.

Tốt hơn nếu kháng thể này hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm kháng thể thể khảm IL-17A và đoạn chức năng của nó, và kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó.

Tức là kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm kháng thể thể khảm IL-17A và đoạn chức năng của nó, hoặc kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó.

Trong lĩnh vực này đã biết rõ là cả tính đặc hiệu và ái lực liên kết của kháng thể được quyết định chủ yếu bởi vùng CDR, và trình tự axit amin của vùng không phải vùng CDR có thể được thay đổi dễ dàng theo các kỹ thuật đã biết rõ để thu được biến thể có hoạt tính sinh học giống nhau. Theo sáng chế, các biến thể kháng thể đơn dòng có trình tự CDR giống với trình tự CDR của kháng thể nhân hóa nêu trên, do vậy, chúng có hoạt tính sinh học giống nhau.

Tốt hơn nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó kháng thể này chứa trình tự vùng hằng định của globulin miễn dịch bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE và IgD của người.

Tốt hơn nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó đoạn chức năng này bao gồm một hoặc nhiều đoạn được chọn từ nhóm bao gồm F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, kháng thể hai giá và đơn vị nhận biết tối thiểu của kháng thể.

“Đoạn chức năng” theo sáng chế để chỉ cụ thể là đoạn kháng thể có tính đặc hiệu với IL-17A giống với tính đặc hiệu của kháng thể gốc. Ngoài các đoạn chức năng nêu trên, đoạn bất kỳ mà thời gian bán hủy của nó tăng lên cũng có thể được bao hàm trong sáng chế.

scFv (sc = sợi đơn), kháng thể hai giá (kháng thể đime).

Các đoạn chức năng này thường có tính đặc hiệu liên kết giống như kháng thể mà từ đó chúng được tạo ra. Từ những điều được mô tả trong bản mô tả sáng chế, chuyên gia trong lĩnh vực này có thể hiểu được rằng đoạn kháng thể theo sáng chế và đoạn

chức năng nêu trên được điều chế bằng phương pháp như cắt bằng enzym (bao gồm pepsin hoặc papain) và/hoặc phương pháp phân cắt hóa học liên kết disulfua.

Đoạn kháng thể cũng có thể thu được bằng cách tổng hợp peptit bằng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp, kỹ thuật này cũng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc bằng thiết bị tổng hợp peptit tự động như thiết bị tổng hợp peptit tự động là sản phẩm của Applied BioSystems chẳng hạn.

Tốt hơn nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể thể khảm IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8.

Tốt hơn nữa nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể thể khảm IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10.

Tốt hơn nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó vùng khung chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó chứa vùng FR-L1, FR-L2, FR-L3 và FR-L4, và vùng khung chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó chứa vùng FR-H1, FR-H2, FR-H3 và FR-H4.

Trình tự axit amin của các vùng FR-L1, FR-L2, FR-L3 và FR-L4 được nêu trong SEQ ID NO: 11 đến 14 tương ứng.

Trình tự axit amin của các vùng FR-H1, FR-H2, FR-H3 và FR-H4 được nêu trong SEQ ID NO: 15 đến 18 tương ứng.

Thông thường, khi ghép vùng CDR của kháng thể của chuột vào vùng khung của người, việc chọn vùng khung của người có mức độ tương đồng trình tự cao sẽ có tỷ lệ thành công chắc chắn. Tuy nhiên, các nghiên cứu đã chứng minh rằng nhiều biến thể ghép CDR cần có đột biến ngược để khôi phục hoạt tính nhất định của kháng thể. Làm thế nào để chọn vùng khung đúng của người là nút thắt chính.

CDR là vị trí thích hợp chính để liên kết kháng nguyên, nhưng trong phần lớn các trường hợp, FR (vùng khung) có ảnh hưởng quan trọng đến cấu dạng của vị trí liên kết. Theo sáng chế, để thu được kháng thể nhân hóa có ái lực cao, trong bản mô tả này, vùng FR thích hợp được chọn và gốc FR thích hợp được đột biến ngược thành axit

amin ban đầu của chuột hoặc axit amin ở người và có cùng chức năng.

Tốt hơn nếu, FR-L1 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

axit amin thứ nhất D được thay bằng I;

axit amin thứ hai V được thay bằng I;

FR-L2 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

axit amin thứ tư F được thay bằng Y;

axit amin thứ mười bốn R được thay bằng L;

FR-L3 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

axit amin thứ ba mươi lăm Y được thay bằng F;

FR-L4 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14;

FR-H1 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

axit amin thứ tư L được thay bằng V;

FR-H2 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

axit amin thứ mười lăm I được thay bằng M;

FR-H3 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

axit amin thứ hai V được thay bằng I;

axit amin thứ sáu V được thay bằng R;

FR-H4 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18;

tốt hơn nếu trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó là trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 19 đến 26;

tốt hơn nếu trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó là trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 27 đến 34;

tốt hơn nữa nếu trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 19; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 27;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 20; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 28;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 21; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 29;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 22; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 30;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 22; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 31;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 23; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 32;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 24; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 33;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 25; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 32;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 26; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 34;

tốt hơn nữa nếu trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10.

Vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng của nó được chọn từ vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể Kapa của người, trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa IL-17A và đoạn chức năng

của nó được chọn từ vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể IgG1 của người, trình tự axit amin của nó được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Cần lưu ý rằng ngoài các trình trình tự axit amin nêu trên theo sáng chế, việc tạo ra các kháng thể thể khảm và kháng thể nhân hóa có thể đạt được bằng phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, như bằng cách thiết kế kháng thể nhân hóa tái tổ hợp dựa trên các vùng CDR được giải trình tự của kháng thể của chuột, kháng thể của chuột này được tiết ra bởi tế bào u tủy của chuột được gây miễn dịch hoặc bởi tế bào u tủy được dung hợp với tế bào lách của loài khác được dung hợp với tế bào u tủy. Chuột được gây miễn dịch có thể bao gồm chuột chuyển gen có locut globulin miễn dịch của người có thể trực tiếp tạo ra kháng thể của người. Một phương án có thể thực hiện khác có thể bao gồm sàng lọc thư viện bằng cách sử dụng kỹ thuật biểu hiện trên thể thực khuẩn.

Phân tử axit nucleic được phân lập được chọn từ:

A) ADN hoặc ARN mã hóa kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên; và

B) axit nucleic bổ sung cho axit nucleic được xác định trong mục A).

Vectơ chứa phân tử axit nucleic như mô tả ở trên.

Sáng chế còn đề cập đến ít nhất một cấu trúc nhân mã hóa phân tử axit nucleic như mô tả ở trên, tốt hơn là vectơ, tốt hơn nữa là vectơ biểu hiện, như plasmid, được mô tả theo một phương án của sáng chế.

Tế bào chủ được biến nạp bằng vectơ như mô tả ở trên.

Tế bào chủ này là tế bào có nhân điển hình, như tế bào của động vật có vú.

Phương pháp tạo ra kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với IL-17A và đoạn chức năng của nó bao gồm các bước sau đây:

nuôi cấy tế bào chủ như mô tả ở trên trong môi trường và trong điều kiện nuôi cấy thích hợp; và

thu hồi kháng thể tạo ra và đoạn chức năng của nó từ môi trường nuôi cấy hoặc từ tế bào chủ được nuôi cấy.

Chế phẩm chứa kháng thể nêu trên và/hoặc đoạn chức năng của nó, hoặc hỗn hợp của kháng thể này và/hoặc đoạn chức năng của nó cùng với các thành phần khác, làm thành phần hoạt tính.

Tốt hơn nếu chế phẩm như mô tả ở trên, trong đó kháng thể và đoạn chức năng của nó được kết hợp với ít nhất một chất chẩn đoán và/hoặc chất điều trị để tạo ra thể liên hợp miễn dịch.

Tốt hơn nếu, chất chẩn đoán là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, chất tương phản phóng xạ, ion thuận từ, kim loại, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang hóa học, chất tương phản siêu âm, và chất cảm quang.

Tốt hơn nếu chất đồng vị phóng xạ là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{94}mTc , ^{94}Tc , ^{99}mTc , ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , ^{52}mMn , ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{82}mRb và ^{83}Sr .

Tốt hơn nếu ion thuận từ là một hoặc nhiều ion được chọn từ nhóm bao gồm crom (III), mangan (II), sắt (III), sắt (II), coban (II), niken (II), đồng (II), neodymi (III), samari (III), yterbi (III), gadolini (III), vanadi (II), tebi (III), dysprosi (III), holmi (III) và erbi (III).

Tốt hơn nếu chất đánh dấu huỳnh quang là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm Alexa 350, Alexa 405, Alexa 430, Alexa 488, Alexa 555, Alexa 647, AMCA, aminoacridin, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 5-carboxy-4',5'-diclo-2',7'-dimetoxyllorescein, 5-carboxy-2',4',5',7'-tetraclorescein, 5-carboxyllorescein, 5-carboxyrodamin, 6-carboxyrodamin, 6-carboxytetrametylrodamin, thuốc nhuộm xanh Cascade, Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, 6-FAM, dansyl clorua, lorescein, HEX, 6-JOE, NBD (7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol), Oregon xanh lá cây 488, Oregon xanh lá cây 500, Oregon xanh lá cây 514, thuốc nhuộm xanh ngọc, axit phtalic, axit terephtalic, axit isophtalic, cresol đỏ tía bền, cresyl tím, cresyl xanh da trời tươi, axit 4-aminobenzoic, erythrosin, phtaloxyanin, azomethin, xyanin, xantin, succinyl lorescein, kim loại đất hiếm cryptat, tri-bipyridyldiamin oxim, hợp chất europi cryptat hoặc chelat, diamin, dixyanin, thuốc nhuộm xanh da trời La Jolla, alophycoyanin, alocoyanin B, phycoyanin C, phycoyanin R, thiamin, R-phycoerythrin, C-phycoyanin, phycoerythrin R, REG, rodamin xanh lá cây, rodamin isothioxyanat, rodamin đỏ, ROX, TAMRA, TET, TRIT (tetrametylrodamin

isothiol), tetramethylrodamin và thuốc nhuộm đỏ Texas.

Tốt hơn nếu chất điều trị là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể trần, chất độc tế bào, dược chất, chất đồng vị phóng xạ, nguyên tử bo, chất điều biến miễn dịch, chất chống chết tế bào theo chương trình, chất điều trị cảm quang, thể liên hợp miễn dịch và oligonucleotit.

Tốt hơn nếu dược chất là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm methotrexate, flouxidil, mercaptopurin, hydroxyure, cytarabine, nitơ mù tạc, xyclophosphamid, thiotepa, cisplatin, mitomycin, bleomycin, camptothecin, podophyllotoxin, actinomycin D, doxorubicin, daunorubicin, vinblastine, paclitaxel, cephalotaxus alkaloit và L-asparaginase.

Tốt hơn nếu oligonucleotit là một hoặc nhiều oligonucleotit được chọn từ nhóm bao gồm shRNA, miRNA và siRNA.

Tốt hơn nếu chất điều biến miễn dịch là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm xytokin, chemokin, yếu tố sinh trưởng tế bào gốc, lymphotoxin, yếu tố tạo máu, yếu tố kích thích tạo cụm (colony stimulating factor: CSF), interferon, erythropoietin, thrombopoietin, interleukin (IL), yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt (G-CSF), yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt-đại thực bào (granulocyte macrophage-colony stimulating factor: GM-CSF) và yếu tố sinh trưởng tế bào gốc.

Trong đó, tốt hơn nếu xytokin này là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng của người, N-methionyl hormon sinh trưởng của người, hormon sinh trưởng của bò, hormon tuyến cận giáp, thyroxin, insulin, proinsulin, relaxin, prorelaxin, hormon kích thích bao trứng (follicle-stimulating hormone: FSH), hormon kích thích tuyến giáp (thyroid stimulating hormone: TSH), hormon tạo thể vàng (luteinizing hormone: LH), yếu tố sinh trưởng gan, prostaglandin, yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi, prolactin, lactogen nhau thai, protein OB, yếu tố hoại tử khối u α , yếu tố hoại tử khối u β , chất ức chế Mullerian, peptit liên quan đến gonadotropin của chuột, inhibin, activin, yếu tố sinh trưởng nội mô mạch, integrin, thrombopoietin (TPO), NGF- β , yếu tố sinh trưởng tiểu cầu, TGF- α , TGF- β , yếu tố sinh trưởng giống insulin I, yếu tố sinh trưởng giống insulin II, erythropoietin (EPO), yếu tố gây tạo xương, interferon- α , interferon- β , interferon- γ , đại thực bào-CSF (M-CSF), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14,

IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, FLT-3, angiostatin, thrombospondin, endostatin, yếu tố hoại tử khối u và LT.

Tốt hơn nếu chemokin là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm RANTES, MCAF, MIP1- α , MIP1- β , và IP-10.

Tốt hơn nếu chất đồng vị phóng xạ là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm ^{111}In , ^{111}At , ^{177}Lu , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{152}Dy , ^{166}Dy , ^{161}Ho , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{211}Pb , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{58}Co , ^{80}mBr , ^{99}mTc , ^{103}mRh , ^{109}Pt , ^{119}Sb , ^{189}mOs , ^{192}Ir , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{221}Fr , ^{255}Fm , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{224}Ac , ^{77}Br , ^{113}mIn , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , ^{121}mTe , ^{122}mTe , ^{125}mTe , ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{76}Br và ^{169}Yb .

Sử dụng chế phẩm như mô tả ở trên để sản xuất thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến sự biểu hiện quá mức và/hoặc giải phóng quá mức IL-17A.

Tốt hơn nếu bệnh này là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm đường dẫn khí, bệnh hen, bệnh hen phế quản, bệnh hen dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh vảy nến, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh xơ cứng toàn thân, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh viêm thận luput, bệnh xơ cứng bì, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh viêm ruột, bệnh viêm màng mạch nhỏ, bệnh viêm dạ dày liên quan đến *Helicobacter pylori*, bệnh loãng xương, ăn mòn xương, áp xe và dính trong màng bụng, bệnh Addison, bệnh suy giảm gama globulin, bệnh rụng tóc từng vùng, bệnh tiêu chảy mỡ, bệnh Chagas, bệnh Crohn, bệnh thái ghép khác gen cùng loài, bệnh Behcet, nhiễm khuẩn, sốc nhiễm khuẩn hoặc sốc nội độc tố và bệnh thiếu máu cục bộ.

Sử dụng kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với IL-17A và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên để sản xuất thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến sự biểu hiện quá mức và/hoặc giải phóng quá mức IL-17A.

Thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến sự biểu hiện quá mức và/hoặc giải phóng quá mức IL-17A chứa kháng thể có thể liên kết đặc hiệu với IL-17A và đoạn chức năng của nó, và chất mang dược dụng.

Theo cách khác, thuốc này chứa chế phẩm như mô tả ở trên và chất mang được dụng.

Ở đây, thuật ngữ “được dụng” để chỉ hợp chất chấp nhận được về mặt sinh lý khi nó được sử dụng cho người, và không gây ra phản ứng dị ứng như rối loạn dạ dày ruột, chóng mặt hoặc phản ứng dị ứng khác, hoặc phản ứng dị ứng toàn thân tương tự với các phản ứng dị ứng này.

Theo sáng chế, “chất mang được dụng” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất kết dính (như xenluloza vi tinh thể, alginat, gelatin và polyvinylpyrrolidon), chất độn (như tinh bột, sucroza, glucoza và axit lactic khan), chất phân rã (như PVP liên kết ngang, tinh bột natri carboxymetyl liên kết ngang, natri croscarmeloza và hydroxypropyl xenluloza được thể ở mức thấp), chất làm trơn (magie stearat, nhôm stearat, bột talc, polyetylen glycol, natri benzoat), chất thấm ướt (như glyxerin), chất hoạt động bề mặt (như rượu xetylic), và chất làm tăng khả năng hấp thu, chất điều vị, chất làm ngọt, chất pha loãng, chất bao, v.v..

Bệnh như mô tả ở trên là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm đường dẫn khí, bệnh hen, bệnh hen phế quản, bệnh hen dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh vảy nến, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh xơ cứng toàn thân, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh viêm thận luput, bệnh xơ cứng bì, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh viêm ruột, bệnh viêm màng mạch nhỏ, bệnh viêm dạ dày liên quan đến *Helicobacter pylori*, bệnh loãng xương, ăn mòn xương, áp xe và dính trong màng bụng, bệnh Addison, bệnh suy giảm gama globulin, bệnh rụng tóc từng vùng, bệnh tiêu chảy mỡ, bệnh Chagas, bệnh Crohn, thải ghép khác gen cùng loài, bệnh Behcet, nhiễm khuẩn, sốc nhiễm khuẩn hoặc sốc nội độc tố và bệnh thiếu máu cục bộ.

Phương pháp phòng và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến sự biểu hiện quá mức và/hoặc giải phóng quá mức IL-17A bao gồm việc cho đối tượng cần phòng và/hoặc điều trị này sử dụng thuốc như mô tả ở trên.

Tốt hơn nếu đối tượng nêu trên là người, và hơn nữa đối tượng nêu trên là người cần phòng và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến sự biểu hiện quá mức và/hoặc giải phóng quá mức IL-17A.

Bệnh như mô tả ở trên là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm đường dẫn khí, bệnh hen, bệnh hen phế quản, bệnh hen dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh vảy nến, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh xơ cứng toàn thân, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh viêm thận luput, bệnh xơ cứng bì, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh viêm ruột, bệnh viêm màng mạch nhỏ, bệnh viêm dạ dày liên quan đến *Helicobacter pylori*, bệnh loãng xương, ăn mòn xương, áp xe và dính trong màng bụng, bệnh Addison, bệnh suy giảm gama globulin, bệnh rụng tóc từng vùng, bệnh tiêu chảy mỡ, bệnh Chagas, bệnh Crohn, thải ghép khác gen cùng loài, bệnh Behcet, nhiễm khuẩn, sốc nhiễm khuẩn hoặc sốc nội độc tố và bệnh thiếu máu cục bộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Để minh họa rõ hơn các phương án cụ thể theo sáng chế hoặc các giải pháp kỹ thuật trong lĩnh vực thông thường, các hình vẽ được sử dụng trong các phương án cụ thể hoặc phần mô tả lĩnh vực thông thường này sẽ được mô tả vắn tắt dưới đây, và rõ ràng là các hình vẽ trong phần mô tả sau đây là một số phương án của sáng chế và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra các hình vẽ khác dựa trên các hình vẽ này mà không cần sáng tạo bất kỳ.

Fig.1 thể hiện hoạt tính liên kết với IL-17A của người của kháng thể đơn dòng được tiết bởi dòng số 88 theo ví dụ 1;

Fig.2 thể hiện hoạt tính trung hòa của kháng thể đơn dòng được tiết bởi dòng số 88 của ví dụ 1 đối với IL-6 do tế bào HFF-1 tiết ra được kích thích bởi IL-17A của người;

Fig.3 thể hiện tính đặc hiệu loài của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người theo ví dụ 4;

Fig.4 thể hiện tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người theo ví dụ 4;

Fig.5 thể hiện hoạt tính trung hòa in vitro của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người theo ví dụ 5;

Fig.6 thể hiện hoạt tính trung hòa in vivo của kháng thể đơn dòng thể khảm

kháng IL-17A của người theo ví dụ 6;

Fig.7 thể hiện đường cong nồng độ-thời gian sau một lần tiêm tĩnh mạch theo ví dụ 7;

Fig.8 thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người theo ví dụ 9;

Fig.9 thể hiện hoạt tính trung hòa in vitro của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người theo ví dụ 10;

Fig.10 thể hiện đường cong nồng độ-thời gian sau một lần tiêm dưới da theo ví dụ 15.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa vào các hình vẽ. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng các phương án sau đây chỉ để minh họa sáng chế và không được dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Đối với các phương án trong đó điều kiện cụ thể không được chỉ rõ thì các phương án này được thực hiện theo điều kiện thông thường hoặc điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Đối với các phương án sử dụng chất phản ứng hoặc thiết bị mà nhà sản xuất không được chỉ ra, chúng đều là các sản phẩm có bán trên thị trường.

Ví dụ 1. Điều chế kháng thể đơn dòng của chuột kháng IL-17A của người

1.1. Gây miễn dịch động vật

Chuột cái BALB/c, 6 đến 8 tuần tuổi mua của Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd. được sử dụng làm động vật thử nghiệm. Một tuần sau khi chuột được làm quen với môi trường, bắt đầu thực hiện việc gây miễn dịch. Protein IL-17A tái tổ hợp của người được biểu hiện ở E. coli, và các thể vùi được thu hồi, biến tính và xử lý tái gấp cuộn để thu được protein IL-17A hòa tan. Để gây miễn dịch lần đầu, 100µg protein IL-17A-Fc tái tổ hợp của người được trộn kỹ với tá chất Freund đầy đủ (Sigma-Aldrich, mã sản phẩm trong catalog F5881) để tạo thành nhũ tương, nhũ tương này được tiêm trong màng bụng cho chuột. Hai tuần sau, việc gây miễn dịch nhắc lại được thực hiện. Để gây miễn dịch nhắc lại, 50µg protein IL-17A-Fc tái tổ hợp của người được trộn kỹ với tá chất Freund không đầy đủ (Sigma-Aldrich, mã sản phẩm

trong catalog F5806) để tạo thành nhũ tương, nhũ tương này được tiêm trong màng bụng cho chuột. Việc gây miễn dịch được nhắc lại theo cách này hai tuần một lần, tổng cộng ba lần. Vào ngày thứ bảy sau lần gây miễn dịch cuối cùng, máu được lấy từ đám rối tĩnh mạch sau ổ mắt của chuột và ly tâm để tách huyết thanh, và độ chuẩn kháng thể được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Chuột có độ chuẩn cao được chọn để lai để tạo ra tế bào lai. Ba ngày trước khi lai, 50µg protein IL-17A-Fc tái tổ hợp của người được tiêm trong màng bụng cho chuột mà không có chất phụ trợ. Vào ngày thực hiện quá trình lai, lách được lấy ra trong điều kiện vô trùng để điều chế hỗn dịch tế bào lách để sử dụng.

1.2. Chuẩn bị tế bào lai

Tế bào u tủy SP2/0 trong pha sinh trưởng logarit được ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút, dịch nổi bề mặt được tách ra, và tế bào được tạo hỗn dịch trong môi trường DMEM không đầy đủ (Gibco, mã sản phẩm trong catalog 11965) và đếm số tế bào. Tế bào cần thiết được thu hồi, rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy không đầy đủ. Đồng thời, hỗn dịch tế bào lách thu được từ chuột sau khi gây miễn dịch được rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy không đầy đủ. Tế bào u tủy và tế bào lách được trộn ở tỷ lệ 1: 10 hoặc 1: 5, và được rửa một lần bằng môi trường nuôi cấy không đầy đủ trong ống ly tâm bằng chất dẻo dung tích 50ml, và sau đó ly tâm ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 8 phút. Dịch nổi bề mặt được tách ra và pipet Pasteur được sử dụng để loại bỏ chất lỏng còn lại. Ống ly tâm được vỗ nhẹ trên lòng bàn tay để làm cho các tế bào kết tủa tơi và đều, và sau đó ống này được cho vào bể cách thủy ở 40°C để gia nhiệt sơ bộ. 1ml PEG-4000 45% (độ pH= 8,0, Sigma, mã sản phẩm trong catalog P7181) đã gia nhiệt trước tới 40°C được bổ sung vào bằng pipet loại 1ml ở thời điểm khoảng 1 phút (với thời gian tối ưu là 45 giây), khuấy nhẹ bằng pipet khi bổ sung (khuấy bằng pipet), các hạt nhìn thấy sẽ được quan sát bằng mắt thường. 20-30ml môi trường không đầy đủ đã được gia nhiệt trước tới 37°C được bổ sung vào ống bằng pipet loại 10ml trong 90 giây để dừng tác dụng của PEG, và để yên ở nhiệt độ 20 đến 37°C trong 10 phút. Ống này được ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút, và dịch nổi bề mặt được tách ra. 5ml môi trường HAT (DMEM + HAT, Sigma, mã sản phẩm trong catalog H0262-10VL) được bổ sung vào, và tế bào kết tủa được trộn nhẹ (nhớ là không được thổi mạnh để làm tách rời các tế bào dung hợp) để tạo ra hỗn dịch

trộn kỹ. Môi trường HAT được bổ sung thêm cho đến thể tích 80-100ml (nồng độ tế bào lách được điều chỉnh tới $1-2 \times 10^6/\text{ml}$). Hỗn dịch này được cho vào đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ, mỗi lỗ 0,1ml; và đĩa có 24 lỗ, mỗi lỗ 1,0-1,5ml. Các đĩa này được ủ trong tủ áp ở nhiệt độ 37°C , 6% CO_2 . Nói chung, sáu đĩa có 96 lỗ được sử dụng. Sau 5 ngày, 1/2 môi trường được thay bằng môi trường HAT mới. Sau 7 đến 10 ngày, môi trường HAT được thay bằng môi trường HT (DMEM + HT, Sigma, mã sản phẩm trong catalog H0137-10VL). Quá trình sinh trưởng của tế bào lai được quan sát đều đặn, và dịch nổi bề mặt được thu hồi để phát hiện kháng thể sau khi đạt mức độ nhập dòng tế bào là 1/10 hoặc cao hơn. Các cụm dương tính được phát triển và đông lạnh.

1.3. Sàng lọc và xác định dòng

Thử nghiệm ELISA được sử dụng để sàng lọc kháng thể kháng IL-17A của người từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy tế bào lai. IL-17A tái tổ hợp của người được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm cacbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là $1\mu\text{g}/\text{ml}$, lượng chất phủ là $100\mu\text{l}/\text{lỗ}$, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa được rửa năm lần bằng PBST, khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng $300\mu\text{l}/\text{lỗ}$, và sau đó ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Các mẫu $100\mu\text{l}$ dịch nổi bề mặt nuôi cấy và mẫu đối chứng huyết thanh dương tính được bổ sung vào mỗi lỗ tương ứng, và sau đó đĩa được ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, $100\mu\text{l}$ kháng thể kháng IgG của chuột được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Abeam, mã sản phẩm trong catalog Ab7068) được pha loãng theo tỷ lệ 1:10000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, và sau đó đĩa được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng $100\mu\text{l}/\text{lỗ}$ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng $100\mu\text{l}/\text{lỗ}$. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa. Các dòng dương tính có thể tạo ra kháng thể kháng IL-17A của người được chọn dựa trên giá trị đọc ở OD 450nm.

Kháng thể kháng IL-17A của người do dòng dương tính tiết ra là kháng thể trung hòa được xác định bằng thử nghiệm tế bào. Mẫu kháng thể kháng IL-17A của người được pha loãng trong môi trường DMEM đầy đủ (GIBCO, mã sản phẩm trong catalog 11995-073) chứa 10% FBS (Hyclone, mã sản phẩm trong catalog SH30084.03). Nồng

độ ban đầu của kháng thể là 160nM và nồng độ cuối là 40nM trong môi trường. Kháng thể được pha loãng theo loạt 5 lần, và sau đó được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào với lượng 50µl mỗi lỗ. 20 ng/ml IL-17A của người (nồng độ cuối 5 ng/ml) được pha loãng bằng chính môi trường đầy đủ này và bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào với lượng 50µl mỗi lỗ. Đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ áp chứa 5% CO₂. Tế bào HFF-1 được tái tạo hỗn dịch trong môi trường đầy đủ và cấy vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ với lượng 100µl mỗi lỗ, 5000 tế bào mỗi lỗ. Tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ trong tủ áp chứa 5% CO₂. Sau khi kết thúc quá trình ủ, đĩa nuôi cấy tế bào được ly tâm ở tốc độ 250×g trong 5 phút, và dịch nổi bề mặt được tách ra, và lượng IL-6 của người được phát hiện bằng cách sử dụng kit ELISA xác định IL-6 của người (R&D systems, mã sản phẩm trong catalog S6050) theo hướng dẫn. Kháng thể có thể ức chế sự tiết IL-6 của người bởi tế bào HFF-1 được kích thích bởi IL-17A của người là kháng thể trung hòa kháng IL-17A của người. Các dòng dương tính có thể tiết ra kháng thể trung hòa kháng IL-17A của người được chọn dựa trên mức độ trung hòa.

Kết quả được thể hiện trên Fig.1. Dòng số 88 có hoạt tính liên kết mạnh với IL-17A của người. Theo Fig.2, dòng số 88 còn có hoạt tính trung hòa IL-17A của người khá mạnh.

1.4. Giải trình tự kháng thể đơn dòng

Các dòng có cả hoạt tính liên kết kháng nguyên và hoạt tính trung hòa kháng nguyên thu được bằng cách sàng lọc được giải trình tự ADN của kháng thể. mRNA trong tế bào trước hết được tách chiết bằng cách sử dụng kit tinh chế RNAprep (Tiangen, DP430). Các bước tiến hành là như sau: 1×10^7 tế bào được ly tâm ở tốc độ 300×g trong 5 phút và được thu hồi trong ống ly tâm, và toàn bộ dịch nổi bề mặt được hút thận trọng. Bước phân giải được thực hiện ngay. Đáy của ống ly tâm được gõ nhẹ để làm rơi viên vón tế bào, 600µl dung dịch đệm phân giải RL được bổ sung kết hợp xoay tròn ống. Toàn bộ dung dịch được chuyển sang cột lọc CS (cột lọc CS được đặt trong ống thu gom), ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400 \times g$) trong 2 phút, và nước lọc được thu hồi. Một lần thể tích ethanol 70% (thường là 350µl hoặc 600µl) được bổ sung vào nước lọc, trộn kỹ, dung dịch thu được và chất kết tủa được chuyển vào cột hấp thụ CR3 (cột hấp thụ CR3 được cho vào ống thu gom), ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400 \times g$) trong 30 đến 60 giây, chất thải lỏng trong ống thu gom được

loại bỏ, cột hấp thụ CR3 đưa trở lại vào ống thu gom. 350 μ l dung dịch đã loại protein RW1 được bổ sung vào cột hấp thụ CR3, ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 30 đến 60 giây, chất thải lỏng trong ống thu gom được loại bỏ, cột hấp thụ CR3 đưa trở lại vào ống thu gom. 80 μ l dung dịch làm việc DNaza I được bổ sung vào phần giữa của cột hấp thụ CR3 và cột CR3 này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. 350 μ l dung dịch đã loại protein RW1 được bổ sung vào cột hấp thụ CR3, ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 30 đến 60 giây, chất thải lỏng trong ống thu gom được loại bỏ, cột hấp thụ CR3 đưa trở lại vào ống thu gom. 500 μ l dung dịch rửa RW được bổ sung vào cột hấp thụ CR3 (kiểm tra xem etanol đã được bổ sung trước khi sử dụng chưa), cột CR3 này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 30 đến 60 giây, chất thải lỏng trong ống thu gom được loại bỏ, cột hấp thụ CR3 đưa trở lại vào ống thu gom. Cột CR3 này được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 2 phút, và chất thải được loại bỏ. Cột hấp thụ CR3 được để ở nhiệt độ trong phòng trong vài phút để dung dịch rửa còn lại trong chất hấp thụ khô hoàn toàn. Cột hấp thụ CR3 được chuyển vào ống ly tâm mới không chứa RNaza, 30 đến 100 μ l ddH₂O không chứa RNaza được bổ sung vào, ống này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, và sau đó ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 2 phút để thu được dung dịch ARN.

Sợi thứ nhất của cADN được tổng hợp bằng cách sử dụng kit QuantScript RT (Tiangen, KR103). Các bước thực hiện là như sau: ARN khuôn được làm tan băng trên nước đá; đoạn môi, hỗn hợp 10 x RT (chứa RNasin và DTT), hỗn hợp dNTP siêu tinh khiết, ddH₂O không chứa RNaza được làm tan băng ở nhiệt độ trong phòng (15 đến 25°C), và cho lên nước đá ngay sau khi làm tan băng. Mỗi dung dịch được trộn kỹ bằng thiết bị trộn xoáy trước khi sử dụng, ống được ly tâm trong thời gian ngắn để thu hồi chất lỏng còn lại trên thành ống. Hỗn hợp hệ phiên mã ngược (kit tổng hợp sợi thứ nhất của cADN Tiangen Bio Quant, mã số trong Catalog KR103-04; 2 μ l 10 $\times$ dung dịch đệm phiên mã ngược, 2 μ l dNTP siêu tinh khiết, 2 μ l đoạn môi ngẫu nhiên, 1 μ l enzym phiên mã ngược) được điều chế theo bảng 1. Hỗn hợp này được trộn kỹ, thời gian trộn xoáy là không lớn hơn 5 phút; và sau đó ly tâm trong thời gian ngắn và cho lên nước đá. Cuối cùng, ARN khuôn (50ng đến 2 μ g) được bổ sung vào hỗn hợp, trộn kỹ, thời gian trộn xoáy là không lớn hơn 5 giây, ly tâm trong thời gian ngắn để thu hồi

chất lỏng còn lại trên các thành của ống, ủ ở 37°C trong 60 phút. Sợi thứ nhất của cADN được tạo ra bằng cách phiên mã ngược này được sử dụng cho phản ứng PCR sau đó.

Các đoạn mồi sử dụng trong phản ứng PCR được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Các đoạn mồi PCR

Đoạn mồi VH
F1:GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTGGTG
R1:AGGT(C/G)(A/C)AACTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG
R2:AGGT(C/G)(A/C)AGCTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG
R3:AGGT(C/G)CAGCTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG
R4:CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTCGTTTT
F2:ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
F3:CTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
F4:AGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG
F5:AGGGACCAAGGGATAGACAGATGG
R5:(G/C)A(A/G)GT(A/T/C/G)(A/C)AGCTG(G/C)AG(G/C)AGTC
R6:(G/C)A(A/G)GT(A/T/C/G)(A/C)AGCTG(G/C)AG(G/C)AGTC(A/T)GG
Đoạn mồi VL
R1:GGTGATATCGTGAT(A/G)AC(C/A)CA(G/A)GATGAACTCTC
R2:GGTGATATC(A/T)TG(A/C)TGACCCAA(A/T)CTCCACTCTC
R3:GGTGATATCGT(G/T)CTCAC(C/T)CA(A/G)TCTCCAGCAAT
F1:GGGAAGATGGATCCAGTTGGTGCAGCATCAGC
F2:GGATACAGTTGGTGCAGCATC
R4:GA(C/T)ATTGTG(A/C)T(G/C)AC(A/C)CA(A/G)(A/T)CT(A/C)CA

Khi các đoạn mồi được sử dụng, đoạn mồi ngược bất kỳ trong số các đoạn mồi VH có thể được sử dụng cùng với đoạn mồi xuôi bất kỳ; theo cách tương tự, đoạn mồi ngược bất kỳ trong số các đoạn mồi VL cũng có thể được sử dụng cùng với đoạn mồi xuôi bất kỳ. Băng đích thu được bằng cách khuếch đại PCR được tạo dòng vào vector pGEM-T. Dòng đơn được chọn để giải trình tự ADN.

Ví dụ 2. Điều chế kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người

Trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể nêu trên (chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ này là SEQ ID NO: 7 liên kết với SEQ ID NO: 9) và chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng này là SEQ ID NO: 8 liên kết với SEQ ID NO: 10) được tạo dòng vào vector biểu hiện của tế bào có nhân điển hình X0GC (trong đó trình tự axit nucleic có chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 23, trình tự axit nucleic có chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 24), sau đó vector biểu hiện này được chuyển nhiễm vào dòng tế bào 293F (tế bào FreeStyle™ 293-F, mã sản phẩm trong catalog R79007, Invitrogen). Tế bào được cấy một ngày trước khi chuyển nhiễm. Tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm vào ngày chuyển nhiễm. Tế bào này được tái tạo hỗn dịch trong môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293 mới (môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293, mã sản phẩm trong catalog 12338001, Gibco), mật độ tế bào là 200×10^5 tế bào/ml. Plasmid được bổ sung theo thể tích chuyển nhiễm, nồng độ cuối là 36,67 µg/ml, trộn nhẹ; sau đó PEI mạch thẳng (polyetylenimin mạch thẳng, trọng lượng phân tử 25000, mã sản phẩm trong catalog 43896, Alfa Aesar) được bổ sung, nồng độ cuối là 55 µg/ml, trộn nhẹ. Sau đó, tế bào được cho vào máy lắc ở tốc độ 120 vòng/phút và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau đó, thể tích chuyển nhiễm 19 lần của môi trường mới được bổ sung vào. Tiếp tục ủ ở nhiệt độ 37°C trên máy lắc ở tốc độ 120 vòng/phút. Dịch nổi bề mặt nuôi cấy tế bào sau khi chuyển nhiễm 5 đến 6 ngày được thu hồi bằng cách ly tâm.

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể thu được bằng cách khuếch đại PCR được nêu trong SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 8. Trình tự của vùng quyết định tính bổ trợ có thể thu được bằng cách loại bỏ trình tự vùng khung ra khỏi trình tự vùng biến đổi của chuỗi; trong đó các trình tự axit amin của ba vùng quyết định tính bổ trợ CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 1, 2 và 3 tương ứng; trình tự axit amin của ba vùng quyết định tính bổ trợ CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 4, 5 và 6 tương ứng. Trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 9, và trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 10. Trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể nêu trên (chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ này là SEQ ID NO: 7 liên kết với SEQ ID NO: 9) và chuỗi

nặng (chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng này là SEQ ID NO: 8 liên kết với SEQ ID NO: 10) được tạo dòng vào vector biểu hiện của tế bào có nhân điển hình X0GC (trong đó trình tự axit nucleic có chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ của kháng thể này được nêu trong SEQ ID NO: 23, trình tự axit nucleic có chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng của kháng thể này được nêu trong SEQ ID NO: 24), sau đó vector biểu hiện này được chuyển nhiễm vào dòng tế bào 293F (tế bào FreeStyle™ 293-F, mã sản phẩm trong catalog R79007, Invitrogen). Tế bào được cấy chuyển một ngày trước khi chuyển nhiễm. Vào ngày chuyển nhiễm, tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm và sau đó tái tạo hỗn dịch trong môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293 mới (môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293, mã sản phẩm trong catalog 12338001, Gibco) ở mật độ 200×10^5 tế bào/ml. Plasmid được bổ sung theo thể tích chuyển nhiễm tới nồng độ cuối 36,67 µg/ml, trộn nhẹ; sau đó PEI mạch thẳng (polyetylenimin mạch thẳng, trọng lượng phân tử 25000, mã sản phẩm trong catalog 43896, Alfa Aesar) được bổ sung tới nồng độ cuối 55 µg/ml, trộn nhẹ. Sau đó, tế bào được cho vào máy lắc ở tốc độ 120 vòng/phút và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau đó, thể tích chuyển nhiễm gấp 19 lần của môi trường mới được bổ sung vào và tế bào được nuôi cấy liên tục ở 37°C trong máy lắc ở tốc độ 120 vòng/phút. Dịch nổi bề mặt nuôi cấy sau khi chuyển nhiễm 5 đến 6 ngày được thu hồi bằng cách ly tâm.

Ví dụ 3. Động học của quá trình liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người với IL-17A của người

Động học của quá trình liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người với kháng nguyên IL-17A của người được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị Biacore 3000. Thiết bị này sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt quang học để phát hiện sự liên kết và phân ly giữa phân tử liên kết trên chip cảm ứng và mẫu phân tích. Các chip CM5 (GE Healthcare, BR-1000-12) được sử dụng. Quy trình thử nghiệm vẫn tắt là như sau; IL-17A của người được hòa tan trong dung dịch đệm natri axetat (pH = 5,0) và được liên kết với chip CM bằng cách bơm ở tốc độ 10 µl/phút. Etanolamin 1M được bơm ở tốc độ 10 µl/phút để khoá. Trong pha liên kết, nồng độ khác nhau của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người và kháng thể đối chứng lần lượt được bơm ở tốc độ 30 µl/phút trong 180 giây, và trong pha phân ly, dung dịch đệm PBS được bơm ở tốc độ 30 µl/phút trong 600 giây. Dung dịch glyxin

10mM (pH= 2,0) được sử dụng để tái sinh. Hằng số tốc độ liên kết và hằng số tốc độ phân ly được phân tích và tính toán bằng chương trình phần mềm điều khiển Biacore 3000. Hằng số tốc độ liên kết, hằng số tốc độ phân ly và hằng số cân bằng phân ly của kháng thể thể khảm kháng IL-17A của người được thể hiện trong bảng 2. So với Secukinumab, mAb kháng IL-17A của người có hằng số cân bằng phân ly nhỏ hơn, ái lực mạnh hơn, đặc biệt là sau khi liên kết với kháng nguyên IL-17A, nó có thể duy trì trạng thái liên kết trong thời gian dài hơn và không dễ bị phân ly, điều này góp phần vào các chức năng sinh học của nó.

Bảng 2. Động học quá trình liên kết của kháng thể thể khảm kháng IL-17A của người với IL-17A của người

Mẫu được phát hiện	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (nM)
Secukinumab	2,52E + 05	7,96E - 05	0,32
Kháng thể thể khảm kháng IL-17A của người	5,41E + 04	1,49E - 06	0,03

Ví dụ 4. Tính đặc hiệu loài và tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người

Tính đặc hiệu loài của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. IL-17A tái tổ hợp của người, IL-17A của khỉ, IL-17A của chuột và IL-17A của chuột nhắt (tất cả đều là sản phẩm của Sino Biological Inc.) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm cacbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là 1µg/ml, lượng chất phủ là 100 µl/lỗ, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa được rửa năm lần bằng PBST và khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng 300 µl/lỗ, và sau đó ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Kháng thể đối chứng và mẫu kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người đã pha loãng theo loạt trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào với lượng 100µl cho mỗi lỗ, ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, 100µl kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần

bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng 100 μ l/lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 μ l/lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. IL-17A tái tổ hợp của người, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-21, IL-22, IL-23, IFN-g và $\text{TNF}\alpha$ (sản phẩm của Sino Biological Inc. hoặc R&D systems) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm cacbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là 1 μ g/ml, lượng chất phủ là 100 μ l/lỗ, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST và khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng 300 μ l/lỗ và được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Kháng thể đối chứng và mẫu kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người đã được pha loãng trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào với lượng 100 μ l cho mỗi lỗ, ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, 100 μ l kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng 100 μ l/lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 μ l/lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. IL-17A tái tổ hợp của người, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-21, IL-22, IL-23, IFN-g và $\text{TNF}\alpha$ (sản phẩm của Sino Biological Inc. hoặc R&D systems) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm cacbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là 1 μ g/ml, lượng chất phủ là 100 μ l/lỗ, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa năm lần bằng PBST. Khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng 300 μ l/lỗ và ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Rửa năm lần bằng PBST. Kháng thể đối chứng và mẫu kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người đã được pha

loãng trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào với lượng 100µl cho mỗi lỗ, ủ ở 25°C trong 1 giờ. Rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, 100µl kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng 100 µl/lỗ và hiện màu ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H₂SO₄ 1M với lượng 100 µl/lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Kết quả được thể hiện trên Fig.3. Kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người liên kết với IL-17A của người và khỉ, nhưng không liên kết với IL-17A của chuột hoặc chuột nhắt chứng tỏ kháng thể này có tính đặc hiệu loài. Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.4, kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người còn có tính đặc hiệu liên kết mạnh, nó chỉ liên kết với IL-17A mà không liên kết với các xytokin khác của họ IL-17 hoặc các xytokin không liên quan.

Ví dụ 5. Hoạt tính trung hòa của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người in vitro

Mẫu kháng thể kháng IL-17A của người được pha loãng trong môi trường DMEM đầy đủ (GIBCO, mã sản phẩm trong catalog 11995-073) chứa 10% FBS (Hyclone, mã sản phẩm trong catalog SH30084.03). Nồng độ ban đầu của kháng thể là 160nM và nồng độ cuối là 40nM trong môi trường. Kháng thể được pha loãng theo loạt 5 lần, và sau đó được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào với lượng 50µl mỗi lỗ. 20 ng/ml IL-17A của người (nồng độ cuối 5 ng/ml) được pha loãng bằng chính môi trường đầy đủ này và bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào với lượng 50µl mỗi lỗ. Đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ áp chứa 5% CO₂. Tế bào HFF-1 được tái tạo hỗn dịch trong môi trường đầy đủ và cấy vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ với lượng 100µl mỗi lỗ, 5000 tế bào mỗi lỗ. Tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ trong tủ áp chứa 5% CO₂. Sau khi kết thúc quá trình ủ, đĩa nuôi cấy tế bào được ly tâm ở tốc độ 250×g trong 5 phút, và dịch nổi bề mặt nuôi cấy được tách ra, và lượng IL-6 của người được phát hiện bằng cách sử dụng kit ELISA xác định IL-6 của người (R&D systems, mã sản phẩm trong catalog S6050) theo hướng dẫn.

Kết quả được thể hiện trên Fig.5. So với Secukinumab, kháng thể đơn dòng thể

khả kháng IL-17A của người có hoạt tính trung hòa IL-17A in vitro mạnh hơn, và hiệu quả tốt hơn đối với việc ức chế sự tiết IL-6 của tế bào HFF-1 được kích thích bởi IL-17A.

Ví dụ 6. Hoạt tính trung hòa của kháng thể đơn dòng thể khả kháng IL-17A của người in vivo

Chuột cái BALB/c, 6 đến 8 tuần tuổi mua của Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd. được sử dụng làm động vật thử nghiệm. Một tuần sau khi chuột này được thích nghi với môi trường, chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm, mỗi nhóm sáu con. Mỗi nhóm được sử dụng kháng thể đơn dòng thể khả kháng IL-17A của người hoặc kháng thể đơn dòng đối chứng Secukinumab ở ba liều là 0,7 nmol/kg, 7 nmol/kg hoặc 70 nmol/kg sử dụng một lần bằng cách tiêm tĩnh mạch. Một giờ sau khi sử dụng, IL-17A của người được tiêm dưới da với liều 10µg cho một con chuột. Hai giờ sau đó, mẫu máu sau ổ mắt được lấy mà không chống đông, và mẫu máu này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút đến 1 giờ. Sau khi máu đông, mẫu máu được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút để thu được mẫu huyết thanh. Nồng độ CXCL1 của chuột (phối tử chemokin motif C-X-C, còn được gọi là KC) trong huyết thanh được phát hiện theo hướng dẫn bằng cách sử dụng kit ELISA xác định CXCL1 (RayBiotech, mã sản phẩm trong catalog ELM-KC).

Kết quả được thể hiện trên Fig.6. Kháng thể đơn dòng thể khả kháng IL-17A của người có tác dụng ức chế sự tiết CXCL1 ở chuột được kích thích bằng IL-17A của người, có hoạt tính mạnh hơn so với kháng thể đơn dòng đối chứng Secukinumab.

Ví dụ 7. Nghiên cứu được động học của kháng thể đơn dòng thể khả kháng IL-17A của người ở chuột

Chuột cái SD, 6 đến 8 tuần tuổi mua của Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd. được sử dụng làm động vật thử nghiệm. Một tuần sau khi chuột này được thích nghi với môi trường, chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm, mỗi nhóm ba con. Kháng thể đơn dòng thể khả kháng IL-17A của người và kháng thể đơn dòng đối chứng Secukinumab được sử dụng tương ứng ở liều 20 nmol/kg bằng cách tiêm một liều qua đường tĩnh mạch. Ở thời điểm 0, 5 phút, 30 phút, 1 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ, 168 giờ, 216 giờ, 264 giờ, 312 giờ sau khi sử dụng, mẫu máu sau ổ mắt được lấy mà không chống đông, và mẫu máu này được để yên ở

nhệt độ trong phòng trong 30 phút đến 1 giờ; sau khi đông, mẫu máu được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút, mẫu huyết thanh thu được được đông lạnh ở nhiệt độ -80°C và bảo quản để thử nghiệm.

Nồng độ kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người và kháng thể đơn dòng đối chứng Secukinumab trong huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Nói một cách ngắn gọn, protein IL-17A tái tổ hợp của người được phủ lên đĩa ELISA có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm cacbonat có độ pH=9,6 ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Để ngăn sự liên kết không đặc hiệu, đĩa được khóa bằng PBST chứa 5% bột sữa không béo, và sau đó rửa bằng PBST. Sau đó, mẫu huyết thanh cần thử nghiệm được pha loãng bằng PBST chứa 10% huyết thanh chuột hỗn hợp và 1% BSA được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ, và đĩa được rửa bằng PBST. Kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) pha loãng trong PBST chứa 5% bột sữa gầy được bổ sung vào, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ, sau đó đĩa được rửa bằng PBST. Cuối cùng, quá trình hiện màu được thực hiện bằng cách sử dụng chất nền so màu TMB ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 μl /lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Kết quả được thể hiện trên Fig.7. Một liều tiêm 20 nmol/kg qua đường tĩnh mạch của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người hoặc kháng thể đơn dòng đối chứng Secukinumab có đường cong nồng độ-thời gian và dữ liệu dược động học giống nhau ở chuột. Các thông số dược lý của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người là như sau: thời gian bán hủy $t_{1/2}$ là 458 giờ; diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian $\text{AUC}_{\text{cuối cùng}}$ là 44286 nM.giờ; nồng độ ban đầu ước tính C_0 là 413nM; thể tích phân bố biểu kiến V_d là 115 ml/kg; mức độ thanh thải CL là 0,17 ml/giờ/kg; thời gian lưu trung bình $\text{MRT}_{\text{cuối cùng}}$ là 140 giờ.

Ví dụ 8. Điều chế kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người

Dạng nhân hóa của kháng thể kháng IL-17 của người được điều chế theo phương pháp của Leung và các đồng tác giả (1995, Molecule Immunol 32: 1413-27).

Khuôn nhân hóa phù hợp nhất với vùng không phải CDR của chuột nhất được chọn từ cơ sở dữ liệu Germline. Khuôn của vùng biến đổi chuỗi nặng là IGVH4-59*01

và trình tự của nó được nêu trong SEQ ID NO: 35. Khuôn của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là IGKV2-30*02 và trình tự của nó được nêu trong SEQ ID NO: 36. Vùng CDR của kháng thể của chuột được ghép vào khuôn nhân hóa đã chọn để thay thế vùng CDR của khuôn của người. Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa ghép thu được có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa ghép thu được có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 38. Chính vị trí đã chọn bằng cách đóng thẳng hàng trình tự được đột biến ngược, bao gồm bốn vị trí trên chuỗi nặng là L4V, I49M, V68I, V72R, và năm vị trí trên chuỗi nhẹ là D1I, V2I, F41Y, R51L, Y92F. Các trình tự nhân hóa khác nhau được thiết kế bằng cách giảm số vị trí đột biến ngược, và trình tự chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong bảng 3. Vùng biến đổi chuỗi nặng (SEQ ID NO: 27 đến 34) của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng (SEQ ID NO: 10) của IgG1 của kháng thể người để thu được trình tự có chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng tương ứng. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 19 đến 26) của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 9) của kháng thể Kapa của người để thu được trình tự có chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ tương ứng. Trình tự có chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng được kết hợp với trình tự có chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ để thu được trình tự có chiều dài đầy đủ của kháng thể nhân hóa. Trình tự có chiều dài đầy đủ này được cắt bằng EcoRI và HindIII, và sau đó gắn vào vectơ X0GC.

Bảng 3. Trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa kháng IL-17A của người

VH	SEQ ID NO:
được ghép	27
BM	28
AS15799	29
AS15802	30
AS15803	31
AS15805/AS15815	32
AS15810	33

AS15820	34
VL	SEQ ID NO:
được ghép	19
BM	20
AS15799	21
AS15802/ AS15803	22
AS15805	23
AS15810	24
AS15815	25
AS15820	26

Ví dụ 9. Hoạt tính liên kết với kháng nguyên của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người

Hoạt tính liên kết với kháng nguyên của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. IL-17A tái tổ hợp của người (sản phẩm của Sino Biological Inc.) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm cacbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là 1µg/ml, lượng chất phủ là 100 µl/lỗ, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST và khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng 300 µl/lỗ và được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Kháng thể đối chứng và mẫu kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người đã được pha loãng trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào với lượng 100µl cho mỗi lỗ, ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, 100µl kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng 100 µl/lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H₂SO₄ 1M với lượng 100 µl/lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Kết quả được thể hiện trên Fig.8. Tất cả các kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người AS15799, AS15802, AS15803, AS15805, AS15810, AS15815 và

AS15820 đều có thể liên kết với IL-17A của người với ái lực cao.

Ví dụ 10. Hoạt tính trung hòa của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người in vitro

Mẫu kháng thể kháng IL-17A của người được pha loãng trong môi trường DMEM đầy đủ (GIBCO, mã sản phẩm trong catalog 11995-073) chứa 10% FBS (Hyclone, mã sản phẩm trong catalog SH30084.03). Nồng độ ban đầu của kháng thể là 160nM và nồng độ cuối là 40nM trong môi trường. Kháng thể được pha loãng theo loạt 5 lần, và sau đó được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào với lượng 50µl mỗi lỗ. 20 ng/ml IL-17A của người (nồng độ cuối 5 ng/ml) được pha loãng bằng chính môi trường đầy đủ này và bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào với lượng 50µl mỗi lỗ. Đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ áp chứa 5% CO₂. Tế bào HFF-1 được tái tạo hỗn dịch trong môi trường đầy đủ và cấy vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ với lượng 100µl mỗi lỗ, 5000 tế bào mỗi lỗ. Tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ trong tủ áp chứa 5% CO₂. Sau khi kết thúc quá trình ủ, đĩa nuôi cấy tế bào được ly tâm ở tốc độ 250×g trong 5 phút, và dịch nổi bề mặt nuôi cấy được tách ra, và lượng IL-6 của người được phát hiện bằng cách sử dụng kit ELISA xác định IL-6 của người (R&D systems, mã sản phẩm trong catalog S6050) theo hướng dẫn.

Kết quả được thể hiện trên Fig.9. So với Secukinumab, các kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người AS15799, AS15802, AS15803, AS15805, AS15810, AS15815 và AS15820 có hoạt tính trung hòa IL-17A mạnh hơn và hiệu quả mạnh hơn đối với việc ức chế sự tiết IL-6 của người bởi tế bào HFF-1 in vitro được kích thích bằng IL-17A của người.

Ví dụ 11. Phát hiện độ tinh khiết và độ ổn định nhiệt của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người bằng phương pháp sắc ký chất lỏng tính năng cao loại trừ kích thước (Size-exclusion High-performance Liquid Chromatography: SE-HPLC)

Cột sắc ký TSKgel SuperSW3000 (mã sản phẩm trong catalog 0018675) được sử dụng. Pha động là 0,1mol/l dung dịch đệm phosphat (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄), 0,1 mol/l dung dịch đệm natri sulfat, độ pH =6,7; tốc độ dòng là 0,35 ml/phút; nhiệt độ cột là 25°C; nhiệt độ khối mẫu là 4°C; bước sóng phát hiện là 280nm. Mẫu được pha loãng bằng dung dịch đệm mẫu tới 1 mg/ml, và thể tích bơm mẫu là 5µl. Kết quả thử nghiệm được xử lý bằng thiết bị sắc ký chất lỏng tính năng cao Agilent 1260, và độ tinh khiết

được tính bằng tỷ lệ phần trăm của đỉnh chính bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn hóa diện tích. Kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người thu được ở trên được phân tích độ tinh khiết bằng phương pháp SE-HPLC. Để xác định độ ổn định nhiệt của các kháng thể đơn dòng này, các mẫu được để trong điều kiện nhiệt độ cao 40°C, và các mẫu này được phân tích bằng phương pháp SE-HPLC ở tuần thứ hai và tuần thứ tư tương ứng để quan sát độ ổn định nhiệt, và kết quả được thể hiện trong bảng 4 dưới đây. Tất cả các kháng thể nhân hóa kháng IL-17A của người đều có độ ổn định tốt và đáng kể.

Bảng 4. Độ ổn định nhiệt của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người ở 40°C xác định bằng phương pháp SE-HPLC

Kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người	Độ tinh khiết theo phương pháp SE-HPLC		
	T=0	Tuần 2	Tuần 4
AS15802	99,9%	98,5	97,3
AS15803	99,9%	98,3	96,9
AS15810	98,0%	96,9	95,9
AS15815	98,1%	97,2	96,5
AS15820	96,5%	95,7	94,5

Ví dụ 12. Xác định chỉ số T_m của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người

Nhiệt độ nóng chảy (T_m) của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người được xác định bằng phương pháp đo huỳnh quang bằng cách quét vi phân (Differential Scanning Fluorimetry: DSF). DSF là phương pháp phát hiện quá trình biến tính do nhiệt của protein trong mẫu bằng cách lợi dụng sự thay đổi cường độ huỳnh quang của chất chỉ thị huỳnh quang để xác định nhiệt độ biến chất protein. Chất phản ứng sử dụng là thuốc nhuộm huỳnh quang protein màu da cam SYPRO (Sigma-Aldrich, Mỹ, mã sản phẩm trong catalog S5692; nồng độ 5000× trong DMSO). Máy PCR thời gian thực AB 7500 là sản phẩm của Applied Biosystems, Inc., Mỹ. Thuốc nhuộm huỳnh quang protein được pha loãng theo tỷ lệ 1:50 bằng dung dịch đệm mẫu và 1μl thuốc nhuộm đã pha loãng được trộn với 19μl dung dịch protein, nên tỷ lệ pha loãng cuối của thuốc nhuộm huỳnh quang là 1:1000. Thuốc nhuộm huỳnh

quang đã pha loãng được bổ sung vào đĩa có 96 lỗ, và ba lỗ song song được ấn định cho mỗi mẫu. Đĩa được bịt kín bằng màng bịt kín quang học, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 2 phút để loại bỏ bọt khí. Chương trình RT-PCR được đặt như sau: đường cong nóng chảy được đặt theo kiểu liên tục, khoảng nhiệt độ quét là 25 đến 99°C, tốc độ gia nhiệt là 1% (khoảng 1°C/phút), và sau đó là 25°C trong 2 phút. Dữ liệu được ghi trong quá trình gia nhiệt, nhóm sử dụng thuốc nhuộm chỉ báo được đặt là “ROX”, nhóm dập tắt được đặt là “không” và thể tích phản ứng là 20µl. Nồng độ mẫu là 1 mg/ml, và dung dịch so sánh là dung dịch đệm mẫu. Đường cong huỳnh quang và đạo hàm bậc nhất được vẽ đồ thị bằng cách sử dụng chương trình phần mềm Protein Thermal Shift™ phiên bản 1.3. Trong thử nghiệm DSF, nhiệt độ điểm giữa của đỉnh chuyển hóa thứ nhất của protein thường được cho là nhiệt độ biến tính của độ ổn định nhiệt của protein. Chỉ số T_m của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người được xác định và kết quả được thể hiện trong bảng 5 dưới đây. Tất cả các kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người đều có chỉ số T_m khá tốt.

Bảng 5 Chỉ số T_m của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người

Kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người	Chỉ số T _m
AS15802	67,2°C
AS15803	68,3°C
AS15810	67,9°C
AS15815	69,3°C
AS15820	67,7°C

Ví dụ 13. Phát hiện chất đồng phân mang điện tích của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (Cation Exchange Chromatography: CEX)

Cột sắc ký trao đổi cation MabPac SCX-10 được sử dụng, 4mm × 250mm (mã sản phẩm trong Catalog: 78655). 20 mmol/l axit 2-(N-morpholin) etansulfonic (MES) (pH= 5,6) và 60 mmol/l natri clorua được sử dụng làm pha động A; 20 mmol/l MES (pH= 5,6) và 300 mmol/l natri clorua được sử dụng làm pha động B. Tốc độ dòng là 0,5 ml/phút; nhiệt độ cột là 25°C; nhiệt độ khối mẫu là 4°C; bước sóng phát hiện là 280nm; thể tích nạp mẫu là 50µl (1 mg/ml); quá trình rửa giải được thực hiện theo gradien tuyến tính từ 5 đến 50% trong 60 phút. Kết quả thử nghiệm được xử lý bằng

hệ thống máy tính sắc ký chất lỏng tính năng cao Agilent 1260, và tỷ lệ phần trăm của điện tích đỉnh được tính bằng phương pháp chuẩn hóa điện tích. Các kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người được phát hiện bằng phương pháp CEX. Để xác định độ ổn định hóa học của các kháng thể đơn dòng này, các mẫu nêu trên được để trong điều kiện nhiệt độ cao 40°C, và các mẫu được lấy ở tuần thứ hai và tuần thứ 4 tương ứng để phát hiện bằng phương pháp CEX, và sự thay đổi tỷ lệ của các biến thể mang điện tích được quan sát. Kết quả được thể hiện trong bảng 6. Tất cả các kháng thể nhân hóa kháng IL-17A của người có tỷ lệ tương đối thấp của các biến thể mang điện tích.

Bảng 6. Sự thay đổi tỷ lệ của các biến thể mang điện tích của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người ở 40°C được xác định bằng phương pháp CEX

	Sự thay đổi tỷ lệ của các biến thể mang điện tích					
	T=0			Tuần 2		
AS15802	64,9	15,5	19,6	53,5	32,7	13,8
AS15803	61,8	17,5	20,7	51,7	37,5	10,8
AS15810	59,7	14	26,3	49,9	36,7	13,5
AS15815	60,3	14,4	25,3	47	40,4	12,6
AS15820	58,7	16,6	24,7	49,1	35,6	15,3

Ví dụ 14. Độ ổn định của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người trong điều kiện độ pH thấp để làm bất hoạt virus

200µg mẫu thử nghiệm được điều chỉnh tới độ pH = $3,4 \pm 0,05$ bằng 1 mol/l dung dịch axit xitric gốc, và nồng độ cuối của mẫu là 1 mg/ml. Mẫu này được để ở nhiệt độ trong phòng và lấy mẫu ở các thời điểm 0, 1, 2, 4 và 6 giờ tương ứng, và độ pH được điều chỉnh tới 7,5 bằng 2 mol/l dung dịch gốc Tris-HCl, độ pH = 9,5. Các mẫu này được phân tích bằng phương pháp SEC nêu trên, và kết quả được thể hiện trong bảng 7. Kháng thể nhân hóa kháng IL-17A của người có thể chịu được điều kiện độ pH thấp để làm bất hoạt virus trong thời gian ít nhất 6 giờ cho thấy độ ổn định tốt.

Bảng 7. Độ ổn định của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người trong điều kiện độ pH thấp được phát hiện bằng phương pháp SE-HPLC

Kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người	Độ tinh khiết theo phương pháp SE-HPLC				
	T=0	Giờ thứ nhất	Giờ thứ hai	Giờ thứ tư	Giờ thứ sáu
AS15802	99,9%	99,8	99,9	99,9	99,8
AS15803	99,9%	99,8	99,8	99,9	99,9
AS15810	98,0%	98,1	98,1	98,0	98,2
AS15815	98,1%	98,4	98,3	98,3	98,5
AS15820	96,5%	96,4	96,4	96,5	96,7

Ví dụ 15. Nghiên cứu được động học của kháng thể đơn dòng nhân hoá kháng IL-17A của người ở chuột

Chuột cái SD, 6 đến 8 tuần tuổi mua của Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd. được sử dụng làm động vật thử nghiệm. Một tuần sau khi chuột này được thích nghi với môi trường, chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm, mỗi nhóm ba con. Kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người và kháng thể đối chứng được sử dụng tương ứng ở liều 15 nmol/kg bằng cách tiêm một liều qua đường dưới da. Ở thời điểm 0, 1 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ, 168 giờ, 216 giờ, 264 giờ, 312 giờ, 360 giờ, 408 giờ và 480 giờ sau khi sử dụng, mẫu máu sau ổ mắt được lấy mà không chống đông, và mẫu máu này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút đến 1 giờ; sau khi máu đông, mẫu máu được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút, mẫu huyết thanh thu được được đông lạnh ở nhiệt độ -80°C và bảo quản để thử nghiệm.

Nồng độ của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng IL-17A của người và kháng thể đối chứng trong huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Nói một cách ngắn gọn, protein IL-17A tái tổ hợp của người được phủ lên đĩa ELISA có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm cacbonat có độ pH=9,6 ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Để ngăn sự liên kết không đặc hiệu, đĩa được khóa bằng PBST chứa 5% bột sữa không béo, và sau đó rửa bằng PBST. Sau đó, mẫu huyết thanh cần thử nghiệm được pha loãng bằng PBST chứa 10% huyết thanh chuột hỗn hợp và 1% BSA được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ, và đĩa được rửa bằng PBST. Kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) pha loãng trong PBST

chứa 5% bột sữa gầy được bổ sung vào, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ, sau đó đĩa được rửa bằng PBST. Cuối cùng, quá trình hiện màu được thực hiện bằng cách sử dụng chất nền so màu TMB ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 μl /lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Kết quả được thể hiện trên Fig.10. Một liều tiêm 15 nmol/kg qua đường dưới da của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng IL-17A của người, kháng thể đơn dòng đối chứng Secukinumab, và kháng thể đơn dòng đối chứng Ixekizumab có đường cong nồng độ-thời gian và dữ liệu được động học giống nhau in vivo.

Cuối cùng, cần hiểu rằng các phương án nêu trên chỉ được sử dụng để minh họa giải pháp kỹ thuật của sáng chế thay vì làm giới hạn nó; mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết dựa vào các phương án nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần hiểu rằng các giải pháp kỹ thuật mô tả trong các phương án nêu trên có thể được cải biến, hoặc một số hoặc tất cả các dấu hiệu kỹ thuật có thể được thay thế theo cách tương đương; và tuy nhiên các cải biến hoặc thay thế này sẽ không làm cho bản chất của các giải pháp kỹ thuật tương ứng đi chệch khỏi phạm vi của các giải pháp kỹ thuật của các phương án của sáng chế.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp: kháng thể và đoạn chức năng của nó được đề xuất bởi sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với IL-17A, và có thể được sử dụng để phòng và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến sự biểu hiện quá mức và/hoặc giải phóng quá mức IL-17A, ví dụ bệnh viêm đường dẫn khí, bệnh hen, bệnh hen phế quản, bệnh hen dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh vẩy nến, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh xơ cứng toàn thân, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh viêm thận luput, bệnh xơ cứng bì, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh viêm ruột, bệnh viêm màng mạch nhỏ, bệnh viêm dạ dày liên quan đến *Helicobacter pylori*, bệnh loãng xương, ăn mòn xương, áp xe và dính trong màng bụng, bệnh Addison, bệnh suy giảm gamma globulin, bệnh rụng tóc từng vùng, bệnh tiêu chảy mãn, bệnh Chagas, bệnh Crohn, thải ghép khác gen cùng loài, bệnh Behcet, nhiễm khuẩn, sốc nhiễm khuẩn hoặc sốc nội độc tố và bệnh thiếu máu cục bộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với IL-17A và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH);
 trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm vùng CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 chứa các trình tự axit amin được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 1, 2 và 3;
 và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm vùng CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 chứa các trình tự axit amin được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 4, 5 và 6;
2. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng hằng định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE và IgD của người.
3. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó đoạn liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm F(ab')₂, Fab', Fab, Fv và scFv.
4. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, mà là kháng thể khảm hoặc kháng thể nhân hóa hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng.
5. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, mà là kháng thể khảm hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8;
6. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9, và vùng hằng định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10.
7. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, mà là kháng thể nhân hóa hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, và chứa các vùng khung chuỗi nhẹ của vùng FR-L1, FR-L2, FR-L3 và FR-L4, và các vùng khung chuỗi nặng của vùng FR-H1, FR-H2, FR-H3 và FR-H4; trong đó:
 FR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, hoặc các biến thể thay thế của nó trong đó axit amin thứ nhất D được thay bằng I, và/hoặc axit amin thứ hai V được thay bằng I;

FR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12, hoặc các biến thể thay thế của nó trong đó axit amin thứ tư F được thay bằng Y, và/hoặc axit amin thứ mười bốn R được thay bằng L;

FR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, hoặc các biến thể thay thế của nó trong đó axit amin thứ ba mươi lăm Y được thay bằng F;

FR-L4 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14;

FR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, hoặc các biến thể thay thế của nó trong đó axit amin thứ tư L được thay bằng V;

FR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, hoặc các biến thể thay thế của nó trong đó axit amin thứ mười lăm I được thay bằng M;

FR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17, hoặc các biến thể thay thế của nó trong đó axit amin thứ hai V được thay bằng I; và/hoặc axit amin thứ sáu V được thay bằng R; và

FR-H4 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18.

8. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 7, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 19 đến 26.

9. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 7, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 27 đến 34.

10. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 7, trong đó:

a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 19; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27;

b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 28;

c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 29;

d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 22; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30;

e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 22; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 31;

f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 32;

g) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 33;

h) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 25; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 32; hoặc

i) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26; và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 34.

11. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 và chất mang được dụng.

12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó được liên kết với ít nhất một chất chẩn đoán và/hoặc chất điều trị để tạo ra thể liên hợp miễn dịch.

13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chất chẩn đoán được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, chất tương phản phóng xạ, ion thuận từ, kim loại, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang hóa học, chất tương phản siêu âm, và chất cảm quang.

14. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chất điều trị được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể trần, chất độc tế bào, dược chất, chất đồng vị phóng xạ, nguyên tử bo, chất điều

biến miễn dịch, chất chống chết tế bào theo chương trình, chất điều trị cảm quang, thể liên hợp miễn dịch và oligonucleotit.

15. Phân tử axit nucleic được phân lập được chọn từ:

A) ADN hoặc ARN mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1; và

B) axit nucleic bổ sung cho axit nucleic được xác định trong mục A).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BEIJING HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI IL-17A HOẶC ĐOẠN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ, CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC ĐƯỢC PHÂN LẬP

<150> CN 201610827097.2

<151> 2016-09-14

<150> PCT/CN2017/101083

<151> 2016-09-08

<160> 38

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 1

Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr
1				5					10	

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 2

Lys	Val	Tyr	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 3

Gln	Ser	Thr	His	Phe	Pro	Thr
1				5		

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 4

Asn	Ser	Ile	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Ala
1				5			

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 5

Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser
1 5

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 6

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 7

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 8

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 9

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 10

<211> 330
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 10

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 11
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 11

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 12

Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
 1 5 10 15

Tyr

<210> 13
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 13

Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 14

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 15
<211> 25
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 15

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 16

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Tyr

<210> 17
<211> 30
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 17

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

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 19
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 19

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 20
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 20

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 21

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 22
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 22

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 23
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 23

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 24
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 24

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 25

<211> 111

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 25

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 26
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 26

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 27
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 27

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 28

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 29

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 30
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 30

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 31

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 32

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

[illegible]

<210>	33
<211>	120
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

<400> 33

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>	34
<211>	120
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

<400> 34

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 98
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<221> đặc điểm khác
<222> (98)..(98)
<223> Xaa có thể là axit amin tự nhiên bất kỳ

<400> 35

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Xaa

<210> 36
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 36

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

Thr His Trp Pro Pro
 100

<210> 37
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 37

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Asp Asp Ile Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 111
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 38

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

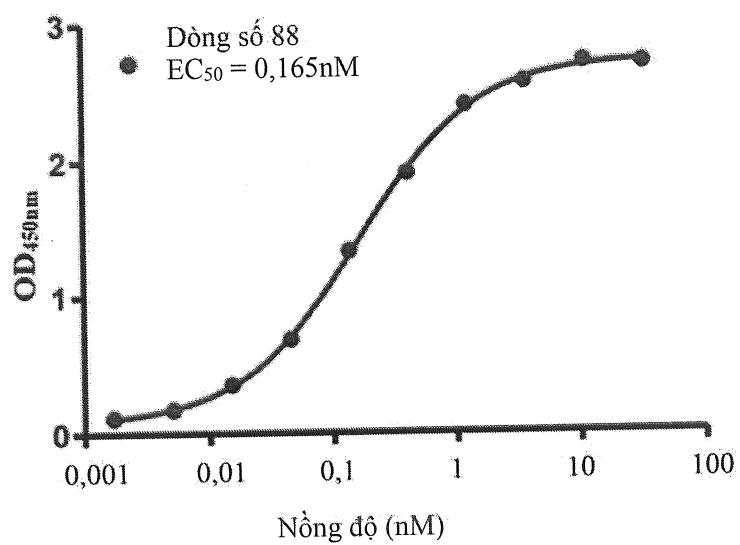


Fig.1

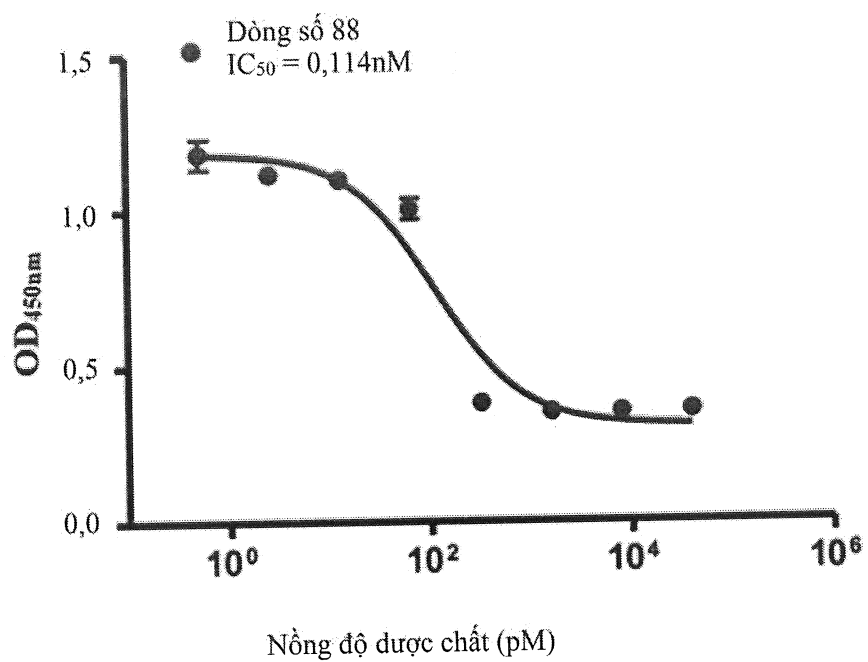


Fig.2

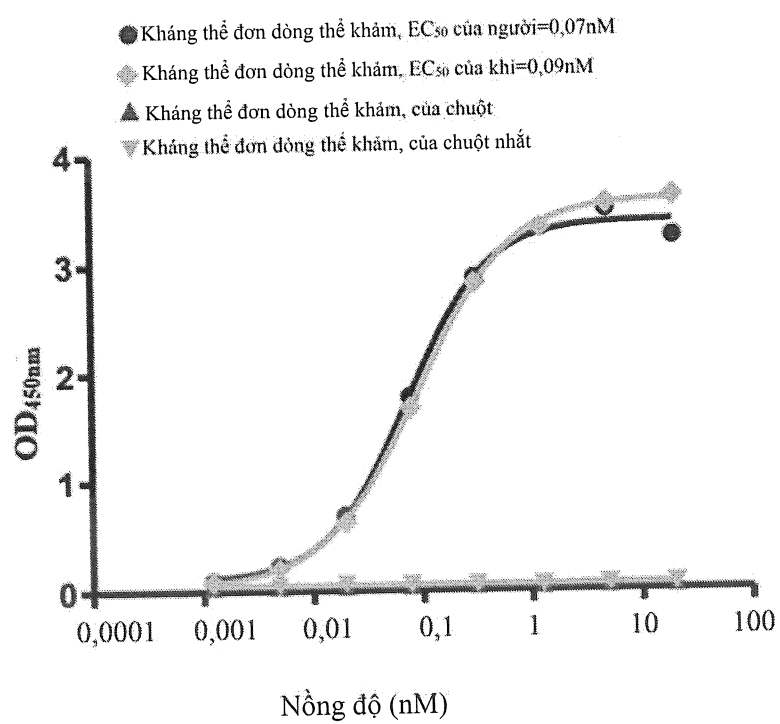


Fig.3

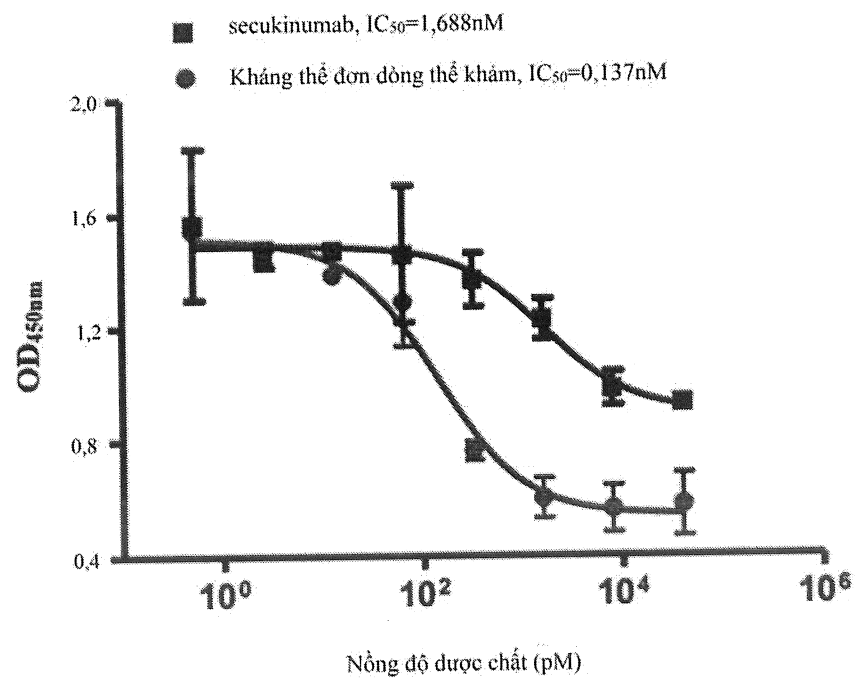


Fig.5

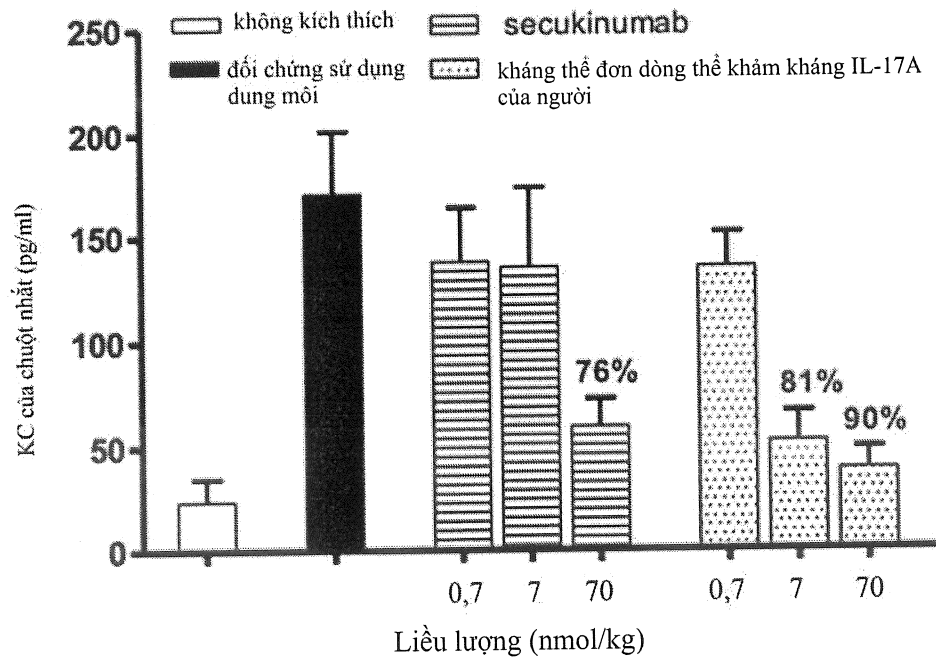


Fig.6

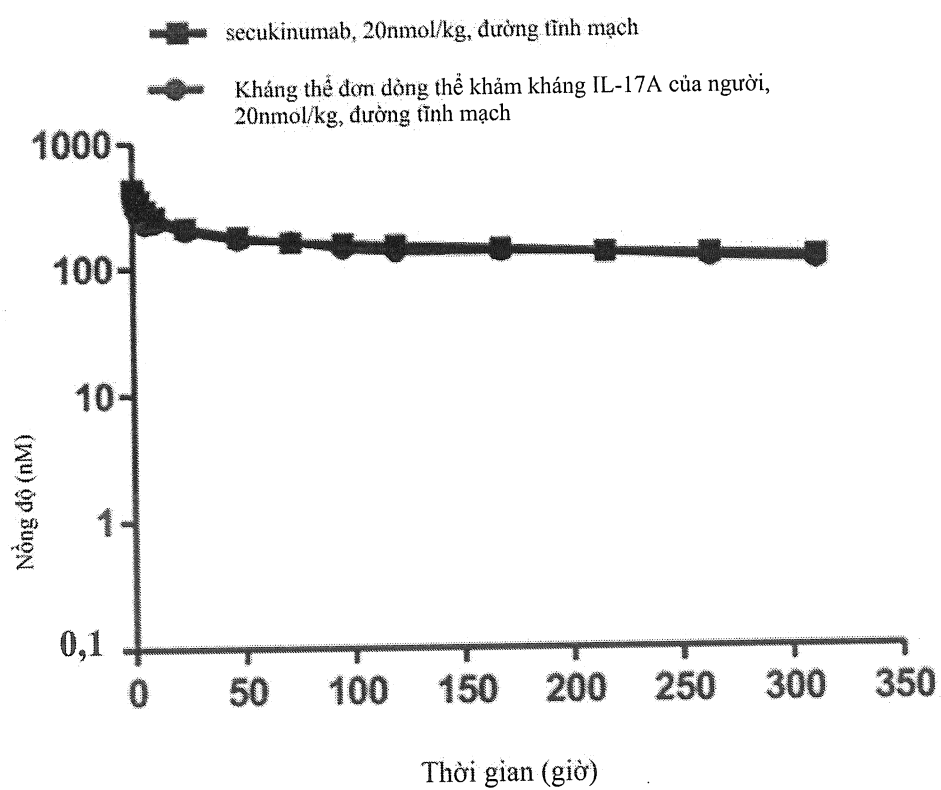


Fig.7

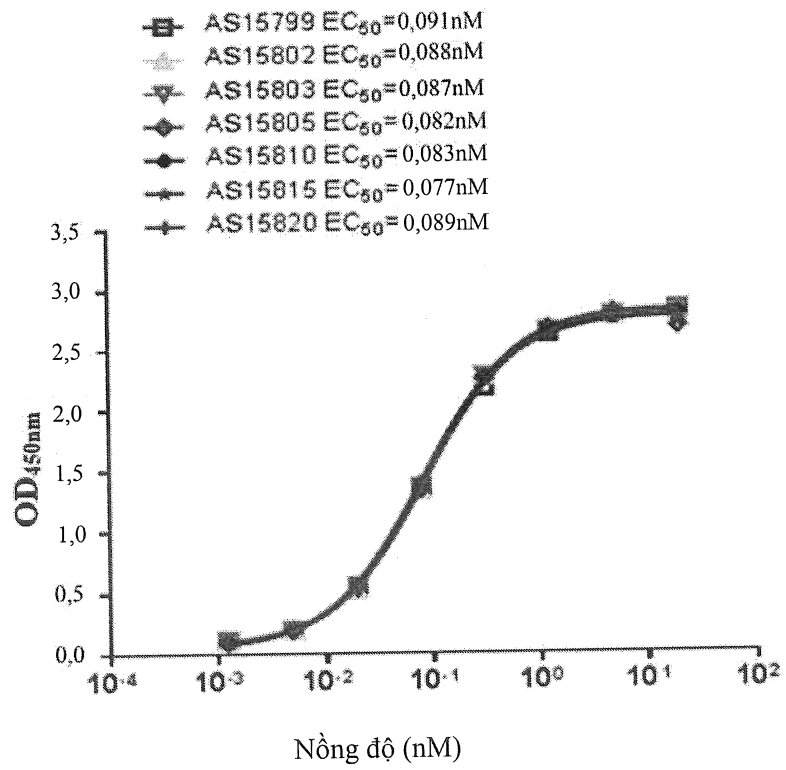


Fig.8

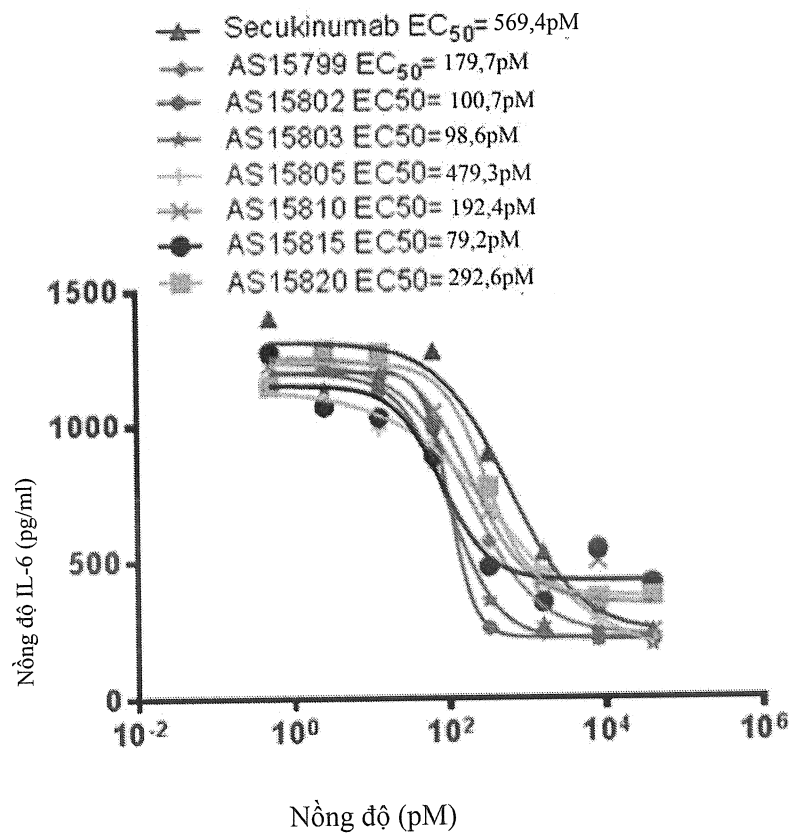


Fig.9

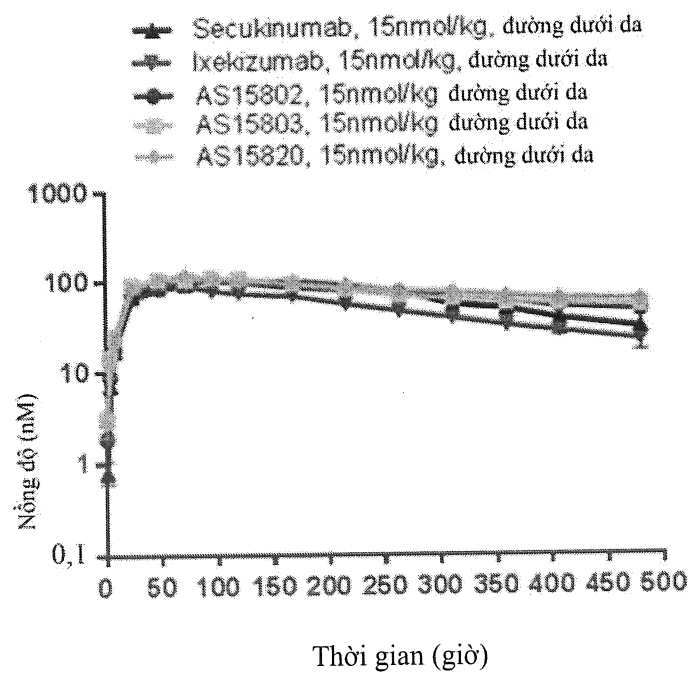


Fig.10