



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0038305

(51)⁷ C07K 16/00; C07K 16/24; C07K 16/46; (13) B
C07K 16/08

(21) 1-2019-06970

(22) 08/06/2018

(86) PCT/IB2018/054140 08/06/2018

(87) WO/2018/229612 20/12/2018

(30) 62/518,090 12/06/2017 US

(45) 25/01/2024 430

(43) 25/06/2020 387

(73) NOVARTIS AG (CH)

Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland

(72) BARDROFF, Michael Otto (DE); BUCH, Tina (DE); GRAF, Christian (DE);
HEITMANN, Daniel (DE); JOSTOCK, Thomas (DE); KNOPF, Hans-Peter (DE);
KOEHLER, Rolf (DE); KOVARIK, Jiri (CH); OLIVER, Stephen John (US);
PATEL, Dhavalkumar (US); WOISETSCHLAEGGER, Maximilian (AT).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐẶC
HIỆU KÉP, VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép thích hợp cho sự đồng biểu hiện ở tế bào chủ thông thường. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp chọn lọc kháng thể đặc hiệu kép, phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép, hệ thống biểu hiện, phương pháp chọn lọc tế bào chủ thông thường và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép hóa trị hai (bbmAb) hoặc biến thể của chúng, và phương pháp sản xuất kháng thể này bằng cách đồng biểu hiện cái gọi là dẫn xuất bị đột biến FC được cải biến núp trong lỗ của hai kháng thể đơn dòng khác nhau trong các dòng tế bào động vật có vú. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến được phẩm bao gồm kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các kháng thể đặc hiệu kép, tức là các kháng thể gắn kết với hai epitop phân biệt, đã được biết rõ trong lĩnh vực. Một phương pháp để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép là phương pháp được gọi là núp trong lỗ (KiH) được mô tả ví dụ bởi Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677-681 (1998), trong đó IgG chuỗi nặng thứ nhất được cải biến để thể hiện cấu trúc giống lỗ bằng cách đưa vào các đột biến điểm như Y349C, T366S, L368A, Y407V; và trong đó IgG chuỗi nặng thứ hai được cải biến để thể hiện cấu trúc giống núp, bằng cách đưa vào các đột biến điểm S354C, T366W ((Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677-681 (1998), trang 678, bảng 1). Sau đó hai cấu trúc IgG khác nhau này tương tác để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép hóa trị hai (bbmAb), tức là protein dị tetrame, gồm hai chuỗi nhẹ khác nhau và hai chuỗi nặng khác nhau.

Khi biểu hiện hai mAb được cải biến KiH trong cùng dòng tế bào chủ, bbmAb mong muốn chỉ tạo ra theo thống kê 25% protein được biểu hiện, còn 75% gọi là các tạp chất đi cùng sản phẩm (Klein, Ch. et al., 2012).

Một số phương pháp để khắc phục vấn đề này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, chẳng hạn như thúc đẩy sự tạo thành chính xác của bbmAb bằng cách áp dụng các cải biến trình tự khác để ép buộc sự gắn kết H-L chính xác (tổng quan xem Klein, Ch. et al., 2012; Kontermann, R. and Brinkmann, U., 2015). Tuy nhiên, các cải biến bổ sung này có thể làm tăng nguy cơ kháng thể kháng thuốc.

Phương pháp khác để tạo ra bbmAb được bộc lộ trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO12023053A2 hoặc WO04009618A2, cùng sử dụng chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kết hợp với các chuỗi biến đổi khác. Tuy nhiên, việc giữ cho một trong hai chuỗi nặng cố định làm giảm đáng kể sự đa dạng của danh mục kháng thể nơi mà các chất gắn kết có thể được sàng lọc.

Phương pháp khác nữa để tạo ra bbmAb được bộc lộ trong bằng sáng chế Mỹ số US9212230, và đưa ra sự biểu hiện và tinh chế riêng rẽ của các mAb mang các cải biến khác nhau. Các mAb thu được cuối cùng được xáo trộn *in vitro* để tạo thành bbmAb dự kiến. Việc xáo trộn *in vitro* này là bước quy trình bổ sung phức tạp mà đòi hỏi sự xác nhận cẩn thận và sự đánh giá phân tích, và có thể làm tăng đáng kể chi phí.

Do đó, các phương pháp hiện có để tạo ra bbmAb có thể hạn chế sự đa dạng của danh mục kháng thể sẵn có để sàng lọc đối với các chất gắn kết hoặc có thể không tạo ra hiệu suất tổng quát, độ tinh khiết và chất lượng sản phẩm đủ ở mức đủ hiệu quả về mặt chi phí để cho phép sản xuất ở quy mô khả thi cho sự phát triển lâm sàng và thương mại hóa. Ngoài ra, sự cải biến bất kỳ của các chuỗi protein vốn đã làm tăng nguy cơ gây ra các kháng thể kháng thuốc. Do đó, các phương pháp mà chỉ đòi hỏi thiết kế protein tối thiểu có thể được ưu tiên về mặt lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Có nhu cầu tạo ra phương pháp được cải thiện để sản xuất các kháng thể đặc hiệu kép hóa trị hai. Cụ thể là, có nhu cầu về phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép hóa trị hai (bbmAb), đảm bảo năng suất tổng thể, độ tinh khiết và chất lượng sản phẩm đủ để tiến đến sự phát triển lâm sàng và sản xuất thương mại, ở mức chi phí hợp lý.

Sáng chế đề xuất không kể những cái khác phương pháp tạo ra bbmAb có một hoặc nhiều ưu điểm sau đây: nó cho phép sử dụng danh mục kháng thể lớn để xác định chất gắn kết vì không cần các chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng chung, không cần sự thiết kế protein mở rộng bất kỳ, bên cạnh sự đột biến thúc đẩy sự dime hóa chuỗi H, và do đó hạn chế nguy cơ kháng thể kháng thuốc, hiệu quả về mặt chi phí vì sự biểu hiện được thực hiện ở dòng tế bào thông thường, do đó bbmAb này có thể được sản xuất trong một quy trình nuôi cấy tế bào mà không cần xáo trộn *in vitro* cụ thể và nó sản xuất ra nguyên

liệu chất lượng cao thích hợp để sử dụng ở người vì các tạp chất đi cùng sản phẩm có thể được loại bỏ một cách hiệu quả.

Sáng chế hữu dụng để nhận diện các kháng thể loại kappa và lambda, trong đó các chuỗi nhẹ không thể hiện sự gắn kết lộn xộn mạnh hướng đến chuỗi nặng của đối tác. Điều này làm cho các kháng thể thích hợp để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Ưu điểm của phương pháp này có thể là dạng kết hợp kháng thể trong đó cả hai chuỗi nhẹ trao đổi với đối tác gắn kết chuỗi nặng ban đầu, mà tạo ra tạp chất đi cùng sản phẩm thuộc loại H1L2-H2L1, có thể được loại bỏ. Điều này là ưu điểm, vì các tạp chất đi cùng sản phẩm như vậy không dễ để loại bỏ bằng cách sử dụng các quy trình tinh chế trong tình trạng kỹ thuật này.

Như sẽ được trình bày dưới đây, các phương án của sáng chế cho phép sản xuất bbmAb bằng cách sử dụng sự đồng biểu hiện CHO ở mức hiệu suất và chất lượng thích hợp cho sự phát triển lâm sàng và thương mại hóa của các sinh vật học.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép thích hợp cho sự đồng biểu hiện ở tế bào chủ thông thường, trong đó kháng thể này bao gồm a) phần thứ nhất mà là globulin miễn dịch có chuỗi nhẹ biến đổi thuộc kiểu đại lambda (VL1) và chuỗi nặng biến đổi thuộc kiểu đại (VH1), mà gắn kết đặc hiệu với đích thứ nhất, và chuỗi nặng cố định thứ nhất (CH1) có sự cải biến heterodime hóa, và b) phần thứ hai mà là globulin miễn dịch có chuỗi nhẹ biến đổi thuộc kiểu đại kappa (L2) và chuỗi nặng biến đổi thuộc kiểu đại (H2), mà gắn kết đặc hiệu với đích thứ hai, khác với đích thứ nhất, và chuỗi nặng cố định thứ hai (CH2) có sự cải biến heterodime hóa mà bổ sung với sự cải biến heterodime hóa của chuỗi nặng cố định thứ nhất, trong đó phần thứ nhất và phần thứ hai này, khi được đồng biểu hiện ở tế bào chủ thông thường, tạo thành kháng thể đặc hiệu kép.

Theo phương án khác của khía cạnh thứ nhất, kháng thể đặc hiệu kép thích hợp cho sự đồng biểu hiện ở tế bào chủ thông thường tạo ra, sau khi tinh chế kháng thể đặc hiệu kép này bằng cách loại bỏ các mảnh ghép đôi nhằm khỏi kháng thể đặc hiệu kép đã ghép đôi chính xác, trong kháng thể đặc hiệu kép mà tinh khiết ít nhất là 60% (khối lượng), 70% (khối lượng), 80% (khối lượng), 85% (khối lượng), chẳng hạn như tinh khiết ít nhất là 90% (khối lượng), 95% (khối lượng), 96% (khối lượng), 97% (khối lượng), 98% (khối lượng), hoặc 99% (khối lượng).

Các chuỗi nặng cố định thứ nhất và thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép này có thể là IgA, IgD, IgE, IgG, hoặc IgM của người, tốt hơn là IgD, IgE hoặc IgG. Theo phương án được ưu tiên, các chuỗi nặng cố định thứ nhất và thứ hai là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người, tốt nhất là IgG1. Theo một phương án, chuỗi nhẹ biến đổi thứ nhất thuộc loại lambda, và chuỗi nhẹ biến đổi thứ hai thuộc loại kappa.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên, chuỗi nhẹ biến đổi thứ nhất thuộc loại lambda 1, và chuỗi nhẹ biến đổi thứ hai thuộc loại kappa 6.

Các chuỗi nặng cố định thứ nhất và thứ hai có thể là IgG1, trong đó chuỗi nặng cố định thứ nhất có các đột biến điểm tạo ra cấu trúc nút và chuỗi nặng cố định thứ hai có các đột biến điểm tạo ra cấu trúc lỗ, hoặc chuỗi nặng cố định thứ nhất có các đột biến điểm tạo ra cấu trúc lỗ và chuỗi nặng cố định thứ hai có các đột biến điểm tạo ra cấu trúc nút. Tùy ý, các chuỗi nặng cố định thứ nhất và thứ hai có thể có thêm các đột biến tạo thành cầu nối disulfua.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm miền VH1 globulin miễn dịch thứ nhất, miền VL1 globulin miễn dịch thứ nhất, miền VH2 globulin miễn dịch thứ hai và miền VL2 globulin miễn dịch thứ hai, trong đó miền VH1 globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm (ví dụ trong trình tự): các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:76, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:77, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:78; hoặc các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:79, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:80, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:81; và miền VL1 globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm (ví dụ trong trình tự): các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:92, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:93, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:94 hoặc các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:95, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:96, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:97; miền VH2 globulin miễn dịch thứ hai bao gồm (ví dụ trong trình tự): các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:44, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:45, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:46; hoặc các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:47, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:48, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:49; và miền VL2 globulin miễn

dịch thứ hai bao gồm (ví dụ trong trình tự): các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:60, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:61, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:62 hoặc các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:63, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:64, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:65.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm miền VH1 globulin miễn dịch thứ nhất, miền VL1 globulin miễn dịch thứ nhất, miền VH2 globulin miễn dịch thứ hai và miền VL2 globulin miễn dịch thứ hai, trong đó: miền VH1 globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 85, miền VL1 globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 101, miền VH2 globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 53, miền VL2 globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 69.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ nhất, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ nhất, chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ hai và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ hai, trong đó: chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 87, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 103, chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 55, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 71.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc kháng thể đặc hiệu kép theo khía cạnh thứ nhất, phương pháp này bao gồm; bước thứ nhất là chọn lọc phần thứ nhất, và phần thứ hai; bước thứ hai là đồng biểu hiện phần thứ nhất và phần thứ hai ở tế bào chủ thông thường, tạo thành kháng thể đặc hiệu kép bao gồm phần thứ nhất và phần thứ hai; bước thứ ba là tinh chế kháng thể đặc hiệu kép bằng cách loại bỏ các mảnh ghép đôi nhằm khỏi kháng thể đặc hiệu kép đã ghép đôi chính xác. Theo một phương án, bước thứ ba là tinh chế tạo thành kháng thể đặc hiệu kép mà tinh khiết ít nhất là 60% (khối lượng), 70% (khối lượng), 80% (khối lượng), 85% (khối lượng), chẳng hạn như tinh khiết ít nhất là 90% (khối lượng), 95% (khối lượng), 96% (khối lượng), 97% (khối lượng), 98% (khối lượng), hoặc 99% (khối lượng).

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép theo khía cạnh thứ nhất bằng sự đồng biểu hiện ở tế bào chủ thông thường,

phương pháp này bao gồm; bước thứ nhất là tạo ra ít nhất là một vector mã hóa phần thứ nhất và phần thứ hai; bước thứ hai là đưa ít nhất là một vector vào trong tế bào chủ thông thường; bước thứ ba là chọn lọc các tế bào biểu hiện đặc hiệu kháng thể đặc hiệu kép; bước thứ tư là nuôi cấy các tế bào được chọn trong điều kiện trong đó các tế bào này biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép; và bước thứ năm là tinh chế kháng thể đặc hiệu kép mà tinh khiết ít nhất là 60% (khối lượng), 70% (khối lượng), 80% (khối lượng), 85% (khối lượng), chẳng hạn như tinh khiết ít nhất là 90% (khối lượng), 95% (khối lượng), 96% (khối lượng), 97% (khối lượng), 98% (khối lượng), hoặc 99% (khối lượng).

Theo một phương án, bước thứ nhất bao gồm việc tạo ra vector thứ nhất mã hóa phần thứ nhất và vector thứ hai mã hóa phần thứ hai.

Theo khía cạnh thứ tư, hệ thống biểu hiện bao gồm ít nhất là một vector bao gồm polynucleotit mã hóa phần thứ nhất hoặc phần thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép theo khía cạnh thứ nhất, và chỉ thị chọn lọc.

Theo một phương án, hệ thống biểu hiện bao gồm polynucleotit mã hóa chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I); và polynucleotit mã hóa chỉ thị chọn lọc thứ hai (sm II), mà khác với chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I).

Theo một phương án, chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I) là yếu tố vận chuyển folat hoặc polynucleotit mã hóa thụ thể folat đột biến, trong đó thụ thể folat đột biến có ái lực gắn kết folat giảm so với thụ thể folat kiểu dại và chỉ thị chọn lọc thứ hai (sm II) là DHFR.

Theo một phương án, chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I) là Hygromyxin và chỉ thị chọn lọc thứ hai (sm II) là Neo/G418.

Theo một phương án, hệ thống biểu hiện bao gồm hai vector biểu hiện trong đó: vector thứ nhất bao gồm polynucleotit mã hóa ít nhất là chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I) và ít nhất là các polynucleotit mã hóa phần thứ nhất; và vector thứ hai bao gồm polynucleotit mã hóa ít nhất là chỉ thị chọn lọc thứ hai (sm II) và ít nhất là các polynucleotit mã hóa phần thứ hai.

Hệ thống biểu hiện có thể bao gồm bộ ba kết thúc xuôi dòng của các polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và polynucleotit mã hóa vùng neo màng globulin miễn dịch nằm xuôi dòng của bộ ba kết thúc.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc tế bào chủ thông thường để sử dụng trong phương pháp theo các khía cạnh trước đó, bao gồm bước thứ nhất là tạo ra nhiều tế bào chủ, bao gồm hệ thống biểu hiện theo các khía cạnh trước đó; và nuôi cấy các tế bào chủ này trong điều kiện chọn lọc đối với chỉ thị chọn lọc, từ đó thu được tế bào chủ biểu hiện sản phẩm quan tâm.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy chọn lọc được chọn từ nhóm gồm có môi trường bao gồm nồng độ giới hạn của folat; và/ hoặc bao gồm axit folic ở nồng độ là 500nM hoặc thấp hơn; và/ hoặc bao gồm axit folic ở nồng độ được chọn từ: 1000nM – 100pM; 100nM – 1nM; 15nM – 1nM; 10nM – 1nM; và 10nM – 2,5nM; và/ hoặc bao gồm chất ức chế DHFR; và/ hoặc bao gồm chất kháng folat; và/ hoặc bao gồm chất kháng folat ở nồng độ là 500nM hoặc thấp hơn; và/ hoặc bao gồm MTX ở nồng độ được chọn từ: 500nM – 3nM; 100nM – 10nM; 50nM – 10nM; và 50nM; và/ hoặc bao gồm nồng độ chất kháng folat gấp lên đến 20 lần nồng độ folat; và/ hoặc bao gồm nồng độ chất kháng folat gấp 10 – 20 lần nồng độ folat; và/ hoặc bao gồm axit folic ở nồng độ lên đến 15nM và nồng độ đẳng mol lên đến 20 lần MTX.

Theo một phương án, tế bào chủ bao gồm hệ thống biểu hiện trong đó ít nhất là một phần của phần thứ nhất hoặc phần thứ hai được biểu hiện dưới dạng polypeptit dung hợp bao gồm vùng neo xuyên màng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó, trong đó polypeptit dung hợp này đang được biểu hiện trên bề mặt của tế bào chủ đã nêu, còn bao gồm bước: cho nhiều tế bào chủ tiếp xúc với hợp chất phát hiện gắn kết với polypeptit dung hợp này; chọn lọc ít nhất là một tế bào chủ dựa vào sự có mặt hoặc lượng hợp chất phát hiện được gắn kết với bề mặt tế bào này.

Theo một phương án, hợp chất phát hiện bao gồm đích thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc dẫn xuất của nó, và chất đánh dấu phát hiện.

Theo một phương án, bước thứ năm là tinh chế kháng thể đặc hiệu kép bao gồm sắc ký ái lực và/ hoặc sắc ký trao đổi ion.

Theo một phương án, sắc ký này bao gồm bước thứ nhất là bắt giữ; bước thứ hai là làm bóng; và tùy ý bước thứ ba là hoàn thiện.

Theo một phương án, bước thứ nhất là bắt giữ được thực hiện theo nguyên lý được chọn từ nhóm gồm có sắc ký ái lực gắn kết Fc, như Protein A hoặc Protein G, sắc

ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ lambda, đã biết rõ trong lĩnh vực này, và có bán sẵn, ví dụ LambdaFabSelect™, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ kappa, đã biết rõ trong lĩnh vực này, và có bán sẵn, ví dụ KappaSelect™, sắc ký ái lực kháng idiotyp, như phần thứ nhất hoặc phần thứ hai, sắc ký ái lực dựa vào đích, như sắc ký ái lực sử dụng đích thứ nhất hoặc đích thứ hai, sắc ký trao đổi ion, đã biết rõ trong lĩnh vực này, và có bán sẵn, ví dụ chất dính Capto™, hoặc Fractogel™ EMD SO₃, và sắc ký tương tác kỵ nước.

Theo một phương án, bước thứ hai là hoàn thiện được thực hiện theo nguyên lý được chọn từ nhóm gồm có sắc ký ái lực gắn kết Fc, như Protein A hoặc Protein G, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ lambda, như LambdaFabSelect™, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ kappa, như KappaSelect™, sắc ký ái lực kháng idiotyp, như phần thứ nhất hoặc phần thứ hai, sắc ký ái lực dựa vào đích, như sắc ký ái lực sử dụng đích thứ nhất hoặc đích thứ hai, sắc ký trao đổi ion, như chất dính Capto™, hoặc Fractogel™ EMD SO₃, sắc ký tương tác kỵ nước, và sự bất hoạt virus.

Theo một phương án, bước thứ ba là hoàn thiện được thực hiện theo nguyên lý được chọn từ nhóm gồm có sắc ký ái lực gắn kết Fc, như Protein A hoặc Protein G, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ lambda, như LambdaFabSelect™, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ kappa, như KappaSelect™, sắc ký ái lực kháng idiotyp, như phần thứ nhất hoặc phần thứ hai, sắc ký ái lực dựa vào đích, như sắc ký ái lực sử dụng đích thứ nhất hoặc đích thứ hai, sắc ký trao đổi ion, như chất dính Capto™, hoặc Fractogel™ EMD SO₃, sắc ký tương tác kỵ nước, và sự bất hoạt virus.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước thứ nhất là bắt giữ Protein A, như MabSelect™ SuRe™, bước thứ hai sắc ký ái lực chuỗi nhẹ lambda, như LambdaFabSelect™, và bước thứ ba sắc ký ái lực chuỗi nhẹ kappa như KappaSelect™; hoặc bước thứ nhất Protein A, như MabSelect™ SuRe™, bước thứ hai sắc ký ái lực chuỗi nhẹ kappa như KappaSelect™, và bước thứ ba sắc ký ái lực chuỗi nhẹ lambda, như LambdaFabSelect™; hoặc bước thứ nhất sắc ký ái lực chuỗi nhẹ kappa như KappaSelect™ và bước thứ hai sắc ký ái lực chuỗi nhẹ lambda, như LambdaFabSelect™; hoặc bước thứ nhất sắc ký ái lực chuỗi nhẹ lambda, như LambdaFabSelect™ và bước thứ hai sắc ký ái lực chuỗi nhẹ kappa như KappaSelect™.

Theo một phương án, dòng tế bào được chọn từ nhóm gồm có tế bào CHO, tế bào lai không sản xuất, như Sp 2/0 hoặc NS0, dòng tế bào thu được từ người, như HEK

hoặc PER.C6, dẫn xuất thận chuột đồng non (BHK), nấm men hoặc nấm sợi, vi khuẩn nhân sơ, như *E. coli* hoặc *Pseudomonas fluorescence*, dẫn xuất từ thực vật, tảo và sinh vật có lông mao.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất dược phẩm, ba gồm kháng thể theo khía cạnh thứ nhất và chất mang dược dụng.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất kháng thể theo khía cạnh thứ nhất, hoặc dược phẩm theo khía cạnh thứ sáu, để sử dụng làm thuốc.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất kháng thể theo khía cạnh thứ nhất, hoặc dược phẩm theo khía cạnh thứ sáu, để sử dụng trong việc điều trị bệnh liên quan đến inflammasom.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất kháng thể theo khía cạnh thứ nhất, hoặc dược phẩm theo khía cạnh thứ sáu, để sử dụng trong việc điều trị bệnh liên quan đến inflammasom, trong đó bệnh liên quan đến inflammasom này được chọn từ nhóm gồm có bệnh hồng cầu hình liềm, bệnh lý mạch máu, tổn thương tái tưới máu-thiếu máu cục bộ, bệnh tim mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh xơ vữa động mạch, rối loạn chức năng mạch máu, bệnh thiếu máu cục bộ cơ xương, bệnh sarcoit phổi, bệnh xơ hóa, bệnh sốt rét, bệnh thận mạn tính, phụ thuộc thẩm tách máu và bệnh Crohn.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn liên quan đến inflammasom bao gồm bước sử dụng cho đối tượng bị rối loạn liên quan đến inflammasom lượng hữu hiệu của kháng thể theo khía cạnh thứ nhất hoặc dược phẩm theo khía cạnh thứ sáu.

Rối loạn liên quan đến inflammasom này có thể là bệnh hồng cầu hình liềm, bệnh lý mạch máu, tổn thương tái tưới máu-thiếu máu cục bộ, bệnh tim mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh xơ vữa động mạch, rối loạn chức năng mạch máu, bệnh thiếu máu cục bộ cơ xương, bệnh sarcoit phổi, bệnh xơ hóa, bệnh sốt rét, bệnh thận mạn tính, phụ thuộc thẩm tách máu hoặc bệnh Crohn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ tổng quát về thiết lập vector theo một phương án.

Hình 2A - 2E thể hiện các biểu đồ sắc ký theo một phương án. Hình 2A là biểu đồ sắc ký RP-UV của bbmAb nguyên vẹn được khử glycosyl hóa theo một phương án. Hình 2B là phổ khối lượng được tháo xoắn của bbmAb1 nguyên vẹn được khử glycosyl hóa theo một phương án. Hình 2C là biểu đồ sắc ký RP-UV thể hiện các mảnh được cắt phân bằng papain của bbmAb theo một phương án. Hình 2D là biểu đồ sắc ký RP-UV thể hiện các mảnh được phân cắt bằng IdeS của bbmAb theo một phương án. Hình 2E là biểu đồ sắc ký RP-UV thể hiện các mảnh được khử glycosyl hóa và được khử DTT của bbmAb theo một phương án.

Hình 3A - 3D thể hiện các biểu đồ sắc ký RP-UV theo một phương án. Hình 3A là biểu đồ sắc ký thể hiện biên dạng độ tinh khiết biểu hiện của bbmAb theo một phương án sau khi cấy. Hình 3B là biểu đồ sắc ký của bbmAb theo một phương án sau khi bắt giữ bằng LambdaFabSelect™. Hình 3C là biểu đồ sắc ký của bbmAb theo một phương án sau khi bắt giữ bằng MabSelect™ SuRe™. Hình 3D là biểu đồ sắc ký của bbmAb theo một phương án sau khi bắt giữ bằng LambdaFabSelect™, hoàn thiện bằng Fractogel™ EMD SO₃ và lọc qua máy siêu lọc.

Hình 4A - 4M là sơ đồ tổng quát về các phương án khác nhau đối với việc ghép đôi nhằm đặc hiệu kép. Hình 4A là sơ đồ biểu diễn của monome núm (lambda) của mAb1, trong đó số 1 là miền chuỗi nặng biến đổi, số 2 là miền chuỗi nặng cố định thứ nhất, số 3 là miền chuỗi nặng cố định thứ hai và số 4 là miền chuỗi nặng cố định thứ ba. Số 5 là miền chuỗi nhẹ biến đổi và số 6 là miền chuỗi nặng biến đổi. Hình 4B là sơ đồ biểu diễn của homodime núm (lambda) của mAb1. Hình 4C là sơ đồ biểu diễn của monome lỗ (kappa) của mAb2, trong đó số 7 là miền chuỗi nặng biến đổi, số 8 là miền chuỗi nặng cố định thứ nhất, số 9 là miền chuỗi nặng cố định thứ hai và số 10 là miền chuỗi nặng cố định thứ ba. Số 11 là miền chuỗi nhẹ biến đổi và số 12 là miền chuỗi nặng không đổi. Hình 4D là sơ đồ biểu diễn của homodime lỗ (kappa) của mAb2. Hình 4E là sơ đồ biểu diễn của homodime núm của mAb1 có một sự bắt cặp nhằm CH/LC. Hình 4F là sơ đồ biểu diễn của homodime núm của mAb1 có hai sự bắt cặp nhằm CH/LC. Hình 4G là sơ đồ biểu diễn của homodime núm của mAb1 có một sự bắt cặp nhằm CH/LC. Hình 4H là sơ đồ biểu diễn của homodime lỗ của mAb2 có một sự bắt cặp nhằm CH/LC. Hình 4I là sơ đồ biểu diễn của homodime lỗ của mAb2 có hai sự bắt cặp nhằm CH/LC. Hình 4J là sơ đồ biểu diễn của homodime lỗ của mAb2 có một sự bắt cặp nhằm

CH/LC. Hình 4K là sơ đồ biểu diễn của bbmAb1 có một sự bắt cặp nhằm kappa (CH/LC). Hình 4L là sơ đồ biểu diễn của bbmAb1 có một sự bắt cặp nhằm lambda (CH/LC). Hình 4M là sơ đồ biểu diễn của bbmAb1 có hai sự bắt cặp nhằm CH/LC.

Hình 5 thể hiện các đường cong chuẩn độ của phương pháp xác định ái lực dựa vào ECL theo một ví dụ.

Hình 6A - 6B thể hiện hai biểu đồ theo một ví dụ.

Hình 7A - 7B thể hiện hai biểu đồ theo một ví dụ.

Hình 8A - 8B thể hiện các mức biểu hiện mARN theo một ví dụ.

Hình 9A - 9B thể hiện các mức biểu hiện mARN theo một ví dụ.

Hình 10A - 10B thể hiện hai biểu đồ theo một ví dụ.

Hình 11 là đồ thị thể hiện các sự tương quan thống kê theo một ví dụ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế không kể những thứ khác (inter alia) dựa trên sự phát hiện bất ngờ rằng các kháng thể nhất định có chuỗi nhẹ thuộc loại lambda (λ) có khả năng đồng biểu hiện với các kháng thể nhất định có chuỗi nhẹ thuộc loại kappa (κ), để tạo thành bbmAb mong muốn.

Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, các CDR của mỗi chuỗi nhẹ và/ hoặc chuỗi nặng có thể ảnh hưởng đáng kể đến chuỗi nhẹ thuộc loại lambda (λ) mà có khả năng đồng biểu hiện với các kháng thể nhất định có chuỗi nhẹ thuộc loại kappa (κ) để thành công thu được bbmAb được tạo thành.

Các kháng thể có chuỗi nhẹ thuộc loại lambda (λ) mà có khả năng đồng biểu hiện với các kháng thể cụ thể có chuỗi nhẹ thuộc loại kappa (κ), để tạo thành bbmAb mong muốn, sau đây còn được gọi là các chất gắn kết đặc hiệu đơn, có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các công nghệ mang lại cơ hội để thu được cả hai loại kháng thể thuộc kháng thể loại kappa hoặc lambda, như các thư viện hiển thị phago, ví dụ HuUCAL GOLD® hoặc HuCAL PLATINUM® (MorphoSys), hoặc bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen, trong đó các trình tự globulin miễn dịch người có liên quan đã được đưa vào trong bộ gen của động vật này bằng cách thiết kế di truyền, ví dụ các kháng thể OmniAb (OMT), Kymouse™ (Kymab), Trianni Mouse™ (Trianni) hoặc AlivaMab

Mouse (Ablexis) (tham chiếu) có thể tạo ra các kháng thể loại kappa hoặc lambda. Các phương pháp để tạo ra các chất gắn kết đặc hiệu đơn như vậy đã được biết đến trong lĩnh vực chuyên ngành, và được áp dụng rộng rãi để tạo ra các tập hợp đa dạng các chất gắn kết đặc hiệu đơn loại kappa hoặc lambda hướng đến đích liên quan được quan tâm. Các chất gắn kết đặc hiệu đơn riêng rẽ được xác định đặc điểm đối với các thông số sinh học liên quan như ái lực hoặc hiệu lực, và cũng được sàng lọc đối với ví dụ các đặc tính lý hóa liên quan để phán đoán các đặc tính được gọi là khả năng phát triển mà cũng đã biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ Lorenz et al., American Pharmaceutical Review, August 8, 2014). Chất gắn kết đặc hiệu đơn thể hiện các đặc tính tốt nhất cuối cùng được đồng biểu hiện trong ví dụ như các tế bào CHO như được mô tả chi tiết dưới đây. Chỉ các dạng kết hợp được thử nghiệm bởi sự đồng biểu hiện mà kháng thể loại kappa gắn kết với đích thứ nhất được kết hợp với kháng thể loại lambda gắn kết với đích thứ hai, và ngược lại. Sản phẩm đồng biểu hiện thu được và các tạp chất đi cùng sản phẩm có liên quan được xác định đặc điểm chi tiết nhằm chọn lọc dạng kết hợp mà mang lại biên dạng tốt nhất, đặc biệt là các dạng kết hợp chỉ thể hiện lượng thấp của sự gắn kết lộn xộn của một chuỗi nhẹ (ví dụ L1, chuỗi nhẹ 1, ví dụ lambda), hướng đến chuỗi nặng sai (ví dụ H2, chuỗi nặng 2). Thuận lợi của phương pháp này có thể là các dạng kết hợp kháng thể mà cả hai chuỗi nhẹ trao đổi đối tác gắn kết chuỗi nặng ban đầu, mà tạo ra tạp chất gắn kết đến sản phẩm thuộc loại H1L2-H2L1, có thể được loại bỏ. Điều này là ưu điểm, vì các tạp chất đi cùng sản phẩm như vậy không dễ để loại bỏ bằng cách sử dụng các quy trình tinh chế trong tình trạng kỹ thuật. Quy trình để đồng biểu hiện các kháng thể riêng rẽ và phân tích sản phẩm đồng biểu hiện được nêu chi tiết dưới đây.

Các kháng thể đặc hiệu được sử dụng làm ví dụ, mAb2 sơ cấp gắn kết với IL-1 β , có chuỗi nhẹ V κ 6 và mAb1 gắn kết với IL-18, có chuỗi nhẹ V λ 1.

Theo một phương án ưu tiên, sự cải biến KiH của phần Fc của hai kháng thể theo Ridgway et al., (1996) được sử dụng. Các kháng thể khác cũng được thử nghiệm.

Như sẽ được thể hiện trong các ví dụ cụ thể dưới đây, bbmAb1 theo phương án ưu tiên được biểu hiện với dòng tế bào đơn, thông thường đảm bảo hiệu suất tổng quát, độ tinh khiết và chất lượng sản phẩm đủ được yêu cầu về mặt sinh học hoặc chẩn đoán để tiến đến sự phát triển lâm sàng và thương mại hóa.

1. Định nghĩa

Nhằm các mục đích hiểu sáng chế này, các định nghĩa sau đây sẽ được áp dụng và khi thích hợp, các thuật ngữ được sử dụng ở dạng số ít cũng sẽ bao gồm cả dạng số nhiều và ngược lại. Các định nghĩa khác được nêu trong toàn bộ phần mô tả chi tiết sáng chế.

Thuật ngữ "IL-18" là đồng nghĩa với polypeptit IL-18, polypeptit Intolokin-18, yếu tố cảm ứng IFN-gamma hoặc yếu tố cảm ứng Interferon-gamma hoặc yếu tố cảm ứng INF- γ . Thuật ngữ "IL-18" dùng để chỉ IL-18 người, trừ khi các loài khác được chỉ ra. IL-18 đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và ví dụ thu được từ MBL® International Corporation với số chỉ dẫn sản phẩm là #B001-5. Trong toàn bộ bản mô tả này, thuật ngữ IL-18 bao hàm cả tiền IL-18 (tiền chất của IL-18 trưởng thành trước khi phân tách bằng proteaza) và IL-18 trưởng thành (sau khi phân cắt bằng proteaza) dùng thay thế cho nhau trừ khi được quy định cụ thể có nghĩa là dạng tiền chất hoặc dạng trưởng thành.

Thuật ngữ "IL-1 β " hoặc "IL-1b" là đồng nghĩa với polypeptit IL-1 β và polypeptit Intolokin-1 β . Thuật ngữ "IL-1 β " dùng để chỉ IL-1 β người trừ khi loài khác được chỉ ra. IL-1 β đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và ví dụ thu được từ Sino Biological với số chỉ dẫn sản phẩm là #10139-HNAE-5.

Thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ globulin miễn dịch nguyên vẹn hoặc mảnh chức năng của nó. Các kháng thể có trong tự nhiên thường bao gồm tetrame mà luôn được tạo thành từ ít nhất hai chuỗi nặng (H) và ít nhất hai chuỗi nhẹ (L). Mỗi chuỗi nặng được tạo thành từ vùng biến đổi trên chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là VH) và vùng không đổi chuỗi nặng, luôn được tạo thành từ ba miền (CH1, CH2 và CH3). Các chuỗi nặng có thể thuộc isotyp bất kỳ, bao gồm IgG (các typ phụ IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4), IgA (các typ phụ IgA1 và IgA2), IgM và IgE. Mỗi chuỗi nhẹ được tạo thành từ vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là VL) và vùng không đổi chuỗi nhẹ (CL). Chuỗi nhẹ gồm các chuỗi kappa (κ) và các chuỗi lambda (λ). Vùng biến đổi trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thường chịu trách nhiệm đối với sự nhận diện kháng nguyên, trong khi vùng không đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể làm trung gian cho sự gắn kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố vật chủ, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ các tế bào tác động) và thành phần thứ nhất (C1q) của hệ thống bổ thể cổ điển. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ thành các vùng có khả năng

siêu biến, gọi là vùng xác định bổ sung (complementarity determining region - CDR), xen kẽ với các vùng được bảo tồn nhiều hơn, được gọi là vùng khung hoạt động (framework region - FR). Mỗi VH và VL gồm ba CDR và bốn FR được sắp xếp từ đầu amin đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết mà tương tác với kháng nguyên.

Thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc đơn giản là "phần kháng nguyên"), như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc một hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên IL-13 hoặc IL-1 β . Đã được chỉ ra rằng chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các ví dụ về các mảnh gắn kết được bao hàm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm mảnh Fab, mảnh hóa trị một gồm các miền VL, VH, CL và CH1; mảnh F(ab)₂, mảnh hóa trị hai gồm hai mảnh Fab được gắn kết bởi cầu nối disulfua tại vùng bản lề; mảnh Fd gồm các miền VH và CH1; mảnh Fv gồm các miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể; mảnh dAb (Ward et al., (1989) Nature; 341:544-546), mà gồm miền VH; và vùng quyết định bổ sung (CDR) được phân lập.

Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng rẽ, chúng có thể được kết hợp, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng cầu nối linh hoạt mà cho phép chúng được tạo ra dưới dạng chuỗi protein đơn trong đó các vùng VL và VH bắt cặp để tạo thành các phân tử hóa trị một (được biết dưới dạng Fv đơn chuỗi (scFv); xem ví dụ Bird et al., (1988) Science 242:423-426; và Huston et al., (1988) Proc Natl Acad Sci. 85:5879-5883). Các kháng thể đơn chuỗi này cũng được dự định là được bao hàm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Các mảnh kháng thể này thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và các mảnh này được sàng lọc để sử dụng theo cùng phương thức như kháng thể nguyên vẹn.

Thuật ngữ "được phân lập" trong toàn bộ bản mô tả này, có nghĩa là globulin miễn dịch, kháng thể hoặc polynucleotit, như trường hợp có thể được, tồn tại trong các môi trường vật lý khác biệt với môi trường mà nó có thể có mặt trong tự nhiên.

Trong toàn bộ bản mô tả này, các vùng quyết định bổ sung ("CDR") được xác định theo định nghĩa Kabat trừ khi được chỉ ra cụ thể là CDR được xác định theo định nghĩa khác. Ranh giới trình tự axit amin chính xác của CDR nhất định có thể được xác định bằng cách sử dụng số lượng bất kỳ của các sơ đồ đã được biết rõ, gồm các sơ đồ được mô tả bởi Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (sơ đồ đánh số "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (sơ đồ đánh số "Chothia") và đánh số ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) (sơ đồ đánh số "IMGT"). Ví dụ như, đối với các định dạng cổ điển, theo Kabat, các gốc axit amin CDR trong miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được đánh số 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), và 95-102 (HCDR3); và các gốc axit amin CDR trong miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được đánh số 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), và 89-97 (LCDR3). Theo Chothia, các axit amin CDR trong VH được đánh số 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2), và 95-102 (HCDR3); và các gốc axit amin trong VL được đánh số 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), và 91-96 (LCDR3). Bằng cách kết hợp các định nghĩa CDR của cả Kabat và Chothia, CDR gồm có các gốc axit amin 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), và 95-102 (HCDR3) trong VH người và các gốc axit amin 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), và 89-97 (LCDR3) trong VL người. Theo IMGT, các gốc axit amin CDR trong VH được đánh số xấp xỉ 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) và 93-102 (CDR3), và các gốc axit amin CDR trong VL được đánh số xấp xỉ 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2), và 89-97 (CDR3) (cách đánh số theo "Kabat"). Theo IMGT, các vùng CDR của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình IMGT/DomainGap Align.

Theo quy ước, các vùng CDR trong chuỗi nặng thường được đề cập đến dưới dạng H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 và trong chuỗi nhẹ là L-CDR1, LCDR2 và L-CDR3. Chúng được đánh số liên tiếp theo hướng từ đầu amino đến đầu carboxy.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chế phẩm của các phân tử kháng thể của hợp phần đơn phân tử. Hợp phần kháng thể đơn dòng thể hiện độ đặc hiệu và ái lực gắn kết đơn lẻ đối với epitop cụ thể.

Thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng ở đây, được dự định là bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi trong đó cả vùng khung hoạt động và vùng CDR được tạo ra từ trình tự có nguồn gốc từ người. Ngoài ra, nếu kháng thể này chứa vùng không đổi, vùng không đổi này cũng được tạo ra từ trình tự của người này, ví dụ, trình tự dòng mầm người, hoặc các phiên bản đột biến của trình tự dòng mầm người hoặc kháng thể chứa trình tự khung hoạt động liên ứng thu được từ phân tích trình tự khung hoạt động của người, ví dụ như, như được mô tả trong Knappik et al., (2000) J Mol Biol; 296:57-86).

Kháng thể người theo sáng chế có thể gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng ở đây, không được dự định là bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR thu được từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột nhắt, đã được ghép lên trên các trình tự khung hoạt động người.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng người" dùng để chỉ các kháng thể thể hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn mà có các vùng biến đổi trong đó cả vùng khung hoạt động và CDR đều thu được từ các trình tự của người.

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp", như được sử dụng ở đây, bao gồm tất cả các kháng thể người được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng phương pháp tái tổ hợp, như các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ chuột nhắt) mà chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể đối với các gen globulin miễn dịch người hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó, các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể người, ví dụ từ tế bào chuyển nạp, các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người tổ hợp, tái tổ hợp, và các kháng thể được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng các cách bất kỳ khác mà bao gồm việc ghép nối tất cả hoặc một phần của gen globulin miễn dịch người. Các kháng thể người tái tổ hợp này có các vùng biến đổi trong đó vùng khung hoạt động và CDR thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Tuy nhiên, theo các phương án cụ thể, các kháng thể người tái tổ hợp này có thể được tiến hành gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi động vật chuyển gen đối với các trình tự Ig người được sử dụng) và do đó các trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp này là các trình

tự mà, mặc dù thu được từ và liên quan đến các trình tự VH và VL dòng mầm người, có thể không tồn tại tự nhiên bên trong danh mục dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Các cụm từ "kháng thể nhận diện kháng nguyên" và "kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên" được sử dụng thay thế nhau ở đây với thuật ngữ "kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên".

Như được sử dụng ở đây, phân tử gắn kết mà "gắn kết đặc hiệu với IL-18" được dùng để chỉ phân tử gắn kết mà gắn kết với IL-18 người với K_D là 100nM hoặc thấp hơn, 10nM hoặc thấp hơn, 1nM hoặc thấp hơn.

Như được sử dụng ở đây, phân tử gắn kết mà "gắn kết đặc hiệu với IL-1 β " được dùng để chỉ phân tử gắn kết mà gắn kết với IL-1 β người với K_D là 100nM hoặc thấp hơn, 10nM hoặc thấp hơn, 1nM hoặc thấp hơn.

Phân tử gắn kết mà "phản ứng chéo với kháng nguyên không phải IL-18" được dùng để chỉ phân tử gắn kết mà gắn kết kháng nguyên đó với K_D là 100nM hoặc thấp hơn, 10nM hoặc thấp hơn, 1nM hoặc thấp hơn. Phân tử gắn kết mà "phản ứng chéo với kháng nguyên không phải là IL-1 β " được dùng để chỉ phân tử gắn kết kháng nguyên đó với K_D là 100nM hoặc thấp hơn, 10nM hoặc thấp hơn, 1nM hoặc thấp hơn.

Phân tử gắn kết mà "không phản ứng chéo với kháng nguyên cụ thể" được dùng để chỉ phân tử gắn kết mà thể hiện sự gắn kết về cơ bản không phát hiện được chống lại các protein này theo các phương pháp thử nghiệm gắn kết chuẩn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất đối kháng" được dùng để chỉ phân tử gắn kết mà ức chế hoạt tính truyền tín hiệu trong sự có mặt của hợp chất hoạt hóa. Ví dụ, trong trường hợp IL-18, chất đối kháng IL-18 sẽ là phân tử gắn kết ức chế hoạt tính truyền tín hiệu trong sự có mặt của IL-18 ở thử nghiệm tế bào người như thử nghiệm sản xuất Interferon-gamma (IFN- γ) phụ thuộc IL-18 ở các tế bào máu người. Các ví dụ về phương pháp thử nghiệm sản xuất IFN- γ phụ thuộc IL-18 trong các tế bào máu người được mô tả chi tiết hơn trong phần ví dụ dưới đây.

Thuật ngữ kháng thể đặc hiệu kép hóa trị hai hoặc các kháng thể đặc hiệu kép hóa trị hai để chỉ các kháng thể gắn kết với hai đích khác nhau, như IL-18 và IL-1 β .

Các kháng thể đặc hiệu kép này là các "heterodime", mà có nghĩa là một phần đến từ kháng thể thứ nhất, đặc hiệu đối với đích thứ nhất, và phần còn lại đến từ kháng thể thứ hai, đặc hiệu đối với đích thứ hai. "Sự cải biến heterodime hóa" là sự cải biến đối với một hoặc cả hai phần của các kháng thể tạo thành kháng thể đặc hiệu kép heterodime này, được dự kiến để thúc đẩy sự tạo thành này. Ví dụ về sự cải biến heterodime hóa của các miền Fc của hai phần IgG1 của kháng thể được dự kiến để tạo thành đặc hiệu kép là "núm" có chuỗi bên axit amin (aa) lớn (S354C, T366W) ở chuỗi nặng thứ nhất và "lỗ" có các chuỗi bên aa nhỏ (Y349C, T366S, L368A, Y407V) được đưa vào trong chuỗi nặng thứ hai cũng như cầu nối disulfua bổ sung trong vùng CH3 nối cả hai chuỗi nặng (Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677-681 (1998), page 678, bảng 1).

Như được sử dụng ở đây, kháng thể "không có hoạt tính đối kháng" được dùng để chỉ phân tử gắn kết mà không làm tăng đáng kể hoạt tính truyền tín hiệu phụ thuộc đích trong sự vắng mặt và/ hoặc có mặt của đích trong phương pháp thử nghiệm dựa vào tế bào, như trong trường hợp IL-18, không làm tăng đáng kể hoạt tính truyền tín hiệu phụ thuộc IL-18 trong sự vắng mặt và/ hoặc có mặt của các tế bào máu người IL-18 trong phương pháp thử nghiệm sản xuất IFN- γ . Các thử nghiệm này được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ dưới đây.

Thuật ngữ " K_{assoc} " hoặc " K_a ", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ tốc độ kết hợp của sự tương tác phân tử gắn kết-kháng nguyên cụ thể, trong đó thuật ngữ " K_{dis} " hoặc " K_d ," như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ tốc độ phân ly của sự tương tác phân tử gắn kết-kháng nguyên cụ thể. Thuật ngữ " K_D ", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ hằng số phân ly, mà thu được từ tỉ lệ của K_d với K_a (tức là K_d/K_a) và được biểu diễn dưới dạng nồng độ mol (M). Các giá trị K_D đối với các kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã được thiết lập rõ trong lĩnh vực. Phương pháp xác định K_D của kháng thể là sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt, như hệ thống Biacore®.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái lực" dùng để chỉ cường độ tương tác giữa phân tử gắn kết và kháng nguyên tại các vị trí kháng nguyên đơn lẻ.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái lực cao" đối với kháng thể dùng để chỉ kháng thể có K_D là 1nM hoặc thấp hơn đối với kháng nguyên đích.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" bao gồm người hoặc động vật không phải người bất kỳ.

Thuật ngữ "động vật không phải người" bao gồm tất cả các động vật có xương sống, ví dụ động vật có vú và không phải động vật có vú, như động vật linh trưởng không phải người, cừu, chó, mèo, ngựa, bò, gà, động vật lưỡng cư, bò sát, v.v..

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ, "trình tự nucleotit được tối ưu hóa" nghĩa là trình tự nucleotit đã được thay đổi để mã hóa trình tự axit amin bằng cách sử dụng các bộ ba mã hóa mà được ưu tiên trong tế bào hoặc sinh vật sản xuất, thường là các tế bào nhân chuẩn, ví dụ, tế bào của *Pichia pastoris*, tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào người. Trình tự nucleotit đã được tối ưu hóa được thiết kế để giữ lại toàn bộ trình tự axit amin ban đầu được mã hóa bởi trình tự nucleotit bắt đầu, mà còn được gọi là trình tự "gốc". Các trình tự được tối ưu hóa ở đây đã được thiết kế để có các bộ ba mã hóa mà được ưu tiên trong các tế bào động vật có vú CHO; tuy nhiên sự biểu hiện được tối ưu hóa của các trình tự này ở các tế bào nhân chuẩn khác cũng được dự tính ở đây.

Thuật ngữ "độ tương đồng" dùng để chỉ độ tương tự giữa ít nhất hai trình tự khác nhau. Độ tương đồng này có thể được biểu hiện dưới dạng Độ tương đồng theo phần trăm và được xác định bằng các thuật toán căn chỉnh hàng chuẩn, ví dụ, Công cụ căn chỉnh hàng vị trí bazơ (BLAST) (Altschul et al., (1990) *J Mol Biol*; 215:403-410); thuật toán của Needleman et al., (1970) *J Mol Biol*; 48:444-453 hoặc thuật toán của Meyers et al., (1988) *Comput Appl Biosci*; 4:11-17). Tập hợp các tham số có thể là ma trận đánh giá Blossum 62 với độ phạt khoảng trống là 12, độ phạt mở rộng khoảng trống là 4, và độ phạt khoảng trống trượt khung là 5. Độ tương đồng theo phần trăm giữa hai trình tự axit amin hoặc nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller, (1989) *CABIOS*; 4(1):1-17) mà đã được kết hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), bằng cách sử dụng bảng dự khối lượng PAM 120, độ phạt chiều dài khoảng trống là 12 và độ phạt khoảng trống là 4. Độ tương đồng theo phần trăm này thường được tính bằng cách so sánh các trình tự có độ dài tương tự.

Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch" dùng để chỉ hoạt động của, ví dụ, các tế bào lympho, các tế bào trình diện kháng nguyên, các tế bào thực bào, các bạch cầu hạt, và các đại phân tử hòa tan được tạo ra bởi các tế bào nêu trên hoặc gan (bao gồm kháng

thể, xytokin, và bỏ thể) mà dẫn đến sự tổn thương chọn lọc đối với, sự phá hủy của, hoặc sự loại loại trừ khỏi cơ thể người tác nhân gây bệnh xâm nhập, tế bào hoặc mô bị nhiễm bệnh, tế bào ung thư, hoặc, trong trường hợp tự miễn hoặc viêm bệnh lý, tế bào hoặc mô người bình thường.

"Con đường truyền tín hiệu" hoặc "hoạt tính truyền tín hiệu" dùng để chỉ mối quan hệ nguyên nhân hóa sinh thường được bắt đầu bởi sự tương tác protein-protein như sự gắn kết của yếu tố sinh trưởng với thụ thể, dẫn đến sự truyền tín hiệu từ một phần của tế bào đến phần khác của tế bào. Thông thường, quá trình truyền này gồm sự phosphoryl hóa đặc hiệu của một hoặc nhiều gốc tyrosin, serin, hoặc threonin trên một hoặc nhiều protein trong loạt phản ứng gây ra sự truyền tín hiệu. Các quy trình gần cuối thường gồm các sự kiện ở nhân, dẫn đến sự biểu hiện gen.

Thuật ngữ "trung hòa" và các biến thể theo quy tắc của nó trong toàn bộ bản mô tả này có nghĩa là, hoạt tính sinh học của đích bị giảm toàn bộ hoặc một phần trong sự có mặt của protein hoặc kháng thể gắn kết, tùy theo từng trường hợp có thể có.

Thuật ngữ "axit nucleic" hoặc "polynucleotit" dùng để chỉ axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc axit ribonucleic (ARN) và polyme của chúng ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Trừ khi bị giới hạn cụ thể, thuật ngữ này bao hàm axit nucleic chứa chất tương tự đã biết của nucleotit tự nhiên mà có tính chất gắn kết tương tự như axit nucleic tham chiếu và được chuyển hóa theo cách tương tự với nucleotit có trong tự nhiên. Trừ khi có quy định khác, trình tự axit nucleic cụ thể cũng ngụ ý bao hàm các biến thể được cải biến bảo toàn của chúng (ví dụ sự thể bộ ba thoái hóa), alen, chất đồng đẳng, SNP, và các trình tự bổ sung cũng như trình tự được chỉ ra rõ ràng. Cụ thể là, sự thể bộ ba thoái hóa có thể đạt được bằng cách tạo ra các trình tự trong đó vị trí thứ ba của một hoặc nhiều bộ ba mã hóa được chọn (hoặc tất cả) được thể bằng các gốc bazơ hỗn hợp và/ hoặc deoxyinosin (Batzner et al., *Nucleic Acids Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); và Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Nucleotit trong "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" có thể bao gồm các cải biến bao gồm các cải biến bazơ như dẫn xuất của bromouridin và inosin, sự cải biến ribosa như phosphorothioat, phosphorodithioat, phosphoroselenoat, phosphorodiselenoat, phosphoroanilothioat, phosphoraniladat và phosphoroamidat.

Thuật ngữ "vector" nghĩa là phân tử hoặc thực thể bất kỳ (ví dụ axit nucleic, plasmid, thể thực khuẩn hoặc virus) mà thích hợp cho sự biến nạp hoặc chuyển nạp của tế bào chủ và chứa các trình tự axit nucleic mà điều khiển và/ hoặc kiểm soát (trong sự liên hợp với tế bào chủ) sự biểu hiện của một hoặc nhiều vùng mã hóa khác loại được gắn kết có điều khiển với chúng.

Thuật ngữ "sự đồng biểu hiện" có nghĩa là các polypeptit khác nhau được biểu hiện cùng nhau trong tế bào chủ đơn lẻ, chung cho tất cả các polypeptit. Sự đồng biểu hiện của kháng thể đặc hiệu kép có nghĩa là các phần khác nhau tạo thành kháng thể đặc hiệu kép hoạt động được biểu hiện trong tế bào chủ đơn lẻ, chung. Sự đồng biểu hiện có thể đạt được bằng cách kết hợp một số vector biểu hiện trong tế bào chủ biểu hiện, như một vector cho mỗi nửa trong số các nửa của kháng thể đặc hiệu kép, hoặc bằng cách kết hợp một vector biểu hiện mã hóa cho tất cả các phần của kháng thể đặc hiệu kép này.

Thuật ngữ "ghép đôi nhằm" có nghĩa là các phần khác nhau của phức hợp protein được dự tính, như kháng thể đặc hiệu kép, không gắn kết phức hợp như dự tính, mà có nghĩa là phức hợp protein này không có bề ngoài hoặc hoạt động như dự tính. Các ví dụ về việc ghép đôi nhằm trong ngữ cảnh của kháng thể đặc hiệu kép được thể hiện trên Hình 4.

"Biến thể bảo toàn" của trình tự mã hóa phân tử gắn kết, kháng thể hoặc mảnh của nó dùng để chỉ trình tự có chứa các cải biến axit amin bảo toàn. "Các cải biến axit amin bảo toàn" được dùng để chỉ các cải biến axit amin mà không ảnh hưởng hoặc làm thay đổi đáng kể đến đặc điểm gắn kết của kháng thể chứa trình tự axit amin này. Các cải biến bảo toàn này bao gồm sự thế, sự bổ sung và sự loại bỏ axit amin. Những sự thế axit amin bảo toàn là những sự thế trong đó gốc axit amin này được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương tự. Các họ của các gốc axit amin có các chuỗi bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các họ này có chứa các axit amin có các chuỗi bên bazơ (ví dụ lysin, arginin, histidin), các chuỗi bên axit (ví dụ axit aspartic, axit glutamic), các chuỗi bên phân cực không tích điện (ví dụ glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein, tryptophan), các chuỗi bên không phân cực (ví dụ alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, phenylalanin, methionin), các chuỗi bên phân nhánh beta (ví dụ threonin, valin, isoleucin) và các chuỗi bên thơm (ví dụ tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Các cải biến có thể được đưa vào trong protein gắn

kết theo sáng chế bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực, như phương pháp gây đột biến điểm định hướng và phương pháp gây đột biến qua trung gian PCR. Sự thể axit amin bảo toàn cũng có thể bao hàm các gốc axit amin không có trong tự nhiên mà thường được kết hợp bằng sự tổng hợp peptit hóa học hơn là bằng sự tổng hợp trong các hệ thống sinh học. Các axit amin không có trong tự nhiên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dạng bất chức peptit, dạng đảo hoặc nghịch đảo của các gốc axit amin.

Thuật ngữ "epitop" là một phần của kháng nguyên mà được nhận biết bởi hệ miễn dịch, như kháng thể hoặc mảnh của nó. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop" được sử dụng thay thế cho cả epitop cấu hình và epitop tuyến tính. Epitop cấu hình được tạo thành từ các phần không liên tục của trình tự axit amin của kháng nguyên, trong khi epitop tuyến tính được tạo thành bởi trình tự liên tục của các axit amin từ kháng nguyên này.

Thuật ngữ "điều trị", "việc điều trị", "sự điều trị", "ngăn ngừa", "việc ngăn ngừa" hoặc "sự ngăn ngừa" bao gồm các điều trị và các ứng dụng trị liệu trong đó nó làm giảm nguy cơ là đối tượng sẽ phát triển rối loạn hoặc yếu tố nguy cơ khác. Sự điều trị không đòi hỏi phải cứu chữa hoàn toàn rối loạn và bao hàm sự giảm đi của triệu chứng hoặc yếu tố nguy cơ tiềm ẩn. Như được sử dụng ở đây, kháng thể người hoặc mảnh của nó bao gồm các vùng biến đổi trên chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ hoặc các chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ mà là "sản phẩm của" hoặc "có nguồn gốc từ" trình tự dòng mầm cụ thể nếu các vùng biến đổi hoặc các chuỗi chiều dài đầy đủ của kháng thể này thu được từ hệ thống mà sử dụng các gen globulin miễn dịch dòng mầm người. Các hệ thống này bao gồm bước gây miễn dịch chuột nhắt chuyển gen mang các gen globulin miễn dịch người bằng kháng nguyên quan tâm hoặc sàng lọc thư viện gen globulin miễn dịch người được biểu hiện trên thực khuẩn thể bằng kháng nguyên quan tâm. Kháng thể người hoặc mảnh của nó mà là "sản phẩm của" hoặc "có nguồn gốc từ" trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người có thể được xác định như bằng cách so sánh trình tự axit amin của kháng thể người với các trình tự axit amin của các globulin miễn dịch dòng mầm người và chọn lọc trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người mà gần nhất trong trình tự (tức là, % độ tương đồng lớn nhất) với trình tự của kháng thể người này. Kháng thể người mà là "sản phẩm của" hoặc "có nguồn gốc từ" trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người cụ thể có thể chứa các sự sai khác axit amin so với trình tự dòng mầm,

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

Các kháng thể người có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các kháng thể người có thể được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai bằng cách sử dụng các dòng tế bào u tủy người hoặc các dòng tế bào u tủy khác loại chuột nhắt-người (Kozbor, *J Immunol*; (1984) 133:3001; Brodeur, *Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications*, pp51-63, Marcel Dekker Inc, 1987). Các phương pháp thay thế bao gồm việc sử dụng các thư viện thực khuẩn thể hoặc chuột nhắt chuyển gen cả hai đều sử dụng các danh mục vùng biến đổi người (Winter G; (1994) *Annu Rev Immunol* 12:433-455, Green LL, (1999) *J Immunol Methods* 231:11-23).

Một số chủng chuột chuyển gen hiện nay có sẵn trong đó các locut globulin miễn dịch chuột nhắt của chúng đã được thay thế bằng các đoạn gen globulin miễn dịch người (Tomizuka K, (2000) *Proc Natl Acad Sci*, 97:722-727; Fishwild DM (1996) *Nature Biotechnol* 14:845-851; Mendez MJ, (1997) *Nature Genetics* 15:146-156). Dựa vào thử thách kháng nguyên, các con chuột nhắt này có khả năng tạo ra danh mục các kháng thể người mà từ đó các kháng thể quan tâm có thể được chọn lọc. Đặc biệt chú ý là hệ TrimerTM (Eren R et al, (1988) *Immunology* 93:154-161) trong đó các lympho bào người được cấy vào chuột nhắt bị chiếu xạ, Hệ thống kháng thể được phân lập lympho

bào chọn lọc (SLAM, Babcook *et al*, Proc Natl Acad Sci (1996) 93:7843-7848) trong đó các lympho bào người (hoặc loài khác) được đặt một cách hiệu quả thông qua quy trình tạo kháng thể được phân lập *in vitro* được gộp lớn sau đó là quy trình tháo xoắn, pha loãng giới hạn và chọn lọc và Xenomouse™ (Abgenix Inc). Phương pháp thay thế là sẵn có từ Morphotek Inc bằng cách sử dụng công nghệ Morphotoma™.

Công nghệ hiển thị phagơ có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể người và mảnh của nó, (McCafferty; (1990) Nature, 348:552-553 và Griffiths AD *et al* (1994) EMBO 13:3245-3260). Theo kỹ thuật này, các gen miễn biến đổi kháng thể được phân lập được tách dòng trong khung vào trong vỏ chính hoặc vỏ phụ của gen protein của thể thực khuẩn dạng sợi như M13 hoặc fd và được hiển thị (thường với sự hỗ trợ của thực khuẩn thể trợ giúp) dưới dạng các mảnh kháng thể được phân lập chức năng trên bề mặt của hạt phagơ này. Sự chọn lọc dựa trên tính chất chức năng của kháng thể được phân lập dẫn đến sự chọn lọc gen mã hóa kháng thể được phân lập thể hiện các tính chất này. Kỹ thuật hiển thị phagơ này có thể được sử dụng để chọn lọc các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên từ các thư viện được tạo ra từ tế bào B người lấy từ cá thể bị bệnh hoặc rối loạn hoặc theo cách khác từ người cho chưa được gây miễn dịch. (Marks; J Mol Bio (1991) 222:581-591.). Khi kháng thể người được phân lập nguyên vẹn được mong muốn bao gồm miền Fc cần phải tách dòng lại mảnh thu được từ thực khuẩn thể được hiển thị vào trong vector biểu hiện động vật có vú bao gồm các vùng không đổi mong muốn và thiết lập các dòng tế bào biểu hiện ổn định.

Kỹ thuật thành thực ái lực (Marks; Biotechnol (1992) 10:779-783) có thể được sử dụng để mang lại ái lực gắn kết trong đó ái lực của kháng thể người sơ cấp được phân lập được cải thiện bằng cách thay thế tuần tự các vùng chuỗi H và L bằng các biến thể có trong tự nhiên và chọn lọc trên cơ sở ái lực gắn kết được cải thiện. Các biến thể của kỹ thuật này như 'kỹ thuật in epitop' hiện nay cũng sẵn có (công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 93/06213; Waterhouse; Nucl Acids Res (1993) 21:2265-2266).

Thuật ngữ "tinh khiết" khi được sử dụng trong ngữ cảnh của kháng thể đặc hiệu kép tinh khiết dùng để chỉ độ tinh khiết và độ giống nhau của các hỗn hợp và các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép khác nhau sau sự đồng biểu hiện ở các tế bào chọn lọc trong điều kiện trong đó các tế bào này biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép và sau sự tinh chế protein-A bằng cách sử dụng phương pháp sàng lọc khối lượng UPLC-MS nguyên vẹn.

Tinh khiết hoặc độ tinh khiết dùng để chỉ lượng tương đối của các bbmAb heterodime và homodime. Bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, bbmAb1 và bbmAb2 heterodime được tạo thành chính xác có thể được quan sát thấy với độ tinh khiết trên 85% dựa trên cường độ tín hiệu khối lượng nguyên vẹn.

2. Kháng thể IL-18

Các kháng thể IL-18 được đặc biệt ưu tiên hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế là các kháng thể người.

Để dễ dàng cho việc tham chiếu, các trình tự axit amin của các vùng siêu biến của kháng thể IL-18 đặc hiệu, được gọi là mAb1, dựa vào định nghĩa Kabat và định nghĩa Chothia, cũng như các miền V_L và V_H và các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ được nêu trong bảng 1, dưới đây.

Bảng 1. Các trình tự axit amin của các vùng siêu biến (CDR), các miền biến đổi (V_H và V_L) và các chuỗi đầy đủ của mAb1. ADN mã hóa V_L của mAb1 được nêu trong SEQ ID NO:18. ADN mã hóa V_H của mAb1 được nêu trong SEQ ID NO:8.

Chuỗi nặng mAb1		
CDR1	Kabat	SEQ ID NO:1
	Chothia	SEQ ID NO:4
CDR2	Kabat	SEQ ID NO:2
	Chothia	SEQ ID NO:5
CDR3	Kabat	SEQ ID NO:3
	Chothia	SEQ ID NO:6
V_H		SEQ ID NO:7
Chuỗi Nặng		SEQ ID NO:9
Chuỗi nhẹ mAb1		
CDR1	Kabat	SEQ ID NO:11
	Chothia	SEQ ID NO:14

CDR2	Kabat	SEQ ID NO:12
	Chothia	SEQ ID NO:15
CDR3	Kabat	SEQ ID NO:13
	Chothia	SEQ ID NO:16
VL		SEQ ID NO:17
Chuỗi nhẹ		SEQ ID NO:19

Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:1, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:2, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:3. Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:4, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:5, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:6.

Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:11, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:12 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:13. Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:14, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:15 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:16.

Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền V_H globulin miễn dịch và ít nhất là một miền V_L globulin miễn dịch, trong đó: a) miền V_H globulin miễn dịch này bao gồm (ví dụ trong trình tự): i) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:1, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:2, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:3;

hoặc ii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:4, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:5, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:6; và b) miền V_L globulin miễn dịch này bao gồm (ví dụ trong trình tự): i) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:11, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:12, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:13 hoặc ii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:14, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:15, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:16.

Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm: a) miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:7; b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:17; c) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:7 và miền V_L globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:17; d) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, và SEQ ID NO:3; e) miền V_L globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 và SEQ ID NO:13; f) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:6; g) miền V_L globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 và SEQ ID NO:16; h) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, và SEQ ID NO:3 và miền V_L globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 và SEQ ID NO:13; i) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, và SEQ ID NO:6 và miền V_L globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 và SEQ ID NO:16; j) chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:19; k) chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:9; hoặc l) chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:19 và chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:9.

Theo một số phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ mAb1) bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:7. Theo các phương án khác, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:17.

Theo các phương án khác, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:7 và ba CDR của SEQ ID NO:17. Theo một số phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:9. Theo các phương án khác, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:19. Theo các phương án khác, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:9 và ba CDR của SEQ ID NO:19.

Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ mAb1) được chọn từ kháng thể IL-18 người mà bao gồm ít nhất: a) chuỗi nặng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nặng của người; CDR1 này có trình tự axit amin SEQ ID NO:1, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:2, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:3; và b) chuỗi nhẹ globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2, và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nhẹ của người, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:11, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:12, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:13.

Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ mAb1) được chọn từ kháng thể IL-18 người mà bao gồm ít nhất: a) chuỗi nặng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nặng của người; CDR1 này có trình tự axit amin SEQ ID NO:4, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:5 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:6; và b) chuỗi nhẹ globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2, và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nhẹ người, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:14, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:15, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:16.

Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ kháng thể đơn chuỗi hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên bao gồm: a) miền thứ nhất bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:1, CDR2 có

trình tự axit amin SEQ ID NO:2, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:3; và b) miền thứ hai bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:11, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:12, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:13; và c) cầu nối peptit mà được gắn kết với đầu N của miền thứ nhất và với đầu C của miền thứ hai hoặc với đầu C của miền thứ nhất và với đầu N của miền thứ hai.

Theo một phương án, kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ mAb1) được chọn từ kháng thể đơn chuỗi hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên bao gồm: a) miền thứ nhất bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:4, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:5, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:6; và b) miền thứ hai bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:14, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:15, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:16; và c) cầu nối peptit mà được gắn kết với đầu N của miền thứ nhất và với đầu C của miền thứ hai hoặc với đầu C của miền thứ nhất và với đầu N của miền thứ hai.

Miền V_H hoặc V_L của kháng thể IL-18 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng trong các phương pháp của sáng chế có thể có các miền V_H và/ hoặc V_L mà về cơ bản giống với các miền V_H hoặc V_L được nêu trong SEQ ID NO:7 và 17. Kháng thể IL-18 người được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chuỗi nặng mà về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:9 và/ hoặc chuỗi nhẹ mà về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:19. Kháng thể IL-18 người được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chuỗi nặng mà bao gồm SEQ ID NO:9 và chuỗi nhẹ mà bao gồm SEQ ID NO:19. Kháng thể IL-18 người được bộc lộ ở đây có thể bao gồm: a) một chuỗi nặng, bao gồm miền biến đổi có trình tự axit amin về cơ bản giống với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:7 và phần không đổi trên chuỗi nặng người; và b) một chuỗi nhẹ, bao gồm miền biến đổi có trình tự axit amin về cơ bản giống với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:17 và phần không đổi trên chuỗi nhẹ người.

Các chất đối kháng IL-18 được ưu tiên khác (ví dụ các kháng thể) để sử dụng trong các phương pháp, bộ kit và phác đồ theo sáng chế là các loại được nêu trong Bảng sáng chế Mỹ số 9,376,489, mà được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

3. Kháng thể IL-1 β

Các kháng thể IL-1 β được đặc biệt ưu tiên hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế là các kháng thể người.

Để dễ dàng cho việc tham chiếu, các trình tự axit amin của các vùng siêu biến của kháng thể IL-1 β đặc hiệu, được gọi là mAb2, dựa vào định nghĩa Kabat và định nghĩa Chothia, cũng như các miền V_L và V_H và các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ được đưa ra trong bảng 2, dưới đây.

Bảng 2. Các trình tự axit amin của các vùng siêu biến (CDR), các miền biến đổi (VH và VL) và các chuỗi đầy đủ của mAb2. ADN mã hóa VL của mAb2 được nêu trong SEQ ID NO:38. ADN mã hóa VH của mAb2 được nêu trong SEQ ID NO:27.

Chuỗi nặng mAb2		
CDR1	Kabat	SEQ ID NO:21
	Chothia	SEQ ID NO:24
CDR2	Kabat	SEQ ID NO:22
	Chothia	SEQ ID NO:25
CDR3	Kabat	SEQ ID NO:23
	Chothia	SEQ ID NO:26
VH		SEQ ID NO:27
Chuỗi Nặng		SEQ ID NO:29
Chuỗi nhẹ mAb2		
CDR1	Kabat	SEQ ID NO:31
	Chothia	SEQ ID NO:34
CDR2	Kabat	SEQ ID NO:32
	Chothia	SEQ ID NO:35
CDR3	Kabat	SEQ ID NO:33

	Chothia	SEQ ID NO:36
VL		SEQ ID NO:37
Chuỗi Nhẹ		SEQ ID NO:39

Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:21, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:22, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:23. Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:24, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:25, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:26.

Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:31, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:32 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:33. Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:34, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:35 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:36.

Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền V_H globulin miễn dịch và ít nhất là một miền V_L globulin miễn dịch, trong đó: a) miền V_H globulin miễn dịch này bao gồm (ví dụ trong trình tự): i) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:21, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:22, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:23; hoặc ii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:24, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:25, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:26; và b) miền V_L globulin miễn dịch này bao gồm (ví dụ trong

trình tự): i) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:31, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:32, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:33 hoặc ii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:34, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:35, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:36.

Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc miền gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm: a) miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:27; b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:37; c) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:27 và miền V_L globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:37; d) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, và SEQ ID NO:23; e) miền V_L globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:33; f) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 và SEQ ID NO:26; g) miền V_L globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35 và SEQ ID NO:36; h) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, và SEQ ID NO:23 và miền V_L globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:33; i) miền V_H globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, và SEQ ID NO:26 và miền V_L globulin miễn dịch bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35 và SEQ ID NO:36; j) chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:37; k) chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:29; hoặc l) chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:39 và chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:29.

Theo một số phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ mAb2) bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:37. Theo các phương án khác, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:27. Theo các phương án khác, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:37 và ba CDR của SEQ ID NO:27. Theo một số phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR

của SEQ ID NO:39. Theo các phương án khác, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:29. Theo các phương án khác, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:39 và ba CDR của SEQ ID NO:29.

Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ mAb2) được chọn từ kháng thể IL-1 β người mà bao gồm ít nhất: a) chuỗi nặng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nặng người; CDR1 này có trình tự axit amin SEQ ID NO:21, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:22, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:23; và b) chuỗi nhẹ globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2, và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nhẹ người, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:31, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:32, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:33.

Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ mAb2) được chọn từ kháng thể IL-1 β người mà bao gồm ít nhất: a) chuỗi nặng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nặng người; CDR1 này có trình tự axit amin SEQ ID NO:24, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:25 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:26; và b) chuỗi nhẹ globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2, và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nhẹ người, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:34, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:35, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:36.

Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ kháng thể đơn chuỗi hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên bao gồm: a) miền thứ nhất bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:21, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:22, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:23; và b) miền thứ hai bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:31, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:32,

và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:33; và c) cầu nối peptit mà được gắn kết với đầu N của miền thứ nhất và với đầu C của miền thứ hai hoặc với đầu C của miền thứ nhất và với đầu N của miền thứ hai.

Theo một phương án, kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ mAb2) được chọn từ kháng thể đơn chuỗi hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên bao gồm: a) miền thứ nhất bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:24, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:25, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:26; và b) miền thứ hai bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:34, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:35, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:36; và c) cầu nối peptit mà được gắn kết với đầu N của miền thứ nhất và với đầu C của miền thứ hai hoặc với đầu C của miền thứ nhất và với đầu N của miền thứ hai.

Miền V_H hoặc V_L của kháng thể IL-1 β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng trong các phương pháp của sáng chế có thể có các miền V_H và/ hoặc V_L mà về cơ bản giống với các miền V_H hoặc V_L được nêu trong SEQ ID NO:27 và 37. Kháng thể IL-1 β người được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chuỗi nặng mà về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:29 và/ hoặc chuỗi nhẹ mà về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:39. Kháng thể IL-1 β người được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chuỗi nặng mà bao gồm SEQ ID NO:29 và chuỗi nhẹ mà bao gồm SEQ ID NO:39. Kháng thể IL-1 β người được bộc lộ ở đây có thể bao gồm: a) một chuỗi nặng, bao gồm miền biến đổi có trình tự axit amin về cơ bản giống với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:27 và phần không đổi trên chuỗi nặng người; và b) một chuỗi nhẹ, bao gồm miền biến đổi có trình tự axit amin về cơ bản giống với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:37 và phần không đổi trên chuỗi nhẹ người.

Các chất đối kháng IL-1 β được ưu tiên khác (ví dụ các kháng thể) để sử dụng trong các phương pháp, bộ kit và phác đồ theo sáng chế là các loại được nêu trong bằng sáng chế Mỹ các số 7,446,175 hoặc 7,993,878 hoặc 8,273,350, mà được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

4. Các cải biến Fc

Ngoài hoặc bên cạnh các cải biến được tạo ra trong các vùng vùng hoặc CDR, các kháng thể theo sáng chế có thể được thiết kế để bao gồm các cải biến ở bên trong vùng Fc, thường để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể này, như thời gian bán thải trong huyết thanh, sự cố định bổ thể, sự gắn kết thụ thể Fc, và/ hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể được cải biến về mặt hóa học (ví dụ một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn vào kháng thể) hoặc được cải biến để thay đổi sự glycosyl hóa của nó, lại để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể này. Mỗi phương án trong số các phương án này được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Cách đánh số các gốc trong vùng Fc là cách đánh số theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85.

Theo một phương án, vùng bản lề của CH1 được cải biến sao cho nhiều gốc xystein trong vùng bản lề này được thay đổi, ví dụ tăng hoặc giảm. Phương pháp này được mô tả thêm trong bằng sáng chế Mỹ số 5,677,425 bởi Bodmer và cộng sự. Nhiều gốc xystein trong vùng bản lề của CH1 được thay đổi để, ví dụ, thúc đẩy sự lắp ráp của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc để làm tăng hoặc giảm độ ổn định của kháng thể.

Theo phương án khác, vùng bản lề Fc của kháng thể được gây đột biến để làm giảm thời gian bán thải sinh học của kháng thể. Cụ thể hơn, một hoặc nhiều đột biến axit amin được đưa vào vùng mặt phân cách miền CH2-CH3 của mảnh bản lề Fc sao cho kháng thể này làm suy yếu sự gắn kết protein A Staphylococcus (SpA) tương quan với sự gắn kết SpA miền bản lề Fc tự nhiên. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong Bằng sáng chế Mỹ số 6,165,745 bởi Ward và cộng sự.

Theo phương án khác, kháng thể được cải biến để làm tăng thời gian bán thải sinh học của nó. Nhiều phương pháp khác nhau có thể sử dụng được. Ví dụ như, một hoặc nhiều đột biến sau đây có thể được đưa vào: T252L, T254S, T256F, như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,277,375 cấp cho Ward. Theo cách khác, để làm tăng thời gian bán thải sinh học, kháng thể có thể được thay đổi ở trong vùng CH1 hoặc CL để chứa epitop gắn kết thụ thể cứu vãn lấy từ hai vòng của miền CH2 của vùng Fc của IgG, như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 5,869,046 và 6,121,022 bởi Presta và cộng sự.

Theo phương án khác nữa, vùng Fc được thay đổi bằng cách thay thế ít nhất là một gốc axit amin bằng gốc axit amin khác để làm thay đổi chức năng tác động của

kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể có ái lực thay đổi đối với phối tử tác động nhưng giữ lại khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể ban đầu. Phối tử tác động mà ái lực với nó được thay đổi có thể là, ví dụ, thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của bổ thể. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong các bằng sáng chế Mỹ số 5,624,821 và 5,648,260, đều của Winter và cộng sự.

Theo phương án khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể có sự gắn kết C1q thay đổi và/ hoặc sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) giảm đi hoặc bị phá hủy. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong các Bằng sáng chế Mỹ số 6,194,551 bởi Idusogie và cộng sự.

Theo phương án khác, một hoặc nhiều gốc axit amin được thay đổi để bằng cách đó làm thay đổi khả năng của kháng thể để cố định bổ thể. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 94/29351 bởi Bodmer và cộng sự.

Theo phương án khác nữa, vùng Fc được cải biến để tăng khả năng của kháng thể để làm trung gian cho sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/ hoặc làm tăng ái lực của kháng thể đối với thụ thể Fcγ bằng cách cải biến một hoặc nhiều axit amin. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 00/42072 bởi Presta. Hơn nữa, các vị trí gắn kết trên IgG1 người đối với FcγRI, FcγRII, FcγRIII và FcRn đã được lập bản đồ và các biến thể với sự gắn kết được cải thiện đã được mô tả (xem Shields, R.L. et al, (2001) J Biol Chem 276:6591-6604).

Theo các phương án cụ thể, miền Fc của isotyp IgG1 được sử dụng. Theo một số phương án đặc trưng, biến thể đột biến của mảnh Fc của IgG1 được sử dụng, ví dụ Fc IgG1 cầm mà làm giảm hoặc loại trừ khả năng của polypeptit dung hợp làm trung gian cho sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/ hoặc gắn kết với thụ thể Fcγ. Ví dụ về đột biến cầm isotyp IgG1 trong đó gốc Loxin được thay thế bằng gốc Alanin tại các vị trí axit amin 234 và 235 như được mô tả bởi Hezareh et al, J. Virol (2001); 75(24):12161-8.

Theo các phương án cụ thể, miền Fc này là thể đột biến ngăn chặn sự glycosyl hóa tại vị trí 297 của miền Fc. Ví dụ, miền Fc chứa sự thể axit amin của gốc asparagin tại vị trí 297. Các ví dụ về sự thể axit amin này là sự thay thế của N297 bằng glyxin hoặc alanin.

Các chức năng tác động bị làm câm có thể thu được bằng sự đột biến ở vùng Fc của các kháng thể và đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật: LALA và N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); và D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181:6664-69; Strohl, W., nêu trên); và DAPA (D265A và P329A) (Shields RL., J Biol Chem. 2001;276(9):6591-604; công bố bằng sáng chế Mỹ số US2015/0320880). Các ví dụ về các kháng thể IgG1 Fc câm bao gồm đột biến được gọi là LALA bao gồm đột biến L234A và L235A ở trình tự axit amin Fc IgG1. Ví dụ khác về kháng thể IgG1 câm này bao gồm đột biến D265A. Ví dụ khác về kháng thể IgG1 câm là đột biến được gọi là DAPA, bao gồm đột biến D265A và P329A đối với trình tự axit amin Fc IgG1. Kháng thể IgG1 câm khác bao gồm đột biến N297A, mà tạo thành các kháng thể không được glycosyl hóa. Các đột biến Fc khác để tạo ra chức năng tác động được làm câm được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/145806 (ví dụ, trên Hình 7 của WO2014/145806), được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn. Một ví dụ từ WO2014/145806 về kháng thể IgG1 câm bao gồm đột biến E233P, L234V, L235A, và S267K, và sự loại bỏ G236 (G236del). Ví dụ khác từ công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/145806 về kháng thể IgG1 câm bao gồm đột biến E233P, L234V, và L235A, và sự xóa bỏ G236 (G236del). Ví dụ khác là công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/145806 về kháng thể IgG1 câm bao gồm đột biến S267K.

Theo phương án khác nữa, sự glycosyl hóa của kháng thể được cải biến. Ví dụ, kháng thể không được glycosyl hóa có thể được tạo ra (tức là, kháng thể thiếu sự glycosyl hóa). Sự glycosyl hóa có thể được thay đổi, ví dụ, để làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên. Các cải biến carbohydrat này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, làm thay đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong trình tự kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều sự thể axit amin có thể được tạo ra mà dẫn đến việc loại bỏ một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa khung vùng biến đổi để nhờ đó loại bỏ sự glycosyl hóa tại vị trí đó. Sự không glycosyl hóa có thể làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Phương pháp như vậy được mô tả chi tiết hơn trong, ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 5,714,350 và 6,350,861 của Co và cộng sự.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể có thể được tạo ra mà có loại glycosyl được thay đổi, như kháng thể được hypofucosyl hóa có lượng gốc fucosyl giảm hoặc kháng thể có các cấu trúc GlcNac chia đôi tăng. Các mô hình glycosyl hóa thay đổi như vậy đã được chứng minh là làm tăng khả năng ADCC của kháng thể. Các cải biến carbohydrat này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ có bộ máy glycosyl hóa thay đổi. Các tế bào có bộ máy glycosyl hóa thay đổi đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được sử dụng làm các tế bào chủ để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế trong đó để từ đó sản xuất kháng thể có sự glycosyl hóa thay đổi. Ví dụ, đơn sáng chế châu Âu số EP 1,176,195 của Hang và cộng sự mô tả dòng tế bào có gen FUT8 bị phá hủy về mặt chức năng, mà mã hóa cho fucosyl transferaza, do vậy các kháng thể được biểu hiện trong dòng tế bào này thể hiện sự hypofucosyl hóa. Do đó, theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế được sản xuất bằng sự biểu hiện tái tổ hợp trong dòng tế bào mà thể hiện mô hình hypofucosyl hóa, ví dụ, dòng tế bào động vật có vú có sự biểu hiện thiếu sót của gen FUT8 mã hóa cho fucosyltransferaza. Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 03/035835 của Presta mô tả dòng tế bào CHO biến thể, tế bào Lec13, có khả năng gắn fucoza với các carbohydrat được gắn kết bởi Asn(297) giảm, cũng dẫn đến sự hypofucosyl hóa của các kháng thể được biểu hiện trong tế bào chủ đó (cũng xem Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 99/54342 của Umana và cộng sự mô tả các dòng tế bào được thiết kế để biểu hiện các glycosyl transferaza cải biến glycoprotein (ví dụ beta(1,4)-N acetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) do vậy các kháng thể được biểu hiện trong các dòng tế bào được thiết kế thể hiện các cấu trúc GlcNac chia đôi tăng mà dẫn đến hoạt tính ADCC tăng của các kháng thể (cũng xem Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180). Theo cách khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra trong nấm men hoặc nấm sợi được thiết kế cho mô hình glycosyl hóa giống động vật có vú, và có khả năng sản xuất các kháng thể thiếu fucoza làm mô hình glycosyl hóa (xem ví dụ bằng sáng chế châu Âu số EP1297172B1).

Sự cải biến khác của các kháng thể ở đây mà được dự tính bởi sáng chế là sự pegyl hóa. Kháng thể có thể được pegyl hóa để, ví dụ, làm tăng thời gian bán thải sinh

học (ví dụ trong huyết thanh) của kháng thể. Để pegyl hóa kháng thể, kháng thể này, hoặc mảnh của nó, thường được cho phản ứng với polyetylen glycol (PEG), chẳng hạn như este phản ứng hoặc dẫn xuất aldehyt của PEG, trong điều kiện trong đó một hoặc nhiều nhóm PEG trở nên được gắn với kháng thể hoặc mảnh kháng thể này. Sự pegyl hóa có thể được thực hiện bằng phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với phân tử PEG phản ứng (hoặc polyme hòa tan trong nước phản ứng tương tự). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polyetylen glycol" được dự định là bao hàm dạng PEG bất kỳ mà đã được sử dụng để tạo dẫn xuất các protein khác, như mono (C1-C10) alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol-maleimide. Theo các phương án cụ thể, kháng thể để được pegyl hóa là kháng thể không được glycosyl hóa. Phương pháp pegyl hóa protein là đã biết trong lĩnh vực và có thể được áp dụng cho các kháng thể theo sáng chế. Xem ví dụ, đơn sáng chế châu Âu số EP 0 154 316 của Nishimura và cộng sự và EP 0 401 384 của Ishikawa và cộng sự.

Sự cải biến khác của các kháng thể mà được dự tính bởi sáng chế là thể liên hợp hoặc thể dung hợp protein của ít nhất là vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế với protein huyết thanh, như albumin huyết thanh người hoặc mảnh của nó để làm tăng thời gian bán thải của phân tử thu được. Phương pháp như vậy ví dụ được mô tả trong đơn sáng chế châu Âu số EP0322094 của Ballance et al..

Sự cải biến khác của kháng thể mà được dự tính bởi sáng chế là một hoặc nhiều sự cải biến để làm tăng sự tạo thành kháng thể đặc hiệu kép heterodimer. Nhiều phương pháp sẵn có trong lĩnh vực có thể được sử dụng để tăng cường sự dimer hóa của hai miền chuỗi nặng của các kháng thể đặc hiệu kép, ví dụ, các bBmAb, như được mô tả trong, ví dụ, đơn sáng chế châu Âu số EP 1870459A1; bằng sáng chế Mỹ số 5,582,996; bằng sáng chế Mỹ số 5,731,168; bằng sáng chế Mỹ số 5,910,573; bằng sáng chế Mỹ số 5,932,448; bằng sáng chế Mỹ số 6,833,441; bằng sáng chế Mỹ số 7,183,076; công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006204493A1; và công bố công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2009/089004A1, nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Sự tạo thành của các kháng thể đặc hiệu kép bằng cách sử dụng phương pháp núng trong lỗ được bộc lộ trong công bố đơn sáng chế số WO1996/027011, Ridgway et al., (1996), và Merchant et al. (1998).

(1) Nút trong lỗ (Knob-in-Hole - KIH)

Các phân tử đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đa đặc hiệu hoặc các phân tử giống kháng thể đa đặc hiệu, theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều, ví dụ, một số lượng, đột biến đối với một hoặc nhiều miền không đổi, ví dụ, các miền CH3. Theo một ví dụ, phân tử đa đặc hiệu theo sáng chế bao gồm hai polypeptit mà mỗi polypeptit này bao gồm miền không đổi chuỗi nặng của kháng thể, ví dụ, miền CH2 hoặc CH3. Theo một ví dụ, hai miền không đổi chuỗi nặng này, ví dụ, miền CH2 hoặc CH3 của phân tử đa đặc hiệu bao gồm một hoặc nhiều đột biến mà cho phép sự kết hợp heterodime giữa hai chuỗi. Theo một khía cạnh, một hoặc nhiều đột biến nằm trên miền CH2 của hai chuỗi nặng của kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép hoặc phân tử giống kháng thể đặc hiệu kép. Theo một khía cạnh, một hoặc nhiều đột biến được đặt trên miền CH3 của ít nhất hai polypeptit của phân tử đặc hiệu kép. Theo một khía cạnh, một hoặc nhiều đột biến đối với polypeptit thứ nhất của phân tử đa đặc hiệu này bao gồm miền không ổn chuỗi nặng tạo thành "nút" và một hoặc nhiều đột biến đối với polypeptit thứ hai của phân tử đa đặc hiệu này bao gồm miền không đổi chuỗi nặng tạo thành "lỗ," sao cho sự heterodime hóa của polypeptit của phân tử đa đặc hiệu này bao gồm miền không đổi chuỗi nặng làm cho "nút" để tạo mặt phân cách (ví dụ, tương tác, ví dụ, miền CH2 của polypeptit thứ nhất tương tác với miền CH2 của polypeptit thứ hai, hoặc miền CH3 của polypeptit thứ nhất tương tác với miền CH3 của polypeptit thứ hai) với "lỗ." Là thuật ngữ được sử dụng ở đây, "nút" dùng để chỉ ít nhất là một chuỗi bên axit amin mà nhô ra từ mặt phân cách của polypeptit thứ nhất của phân tử đa đặc hiệu bao gồm miền không đổi chuỗi nặng và do đó định vị được trong "lỗ" bù trong mặt phân cách với polypeptit thứ hai của phân tử đa đặc hiệu bao gồm miền không đổi chuỗi nặng để ổn định hóa heteromultime, và do đó, ví dụ ưu tiên sự hình thành heteromultime hơn là sự hình thành homomultime. Nút này có thể tồn tại trong mặt phân cách ban đầu hoặc có thể được đưa vào bằng cách tổng hợp (ví dụ bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa cho mặt phân cách này). Các gốc nhập vào được ưu tiên cho sự hình thành nút thường là các gốc axit amin có trong tự nhiên và tốt hơn là được chọn từ arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y) và tryptophan (W). Được ưu tiên nhất là tryptophan và tyrosin. Theo phương án được ưu tiên, gốc ban đầu cho sự hình thành chỗ lồi lên này có thể tích chuỗi bên nhỏ, như alanin, asparagin, axit aspartic, glyxin, serin, threonin hoặc valin.

"Lỗ" dùng để chỉ ít nhất là một chuỗi bên axit amin mà được tạo hóc từ mặt phân cách của polypeptit thứ hai của phân tử đa đặc hiệu này bao gồm miền không đối chuỗi nặng và do đó tiếp nhận núp tương ứng trên bề mặt mặt phân cách liền kề của polypeptit thứ nhất của phân tử đa đặc hiệu bao gồm miền không đối chuỗi nặng. Lỗ này có thể tồn tại trong mặt phân cách ban đầu hoặc có thể được đưa vào bằng cách tổng hợp (ví dụ bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa cho mặt phân cách này). Các gốc nhập vào được ưu tiên cho sự hình thành hóc thường là các gốc axit amin có trong tự nhiên và tốt hơn là được chọn từ alanin (A), serin (S), threonin (T) và valin (V). Được ưu tiên nhất là serin, alanin hoặc threonin. Theo phương án được ưu tiên này, gốc ban đầu cho sự hình thành hóc này có thể tích chuỗi bên lớn, như tyrosin, arginin, phenylalanin hoặc tryptophan.

Theo phương án được ưu tiên, miền CH₃ thứ nhất bị đột biến tại gốc 366, 405 hoặc 407 theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85 để tạo thành "núp" hoặc "lỗ" (như được mô tả trên đây), và miền CH₃ thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH₃ thứ nhất bị đột biến tại: gốc 407 nếu gốc 366 bị đột biến ở miền CH₃ thứ nhất, gốc 349 nếu gốc 405 bị đột biến ở miền CH₃ thứ nhất, hoặc gốc 366 nếu gốc 407 bị đột biến ở miền CH₃ thứ nhất, theo sơ đồ đánh số Châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85, để tạo thành "lỗ" hoặc "núp" bổ sung với "núp" hoặc "lỗ" của miền CH₃ thứ nhất.

Theo phương án được ưu tiên, miền CH₃ thứ nhất bị đột biến tại gốc 366 theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85 để tạo thành "núp" hoặc "lỗ" (như được mô tả trên đây), và miền CH₃ thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH₃ thứ nhất bị đột biến tại các gốc 366, 368 và/hoặc 407 theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85, để tạo thành "lỗ" hoặc "núp" bổ sung với "núp" hoặc "lỗ" của miền CH₃ thứ nhất. Theo một phương án, sự đột biến đối với miền CH₃ thứ nhất đưa vào gốc tyrosin (Y) tại vị trí 366. Theo một phương án, sự đột biến đối với CH₃ thứ nhất là T366Y. Theo một phương án, sự đột biến đối với miền CH₃ thứ nhất đưa vào gốc tryptophan (W) tại vị trí 366. Theo một phương án, sự đột biến đối với CH₃ thứ nhất là T366W. Theo các phương án, sự đột biến đối với miền CH₃ thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH₃ thứ nhất bị đột biến tại vị trí 366 (ví dụ, có tyrosin (Y) hoặc tryptophan (W) được đưa vào tại vị trí 366,

ví dụ, bao gồm đột biến T366Y hoặc T366W), bao gồm đột biến tại vị trí 366, đột biến tại vị trí 368 và đột biến tại vị trí 407, theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85. Theo các phương án, đột biến tại vị trí 366 này đưa vào gốc serin (S), đột biến tại vị trí 368 đưa vào alanin (A), và đột biến tại vị trí 407 đưa vào valin (V). Theo các phương án, các đột biến bao gồm T366S, L368A và Y407V. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất của phân tử đa đặc hiệu bao gồm đột biến T366Y, và miền CH3 thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH3 thứ nhất bao gồm các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc ngược lại. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất của phân tử đa đặc hiệu bao gồm đột biến T366W, và miền CH3 thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH3 thứ nhất bao gồm các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc ngược lại.

Các đột biến không gian hoặc "lệch" (ví dụ, nùm trong lỗ) được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/145806 (ví dụ, Hình 3, Hình 4 và Hình 12 của WO2014/145806), công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/110601, và công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2016/086186, WO 2016/086189, WO 2016/086196 và WO 2016/182751 nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ về biến thể KIH bao gồm chuỗi không đổi thứ nhất bao gồm đột biến L368D và K370S, bắt cặp với chuỗi không đổi thứ hai bao gồm đột biến S364K và E357Q.

Các cặp đột biến nùm trong lỗ bổ sung thích hợp để sử dụng trong phân tử đa đặc hiệu bất kỳ theo sáng chế được mô tả thêm trong, ví dụ, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1996/027011, và Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677-681 (1998), nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Theo phương án bất kỳ được mô tả ở đây, các miền CH3 này có thể bị đột biến bổ sung để đưa vào cặp gốc xystein. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng sự đưa vào cặp gốc xystein có khả năng tạo thành gắn kết disulfua mang lại độ ổn định cho phân tử đa đặc hiệu được heterodime hóa này. Theo các phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm xystein tại vị trí 354, theo sơ đồ đánh số Châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85, và miền CH3 thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH3 thứ nhất bao gồm xystein tại vị trí 349, theo sơ đồ đánh số Châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85. Theo các phương án, miền CH3 thứ nhất của phân tử đa đặc hiệu bao gồm xystein tại vị trí 354 (ví dụ, bao gồm đột biến S354C) và tyrosin

(Y) tại vị trí 366 (ví dụ, bao gồm đột biến T366Y), và miền CH3 thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH3 thứ nhất bao gồm xystein tại vị trí 349 (ví dụ, bao gồm đột biến Y349C), serin tại vị trí 366 (ví dụ, bao gồm đột biến T366S), alanin tại vị trí 368 (ví dụ, bao gồm đột biến L368A), và valin tại vị trí 407 (ví dụ, bao gồm đột biến Y407V). Theo các phương án, miền CH3 thứ nhất của phân tử đa đặc hiệu bao gồm xystein tại vị trí 354 (ví dụ, bao gồm đột biến S354C) và tryptophan (W) tại vị trí 366 (ví dụ, bao gồm đột biến T366W), và miền CH3 thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH3 thứ nhất bao gồm xystein tại vị trí 349 (ví dụ, bao gồm đột biến Y349C), serin tại vị trí 366 (ví dụ, bao gồm đột biến T366S), alanin tại vị trí 368 (ví dụ, bao gồm đột biến L368A), và valin tại vị trí 407 (ví dụ, bao gồm đột biến Y407V).

(2) Nút và lỗ thay thế: Sự heterodime hóa IgG

Theo một khía cạnh, quá trình heterodime hóa của các chuỗi polypeptit (ví dụ, của các nửa kháng thể) của phân tử đa đặc hiệu được tăng lên bởi việc đưa một hoặc nhiều đột biến vào trong miền CH3 mà thu được từ lớp kháng thể IgG1. Theo một phương án, các đột biến bao gồm đột biến K409R đối với một miền CH3 được bắt cặp với đột biến F405L ở miền CH3 thứ hai, theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85. Các đột biến bổ sung có thể cũng, hoặc theo cách khác, là tại các vị trí 366, 368, 370, 399, 405, 407, và 409 theo sơ đồ đánh số Châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85. Tốt hơn là, sự heterodime hóa của các polypeptit bao gồm các đột biến đạt được trong điều kiện khử, ví dụ, 10-100 mM 2-MEA (ví dụ, 25, 50, hoặc 100 mM 2-MEA) cho 1-10, ví dụ, 1,5-5, ví dụ, 5, giờ tại 25-37C, ví dụ, 25C hoặc 37C.

Những sự thay thế axit amin được mô tả ở đây được đưa vào trong các miền CH3 bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực này. Thông thường ADN mã hóa (các) chuỗi nặng thường được thiết kế bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong Mutagenesis: a Practical Approach. Sự gây đột biến qua trung gian oligonucleotit là phương pháp được ưu tiên để tạo ra các biến thể đột biến thể của ADN mã hóa hai chuỗi nặng-lai. Kỹ thuật này đã biết rõ trong lĩnh vực này như được mô tả bởi Adelman et al., (1983) DNA, 2:183.

Chiến lược heterodimer hóa IgG được mô tả trong, ví dụ, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2008/119353, WO2011/131746, và WO2013/060867, nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Theo phương án bất kỳ được mô tả ở đây, các miền CH3 này có thể bị đột biến bổ sung để đưa vào cặp gốc xystein. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng sự đưa vào cặp gốc xystein có khả năng tạo thành gắn kết disulfua mang lại độ ổn định cho phân tử đa đặc hiệu được heterodimer hóa này. Theo các phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm xystein tại vị trí 354, theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85, và miền CH3 thứ hai mà tạo heterodimer hóa với miền CH3 thứ nhất bao gồm xystein tại vị trí 349, theo sơ đồ đánh số Châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85.

(3) Cầu phân cực

Theo một khía cạnh, quá trình heterodimer hóa các chuỗi polypeptit (ví dụ, của các nửa kháng thể) của phân tử đa đặc hiệu được tăng bởi việc đưa vào các đột biến dựa vào "sự bắc cầu phân cực" hợp lý, mà để làm cho các gốc tại mặt phân cách gắn kết của hai chuỗi polypeptit này tương tác với các gốc có tính chất vật lý tương tự (hoặc bổ sung) trong cấu hình heterodimer, trong khi với các gốc có tính chất vật lý khác ở cấu hình homodimer. Cụ thể, các đột biến được thiết kế để, trong sự tạo thành heterodimer, các gốc phân cực tương tác với các gốc phân cực, trong khi các gốc kỵ nước tương tác với các gốc kỵ nước. Ngược lại, trong sự tạo thành homodimer, các gốc được gây đột biến sao cho các gốc phân cực tương tác với các gốc kỵ nước. Những sự tương tác được ưu tiên trong cấu hình heterodimer và những sự tương tác không được ưu tiên trong cấu hình homodimer hoạt động cùng nhau để làm cho các miền CH3 có khả năng tạo thành heterodimer hơn là tạo thành homodimer.

Theo phương án điển hình, các đột biến trên đây được tạo ra tại một hoặc nhiều vị trí của các gốc 364, 368, 399, 405, 409, và 411 của miền CH3, cách đánh số axit amin theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., PNAS, 1969 May, 63(1):78-85.

Theo một khía cạnh, một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm gồm có: Ser364Leu, Thr365Val, Leu368Gln, Asp399Lys, Phe405Ser, Lys409Phe và Thr411Lys được đưa vào trong một trong hai miền CH3. (Ser364Leu: gốc serin ban đầu tại vị trí

364 được thay thế bằng loxin; Thr366Val: gốc threonin ban đầu tại vị trí 366 được thay thế bằng valin; Leu368Gln: gốc loxin ban đầu tại vị trí 368 được thay thế bằng glutamin; Asp399Lys: gốc axit aspartic ban đầu tại vị trí 399 được thay thế bằng lysin; Phe405Ser: gốc phenylalanin ban đầu tại vị trí 405 được thay thế bằng serin; Lys409Phe: gốc lysin ban đầu tại vị trí 409 được thay thế bằng phenylalanin; Thr411Lys: gốc threonin ban đầu tại vị trí 411 được thay thế bằng lysin.).

Theo khía cạnh khác, CH3 còn lại có thể được đưa vào một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm gồm có: Tyr407Phe, Lys409Gln và Thr411Asp (Tyr407Phe: gốc tyrosin ban đầu tại vị trí 407 được thay thế bằng phenylalanin; Lys409Glu: gốc lysin ban đầu tại vị trí 409 được thay thế bằng axit glutamic; Thr411Asp: gốc threonin ban đầu tại vị trí 411 được thay thế bằng axit aspartic).

Theo khía cạnh khác, một miền CH3 có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm gồm có: Ser364Leu, Thr366Val, Leu368Gln, Asp399Lys, Phe405Ser, Lys409Phe và Thr411Lys, trong khi miền CH3 còn lại có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm gồm có: Tyr407Phe, Lys409Gln và Thr411Asp.

Theo một phương án làm ví dụ, gốc threonin ban đầu tại vị trí 366 của một miền CH3 được thay thế bằng valin, trong khi gốc tyrosin ban đầu tại vị trí 407 của miền CH3 còn lại được thay thế bằng phenylalanin.

Theo phương án làm ví dụ khác, gốc serin ban đầu tại vị trí 364 của một miền CH3 được thay thế bằng loxin, trong khi gốc loxin ban đầu tại vị trí 368 cùng miền CH3 này được thay thế bằng glutamin.

Theo phương án làm ví dụ khác nữa, gốc phenylalanin ban đầu tại vị trí 405 của một miền CH3 được thay thế bằng serin và gốc lysin ban đầu tại vị trí 409 của miền CH3 này được thay thế bằng phenylalanin, trong khi gốc lysin ban đầu tại vị trí 409 của miền CH3 còn lại được thay thế bằng glutamin.

Theo phương án làm ví dụ khác nữa, gốc axit aspartic ban đầu tại vị trí 399 của một miền CH3 được thay thế bằng lysin, và gốc threonin ban đầu tại vị trí 411 của cùng miền CH3 này được thay thế bằng lysin, trong khi gốc threonin ban đầu tại vị trí 411 của miền CH3 còn lại được thay thế bằng axit aspartic.

Những sự thay thế axit amin được mô tả ở đây được đưa vào trong các miền CH3 bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực này. Thông thường ADN mã hóa (các) chuỗi nặng thường được thiết kế bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong *Mutagenesis: a Practical Approach*. Sự gây đột biến qua trung gian oligonucleotit là phương pháp được ưu tiên để tạo ra các biến thể đột biến thể của ADN mã hóa hai chuỗi nặng lại. Kỹ thuật này đã biết rõ trong lĩnh vực này như được mô tả bởi Adelman et al., (1983) *DNA*, 2:183.

Chiến lược cầu nối phân cực được mô tả trong, ví dụ, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2006/106905, WO2009/089004 và K.Gunasekaran, et al. (2010) *The Journal of Biological Chemistry*, 285:19637-19646, nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Các đột biến cầu nối phân cực bổ sung được mô tả trong, ví dụ, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/145806 (ví dụ, Hình 6 của WO2014/145806), công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/110601, và công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2016/086186, WO 2016/086189, WO 2016/086196 và WO 2016/182751 nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ về biến thể cầu nối phân cực bao gồm chuỗi không đổi bao gồm đột biến N208D, Q295E, N384D, Q418E và N421D.

Theo phương án bất kỳ được mô tả ở đây, các miền CH3 này có thể bị đột biến bổ sung để đưa vào cặp gốc xystein. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng sự đưa vào cặp gốc xystein có khả năng tạo thành gắn kết disulfua mang lại độ ổn định cho phân tử đa đặc hiệu được heterodime hóa này. Theo các phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm xystein tại vị trí 354, theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., *PNAS*, 1969 May, 63(1):78-85, và miền CH3 thứ hai mà tạo heterodime hóa với miền CH3 thứ nhất bao gồm xystein tại vị trí 349, theo sơ đồ đánh số châu Âu của Edelman et al., *PNAS*, 1969 May, 63(1):78-85.

Các chiến lược bổ sung để tăng cường quá trình heterodime hóa được mô tả trong, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO2016/105450, WO2016/086186, WO2016/086189, WO2016/086196, WO2016/141378, và WO2014/145806, và WO2014/110601, toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn. Bất kỳ chiến lược nào trong số các chiến lược đã nêu có thể được sử dụng trong phân tử đa đặc hiệu được mô tả ở đây.

Theo các phương án, hai hoặc hơn hai cải biến trong số các cải biến được thảo luận ở đây được kết hợp trong kháng thể đặc hiệu kép đơn lẻ, ví dụ, bbmAb.

5. Ví dụ 1: Tạo ra bbmAb bbmAb1

Ví dụ, sự tạo ra bbmAb đặc hiệu được mô tả dưới đây, cho phép người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực thực hiện sáng chế.

bbmAb thu được, bbmAb1, là IgG1 đặc hiệu kép, có các đột biến cam LALA, gắn kết đồng thời với hai đích phân biệt, IL-1 β và IL-18. Kháng thể này kết hợp hai nhánh gắn kết kháng nguyên phân biệt (các mảnh Fab), trong khi Fab định hướng chống lại IL-1 β được dựa trên mAb2 và chứa chuỗi nhẹ kappa (Vk6). Fab định hướng chống lại IL-18 dựa trên mAb1 và được tạo thành từ chuỗi nhẹ lambda (V λ 1). Để gây ra sự heterodimer hóa của miền Fc trong quá trình biểu hiện "núm" có chuỗi bên axit amin (aa) lớn (S354C và T366W) trong chuỗi nặng mAb1 và "lỗ" có chuỗi bên aa nhỏ (Y349C, T366S, L368A, Y407V) được đưa vào trong chuỗi nặng mAb2.

Để dễ dàng cho việc tham chiếu, các trình tự axit amin của các vùng siêu biến đổi của kháng thể bbmAb1, dựa vào định nghĩa Kabat và định nghĩa Chothia, cũng như các miền V_L và V_H và các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ được đưa ra trong bảng 3, dưới đây.

Bảng 3. Các trình tự axit amin của các vùng siêu biến đổi (CDR), các miền biến đổi (V_H và V_L) và các chuỗi đầy đủ của bbmAb1. ADN mã hóa V_L thứ nhất được nêu trong SEQ ID NO:102 và ADN mã hóa V_L thứ hai được nêu trong SEQ ID NO: 70. ADN mã hóa V_H thứ nhất được nêu trong SEQ ID NO:86 và ADN mã hóa V_H thứ hai được nêu trong SEQ ID NO: 54.

Chuỗi nặng bbmAb1 1 (từ mAb1)		
CDR1-1	Kabat	SEQ ID NO:76
	Chothia	SEQ ID NO:79
	IMGT	SEQ ID NO:82

CDR2-1	Kabat	SEQ ID NO:77
	Chothia	SEQ ID NO:80
	IMGT	SEQ ID NO:83
CDR3-1	Kabat	SEQ ID NO:78
	Chothia	SEQ ID NO:81
	IMGT	SEQ ID NO:84
VH-1		SEQ ID NO:85
Chuỗi nặng-1		SEQ ID NO:87
Chuỗi nhẹ bbmAb1 1 (từ mAb1)		
CDR1-1	Kabat	SEQ ID NO:92
	Chothia	SEQ ID NO:95
	IMGT	SEQ ID NO:98
CDR2-1	Kabat	SEQ ID NO:93
	Chothia	SEQ ID NO:96
	IMGT	SEQ ID NO:99
CDR3-1	Kabat	SEQ ID NO:94
	Chothia	SEQ ID NO:97
	IMGT	SEQ ID NO:100
VL-1		SEQ ID NO:101
Chuỗi nhẹ-1		SEQ ID NO:103
Chuỗi nặng bbmAb1 2 (từ mAb2)		
CDR1-2	Kabat	SEQ ID NO:44
	Chothia	SEQ ID NO:47
	IMGT	SEQ ID NO:50

CDR2-2	Kabat	SEQ ID NO:45
	Chothia	SEQ ID NO:48
	IMGT	SEQ ID NO:51
CDR3-2	Kabat	SEQ ID NO:46
	Chothia	SEQ ID NO:49
	IMGT	SEQ ID NO:52
VH-2		SEQ ID NO:53
Chuỗi nặng-2		SEQ ID NO:55
Chuỗi nhẹ bbmAb1 2 (từ mAb2)		
CDR1-2	Kabat	SEQ ID NO:60
	Chothia	SEQ ID NO:63
	IMGT	SEQ ID NO:66
CDR2-2	Kabat	SEQ ID NO:61
	Chothia	SEQ ID NO:64
	IMGT	SEQ ID NO:67
CDR3-2	Kabat	SEQ ID NO:62
	Chothia	SEQ ID NO:65
	IMGT	SEQ ID NO:68
VL-2		SEQ ID NO:69
Chuỗi nhẹ-2		SEQ ID NO:71

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-13/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ nhất (V_{H1}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:76, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:77, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:78. Theo một phương án, kháng

thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ nhất (V_{H1}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:79, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:80, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:81. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ nhất (V_{H1}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:82, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:83, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:84.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ hai (V_{H2}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:44, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:45, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:46. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ hai (V_{H2}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:47, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:48, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:49. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ hai (V_{H2}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:50, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:51, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:52.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ nhất (V_{L1}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:92, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:93 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:94. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ nhất (V_{L1}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:95, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:96 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:97. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ nhất (V_{L1}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:98, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:99 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:100.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ hai (V_{L2}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2

và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:60, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:61 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:62. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ hai (V_{L2}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:63, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:64 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:65. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ hai (V_{L2}) bao gồm các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:66, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:67 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:68.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền V_{H1} globulin miễn dịch thứ nhất và miền V_{L1} globulin miễn dịch thứ nhất, trong đó: a) miền V_{H1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm (ví dụ trong trình tự): i) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:76, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:77, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:78; hoặc ii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:79, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:80, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:81; hoặc iii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:82, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:83, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:84 và b) miền V_{L1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm (ví dụ trong trình tự): i) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:92, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:93, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:94 hoặc ii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:95, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:96, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:97 hoặc iii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:98, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:99, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:100.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm miền V_{H2} globulin miễn dịch thứ hai và miền V_{L2} globulin miễn dịch thứ hai, trong đó: a) miền V_{H2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm (ví dụ trong trình tự): i) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:44, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:45, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:46; hoặc ii) các

vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:47, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:48, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:49; hoặc iii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:50, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:51, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:52 và b) miền V_{L2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm (ví dụ trong trình tự): i) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:60, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:61, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:62 hoặc ii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:63, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:64, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:65 hoặc iii) các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:66, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:67, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:68.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β này bao gồm: a) miền biến đổi chuỗi nặng (V_{H1}) globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:85; b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_{L1}) globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:101; c) miền V_{H1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:85 và miền V_{L1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:101; d) miền V_{H1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, và SEQ ID NO:78; e) miền V_{L1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:93 và SEQ ID NO:94; f) miền V_{H1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 và SEQ ID NO:81; g) miền V_{L1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96 và SEQ ID NO:97; h) miền V_{H1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, và SEQ ID NO:78 và miền V_{L1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:93 và SEQ ID NO:94; i) miền V_{H1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, và SEQ ID NO:81 và miền V_{L1} globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96 và SEQ ID NO:97; j) chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm

SEQ ID NO:103; k) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:87; hoặc l) chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:103 và chuỗi nặng thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:87.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β này có chứa: a) miền biến đổi chuỗi nặng (V_{H2}) globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:53; b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_{L2}) globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:69; c) miền V_{H2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:53 và miền V_{L2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:69; d) miền V_{H2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, và SEQ ID NO:46; e) miền V_{L2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 và SEQ ID NO:62; f) miền V_{H2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49; g) miền V_{L2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 và SEQ ID NO:65; h) miền V_{H2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, và SEQ ID NO:46 và miền V_{L2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 và SEQ ID NO:62; i) miền V_{H2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, và SEQ ID NO:49 và miền V_{L2} globulin miễn dịch thứ hai bao gồm các vùng siêu biến được nêu trong SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 và SEQ ID NO:65; j) chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm SEQ ID NO:81; k) chuỗi nặng thứ hai bao gồm SEQ ID NO:55; hoặc l) chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm SEQ ID NO:81 và chuỗi nặng thứ hai bao gồm SEQ ID NO:55.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:53. Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:69. Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:53 và ba CDR của SEQ ID NO:69. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:85. Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:101. Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:85 và ba CDR của SEQ ID NO:101.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:85. Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:101. Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:85 và ba CDR của SEQ ID NO:101. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:53. Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:69. Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:53 và ba CDR của SEQ ID NO:69. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép L-18/IL-1 β bao gồm ba CDR của SEQ ID NO:85, ba CDR của SEQ ID NO:101, ba CDR của SEQ ID NO:53 và ba CDR của SEQ ID NO:69.

Theo một phương án, phần thứ nhất của kháng thể đặc hiệu kép L-18/IL-1 β này được chọn từ kháng thể IL-18 người mà bao gồm ít nhất: a) chuỗi nặng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nặng người; CDR1 này có trình tự axit amin SEQ ID NO:76, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:77, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:78; và b) chuỗi nhẹ globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2, và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nhẹ người, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:92, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:93, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:94. Hơn nữa, phần thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β này được chọn từ kháng thể IL-1 β người mà bao gồm ít nhất: a) chuỗi nặng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nặng người; CDR1 này có trình tự axit amin SEQ ID NO:44, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:45, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:46; và b) chuỗi nhẹ globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2, và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nhẹ người, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:60, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:61, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:62.

Theo một phương án, phần thứ nhất của kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β này được chọn từ kháng thể IL-18 người mà bao gồm ít nhất: a) chuỗi nặng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nặng người; CDR1 này có trình tự axit amin SEQ ID NO:76, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:77 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:78; và b) chuỗi nhẹ globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2, và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nhẹ người, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:92, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:93, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:94. Hơn nữa, phần thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β này được chọn từ kháng thể IL-1 β người mà bao gồm ít nhất: a) chuỗi nặng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nặng người; CDR1 này có trình tự axit amin SEQ ID NO:44, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:45 và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:46; và b) chuỗi nhẹ globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó mà bao gồm miền biến đổi bao gồm, trong trình tự, các vùng siêu biến CDR1, CDR2, và CDR3 và phần không đổi hoặc mảnh của nó của chuỗi nhẹ người, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:60, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:61, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:62.

Miền V_{H1} hoặc V_{L1} thứ nhất của kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể có các miền V_{H1} thứ nhất và/ hoặc V_{L1} thứ nhất mà về cơ bản giống với miền V_H hoặc V_L được nêu trong SEQ ID NO:85 và 101. Kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chuỗi nặng thứ nhất mà về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:87 và/ hoặc chuỗi nhẹ thứ nhất mà về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:103. Kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chuỗi nặng thứ nhất mà bao gồm SEQ ID NO:87 và chuỗi nhẹ thứ nhất mà bao gồm SEQ ID NO:103. Kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β được bộc lộ ở đây có thể bao gồm: a) chuỗi nặng thứ nhất, bao gồm miền biến đổi có trình tự axit amin về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:85 và phần không đổi trên chuỗi nặng người có sự cải biến heterodime hóa;

và b) chuỗi nhẹ thứ nhất, bao gồm miền biến đổi có trình tự axit amin về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:101 và phần không đổi trên chuỗi nhẹ của người. Phần không đổi trên chuỗi nặng của người có thể là IgG1. Theo một phương án, IgG1 là IgG1 người mà không có các đột biến yếu tố tác động. Theo một phương án, IgG1 chuỗi nặng người bao gồm đột biến cam N297A, D265A hoặc sự kết hợp của L234A và L235A. Theo một phương án cụ thể, IgG1 chuỗi nặng người bao gồm đột biến cam mà là sự kết hợp của L234A và L235A, theo SEQ ID NO:87.

Miền V_{H2} hoặc V_{L2} thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể có các miền V_{H2} thứ nhất và/ hoặc V_{L2} thứ nhất mà về cơ bản giống với miền V_H hoặc V_L được nêu trong SEQ ID NO:53 và 69. Kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chuỗi nặng thứ hai mà về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:55 và/ hoặc chuỗi nhẹ thứ hai mà về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:71. Kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β được bộc lộ ở đây có thể bao gồm chuỗi nặng thứ hai mà bao gồm SEQ ID NO:53 và chuỗi nhẹ thứ hai mà bao gồm SEQ ID NO:69. Kháng thể đặc hiệu kép IL-18/IL-1 β được bộc lộ ở đây có thể bao gồm: a) chuỗi nặng thứ hai, bao gồm miền biến đổi có trình tự axit amin về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:53 và phần không đổi trên chuỗi nặng người có sự cải biến heterodime hóa, mà bổ sung với quá trình heterodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất; và b) chuỗi nhẹ thứ hai, bao gồm miền biến đổi có trình tự axit amin về cơ bản giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO:69 và phần không đổi trên chuỗi nhẹ của người. Phần không đổi trên chuỗi nặng của người có thể là IgG1. Theo một phương án, IgG1 là IgG1 người mà không có các đột biến yếu tố tác động. Theo một phương án, IgG1 chuỗi nặng người bao gồm đột biến cam N297A, D265A hoặc sự kết hợp của L234A và L235A. Theo một phương án cụ thể, IgG1 chuỗi nặng người bao gồm đột biến cam mà là sự kết hợp của L234A và L235A, theo SEQ ID NO:55.

Các chất đối kháng IL-18 được ưu tiên khác (ví dụ các kháng thể) để sử dụng làm phần thứ nhất của kháng thể đặc hiệu kép trong các phương pháp, bộ kit và phác đồ theo sáng chế là các loại được nêu trong bằng sáng chế Mỹ số 9,376,489, mà được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Các chất đối kháng IL-1 β được ưu tiên khác (ví dụ các kháng thể) để sử dụng làm phân thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép trong các phương pháp, bộ kit và phác đồ theo sáng chế là các loại được nêu trong bằng sáng chế Mỹ các số 7,446,175 hoặc 7,993,878 hoặc 8,273,350, mà được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

(1) Thiết kế vector

Hai vector, vector A và vector B, được tạo ra theo thiết lập sau đây. Vector A được thiết kế cho phần kháng thể mAb1 (IgG1 kháng IL18). Vùng không đổi của chuỗi nặng 1 được cải biến bởi hai đột biến điểm, T thành W như được quan sát thấy trong vị trí 366 của SEQ ID NO: 87, và S thành C như được quan sát thấy trong vị trí 354 của SEQ ID NO: 87, để tạo ra cấu trúc núp và cho phép tạo cầu Cys. Ngoài ra, vùng không đổi của chuỗi nặng 1 được cải biến bởi các đột biến điểm, L thành A như được quan sát thấy trong vị trí 234 của SEQ ID NO: 87 và L thành A như được quan sát thấy trong vị trí 235 của SEQ ID NO: 87 (còn gọi là LALA), để làm câm một phần các chức năng yếu tố tác động FC. Kháng thể này có vùng chuỗi nhẹ biến đổi, mà thuộc loại lambda 1, λ 1.

Vector B được thiết kế cho phần kháng thể mAb2 (IgG1 kháng IL-1 β). Vùng không đổi của chuỗi nặng 2 được cải biến bởi bốn đột biến điểm, T thành S như được quan sát thấy trong vị trí 366 của SEQ ID NO: 55, L thành A như được quan sát thấy trong vị trí 368 của SEQ ID NO: 55, Y thành V như được quan sát thấy trong vị trí 407 của SEQ ID NO: 55, và Y thành C như được quan sát thấy trong vị trí 349 của SEQ ID NO: 55, để tạo ra cấu trúc lỗ và cho phép tạo cầu Cys khác. Cấu trúc lỗ này tương tác với cấu trúc núp, để thúc đẩy sự tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Ngoài ra, vùng không đổi của chuỗi nặng 2 được cải biến bởi hai đột biến LALA, L thành A như được quan sát thấy trong vị trí 234 của SEQ ID NO: 55, L thành A như được quan sát thấy trong vị trí 235 của SEQ ID NO: 55, để làm câm một phần các chức năng yếu tố tác động FC. Kháng thể này có vùng chuỗi nhẹ biến đổi, mà thuộc loại kappa 6, κ 6.

Vector A và B mang tổ hợp DHFR và các chỉ thị chọn lọc neomycin cũng như là FOLR và các chỉ thị chọn lọc hygromycin, tương ứng. Axit folic là vitamin thiết yếu cho quá trình tổng hợp purin và methionin và cần được hấp thụ bởi các tế bào động vật có vú từ môi trường nuôi cấy. "Thụ thể axit folic" (FolR) có mặt trên plasmit biểu hiện A là FolR đột biến có ái lực thay đổi với các folat, thúc đẩy sự vận chuyển axit folic từ

môi trường vào trong tế bào động vật có vú. Vì các thụ thể axit folic ái lực cao chỉ được biểu hiện yếu trong các tế bào CHO được nuôi cấy, các tế bào biểu hiện FolR tái tổ hợp có lợi thế sinh trưởng rõ ràng trong điều kiện folat thấp (50nM). Chỉ thị chọn lọc FolR được mã hóa tại vector B

Ngoài FolR, "đihydrofolat reductaza" (DHFR) có mặt trên vector A cũng làm chỉ thị chọn lọc. DHFR chuyển hóa axit folic thành các tiền chất sống cho quá trình tổng hợp purin và methicnin. MTX là chất tương tự về mặt hóa học của axit folic. Nó cạnh tranh đối với các vị trí gắn kết tự do trên DHFR và do đó phong bế enzym này. Các tế bào biểu hiện quá mức DHFR ngoại sinh có thể xử lý với nồng độ MTX tăng, làm cho các tế bào này sinh trưởng với lợi thế chọn lọc rõ ràng trong môi trường có bổ sung MTX. Sự chọn lọc FolR và DHFR kết hợp đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và được bộc lộ ví dụ trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2010/097240A1, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn. MTX đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và được bộc lộ ví dụ trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2010/097239A1, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn. Các vector biểu hiện đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và được bộc lộ ví dụ trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2009/080720A1, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Sơ đồ tổng quát của hai vector này được trình bày trên Hình 1.

(2) Dòng tế bào chủ và sự chuyển nhiễm

Dòng tế bào CHO bố mẹ được sử dụng làm dòng tế bào chủ để sản xuất dòng tế bào biểu hiện bbmAb1. Dòng tế bào chủ này thu được từ dòng tế bào CHO-K1, đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, theo cách được mô tả trong ví dụ các đơn sáng chế quốc tế số WO2015092737 và WO2015092735, cả hai tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Một ống chứa dòng CHO được sử dụng để tạo ra dòng tế bào tái tổ hợp bbmAb1. Dòng CHO này được điều chế trong môi trường xác định về mặt hóa học.

Các tế bào này được cho sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy xác định về mặt hóa học.

Một μg ADN plasmit được tạo mạch thẳng *SwaI*, vector biểu hiện A & B mã hóa cho bbmAb, được bổ sung trong mỗi lần chuyển nhiễm. Phản ứng chuyển nhiễm này được thực hiện trong môi trường nuôi cấy đã xác định về mặt hóa học.

Sự chuyển nhiễm được thực hiện bằng cách xung điện bằng cách sử dụng AMAXA Gene Pulser, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào CHO bố mẹ được sử dụng để chuyển nhiễm ở pha sinh trưởng hàm mũ với khả năng sống tế bào cao hơn 95%. Tổng cộng, ba lần chuyển nhiễm được thực hiện với 5×10^6 tế bào trong mỗi lần chuyển nhiễm.

Ngay sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được chuyển vào bình lắc, chứa môi trường nuôi cấy được xác định về mặt hóa học.

Các tập hợp tế bào được ủ trong 48 giờ tại $36,5^\circ\text{C}$ và CO_2 10% trước khi bắt đầu quy trình chọn lọc.

(3) Sự chọn lọc và phân loại tế bào

Quy trình chọn lọc được thực hiện bằng cách sử dụng chỉ thị chọn lọc được mã hóa bởi vector biểu hiện A và B riêng lẻ, như được mô tả trên đây. Cả hai protein (FolR và DHFR) đều tham gia vào cùng con đường phân tử; FolR vận chuyển axit folic cũng như là chất tương tự folat MTX vào trong tế bào, DHFR chuyển hóa nó thành các tiền chất sống cho quá trình tổng hợp purin và methionin. Bằng cách kết hợp chúng làm nguyên lý chọn lọc, chế độ chọn lọc đặc biệt mạnh có thể được thực hiện để làm giàu cho các tế bào tái tổ hợp biểu hiện cả hai protein tái tổ hợp.

48 giờ sau khi chuyển nhiễm và sinh trưởng trong điều kiện folat thấp, áp lực chọn lọc bổ sung được áp dụng bằng cách bổ sung 10nM MTX vào môi trường nuôi cấy xác định về mặt hóa học này. 22 ngày sau khi bắt đầu chọn lọc MTX, các quần thể gộp gồm chủ yếu là các tế bào kháng MTX nổi lên. Sau khi các tế bào thu hồi gộp được kết đông và chuẩn bị sinh khối tế bào. Các mẻ tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy xác định về mặt hóa học được thiết lập cho việc xác định nồng độ của bbmAb này.

Phương pháp HPLC protein A được sử dụng để xác định hoàn toàn tất cả các loại sản phẩm và các tạp chất liên quan mang phần Fc, trong khi phương pháp sắc ký pha đảo (RPC) được sử dụng để thu được dấu vân tay đối với sự phân bố của các phân đoạn riêng lẻ – các đỉnh riêng lẻ đã được chỉ ra bằng phương pháp MS.

Các tập hợp tế bào CHO sản xuất bbmAb1 được sử dụng cho quy trình tách dòng FACS để thu được các dòng tế bào tạo dòng được tách riêng làm nguyên liệu ban đầu cho tất cả các đánh giá khác. Sự chọn lọc tế bào sử dụng phân tích FACS được mô tả trong ví dụ đơn sáng chế Mỹ số US20110281751, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Các dòng tế bào CHO tạo dòng riêng lẻ biểu hiện bbmAb1 được tạo ra bằng cách Phân loại tế bào được hoạt hóa bằng huỳnh quang (FACS). Để cho phép phân loại FACS, các tế bào được ủ với Fab kháng IgG1 được đánh dấu bằng FITC trong 30 phút và được rửa hai lần trong PBS trước khi được sử dụng trong phương pháp phân loại tế bào đơn lẻ được hỗ trợ bởi FACS, quy trình đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Quy trình phân loại tế bào FACS được thực hiện với thiết bị FACS Aria (Becton Dickinson), được trang bị bộ kết tủa tế bào tự động (Automatic Cell Deposition Unit - ACUDU) sử dụng phần mềm FACS Diva.

Để đảm bảo rằng chỉ các tế bào đơn lẻ được phân loại bởi thiết bị FACS, các cài đặt được điều chỉnh thành chế độ chính xác tế bào đơn lẻ bằng cách sử dụng vòi phun 130µm cũng như tốc độ dòng thích hợp để đảm bảo chất lượng phân loại tốt.

Trong chế độ tế bào đơn lẻ, mật độ tinh khiết được đặt đến tối đa, nên chỉ các giọt không chứa hạt hoặc các tế bào khác được phân loại.

Mật độ pha được đặt đến một nửa giá trị tối đa, nên chỉ các hạt tập trung bên trong giọt được phân loại được làm lệch. Quỹ đạo giọt và độ chính xác số đếm được tối ưu hóa ở mức chi phí năng suất để làm tăng xác suất là mỗi giọt chứa không nhiều hơn 1 tế bào đơn lẻ.

Để xác minh và tư liệu hóa nguồn gốc đơn dòng, và để xác nhận trạng thái tế bào đơn lẻ tại ngày 0 sau khi tách dòng FACS ảnh của tất cả các giếng của các đĩa 96 giếng được chụp bằng cách sử dụng hệ thống chụp ảnh.

Ảnh của ngày 0 chỉ ra dòng sản xuất bbmAb1 được đánh giá bằng mắt thường trong hai bản sao, khẳng định rằng chỉ một tế bào đơn lẻ có thể được nhận diện trên ảnh này của giếng tương ứng được chụp bằng hệ thống chụp ảnh.

Điều này nhấn mạnh nguồn gốc tế bào đơn lẻ của dòng sản xuất bbmAb1.

(4) Mở rộng tế bào

Sau khi tách dòng FACS, các dòng này được xử lý bằng hệ thống robot trong các tuần đầu tiên và được xử lý thủ công sau đó ở, từng bước mở rộng nuôi cấy từ đĩa 96 giếng, đĩa 24 giếng hướng đến máy lắc, và cuối cùng là máy phản ứng sinh học, đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, để đánh giá hiệu suất (năng suất và chất lượng của sự biểu hiện bbmAb).

Trong quá trình mở rộng/nuôi cấy, các tế bào CHO tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy xác định về mặt hóa học được bổ sung Methotrexat (MTX) ở nồng độ cuối là 10nM.

Các tế bào được chuyển 2-3 lần mỗi tuần vào môi trường mới và được giữ ở pha sinh trưởng logarit trong toàn bộ nghiên cứu.

Năng suất được đánh giá bằng HPLC Protein A, biên dạng chất lượng sản phẩm ban đầu được xác định bằng phương pháp sắc ký pha đảo (RPC).

Tất cả các dung dịch dự trữ đông lạnh được tạo ra trong môi trường nuôi cấy, được bổ sung DMSO 7,5%.

(5) Độ ổn định của dòng

bbmAb được phân lập từ các tập hợp và các dòng được đánh giá cẩn thận bằng các phương pháp phân tích khác nhau để phán đoán các đặc tính của sản phẩm và các thông số chất lượng để đảm bảo sự chọn lọc dòng sản xuất phù hợp nhất.

Ngoài ra, phương pháp phân tích quá mức độ ổn định sản xuất được thực hiện cho các dòng sản xuất này để đảm bảo sự chọn lọc của các dòng sản xuất thích hợp nhất.

Trạng thái khác nhau của các phương pháp phân tích trong lĩnh vực được sử dụng để đánh giá độ ổn định dòng: sắc ký lỏng ái lực, sắc ký pha đảo, FACS và MS.

(6) Sản xuất

(a) Xử lý ngược dòng

Nguyên liệu bbmAb được sản xuất trong các bình lắc hoặc các môi trường nuôi cấy nạp liệu theo mẻ dao động. Dung dịch dự trữ đông lạnh của các tập hợp hoặc các dòng như PSL được rã đông và được mở rộng trong khoảng thời gian yêu cầu trong môi

trường xác định về mặt hóa học để thu được số lượng tế bào yêu cầu để cấy môi trường sản xuất, thường là với mật độ tế bào cấy giống là $4,0 \times 10^5$ tế bào/ml. Môi trường nuôi cấy riêng lẻ được nuôi cấy trong khoảng thời gian 13-14 ngày. Trong quá trình nuôi cấy, sự kiểm soát trong quy trình được thực hiện để theo dõi nồng độ của bbmAb và biên dạng chất lượng của dịch nổi. Tại thời điểm kết thúc quá trình nuôi cấy, các tế bào được tách khỏi dịch nổi nuôi cấy bằng phương pháp ly tâm (ví dụ máy lắ) hoặc phương pháp lọc sâu sau đó là lọc vô khuẩn trước khi tiếp tục xử lý DSP thêm.

(b) Xử lý xuôi dòng

Dựa vào thiết kế định dạng và phương pháp đồng biểu hiện không chỉ sản phẩm nguyên vẹn bbmAb1 và các tạp chất thông thường như các chất kết tụ, ADN và protein tế bào chủ, mà cả các monome, homodime và các biến thể bbmAb1 chuỗi nhẹ/chuỗi nặng không bắt cặp thu được từ mAb1 và mAb2, như được thể hiện trên Hình 4, được mong đợi trong dịch nổi sau khi nuôi cấy tế bào và loại bỏ các mảnh vụn tế bào. Các biến thể bbmAb1 chuỗi nhẹ /chuỗi nặng không bắt cặp (từ Hình 4E đến Hình 4M) được nghi ngờ là có cùng các tính chất lý sinh như bbmAb1 nguyên vẹn mà không dễ dàng được loại bỏ ở quy mô điều chế.

Phương pháp I: Tinh chế bằng cách bắt giữ trên MabSelect™ SuRe™, hoàn thiện trên LambdaFabSelect™ và KappaSelect™

Các biến thể bbmAb1 và bbmAb1 mang phần Fc được bắt giữ từ dịch nổi không có tế bào bằng bước sắc ký lỏng ái lực (ALC) thứ nhất trên MabSelect™ SuRe™. Các biến thể bbmAb1 chỉ chứa các chuỗi nhẹ kappa (lỗ mAb2, Hình 4C và 4D) và HCP được loại bỏ bằng phương pháp hoàn thiện thứ nhất trên LambdaFabSelect™ và các biến thể bbmAb1 chỉ chứa các chuỗi nhẹ lambda (núm mAb1, Hình 4A và 4B) và HCP được loại bỏ bằng bước hoàn thiện thứ hai trên KappaSelect™.

Sắc ký được thực hiện tại nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng thời gian lưu (RT) 4 phút trong toàn bộ phương pháp. Tất cả các cột được làm cân bằng với 4 thể tích cột (CV) 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, độ pH 7,0 trước khi tải. Để loại bỏ các tạp chất gắn kết không đặc hiệu khỏi sản phẩm, như các protein tế bào chủ (HCP), các thành phần môi trường và ADN, cột sắc ký này được rửa bằng 4 CV 250 mM Arginin-HCl,

1M NaCl, 88mM NaOH, pH 9,0 và 3 CV đương lượng chất đệm sau khi tải dịch nổi bbmAb1 không chứa tế bào từ bình lắc lên trên cột ALC. bbmAb1 và các biến thể bbmAb1 tiềm năng được rửa giải khỏi cột sắc ký bằng cách sử dụng 50 mM axit axetic, pH 3,0 tương ứng 50mM axit axetic/HCl, pH 2,0 cho sự tách rửa từ KappaSelect™ và LambdaFabSelect™. Quá trình thu gom đỉnh sản phẩm được bắt đầu và kết thúc tại 0,5 AU/cm hoặc 0,25 AU/cm (280nm). Độ pH của các chất rửa giải bbmAb1 được điều chỉnh đến ~pH 5,0 bằng 0,1 hoặc 1M Tris trước khi bảo quản tại 2-8°C tương ứng cho các đánh giá phân tích.

Phương pháp II: Tinh chế bằng cách bắt giữ trên LambdaFabSelect™, hoàn thiện trên chất dính Capto™ và Fractogel™ EMD SO₃

Trong phương pháp thứ hai, bbmAb1 nguyên vẹn và các biến thể bbmAb1 chỉ chứa các chuỗi nhẹ lambda (monome và homodime nóm mAb1, Hình 4A và 4B) được bắt giữ từ dịch nổi không có tế bào bằng phương pháp sắc ký lỏng ái lực trên LambdaFabSelect™. Để làm bất hoạt các virus được bao vỏ có mặt tiềm năng, quá trình xử lý tại độ pH thấp của chất rửa giải ALC được thực hiện sau đó là hai bước hoàn thiện sắc ký trên chất dính Capto và Fractogel™ EMD SO₃ để loại bỏ các tạp chất liên quan đến sản phẩm, ADN và HCP. Các virus có mặt tiềm năng sau đó được loại ra bằng phương pháp lọc nano trước bước cô đặc và trao đổi đệm cuối cùng bằng cách sử dụng phương pháp lọc tiếp tuyến thấp.

a) Phương pháp sắc ký lỏng ái lực (ALC) trên LambdaFabSelect™

ALC được thực hiện tại 18-28°C bằng các sử dụng thời gian lưu (RT) 3,6-4,4 phút trong toàn bộ phương pháp. Đầu tiên, cột ALC được làm cân bằng bằng 4-6 CV 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,0. Sau đó dịch nổi bbmAb1 không tế bào được gạn lọc từ máy dao động hoặc các máy phản ứng sinh học được tải lên trên cột LambdaFabSelect™ với tỉ trọng tải là 7-23 g/l. Rửa cột bằng 4-6 CV 250mM Arginin-HCl, 1M NaCl, 88mM NaOH, pH 9,0 và lần rửa thứ hai bằng 3-5 CV đương lượng đệm trước khi tách rửa sản phẩm bằng 4-6 CV 50mM axit axetic. Đỉnh sản phẩm được thu thập từ 0,5-2,0 AU/cm (280nm) tăng dần và 0,5-2,0 AU/cm (280nm) giảm dần. Cột

LambdaFabSelect™ được làm sạch bằng cách sử dụng 3-5 CV 120mM axit phosphoric, 167mM axit axetic, pH 1,5 trước khi được làm cân bằng lại bằng 3-5 CV 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,0 và bảo quản trong 4-6 CV 20% etanol.

b) Làm bất hoạt virus

Độ pH của chất rửa giải ALC được điều chỉnh đến độ pH 3,4-3,6 bằng cách sử dụng 0,3M axit phosphoric. Sau đó, dung dịch protein này được ủ tiếp trong 60-90 phút tại độ pH thấp trước khi điều chỉnh độ pH đến 7,3-7,7 bằng 1M Tris. Bước lọc sâu sử dụng thiết bị lọc Millipore B1HC Pod được sử dụng áp dụng tốc độ dòng 100-300LMH trước khi lọc vô trùng bằng thiết bị lọc vô trùng 0,45/0,2µm Sartopore™.

c) Sắc Ký Trao Đổi Anion Đa Mô Đun (MAC) trên chất dính Capto™

MAC được thực hiện theo chế độ dòng chảy qua tại 18-28°C bằng cách sử dụng thời gian lưu 4-6 phút trong toàn bộ phương pháp này. Đầu tiên, cột MAC được làm cân bằng bằng 7-9 CV 20mM Tris/Tris-HCl, pH 7,5. Sau đó chất rửa giải ALC được xử lý tại pH thấp được tải lên trên cột chất dính Capto™ bằng cách sử dụng tỉ trọng tải là 175-350 g/l. Quá trình thu gom đỉnh sản phẩm do đó được bắt đầu tại 0,5-2,0 AU/cm (280nm) tăng dần. Sau đó cột MAC này được rửa bằng 5-7 CV đương lượng đệm và quá trình thu gom đỉnh sản phẩm kết thúc tại 0,5-2,0 AU/cm (280nm) giảm dần. Cột chất dính Capto™ sau đó được tách bằng 6-8 CV 100 mM axit axetic, sau đó là bước làm sạch tại chỗ bằng 3-5 CV 0,5 M NaOH và bảo quản trong 3-5 CV 0,1M NaOH.

d) Sắc ký trao đổi cation trên Fractogel™ EMD SO₃.

CEC trên Fractogel™ EMD SO₃ được thực hiện theo chế độ tách rửa gắn kết tại 18-28°C. Thời gian lưu 6-8 phút được sử dụng trong quá trình làm cân bằng, tách, CIP và bảo quản và thời gian lưu 8-10 phút trong quá trình tải, rửa và tách rửa. Cột CEC này được làm cân bằng bằng 6-8 CV 20mM axit succinic, 35,1mM NaOH, pH 6,0. Sau đó chất thấm MAC được tải lên trên cột với tỉ trọng tải là 35-70 g/l. Tiếp theo, cột CEC được rửa bằng 5-7 CV đương lượng đệm. Quá trình tách rửa được thực hiện bằng cách

sử dụng gradien muối tuyến tính từ 10 đến 90% 20 mM axit succinic, 500mM NaCl, 37,4mM NaOH, pH 6,0 trong 15 CV. Đỉnh sản phẩm bbmAb1 được thu gom bắt đầu tại 0,1-0,4 AU/cm tăng dần đến 20%-40% độ cao đỉnh tối đa tại 300nm. Cột Fractogel™ EMD SO₃ được tách bằng 3-5 CV 1M NaCl, sau đó là bước làm sạch tại chỗ bằng 3-5 CV 0,5M NaOH và bảo quản trong 3-5 CV 0,1M NaOH.

e) Lọc nano

Các virus có mặt tiềm năng được loại bỏ bằng phương pháp lọc nano sử dụng thiết bị lọc nano Planova™ 20N và thiết bị lọc sơ bộ 0,5/0,1µm Millipore SHR-P. Lọc sơ bộ và lọc nano được thực hiện bằng cách áp dụng áp suất chênh là 0,7-0,9 bar.

f) Lọc dòng tiếp tuyến và Tạo chế phẩm

Để cô và lọc tuần hoàn có pha loãng bbmAb1, bước lọc dòng tiếp tuyến trên các màng Millipore™ Pellicon™ 3 RC 30 kDa được thực hiện tại 18-28°C. Đầu tiên, dung dịch protein bbmAb1 đã được lọc nano được cô bằng tỉ trọng tải tối đa là 1000g/m² đến 60-80 g/l sử dụng áp suất dòng cấp là 0,5 đến 1,2 bar và áp suất xuyên màng (TMP) là 0,3-0,6 bar. Sau đó, bbmAb1 được lọc tuần hoàn có pha loãng với 7-9 thể tích lọc tuần hoàn có pha loãng 20 mM histidin/histidin-HCl, pH 6,0 tại áp suất dòng cấp là 0,8 đến 1,8 bar và TMP là 0,4-0,9 bar. Bước cô thứ hai đến 134±10 g/l tại áp suất dòng cấp là 1,4-3,0 bar và TMP là 0,7 đến 1,5 bar được thực hiện. Dung dịch protein bbmAb1 được lọc siêu lọc cuối cùng được điều chế đến nồng độ 100±10 g/l và 0,04 % (khối lượng/thể tích) Polysorbat 20. Dược chất (DS) cuối cùng được lọc qua thiết bị lọc 0,2µm được bảo quản đông lạnh tại ≤-60°C.

(7) Xác định đặc điểm phân tích và đánh giá độ tinh khiết

(a) Sàng lọc LC-MS của bbmAb nguyên vẹn và các biến thể

100 µg mẫu bbmAb được tính chế bằng protein A được làm đông khô trong đĩa 96 giếng và được khử glycosyl hóa bằng PNGaseF (New England Biolabs) trong 18 giờ tại 37°C trong 100µl chất đệm 50 mM Tris-HCl pH 7,5). Các mẫu được đo bằng LC-ESI-MS trên UPLC lớp H (Waters) được nối với máy đo phổ khối Synapt G2 Q-TOF

(Waters). Cột khử muối MassPREP Micro 2,1x 5mm (Waters) được sử dụng tại nhiệt độ cột 80°C. Gradient tuyến tính được áp dụng tại 0,3 ml/phút với pha động A: 0,1% axit formic trong nước, pha động B: 0,1% FA trong axetonitril: 0-2 phút 5% B, 2-12 phút 5-90% B, sau đó là một số bước rửa tại 0,5 ml/phút. Các Thông Số MS: ESI + Chế độ phân giải, Điện áp mao dẫn 3 kV, hình nón lấy mẫu 40V, nhiệt độ nguồn 150°C, nhiệt độ khử solvat hóa 400°C. Hệ thống được hiệu chuẩn bằng dung dịch mao dẫn NaCl, khối khóa là Leucin Enkephalin. Số liệu được xử lý bằng phương pháp giải chập MaxEnt1 tự động (khoảng khối lượng 60-150 kDa, sự kìm hãm hài hòa) bằng phần mềm UNIFI 1.6 (Waters). Sự xác định và định lượng tương đối của các loại bbmAb và các biến thể bất cặp nhằm dựa vào sự khớp với khối lượng kỳ vọng về mặt lý thuyết và cường độ tín hiệu khối lượng tương đối của phổ khối được giải chập.

(b) Xác định đặc điểm LC-MS của bbmAb1

bbmAb đã được khử glycosyl hóa nguyên vẹn: Kháng thể bbmAb1 đã tinh chế được pha loãng trong 20mM Tris-HCl pH 7,5 đến 1 mg/ml và được khử glycosyl hóa trong 4 giờ tại 37°C bằng cách sử dụng 2µl enzym PNGaseF (New England Biolabs). Sự phân cắt được làm dừng bằng cách bổ sung axit trifloroaxetic (TFA) đến 2%.

bbmAb đã được khử glycosyl bị khử: bbmAb1 được pha loãng đến 5 mg/ml trong 20µl 0,1 M Tris-HCl pH 7,5. 2µl PNGase F được bổ sung và được ủ trong 4 giờ tại 37°C, sau đó 80 µl đệm biến tính (50mM Tris-HCl pH 8,0, 6M guanidin hydroclorua) và 1µl DTT 1 M được bổ sung vào hỗn hợp. Sau khi ủ trong 1 giờ tại 37°C, mẫu được axit hóa bằng 1µl TFA.

Phân cắt bằng papain bbmAb thành Fab và Fc. bbmAb1 được trộn với chất đệm phân cắt (20mM axit succinic, 35,1mM NaOH, pH 6,0, 1mM Cys-HCl, 1mM EDTA) đến 5 mg/ml, sau đó papain proteaza (Roche, Germany) được bổ sung đến nồng độ cuối là 5 µg/ml (tỉ lệ proteaza/ protein 1:1000) và được ủ trong 2 giờ tại 37°C có lắc. Sau khi ủ, dung dịch này được làm dừng bằng cách bổ sung dung dịch iodoacetamid đến nồng độ cuối là 1,2mM.

Phân cắt bằng IdeS bbmAb thành F(ab')₂ và Fc. 100µg bbmAb1 được trộn với chất đệm phân cắt (50mM natri photphat, 150mM NaCl, pH 6,6) và được phân cắt bằng

100 U IdeS proteaza (Fabricator, Genovis) qua đêm tại 37°C. Sau khi ủ, dung dịch này được làm dừng bằng cách bổ sung TFA đến nồng độ cuối cùng là 2%.

Phân cắt LysC bị khử - Lập bản đồ peptit. (Theo Rombach-Riegraf et al, PlosOne 2014) 200µg protein được làm biến tính bằng cách sử dụng 150µl dung dịch làm biến tính (6M guanidin hydroclorua, 50mM Tris-HCl, 5mM Na₂EDTA, pH 8,0) và được khử bằng cách bổ sung 1,5µl DTT 1M và được ủ tại 37°C trong một giờ. Sự alkyl hóa được thực hiện bằng cách bổ sung 3µl iodoacetamid 1M sau đó ủ tại 37°C trong tối. Phản ứng này được làm dừng bằng 1µl của DTT 1M. Sau khi khử/alkyl hóa, 750µl chất đệm phân cắt (50mM Tris-HCl, pH 8) được bổ sung vào mẫu. Sau đó mẫu này được phân cắt bằng hai lần bổ sung 4µl của dung dịch 1 µg/µl endoproteinaza LysC (Wako (Osaka, Nhật Bản)) và ủ tại 37°C trong 1 giờ và 3 giờ tương ứng. 5µl TFA được bổ sung để làm dừng sự phân cắt này.

Đo LC-MS. Các mẫu protein được cho qua hệ thống LC-MS sử dụng Waters UPLC lớp H được trang bị cột BEH C4 RP (1,7µm, 2,1 x 100mm, 300Å, Waters) và máy đo phổ khối Xevo G2 TOF (Waters, Milford). Các chất rửa giải là A: TFA 0,1% trong nước và B: TFA 0,09 % trong axetonitril. Cột này được đặt đến 80°C. Tốc độ dòng là 0,2 ml/phút. Các protein được rửa giải bằng gradien 40 phút như sau: 0-5 phút 10% B, 5-10 phút 10-30% B, 10-25 phút 30-40% B, 25-26 phút 40-95%B, 26-28 phút 95%, 28-40 phút 10% B.

Cài đặt MS: Chế độ ESI (+) TOF, Chế độ phân giải, Khoảng khối lượng 400-4000Da, Thời gian quét: 1 giây, điện áp mao dẫn 3kV, hình nón lấy mẫu 25V-40V. Hệ thống được hiệu chuẩn bằng cách sử dụng dung dịch NaCsI.

Các chất phân giải peptit được phân tích bằng RP-LC-MS trên UPLC loại H (Waters) được kết hợp với máy đo phổ khối Synapt G2 Q-TOF (Waters) sử dụng CSH130 C18 2,1mm x 150, 1,7µm (Waters, Milford). Pha động A: TFA 0,1% trong nước và pha động B: TFA 0,09 % trong axetonitril. Các peptit được rửa giải khỏi cột này với gradien như sau: 0-5 phút 0%B, 5-10 phút 0-2%B, 10-40 phút 2-20%B, 40-120 phút 20-40%B, 120-135 phút 40-70% tại nhiệt độ cột 40°C. Các biểu đồ sắc ký UV được ghi lại tại 214nm và việc thu thập số liệu MS được thực hiện trong chế độ phân giải ES(+) dương tính là thí nghiệm MS^E bằng cách sử dụng sự phân mảnh năng lượng thấp (4 eV), và năng lượng cao (30-55V). Khối khóa là Leucin Enkephalin (Waters).

Xử lý và đánh giá số liệu được thực hiện bằng phần mềm MassLynx 4.2 hoặc UNIFI 1.6 (Waters). Thuật toán MaxEnt1 được sử dụng cho sự giải chấp phổ khối protein. Các tính toán khối lượng lý thuyết được thực hiện bằng phần mềm GPMW 9.2 (dữ liệu Lighthouse).

(c) Sắc ký pha đảo

Các mẫu bbmAb được phân tích trên Agilent 1260 HPLC sử dụng cột Poroshell 300 SB-C8 RP, 2,1mm x 75mm, 5 μ m (Agilent). Nhiệt độ cột được đặt đến 80°C, tốc độ dòng là 2 ml/phút, pha động A: 90% nước, 10 % axetonitril, 0,1% TFA, 0,3% PEG-300, pha động B: 10 % nước, 90 % axetonitril, TFA 0,1%, 0,3% PEG-300. Gradient được sử dụng là: 0-5 phút 22-37% B, 5,0-5,1 phút 100% B, 5,1-6 phút 100% B, 6,1.-8,5 phút 22% B. Tín hiệu UV được ghi lại tại 210nm. Việc thu thập và đánh giá số liệu được điều khiển và thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Chromeleon™ 6.8 (Thermo Scientific).

(d) Sắc ký loại trừ kích thước

Mẫu bbmAb1 được cho qua cột TSK gel G3000SWXL (Tosoh #808541, 5 μ m, 7,8mm x 300mm) SEC, kích thước lỗ 250A sử dụng hệ thống Agilent 1260. Pha động là dung dịch kali photphat 150mM, pH 6,5, Tốc độ dòng là 0,4 ml/phút, nhiệt độ cột là 30°C. UV được ghi tại 210nm. Việc thu thập số liệu và tích phân đỉnh được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Chromeleon™ 6.8 (Thermo Scientific).

(e) Điện di mao dẫn CE-SDS

Đối với CE-SDS không khử, mẫu bbmAb được trộn với chất đệm mẫu (0,1 natri photphat/ 1,0% SDS, pH 6,6) và sau đó được trộn với dung dịch iodoacetamid. Đối với CE-SDS khử, protein này được trộn với chất đệm mẫu 0,1M Tris/ 1% SDS, pH 8,0 và được khử bằng 5% (thể tích/thể tích) mercaptoetanol. Cả hai mẫu đều trải qua bước biến tính nhiệt tại 70°C trong 10 phút.

Các mẫu được phân tích trên hệ thống Beckman PA 800 được trang bị ống mao dẫn silic đioxit được dung hợp trần (50 μ m, 375 OD, 67cm, Beckman) với chiều dài ống mao dẫn là 30 cm và được nạp đầy bằng chất đệm gel sàng Beckman SDS MW. Sự tách được tiến hành từ độ phân cực âm đến dương tại 15kV và nhiệt độ ống mao dẫn 25°C,

phát hiện bằng tia UV tại 214nm. Các điện di đồ được xử lý và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Chromeleon™ 6.8.

(f) Điện di vùng mao dẫn CZE

Sự tách được thực hiện trên Hệ thống phân tích được lý Beckman Coulter PA 800 được trang bị máy phát hiện UV tại 214nm. Protein được tách trên ống mao dẫn silic đioxit dung hợp (ID 50 μ m) có tổng chiều dài là 40 cm với điện áp mao dẫn là 20kV tại 25°C và độ phân cực dương. Chất đệm chạy: 400mM axit 6-aminocaproic/axit axetic pH 5,7 với 2mM TETA và 0,03% Tween 20. Sự tích phân đỉnh được thực hiện bằng phần mềm Chromeleon™ 6.8.

(8) Kết quả phân tích

Độ tinh khiết và độ đồng nhất của các hỗn hợp và các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép khác nhau sau khi đồng biểu hiện được phân tích sau khi được tính chế protein-A bằng cách sử dụng phương pháp sàng lọc khối lượng UPLC-MS nguyên vẹn. Phương pháp này được sử dụng để khẳng định và định lượng tương đối các heterodime và homodime được tạo thành từ dịch nổi tế bào. bbmAb1 và bbmAb2 heterodime được tạo thành chính xác có thể được quan sát thấy với độ tinh khiết trên 85% dựa vào cường độ tín hiệu khối lượng nguyên vẹn. Các tạp chất chính được quan sát thấy trong màn hình là các kháng thể không được bắt cặp với hai chuỗi nhẹ kappa, hai chuỗi nhẹ lambda và các phân tử HC lõi-dime.

Bảng 4. Tóm tắt kết quả phân tích thu được đối với bbmAb1-bbmAb11

Ứng viên	Núm/ Lỗ	L1/L2	Độ tương đồng các biến thể Ab đặc hiệu kép bằng MS		Hạng
			ID	Rel. Tương đối	
bbmAb1	mAb1/ mAb2	mAb1 (l)/ mAb2 (k)	bsAb	85%	1
			KH:L2L2	5%	
			KH:L1L1	10%	

bbmAb2	mAb2/ mAb1	mAb1 (l)/ mAb2 (k)	bsAb KH:L1L1 KH:L2L2	84% 6% 10%	1
bbmAb3	mAb3/ mAb4	mAb3 (k)/ mAb4 (k)	bsAb KH:L1L1 HH:L1L1 (đime H)	54% 35% 11%	2
bbmAb4	mAb5/ mAb2	mAb2 (k)/ mAb5 (l)	bsAb KH:L2L2 HH:L1L1 (đime H) KH:L2L2	63% 9% 11% 17%	2
bbmAb5	mAb1/ mAb6	mAb6(k)/ mAb1	bsAb HH:L2L2 (đime H)	53% 47%	2
bbmAb6	mAb7/ mAb1	mAb1(l)/ mAb7 (k)	bsAb KH:L2L2 KH:L1L1 HH:L1L1 (đime H)	51% 21% 20% 9%	3
bbmAb7	mAb8/ mAb1	mAb8 (l)/ mAb1(l)	bsAb HH:L2L2 (đime H) Ab một phần: H:L2, H:L2+Cys	80% 20%	2

bbmAb8	mAb9/ mAb1	mAb9 (k)/ mAb1 (l)	bsAb KH:L2L2 KH:L1L1 HH:L2L2 (đime H)	35% 34% 17% 14%	3
bbmAb9	mAb1 0/mAb 1	mAb10 (k) /mAb1 (l)	bsAb KH:L1L1 HH:L1L1 (đime H) KH:L2L2	58% 23% 12% 7%	3
bbmAb1 0	mAb1 1/mAb 1	mAb11 (k) /mAb1 (l)	bsAb KH:L1L1 HH:L1L1 (đime H) Kẹp HC bsAb Ab một phần: H:L1, H:L1+Cys	45% 22% 23% 10%	2
bbmAb1 1	mAb1 2/mAb 1	mAb12 (k) /mAb1 (l)	bsAb HH:L1L1 (đime H) KH:L1L1 Ab một phần: H:L1, H:L1+Cys	49% 41% 10%	2

Ký hiệu l là chuỗi lambda, k là chuỗi kappa.

mAb3 là kháng thể thuộc loại VH3, Vk1.

mAb4 là kháng thể thuộc loại VH3, Vk1.

mAb5 là phiên bản ghép của mAb1 (VH1, V11).

mAb6 là phiên bản ghép của mAb2 (VH1_46, Vk3).

mAb7 là kháng thể thuộc loại VH3, Vk1.

mAb8 là kháng thể thuộc loại VH1_2, Vk2.

mAb9 là kháng thể thuộc loại VH5, Vk6.

mAb10 là kháng thể thuộc loại VH1_46, Vk6.

mAb11 là kháng thể thuộc loại VH3, Vk3.

mAb12 là kháng thể thuộc loại VH3, Vk2.

bbmAb1 được xác định đặc điểm chi tiết hơn để đánh giá tất cả các biến thể sản phẩm được tạo thành và các tạp chất sau các bước tinh chế khác nhau bằng LC-MS sử dụng một số phương pháp điều chế mẫu, và với các kỹ thuật phân tách khác. Khối lượng của sản phẩm được tinh chế hai bước (lambda/CEC) nguyên vẹn được xác định sau khi khử glycosyl hóa bằng enzym PNGaseF và sau đó được phun vào trong cơ cấu RP-LC-MS. Phổ khối được giải chập của bbmAb1 nguyên vẹn xác nhận sự tạo thành chính xác heterodime nóm trong lỗ sau quá trình đồng biểu hiện và tinh chế chọn lọc lambda. Không có tạp chất chính nào giống các homodime hoặc các kháng thể một phần có thể được phát hiện sau quá trình tinh chế chọn lọc lambda. Độ tương đồng của bốn chuỗi kháng thể khác nhau có thể được xác nhận sau quá trình khử và khử glycosyl hóa mẫu.

Để kiểm tra sự bắt cặp nhằm chuỗi và các tạp chất nồng độ thấp khác, mẫu đã tinh chế được phân cắt bằng papain proteaza để phân tích các mảnh Fab và Fc riêng lẻ. Các khối lượng đo được của các mảnh này xác nhận lại sự tạo thành chính xác của các nhánh Fab khác nhau (Núm-lambda, Lỗ-kappa), cũng như sự tạo thành chính xác của mảnh Fc nóm trong lỗ. Mảnh Fab bắt cặp nhằm (Fab4, Núm-kappa) có thể được quan sát thấy ở mức <1%. Phương pháp thay thế để tạo ra các mảnh Fab với sự phân cắt LysC giới hạn được thử nghiệm mà cho phép điều chế mẫu nhanh hơn trong quá trình chọn lọc tập hợp và dòng.

Chiến lược phân cắt khác sử dụng enzym IdeS (Fabricator) được thử nghiệm để tạo ra các mảnh Fc và F(ab')₂. Trong thí nghiệm này, khối lượng của heterodime Fc được quan sát thấy và F(ab')₂ heterodime được tạo thành chính xác. Sự có mặt của heterodime Fc cũng là bằng chứng của sự tạo thành chính xác của cầu nối di-sulfua bổ sung trong phần Fc của bbmAb1, vì theo cách khác chỉ mảnh Fc/2 có khối lượng nhỏ hơn được sinh ra.

Lập bản đồ peptit LysC với LC-MS có thể xác nhận độ tương đồng của phân tử có sự bao phủ trình tự tổng quát của các peptit là 99%.

Các kết quả cụ thể của các mẫu được tinh chế được thể hiện trên Hình 2. Cụ thể là, biểu đồ sắc ký RP-UV của mAb đặc hiệu kép nguyên vẹn được khử glycosyl hóa được thể hiện trên Hình 2A. Các mảnh bbmAb1 được cắt phân bằng papain được thể hiện trên Hình 2C. Các mảnh bbmAb1 được phân cắt bằng IdeS được thể hiện trên Hình 2D. Các mảnh bbmAb1 được khử glycosyl hóa và được khử DTT được thể hiện trên Hình 2E. Các phổ khối được giải chấp của mAb đặc hiệu kép được khử glycosyl hóa nguyên vẹn bbmAb1 được thể hiện trên Hình 2B.

Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Sự chỉ định của các khối lượng bbmAb1 đo được bằng RP-LC-MS

bbmAb1	Độ đồng nhất	Khối lượng được quan sát (Da)	Khối lượng lý thuyết (Da)	Độ lệch khối lượng (Δ Da)
bsAB được khử glycosyl hóa nguyên vẹn	L1H1:L2H2 mAb	144104	144101	+ 4
Sự phân cắt bằng papain	Fc (H1-H2)+ bG0/bG0/0K	52570	52570	0
	Fab1 (L1H1 lambda /núm)	46952	46952	0
	Fab2 (L2H2 kappa/lỗ)	47503	47504	- 1

bbmAb1	Độ đồng nhất	Khối lượng được quan sát (Da)	Khối lượng lý thuyết (Da)	Độ lệch khối lượng (Δ Da)
	Fab4	47329	47330	+ 1
Sự phân cắt bằng IdeS	F(ab') ₂	96644	96643	+1
	Dime Fc (H1- H2) +bG0/bG0 / 0K	50383	50383	0
bsAb được khử glycosyl hóa bị khử	L1 (λ -LC)	22980	22980	0
	L2 (κ -LC) pyro-E	23358	23358	0
	H1 (núm-CH) 0K	48953	48952	1
	H2 (lỗ-CH) pE,0K	50290	50289	1

Độ tinh khiết tăng thu được sau khi áp dụng các bước khác nhau được mô tả trên đây được thể hiện trên Hình 3. Hình 3A là biểu đồ sắc ký thể hiện đặc tính biểu hiện sau khi nuôi cấy, Hình 3B là biểu đồ sắc ký sau khi bắt giữ bởi LambdaFabSelect™, Hình 3C là biểu đồ sắc ký sau khi bắt giữ bằng MabSelect™ SuRe™, và Hình 3D là biểu đồ sắc ký sau khi bắt giữ bằng LambdaFabSelect™, hoàn thiện bằng Fractogel™ EMD SO₃ và lọc siêu lọc.

bbmAb1 đặc hiệu kép (lambda/CEC) được tinh chế hai bước cuối cùng còn được phân tích bằng các phương pháp được liệt kê trong bảng 6. Tổng quan nguyên liệu thể hiện độ tinh khiết cao với hàm lượng chất kết tụ hoặc các sản phẩm phân hủy thấp như được phát hiện bằng một số phương pháp phân tách như phương pháp sắc ký loại trừ kích thước (SEC), CE-SDS và điện di vùng mao dẫn (CZE).

Bảng 6. Phân tích độ tinh khiết của bbmAb1 đã tinh chế

Phương pháp	Tham số	Giá trị
Độ tinh khiết theo SEC	Các sản phẩm kết tụ	1,3 %
	Các sản phẩm phân hủy	1,2 %
CZE	Loại axit	24,7 %
	Loại bazơ	16,6 %
Độ tinh khiết theo CE-SDS	Khử	98,2 %
	Không khử	94,6 %

Các dạng kết hợp khác của các kháng thể khác cũng được kiểm tra. Bảng 4 thể hiện tóm tắt kết quả phân tích thu được.

6. Ví dụ 2: Hoạt tính in vitro của bbmAb1

Hoạt tính gắn kết của bbmAb1 được kiểm tra trong nhiều thử nghiệm tế bào khác nhau.

(1) Nguyên liệu và phương pháp

(a) Đối với các thử nghiệm chuẩn độ cân bằng dung dịch (SET)

Nguyên liệu sau đây được sử dụng:

IL-18 người tái tổ hợp, được biotinyl hóa (BTP25828)

IL-1 β khỉ Cynomolgus tái tổ hợp (Novartis)

Kháng thể kháng IgG người, được đánh dấu SULFO-TAG (Meso Scale discovery (MSD) # R32AJ-5)

Kháng thể đặc hiệu của dê kháng Fab người, được liên hợp với MSD SULFO-TAG NHS Ester (Jackson Immuno Research # 109-005-097, MSD #R91AN-1) BSA (Sigma # A-9647)

Chất đệm đọc MSD T với chất hoạt động bề mặt (MSD #R92TC-1)

Dung dịch muối đệm photphat (PBS) 10x (Teknova #P0195) dung dịch muối đệm Tris, pH 7,5 (TBS) 10x (Teknova #T1680) Tween-20 (Fluka #93773)

Đĩa vi chuẩn độ polyprepnylen (MTP) (Greiner #781280)

Đĩa 384 giếng, chuẩn (MSD #L21XA)

(b) Đối với các thử nghiệm tế bào và thử nghiệm SET

mAb2 như được mô tả trong phần kháng thể IL-1 β .

mAb1 như được mô tả trong phần kháng thể IL-18.

bbmAb1 như được mô tả trong ví dụ 1.

IL-18 người tái tổ hợp (BTP 25829) được mua từ MBL Int. Corp. (#B001-5)

IL-1 β khi đuôi sóc tái tổ hợp (Novartis)

IL-18 khi đuôi sóc tái tổ hợp (Novartis)

IL-12 người tái tổ hợp (#573008 được mua từ dòng tế bào Biolegend KG-1 (ATCC #CCL-246)

Các nguyên bào sợi da người bình thường (#CC-2509) được mua từ Lonza

Các nguyên bào sợi biểu bì khi đuôi sóc (#42637F (510))

Các tế bào HEK-Blue™ IL-18/IL-1 β (#hkb-il18) được mua từ InvivoGen

PBMC được phân lập từ lớp phủ màu nâu vàng thu được từ Blutspendezentrum Bern

Máu khi đuôi sóc thu được từ SILABE, Niederhausbergen

IL-6 ELISA: Người (BioLegend, #430503); Khi đuôi sóc (U-CyTech biosciences, CT974-5)

IFN γ ELISA: Người (BD555142) và khi đuôi sóc (U-CyTech biosciences #CT340A)

Các thử nghiệm QUANTI-Blue™ (#rep-qbl) để phát hiện SEAP được mua từ InvivoGen

Môi trường tế bào: RPMI 1640 (Invitrogen #31870) được bổ sung 10% huyết thanh thai bò (Invitrogen #10108-157), 1% L-Glutamin (Invitrogen #25030-03), 1% penixilin/streptomycin (Invitrogen #15140-148), 10 μ M 2-Mercaptoetanol (Gibco #31350-010), 5mM Hepes (Gibco #15630-030)

Các đĩa 96 giếng được xử lý nuôi cấy mô, đáy tròn (Costar #3799)

Các đĩa 96 giếng được xử lý nuôi cấy mô, đáy dẹt (Costar #3596)

Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Life Sciences #17-1440-02) PBS 1X, không có Canxi và Magie (Gibco #14190094)

Ống Leucosep không có lớp chắn xốp, 50ml, polypropylen (Greiner bio-one #227290)
ống hình nón polypropylen Falcon 15ml (BD#352096)

Ống hình nón polypropylen Falcon 50ml (BD #352070)

(c) Đo ái lực bằng SET

Thử nghiệm gắn kết đích riêng lẻ SET

22 dung dịch pha loãng theo dãy 1,6n của các kháng nguyên (nồng độ cao nhất: huIL-18, 5nM; marIL-18, 10nM; huIL-1 β , 0,5nM; marIL-1 β , 0,5nM) được điều chế trong chất đệm mẫu (PBS chứa 0,5% albumin huyết thanh bò (BSA) và 0,02 % Tween-20) và nồng độ không đổi của kháng thể được bổ sung (cho kết quả đọc IL-18 10pM, cho kết quả đọc IL-1 β 1pM). Thể tích 60 μ l/giếng của hỗn hợp kháng nguyên-kháng thể được phân bố trong hai bản sao vào đĩa vi chuẩn độ polypropylen (MTP) 384 giếng. Chất đệm mẫu đóng vai trò là đối chứng âm và mẫu chỉ chứa kháng thể là đối chứng dương (tín hiệu phát quang điện hóa tối đa mà không có kháng nguyên, B_{max}). Đĩa này được bịt kín và được ủ qua đêm (o/n, ít nhất 16 giờ) tại nhiệt độ trong phòng (RT) trên máy lắc.

Kết quả đọc IL-18: MTP mảng MSD 384 giếng được phủ streptavidin được phủ bằng 30 μ l/giếng huIL-18 được biotinyl hóa (0,1 μ g/ml, PBS) và được ủ trong 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng trên máy lắc.

Kết quả đọc IL-1 β : MTP mảng MSD 384 giếng chuẩn được phủ bằng 30 μ l/giếng huIL-1 (3 μ g/ml, PBS) được pha loãng trong PBS làm chất bắt giữ và được ủ qua đêm tại 4°C.

Đĩa này được phong bế bằng 50 μ l/giếng chất đệm phong bế (PBS chứa 5% BSA) trong 1 giờ (h), tại nhiệt độ trong phòng (RT). Sau khi rửa (TBST, TBS chứa 0,05% Tween 20), thể tích 30 μ l/giếng hỗn hợp kháng nguyên - kháng thể cân bằng được chuyển từ polypropylen MTP sang đĩa MSD được phủ và được ủ trong 20 phút tại nhiệt độ trong phòng. Sau bước rửa bổ sung, 30 μ l kháng thể phát hiện kháng IgG được gắn đuôi sulfo (0,5 μ g/ml) được pha loãng trong chất đệm mẫu được bổ sung vào từng giếng và được ủ trong 30 phút tại nhiệt độ trong phòng trên máy lắc. Đĩa MSD này được rửa và 35 μ l/giếng chất đệm đọc MSD được bổ sung và được ủ trong 5 phút tại nhiệt độ trong phòng. Các tín hiệu phát quang điện hóa (ECL) được tạo ra và được đo bằng MSD Sector Imager 6000.

Thử nghiệm gắn kết đích đồng thời SET

Thử nghiệm SET được thực hiện như mô tả trên đây, trừ thử nghiệm A: Quy trình cân bằng (hỗn hợp kháng thể/kháng nguyên) được thực hiện trong sự có mặt của lượng dư của một đích (500pM của IL18 hoặc IL-1 β) trong khi đánh giá K_D của đích còn lại.

Thử nghiệm B: Quy trình cân bằng (hỗn hợp kháng thể/kháng nguyên) được thực hiện với cả hai đích trong các dịch pha loãng theo dãy trong một hỗn hợp một cách đồng thời (nồng độ ổn định của kháng thể là 10pM, nồng độ kháng nguyên cao nhất xem trên đây). Sau đó cùng hỗn hợp này được phân tích đối với nồng độ kháng thể tự do của nó trên các đĩa phủ IL18 và IL-1 β như được mô tả trên đây.

Dữ liệu SET được xuất ra cho Xlfit, phần mềm bổ sung tính năng MS Excel. Tín hiệu ECL trung bình được tính từ các phép đo trong hai bản sao trong mỗi thử nghiệm. Dữ liệu được điều chỉnh đường cơ sở bằng cách trừ giá trị thấp nhất khỏi tất cả các điểm dữ liệu và được lập đồ thị so với nồng độ kháng nguyên tương ứng để tạo ra đường cong chuẩn độ. Giá trị K_D được xác định bằng cách làm khớp đồ thị với các loại sau đây:

mô hình gắn kết 1:2 cho Ab đặc hiệu đơn

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left[\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right]$$

mô hình gắn kết 1:1 cho Ab đặc hiệu kép nóm trong lỗ

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]} \left([Fab] + x + K_D - \sqrt{([Fab] + x + K_D)^2 - 4x[Fab]} \right) \right)$$

trong đó

y: tín hiệu ECL đã trừ giá trị trống

$B_{\max}$: tín hiệu ECL lớn nhất tại nồng độ kháng nguyên bằng không

$[IgG]$: nồng độ kháng thể được sử dụng

$[Fab]$: tổng nồng độ Fab được sử dụng

K_D : Hằng số cân bằng phân ly

x: nồng độ kháng nguyên được sử dụng

(d) Nuôi cấy tế bào

Tế bào KG-1 được cho sinh trưởng trong RPMI 1640 bổ sung 10% huyết thanh thai bò, 1% L-Glutamin và 1% penixilin/streptomycin ở mật độ từ 2×10^5 đến 1×10^6 tế bào sống/ml.

Nguyên bào sợi người bình thường và nguyên bào sợi khỉ đuôi sóc được cho sinh trưởng trong FBM (Clenetics, CC-3131) có chứa bFGF (1 ng/ml, CC-4065), insulin (5 µg/ml, CC-4021), và 2% FCS (CC-4101). Để làm môi trường đối, môi trường nền nguyên nào sợi (LONZA # CC-3131) được sử dụng.

Tế bào HEK-Blue™ IL-18/IL-1β được cho sinh trưởng trong Môi Trường Sinh Trưởng (DMEM, 4,5 g/l glucoza, 10% (thể tích/thể tích) huyết thanh thai bò, 50 U/ml penixilin, 50 mg/ml streptomycin, 100 mg/ml Normocin™, 2mM L-glutamin bổ sung 30 µg/ml Blastidin, 200 µg/ml HygroGold™ và 100 µg/ml Zeocin™.

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (PBMC) được phân lập mới từ lớp nổi màu nâu vàng bằng cách sử dụng ống LeucoSep theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách

vấn tắt, 13ml Ficoll-Paque được tải trước trong ống LeucoSep 14ml bằng cách ly tâm trong 30 giây tại $1.000 \times g$. Các mẫu máu toàn phần được heparin hóa được pha loãng với các thể tích PBS bằng nhau, và 25ml máu đã pha loãng được bổ sung vào ống LeucoSep. Các ống phân tách tế bào này được ly tâm trong 15 phút tại $800 \times g$ mà không ngừng tại nhiệt độ trong phòng. Lớp huyền phù tế bào được thu gom, và các tế bào được rửa hai lần trong PBS (trong 10 phút lần lượt tại 640 và $470 \times g$, trong hai lần rửa liên tiếp) và được tái tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy trước khi đếm.

Máu khi đuôi sóc được thu gom trong các ống được heparin hóa và được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc tế bào 70 μ m (BD Biosciences #352350)

(e) Thử nghiệm trung hòa IL-1 β

Thử nghiệm sản xuất IL-6 được cảm ứng bởi IL-1 β trong các nguyên bào sợi được tiến hành về cơ bản như được mô tả (Gram 2000) chỉ với các cải biến nhỏ. Một cách vắn tắt, các nguyên bào sợi được cấy ở mật độ 5×10^3 tế bào trên mỗi giếng (trong 100 μ l) trong đĩa nuôi cấy mô đáy dẹt 96 giếng. Ngày hôm sau, các tế bào bị bỏ đói trong 5 giờ trong môi trường đói trước khi bổ sung hỗn hợp dung dịch IL-1 β tái tổ hợp/hợp chất (nồng độ IL-1 β được nêu trong bảng). Hỗn hợp dung dịch IL-1 β /hợp chất này được chuẩn bị trước bằng cách ủ IL-1 β tái tổ hợp với khoảng nồng độ của hợp chất trong 30 phút tại 37°C. Các dịch nổi tế bào được thu gom sau khi ủ o/n tại 37°C và lượng IL-6 được giải phóng được xác định bằng ELISA. Thử nghiệm sản xuất IL-6 được cảm ứng bằng IL-1 β trong PBMC được thực hiện theo phương pháp sau đây. PBMC được cấy tại 3×10^5 tế bào trên mỗi giếng (trong 100 μ l) trong đĩa nuôi cấy mô 96 giếng và được ủ với hỗn hợp dung dịch IL-1 β tái tổ hợp/hợp chất trong 24 giờ tại 37°C (nồng độ IL-1 β được chỉ ra trong bảng). Hỗn hợp dung dịch IL-1 β /hợp chất này được chuẩn bị trước bằng cách ủ IL-1 β tái tổ hợp với khoảng nồng độ của hợp chất trong 30 phút tại 37°C. Các dịch nổi tế bào được thu gom sau 24 giờ kích thích và lượng IL-6 được giải phóng được xác định bằng ELISA.

(f) Thử nghiệm trung hòa IL-18

Thử nghiệm này được thực hiện về cơ bản theo phương pháp sau đây. Tế bào KG-1 (bị bỏ đói trong 1 giờ trong PBS + 1% FCS được chuẩn bị trước) hoặc PBMC ở mật độ là 3×10^5 mỗi giếng được cấy vào trong các đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng đáy tròn

và được ủ với hỗn hợp dung dịch chứa IL-18/IL-12 tái tổ hợp cùng với khoảng nồng độ các hợp chất (các nồng độ IL-18/IL-12 được chỉ ra trong bảng). Sau khi ủ 24 giờ tại 37°C, các dịch nổi được thu gom và lượng IFN γ giải phóng được xác định bằng ELISA. Đối với các thử nghiệm với máu khỉ đuôi sóc, 85 μ l máu mỗi giếng được sử dụng.

(g) Sự trung hòa IL1 β /IL-18 kép ở các tế bào HEK-Blue™

Thử nghiệm này được tiến hành về cơ bản như được mô tả trong các quy trình xử lý của nhà sản xuất. Một cách vắn tắt, các tế bào HEK-Blue™ được cấy giống ở mật độ là 4 x 10⁴ mỗi giếng vào trong các đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng và được ủ với dung dịch chứa IL-1 β và IL-18 tái tổ hợp (để tạo ra tín hiệu 1:1 SEAP) cùng với khoảng nồng độ của các hợp chất. Sau khi ủ 24 giờ tại 37°C, các dịch nổi được thu gom và lượng SEAP giải phóng được xác định bằng cách sử dụng phương pháp QUANTI-Blue™ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tất cả các dữ liệu được xuất sang phần mềm EXCEL và các giá trị IC₅₀ được tính bằng cách dựng đồ thị đường cong đáp ứng liều đối với các hàm làm khớp đường cong logistic bằng cách sử dụng phần mềm EXCEL/XLfit4 hoặc GraphPad Prism.

(2) Kết quả

(a) Ái lực đối với IL1 β và IL-18 khi đuôi sóc và người tái tổ hợp

Ái lực gắn kết của bbmAb1 với các protein IL-1 β và IL-18 tái tổ hợp người và khỉ đuôi sóc được đo bằng chuẩn độ cân bằng dung dịch (SET) (Hình 5) và các giá trị K_D được tạo ra được so sánh với các giá trị K_D của mAb2 đối với IL-1 β và mAb1 để gắn kết IL-18. Hình 5 thể hiện các đường cong chuẩn độ của sự xác định ái lực dựa trên ECL trong dung dịch, nồng độ không đổi của kháng thể: đối với kết quả đọc IL-18 10pM, đối với kết quả đọc IL-1 β 1pM; các dịch pha loãng kháng nguyên: nồng độ cao nhất: huIL-18, 5nM; marIL-18, 10nM; huIL-1 β , 0,5nM; marIL-1 β , 0,5nM. Các đường nét liền thể hiện sự khớp của dữ liệu bằng cách sử dụng mô hình được mô tả trên đây. Các đường chấm chấm chỉ ra khoảng tin cậy 95 %, n=3.

So sánh các ái lực gắn kết trong thử nghiệm gắn kết đích riêng lẻ, bbmAb1 thể hiện K_D trung bình tương tự so với mAb1 đối với IL-18 người và khỉ đuôi sóc (Bảng 7). Để gắn kết IL-1 β người, giá trị K_D trung bình hơi cao hơn đối với bbmAb1 (2,6pM)

so với mAb2 (0,6pM) nhưng vẫn nằm trong cùng khoảng pM thấp. Các phép đo tiếp theo trong thử nghiệm gắn kết đích kép đồng thời (Bảng 8) khẳng định rằng các giá trị K_D gắn kết bbmAb1 đối với IL-1 β là tương tự các giá trị của mAb2 với nguyên liệu loại tiền lâm sàng cũng như với nguyên liệu loại lâm sàng. Do đó, bbmAb1 có ái lực gắn kết đối với cả hai đích ở người và khỉ đuôi sóc mà tương ứng tương tự với mAb2 và mAb1.

Bảng 7. Ái lực đối với IL-1 β và IL-18 người (hu) và khỉ đuôi sóc (mar) tái tổ hợp được đo bằng SET (sự xác định gắn kết đích riêng lẻ)

Mẫu	Xác định ái lực IL-18/IL-1 β độc lập			
	huIL-18 [pM]	marIL-18 [pM]	huIL-1 β [pM]	marIL-1 β [pM]
mAb1	9 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3	n/a	n/a
mAb2	n/a	n/a	0,6 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,7
bbmAb1	12 $\pm$ 4	33 $\pm$ 7	2,6 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 2,4

Ngoài các kết quả gắn kết đích riêng lẻ, các ái lực gắn kết đích kép đồng thời của bbmAb1 cũng được khảo sát (Bảng 8) bằng các sử dụng lượng dư của một đích trong quá trình đánh giá sự gắn kết các giá trị K_D của đích còn lại (Thử nghiệm A) hoặc bằng cách sử dụng hỗn hợp của cả hai đích trong các dịch pha loãng theo dãy (Thử nghiệm B). Sự xác định ái lực IL-1 β /IL-18 đồng thời thể hiện không có sự khác biệt đáng kể giữa thử nghiệm A (lượng dư của một đích) và thử nghiệm B (hỗn hợp của cả hai đích trong các dịch pha loãng theo dãy) mà chúng tỏ rằng cả hai đích đã gắn kết đồng thời mà không ảnh hưởng đến sự gắn kết của đích còn lại. Hơn nữa, các giá trị K_D thu được với các thử nghiệm gắn kết kép đồng thời này là tương tự với các giá trị K_D thu được với thử nghiệm chuẩn (Bảng 7; trong sự vắng mặt của kháng nguyên thứ hai) mà chúng tỏ rằng bbmAb1 có thể gắn kết cả hai kháng nguyên một cách độc lập. Do đó, bbmAb1 gắn kết đồng thời và độc lập cả IL-1 β và IL-18 người và phản ứng chéo đầy đủ với các protein khỉ đuôi sóc tương ứng.

Bảng 8. Ái lực đối với IL-1 β và IL-18 người (hu) và khỉ đuôi sóc (mar) tái tổ hợp được đo bằng SET (sự xác định gắn kết đích đồng thời)

	Xác định ái lực IL-18/IL-1 β đồng thời							
	huIL-18 K _D [pM]		marIL-18 K _D [pM]		huIL-1 β K _D [pM]		marIL-1 β K _D [pM]	
Mẫu	Thử nghệ m A	Thử nghệ m B	Thử nghệ m A	Thử nghệ m B	Thử nghệ m A	Thử nghệ m B	Thử nghệ m A	Thử nghệ m B
mAb1	13,5	11,4	27,1	26,3	n/a	Không gắn kết	n/a	Không gắn kết
mAb2	n/a	Không gắn kết	n/a	Không gắn kết	1,1	3,2	0,8	4,8
bbmAb 1	14,8	19,5	47,9	44,2	3	0,5	2	0,6

(b) Hoạt tính làm trung hòa của bbmAb1 trong các thử nghiệm tế bào người và khỉ đuôi sóc

Hoạt tính làm trung hòa của bbmAb1 đối với cả hai xytokin (IL1 β và IL-18) được đánh giá mAb2 mAb1). Ngoài ra, hiệu lực của bbmAb1 đối với sự trung hòa IL-1 β và IL-18 khỉ đuôi sóc sử dụng các hệ thống thử nghiệm tế bào khỉ đuôi sóc cũng được đánh giá (xem phần d).

(c) Sự trung hòa IL-1 β và IL-18 riêng lẻ và đồng thời ở tế bào người

Hoạt tính làm trung hòa của bbmAb1 trên IL-1 β được đánh giá bằng sự ức chế sản xuất IL-6 được cảm ứng bởi IL-1 β tái tổ hợp ở các nguyên bào sợi da người (IL-1 β

được sử dụng tại 6pM) và ở PBMC người (IL-1 β được sử dụng tại 60pM). Hoạt tính trung hòa của bbmAb1 trên IL-18 được đo bằng sự ức chế sản xuất IFN- γ được cảm ứng bởi IL-18 tái tổ hợp trong các tế bào KG-1 và PBMC người (cả hai tế bào này đều được hoạt hóa bằng 3nM IL-18 người tái tổ hợp cùng với 1ng/ml IL-12 người tái tổ hợp). Hiệu lực ức chế của bbmAb1 trên IL-1 β và IL-18 luôn được so sánh với hiệu lực của mAb2 hoặc mAb1, tương ứng. Tùy thuộc vào các thử nghiệm, các giá trị IC₅₀ trung bình của bbmAb1 là trong các khoảng dưới nM hoặc nM một chữ số và cao hơn lên đến từ 2 đến 4 lần trong sự so sánh trực tiếp với mAb2 (cho IL-1 β) và mAb1 (cho IL-18), tương ứng (Bảng 9 và Bảng 10). Các định dạng hóa trị một của bbmAb1 khi được so sánh với định dạng hóa trị hai của mAb2/mAb1 cũng như tiềm năng mà các đột biến KiH có thể là nguyên nhân cho sự chênh lệch nhỏ này của hiệu lực của bbmAb1.

Bảng 9. Giá trị IC₅₀ trung bình đối với sự trung hòa IL-1 β bởi bbmAb1 so với mAb2 ở các nguyên bào sợi da người và PBMC người. *Sự ức chế quá trình sản xuất IL-6 ở nguyên bào sợi da người hoặc PBMC được kích thích bằng IL-1 β người tái tổ hợp (6pM cho các nguyên bào sợi da và 60pM cho PBMC). Giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=3 PBMC và n=6 nguyên bào sợi da người) được trình bày.

Sự ức chế IL-1 β	IL-6 prod.* nguyên bào sợi da IC ₅₀ [nM]	IL-6 prod.* PBMC IC ₅₀ [nM]
mAb2	0,031 $\pm$ 0,006	0,29 $\pm$ 0,67
bbmAb1	0,136 $\pm$ 0,045	1,35 $\pm$ 0,59

Bảng 10. Giá trị IC₅₀ trung bình đối với sự trung hòa IL-18 bởi bbmAb1 so với mAb1 ở các tế bào KG-1 và PBMC người. **Sự ức chế sản xuất IFN γ ở các tế bào KG-1 hoặc PBMC được kích thích bằng IL-18 người tái tổ hợp (3nM) và IL-12 người (1ng/ml). Giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=3 KG-1 và n=4 PBMC) được trình bày.

Sự ức chế IL-18	IFN γ prod.** Tế bào KG- 1 IC ₅₀ [nM]	IFN γ prod.** PBMC IC ₅₀ [nM]
-----------------	---	--

	IC ₅₀ [nM]	
mAb1	0,035±0,011	0,78±0,49
bbmAb1	0,071±0,046	0,87±0,51

bbmAb1 có khả năng trung hòa đồng thời hoạt tính sinh học của cả IL-1 β và IL-18 như được chứng minh bằng các tế bào báo cáo HEK Blue™ sản xuất SEAP trong sự đáp ứng với sự kích thích 1+1 bằng IL-1 β và IL-18 tái tổ hợp (Bảng 11). Sự ức chế tương tự của SEAP trong hệ thống thử nghiệm này chỉ đạt được bằng dạng kết hợp mAb2 và mAb1 nhưng không thể đạt được bằng cách sử dụng các kháng thể riêng lẻ.

Bảng 11. Giá trị IC₅₀ trung bình đối với sự trung hòa đồng thời IL-1 β và IL-18 trên hoạt tính báo cáo SEAP ở tế bào HEK Blue™. Giá trị trung bình $\pm$ SEM của n=5 thí nghiệm được trình bày.

Sự ức chế SEAP trong các tế bào báo cáo HEK được kích thích đồng thời bằng IL-1 β và IL-18	IC ₅₀ [nM]
một mình mAb2 hoặc mAb1	>30
mAb2 và mAb1 kết hợp	0,24±0,09
bbmAb1	0,71±0,28

- (d) Hoạt tính làm trung hòa của bbmAb1 trên IL-1 β khi đuôi sóc và IL-18 khi đuôi sóc ở các thử nghiệm tế bào khi đuôi sóc

Để chứng tỏ hoạt tính ức chế của bbmAb1 ở khi đuôi sóc, các thử nghiệm in vitro tương tự được thực hiện với tế bào khi đuôi sóc như với các tế bào người tuy nhiên sử dụng IL-1 β và IL-18 khi đuôi sóc tái tổ hợp để kích thích. Khi đánh giá sự ức chế sản xuất IL-6 được cảm ứng bằng IL-1 β khi đuôi sóc tái tổ hợp ở các nguyên bào sợi da khi đuôi sóc, bbmAb1 thể hiện hiệu lực dưới nM với các giá trị IC₅₀ cao hơn từ 2 đến 3 lần

so với mAb2 (Bảng 12). Thử nghiệm bbmAb1 với nguyên bào sợi da người được kích thích bằng IL-1 β khi đuôi sóc tạo ra biên dạng ức chế tương tự như với IL-6 người.

Bảng 12. Sự ức chế sản xuất IL-6 được cảm ứng bằng IL-1 β khi đuôi sóc tái tổ hợp ở các nguyên bào sợi khi đuôi sóc và người bằng bbmAb1. * Sự ức chế sản xuất IL-6 ở các nguyên bào sợi da khi đuôi sóc và người được kích thích bằng IL-1 β khi đuôi sóc tái tổ hợp (18pM). Kết quả của 3 thí nghiệm riêng lẻ (A, B và C) được trình bày.

IL-1 β khi đuôi sóc	IL-6 prod.* nguyên bào sợi da khi đuôi sóc IC ₅₀ [nM]		IL-6 prod.* nguyên bào sợi da người IC ₅₀ [nM]
	Thí nghiệm A	Thí nghiệm B	Thí nghiệm C
bbmAb1	0,174	0,364	0,220
mAb2	0,095	0,138	0,114

Các giá trị IC₅₀nM từ một đến hai chữ số của bbmAb1 xác nhận hoạt tính làm trung hòa của bbmAb1 đối với IL-18 khi đuôi sóc được kiểm tra trong thử nghiệm sản xuất IFN γ bằng tế bào máu khi đuôi sóc (Bảng 3 -7). Thử nghiệm bbmAb1 với PBMC người được kích thích bằng IL-18 khi đuôi sóc tạo ra biên dạng ức chế tương tự khi đo sự sản xuất IFN γ người.

Do đó, bbmAb1 đã được chứng tỏ rằng có phản ứng chéo đầy đủ với IL-1 β khi đuôi sóc và IL-18 khi đuôi sóc trong các thử nghiệm chức năng sử dụng các tế bào đáp ứng khi đuôi sóc.

Bảng 13. Giá trị IC₅₀ trung bình đối với sự ức chế sản xuất IFN γ được cảm ứng bằng IL-18 khi đuôi sóc tái tổ hợp ở máu toàn phần khi đuôi sóc hoặc PBMC người. ** Sự ức chế sản xuất IFN γ ở máu toàn phần khi đuôi sóc (n=3 mỗi hợp chất/điều kiện) hoặc

PBMC người (n=6) được kích thích bằng IL-18 khi đuôi sóc tái tổ hợp (nồng độ được chỉ ra) & IL-12 người (10ng/ml). Giá trị trung bình $\pm$ SEM được trình bày.

IL-18 khi đuôi sóc	IFN γ prod.** Máu khi đuôi sóc IC ₅₀ [nM]	IFN γ prod.** PBMC người IC ₅₀ [nM]	Nồng độ IL-18 khi đuôi sóc được sử dụng
bbmAb1	10,0 $\pm$ 4,1		1nM
mAb1	4,7 $\pm$ 2,6		0,3nM
mAb1	181 $\pm$ 108		3nM
mAb1		6,6 $\pm$ 5,0	1nM

Đã chứng tỏ rằng bbmAb1, mAb đặc hiệu kép IL-1 β /IL-18 định dạng KiH vẫn giữ được sự gắn kết ái lực cao cũng như hiệu lực làm trung hòa xytokin đối với hai đích riêng lẻ IL-1 β và IL-18 khi so sánh với các mAb ban đầu, mAb2 và mAb1, trong nhiều thử nghiệm tế bào khác nhau. Các tính chất làm trung hòa IL-1 β và IL-18 kép của bbmAb1 không chỉ được chứng minh đối với các xytokin/tế bào người mà còn cả các xytokin/tế bào khi đuôi sóc tương ứng, thúc đẩy các nghiên cứu độc học thích hợp. Các giá trị IC₅₀ cao hơn lên đến từ 2 đến 4 lần mà đã được tạo ra trong một số thử nghiệm tế bào đối với sự trung hòa IL-1 β và IL-18 có thể là kết quả của sự gắn kết hóa trị một của bbmAb1 so với gắn kết hóa trị hai lần lượt của mAb2 và mAb1. Tuy nhiên, sự trung hòa xytokin kép bởi bbmAb1 có thể dẫn đến các hoạt tính ức chế cộng gộp hoặc hiệp đồng *in vivo* mà có thể không được thể hiện tương xứng ở các hệ thống tế bào *in vitro* của chúng tôi.

7. Ví dụ 3: Tác dụng kích thích và phong bế IL-1 β và IL-18 kết hợp ở PBMC

Sự phân cắt phụ thuộc vào sự hoạt hóa inflammasom của các xytokin tác động IL-1 β và IL-18 dẫn đến sự cảm ứng của các chất trung gian tiền viêm thứ cấp và thúc đẩy sự huy động/hoạt hóa tế bào miễn dịch không chỉ toàn thân mà còn cả tại vị trí viêm. Trong hai mô hình chuột khác nhau đối với chứng viêm hệ thống gây chết (a) mô hình

tiêm LPS và (b) chuột nhắt FCAS (hoạt hóa các đột biến sai nghĩa ở NLRP3), sự vắng mặt/ức chế đồng thời cả IL-1 β và IL-18 đã bảo vệ hơn khỏi sự gây chết so với sự vắng mặt/sự ức chế IL-1 β đơn lẻ hoặc IL-18 đơn lẻ, chứng tỏ các cơ chế cộng gộp hoặc hiệp đồng đối với sự hoạt hóa miễn dịch (Brydges 2013, van den Berghe 2014). bbmAb1 là mAb đặc hiệu kép phản ứng IL-1 β /IL-18 người/khỉ đuôi sóc mà không có khả năng phản ứng chéo loài gặm nhấm và do đó không thể được thử nghiệm ở mô hình chuột nhắt. Do đó, các tác giả sáng chế đã sử dụng LPS/IL-12 cho sự hoạt hóa con đường phụ thuộc vào inflammasom bất chước *in vitro* để kích thích PBMC người để bộc lộ các tác dụng ức chế cộng gộp hoặc hiệp đồng của sự trung hòa IL-1 β /IL-18 kết hợp bởi bbmAb1 và thực hiện phân tích biểu hiện gen không lệch bằng cách sử dụng kỹ thuật vi mảng. Là hoạt tính bổ sung, các tác giả sáng chế cũng so sánh biên dạng biểu hiện gen của PBMC từ những người cho khác nhau với dạng kết hợp của IL-1 β tái tổ hợp và IL-18 tái tổ hợp hoặc một mình các xytokin riêng lẻ.

(1) Nguyên liệu và phương pháp

(a) Nuôi cấy tế bào và ELISA

RPMI 1640 (Invitrogen # 61870 31870) hoặc Gibco #61870-010) được bổ sung 10% Huyết Thanh Thai Bò (Invitrogen #10108-157), 1% L-Glutamin (Invitrogen #25030-03), 1% penixilin/ streptomycin (Invitrogen #15140-148), 10 μ M 2-Mercaptoetanol (Gibco #31350-010), 5mM Hepes (Gibco #15630-080)

IL-1 β người tái tổ hợp được mua từ Sino Biological Inc. (#10139-HNAE-5)

IL-18 người tái tổ hợp được mua từ MBL (#B001-5)

IL-12 người tái tổ hợp được mua từ Biolegend (#573008)

IFN γ ELISA: Thiết bị tiêu chuẩn MAX, BioLegend, #430103 hoặc Thiết bị ELISA BD OptEIA IFN γ người, BD #555142

IL-6 ELISA: Thiết bị tiêu chuẩn MAX, BioLegend, #430503

IL-26 ELISA: Cloud Clone Corp #SEB695Hu

mAb2 như được mô tả trong phần kháng thể IL-1 β .

mAb1 như được mô tả trong phần kháng thể IL-18.

bbmAb1 như được mô tả trong ví dụ 1.

LPS từ bệnh viêm ruột typ huyết thanh *Salmonella enterica*, Sigma #L7770

PBMC được phân lập từ lớp phủ màu nâu vàng thu được từ Blutspendezentrum Bern

Các đĩa 96 giếng được xử lý nuôi cấy mô, đáy tròn (Costar #3799) (Costar #3799) Các đĩa 96 giếng được xử lý nuôi cấy mô, đáy dẹt (Costar #3799) (Costar #3595) Ficoll-Paque™Plus (GE Healthcare Life Sciences #17-1440-02) PBS 1X, mà không có Canxi và Magie (Gibco #14190094)

Các ống hình nón polypropylen Falcon 15ml (BD#352096) các ống hình nón polypropylen Falcon 50ml (BD #352070)

Các ống Leucosep™ với lớp chắn xốp, 50ml, Greiner bio-one #227290

Bộ lọc tế bào 70µM, BD Biosciences #352350

Trypanblue, Sigma # T8154

Các kỹ thuật phân lập, định lượng và định tính ARN và qPCR:

Nước không chứa nucleaza, Ambion #AM9938

ARNaza Zap, Ambion #AM9780

Ống Eppendorf 1,5ml, vô khuẩn, không chứa ARNaza & ADNaza

Chất đệm RLT, Qiagen #1015762

Bộ Kit Rneasy Mini, Qiagen #74104

Thiết bị ADNaza không chứa ARNaza, Qiagen #79254

Bộ Kit Agilent RNA 6000 Nano, Agilent #5067-1511

Điểm mồi chip, Agilent #5065- 4401

Máy trộn xoay IKA

RNaseZAP®, Ambion #9780

Máy phân tích sinh học Agilent 2100

Bộ kit phiên mã ngược cADN dung tích cao, Applied Biosystems, # PN4374966

Các ống PCR 0,2ml không chứa Naza, thành mỏng, nắp mờ, Ambion #AM12225

Đĩa phản ứng 384 giếng MicroAmp Optical, Applied Biosystems #4309849

Hỗn hợp pha sẵn TaqMan GenEx, Applied Biosystems #4369514

Đoạn mồi PCR (Applied Biosystems)

Đích	Taqman ID thử nghiệm	màu/chất dừng
IFN γ	Hs00989291_m1	FAM-MGB
IL-26	Hs00218189_m1	FAM-MGB
RPL27	Hs03044961_g1	FAM-MGB
HPRT1	Hs02800695_m1	FAM-MGB

Điều chế PBMC: PBMC được phân lập từ lớp phủ màu nâu vàng bằng phương pháp ly tâm gradien Ficoll -Paque trong các ống Leucosep theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách vắn tắt, 15ml Histopaque được cho vào trong các ống LeucosepTM 50ml và được ly tâm trong 30 giây tại 1300 vòng/phút tại nhiệt độ trong phòng. 30ml huyền phù được pha loãng của lớp phủ màu nâu vàng được bổ sung bằng pipet lên phía trên của dung dịch Histopaque và được ly tâm trong 15 phút tại nhiệt độ trong phòng tại 1000g mà không ngừng. Huyết thanh được loại bỏ (khoảng 20ml) và vòng phân cách được thu gom (=PBMC người) và được chuyển vào ống falcon 50ml. Ống này được nạp đầy bằng 50ml PBS vô trùng và được ly tâm một lần tại 1200 vòng/phút trong 5 phút tại nhiệt độ trong phòng. Quá trình ly tâm này được lặp lại 2 lần. Dịch nổi được loại bỏ nhẹ nhàng và tế bào tái huyền phù trong 50ml PBS với 2% FCS và 2mM EDTA. Huyền phù tế bào được lọc bằng các sử dụng bộ lọc tế bào 70 μ m và các tế bào được đếm bằng các sử dụng thuốc nhuộm xanh dương trypan (500 μ l màu xanh dương trypan + 200 μ l tế bào + 300 μ l PBS).

Sự kích thích LPS/IL-12 của PBMC: Sự sản xuất xytokin trong dịch nổi được chuẩn bị như sau. 250.000 tế bào/giếng trong thể tích cuối 100 μ l được phân bố trong các đĩa đáy trên 96 giếng. LPS được sử dụng tại các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,3 μ g/ml đến 3000 μ g/ml cùng với IL-12 tái tổ hợp tại 10ng/ml. Các dịch nổi được thu hoạch sau 24 giờ tại 37°C và CO₂ 10%.

Chiết ARN từ sinh khối tế bào được thực hiện như sau. 3×10^6 tế bào/giếng trong thể tích cuối 1000 μ l được phân bố trong các đĩa 24 giếng đáy dẹt. LPS được sử dụng tại 3 μ g/ml cùng với IL-12 tái tổ hợp tại 10ng/ml. Tế bào được thu hoạch sau 24 giờ tại 37°C và CO₂ 10%.

Sự kích thích PBMC bằng các xytokin tái tổ hợp: 7×10^6 PBMC mỗi giếng của đĩa 12 giếng được sử dụng trong thể tích cuối 1,5ml của môi trường RPMI hoàn chỉnh. Các xytokin tái tổ hợp được bổ sung tại các nồng độ cuối sau đây: 10ng/ml IL-1 β tái tổ hợp, 3nM IL-18 tái tổ hợp, 1ng/ml IL-12 tái tổ hợp. Cả dịch nổi cũng như tế bào được thu gom sau 4 giờ và 24 giờ tại 37°C và CO₂ 10%.

Các kỹ thuật phân lập, định lượng và đánh giá chất lượng ARN: Các tế bào được tạo viên và viên này được phân giải trong 350 μ l chất đệm Qiagen RTL có 2% β -mercaptoethanol và được kết đông tại -20°C hoặc -80°C tới khi tất cả các mẫu nghiên cứu đã được thu gom. Sự phân lập ARN được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình chuẩn Qiagen. Một cách vắn tắt, 350 μ l của etanol 70% được bổ sung trong tất cả các mẫu trước khi chuyển sang cột quay RNeasy và được ly tâm trong 15 giây tại 8000g. Sau khi loại bỏ dòng chảy qua, 350 μ l chất đệm RW1 được bổ sung và cột này được ly tâm trong 15 giây tại 8000g để rửa màng cột quay. Dung dịch hỗn hợp của ADNaza I được điều chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được bổ sung vào cột quay RNeasy và được ủ trong 15 phút tại nhiệt độ trong phòng. Sau các lần rửa bằng 350 μ l và 500 μ l chất đệm RW1, cột quay RNeasy được đặt trong ống thu gom 2ml mới và được ly tâm ở tốc độ tối đa trong 1 phút. ARN cuối cùng được thu gom bằng cách bổ sung 35 μ l nước không chứa ARNaza trực tiếp vào màng cột quay và ly tâm trong 1 phút tại 8000g để rửa giải ARN. Lượng ARN được đo bằng cách sử dụng Nanodrop ND-1000 và ARN được bảo quản tại -20°C. Việc đo RIN được thực hiện để đánh giá chất lượng ARN theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách vắn tắt 1 μ l ARN hoặc thang chuẩn được hút bằng pipet vào trong chip Agilent RNA 6000 Nano và được đo bằng cách sử dụng máy Agilent 2100 Bioanalyser.

Phân tích sự biểu hiện gen xytokin bằng qPCR:

Phương pháp này được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách vắn tắt, 400ng ARN được phiên mã ngược theo hướng dẫn bằng cách sử dụng bộ Kit Phiên Mã Ngược cADN Dung Lượng Cao. Dung dịch cADN được pha loãng 1/10 trong nước

không chứa ARN/ADN và 1µl cADN được chuyển vào đĩa phản ứng 384 giếng và sau đó được trộn với 1µl của 20X gen FAM đích thử nghiệm biểu hiện gen TaqMan® và 10µl của 2x hỗn hợp pha sẵn biểu hiện gen TaqMan® và 10µl nước không chứa ARN/ADN. Các đĩa này được tải lên trên hệ thống PCR thời gian thực Applied Biosystems ViiA™ 7 và các cài đặt thiết bị sau đây được sử dụng:

Các thông số tư liệu đĩa/thí nghiệm	Các điều kiện chu kỳ nhiệt		
	Giai đoạn	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (mm:ss)
Rxn. Thử nghiệm: 20µl	Giữ	50	2:00
	Giữ	95	0:20
Tốc độ dốc: Nhanh	Chu kỳ (40 chu kỳ)	95	0:01
		60	0:20

Các gen giữ nhà được sử dụng cho nghiên cứu này là HPRT1 và RLP27. Công thức sau đây được sử dụng để tính mức độ biểu hiện tương đối của các gen đích:

- 1) $Ct [\text{Tham chiếu}] = (Ct [\text{HPRT1}] + Ct [\text{RLP27}]) / 2$
- 2) $dCt [\text{Tham chiếu}] = 40 - Ct [\text{Tham chiếu}]$
- 3) $dCt [\text{Đích}] = Ct [\text{Đích}] - Ct [\text{Tham chiếu}]$
- 4) $ddCt = dCt [\text{Tham chiếu}] - dCt [\text{Đích}]$
- 5) $\text{Sự biểu hiện gen đích tương đối} = 2^{ddCt}$

Kỹ thuật vi mảng được thực hiện như sau. Các mẫu được xử lý bằng CiToxLAB France trên các vi mảng Affymetrix HG_U133_Plus2. Chúng được chuẩn hóa RMA và được phân tích trong GeneSpring 11.5.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Phân tích con đường được thực hiện bằng các sử dụng Ingenuity Pathway Analysis (IPA) và Nextbio (Illumina). Hai bộ dữ liệu được xử lý độc lập.

Bắt đầu là, dữ liệu được cho qua kiểm soát chất lượng chuẩn (QC) bởi CiToxLAB, QC nội bộ bằng cách sử dụng phần mềm R script (MA_AffyQC.R) trong

bộ Rstudio' và trong GeneSpring (PCA, các đối chứng lai hóa). Tiếp theo, nó được lọc để loại bỏ các mức độ biểu hiện không đáng tin cậy: Các thực thể (các đầu dò) được giữ tại ít nhất 100 phần trăm của các mẫu trong 1 trong số các điều kiện thí nghiệm bất kỳ có giá trị cao hơn bách phân vị thứ 20.

Các gen được biểu hiện khác biệt (DEG) được xác định bằng cách sử dụng đặc tính "bộ lọc trên đồ thị hình núi lửa" trong GeneSpring. Sử dụng các gen được lọc (biểu hiện trong các bách phân vị từ thứ 20,0 đến 100,0) với kiểm định T không bắt cặp, các bộ đầu dò có giá trị p được hiệu chỉnh dưới 0,05 và số lần thay đổi trên 2,0 được coi là được biểu hiện khác biệt. Nếu có thể, tức là trong nghiên cứu với LPS (NUID-0000-0202-4150) phương pháp hiệu chỉnh nhiều thử nghiệm Benjamini-Hochberg được sử dụng.

Đối với các thí nghiệm kích thích xytokin, tác dụng hiệp đồng được tính bằng cách sử dụng công thức sau đây: Tín hiệu A+B / (Tín hiệu A + Tín hiệu B – Đối chứng) $\geq 1,5$.

Các dấu hiệu tương ứng (hoặc các danh mục DEG) được sử dụng để tính các giá trị p với kiểm định chính xác Fisher mà có ý nghĩa thống kê của quan sát xếp chồng giữa dấu hiệu này và 'danh mục gen bệnh' (thương tổn so với không thương tổn) của bộ dữ liệu công khai. Để thực hiện điều này, các danh mục đã được tải lên Illumina Base Space Correlation Engine (trước đây là Nextbio) và được so sánh bằng cách sử dụng tính năng Meta-Analysis và tra cứu từ khóa cho các bệnh.

Tất cả các dữ liệu được xuất sang phần mềm EXCEL và các giá trị IC₅₀ được tính bằng cách dựng đồ thị đường cong đáp ứng liều lượng đối với các hàm làm khớp đường cong logistic bằng cách sử dụng phần mềm EXCEL/XLfit4 hoặc GraphPad Prism. Sự chênh lệch giữa các nhóm điều trị được phân tích bằng ANOVA một chiều sau đó là phương pháp đa so sánh Dunnett bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism và kết quả được coi là có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$.

(2) Kết quả

- (a) bbmAb1 có hiệu quả cao trong việc ức chế sản xuất IFN γ được cảm ứng bởi LPS/IL-12 ở máu toàn phần

Cho máu toàn phần người tiếp xúc với LPS được bổ sung 10ng/ml IL-12 tạo ra sự đáp ứng IFN γ mà phần lớn nhưng không hoàn toàn phụ thuộc vào IL-18 "tự nhiên" được sản xuất bởi các tế bào máu này. Việc bổ sung IL-12 giúp tăng cường các đáp ứng IFN γ do LPS gây ra, có khả năng là bằng cách điều chỉnh tăng các thụ thể IL-18 trên các tế bào đáp ứng.

Trong các điều kiện thí nghiệm được sử dụng, sự trung hòa IL-18 với mAb1 chỉ dẫn đến sự ức chế không hoàn toàn sự sản xuất IFN γ trong khi sự phong bế IL-1 β (sử dụng mAb2) chỉ có tác dụng nhỏ đối với sự đáp ứng IFN γ . Điều thú vị là, sự ức chế kết hợp IL-1 β và IL-18 bởi bbmAb1 hoặc dạng kết hợp của mAb2 và mAb1 ức chế mạnh mẽ hơn và hoàn toàn sự sản xuất IFN γ so với sự trung hòa xytokin đơn lẻ (Hình 6). Hình 6 thể hiện sự ức chế IFN γ do LPS (0,3 μ g/ml) / IL-12 gây ra trong máu toàn phần bởi bbmAb1, mAb2, mAb1 hoặc mAb2 & mAb1 kết hợp (Combo) (đường cong ức chế điển hình được thể hiện trên Hình 6A). Phần trăm ức chế IFN γ của n = 4 người cho riêng lẻ ở máu toàn phần bởi bbmAb1, mAb1 và mAb2 được sử dụng tại 100nM (giá trị trung bình và SEM được thể hiện trên Hình 6B).

Ngoài IFN γ , không có xytokin nào khác được thử nghiệm (IL-2,-4,-6,-8,-10,-13 và TNF α) bị ức chế cộng gộp bởi sự trung hòa kết hợp của IL-1 β và IL-18 trong thử nghiệm tế bào (dữ liệu không được thể hiện). Hiệu lực của bbmAb1 ở trong cùng khoảng giá trị như dạng kết hợp (combo) của mAb2 và mAb1, xem xét đến định dạng hóa trị một của phân tử đặc hiệu kép này.

- (b) IFN γ bị ức chế cộng gộp bởi bbmAb1 (tức là sự ức chế IL-1 β /IL-18 kết hợp) so với sự ức chế IL-1 β hoặc IL-18 đơn lẻ ở PBMC người được hoạt hóa bằng LPS/IL-12

Sự đánh giá phiên mã không lệch được yêu cầu để bộc lộ thêm các tác dụng cộng gộp (ngoài IFN γ) bởi sự ức chế IL-1 β /IL-18 kết hợp bằng cách sử dụng bbmAb1. Vì máu toàn phần không tối ưu cho phân tích phiên mã, các tác giả sáng chế đã làm thích ứng các điều kiện thử nghiệm kích thích LPS/IL-12, được mô tả trong phần nguyên liệu và phương pháp trên đây, cho các mẫu PBMC người. Bằng cách sử dụng các PBMC từ tổng cộng 9 người cho, tác giả sáng chế xác nhận rằng bbmAb1 đã ức chế cộng gộp sự tiết protein IFN γ vào dịch nổi của PBMC (Hình 7). So sánh với các thí nghiệm máu toàn phần, sự sản xuất IFN γ bị ức chế ở khoảng nồng độ thấp hơn 10 lần của các mAb tương

ứng được sử dụng. Quan trọng là, mô hình ức chế tương tự được chứng minh ở cấp độ mRNA cho IFN γ (Hình 7) mà xác nhận độ phù hợp của các mẫu này cho phân tích biểu hiện gen dựa vào kỹ thuật vi mảng không lệch. Hình 7 thể hiện tác dụng ức chế sản xuất protein IFN γ được cảm ứng bởi LPS (0,3 μ g/ml) /IL-12 (Hình 7A) và sự biểu hiện gen IFN γ được cảm ứng bởi LPS (0,3 μ g/ml) /IL-12 (Hình 7B) bởi bbmAb1, mAb2 và mAb1 (tại nồng độ 10nM mỗi loại) ở PBMC người. Được thể hiện là phần trăm ức chế ở n=9 người cho $\pm$ SEM. ***p < 0,05 (ANOVA một chiều)

Phân tích vi mảng Affymetrix được thực hiện với n=5 người cho riêng rẽ từ các PBMC mà được lấy mẫu từ các thí nghiệm kích thích LPS/IL-12 được mô tả ở phần nguyên liệu và phương pháp trên đây. Không may là, sự đánh giá tổng quát biên dạng biểu hiện gen chứng tỏ hiệu quả ức chế LPS/IL-12 mạnh và PCA thể hiện sự kết cụm cho mỗi người cho hơn là hợp chất bên trong các nhóm được kích thích hoặc không được kích thích. Tuy nhiên, so sánh với các mẫu được kích thích bằng LPS/IL-12 với được kích thích cộng bbmAb1 đối với các gen được biểu hiện khác nhau thể hiện danh sách ngắn gọn của các gen mà được điều hòa giảm bởi sự phong bế IL-1 β /IL-18 kết hợp bằng bbmAb1 (Bảng 14). Ngoài sự điều hòa giảm mạnh gen IFN γ mà tái xác nhận dữ liệu liệu phân tích vi mảng của chúng tôi, còn cả gen IL-26 cũng là gen xytokin khác bị ức chế cộng gộp bởi bbmAb1 so với sự ức chế IL-1 β đơn lẻ (bởi mAb2) hoặc sự ức chế IL-18 (bởi mAb1) (xem Hình 8). Hình 8 và Hình 9 thể hiện dữ liệu phân tích vi mảng thu được từ các mức độ biểu hiện gen đối với IFN γ và IL-26 và sự ức chế bởi bbmAb1, mAb2 và mAb1 (10nM mỗi loại) ở PBMC được kích thích bằng LPS (0,3 μ g/ml) / IL-12 tại 24 giờ. Các giá trị của các người cho riêng lẻ được trình bày trên Hình 8A (IFN γ) và Hình 8B (IL-26) và phần trăm ức chế (giá trị trung bình $\pm$ SEM) từ n=5 người cho được trình bày trên Hình 9A (IFN γ) và Hình 9B (IL-26).

Bảng 14. Các gen được biểu hiện khác nhau (các gen được điều hòa giảm chỉ giữa nhóm bbmAb1 và nhóm đối chứng trong các mẫu được kích thích bởi LPS/IL-12). FC= số lần thay đổi.

ID Bộ mẫu dò	Ký hiệu gen	Gen Entrez	Giá trị p	FC
222974_at	IL22	50616	0,03188	6,6

221111_at	IL26	55801	0,00224	5,2
223939_at	SUCNR1	56670	0,00234	4,0
1560791_at	OTTHUMG0000010886		0,03660	3,7
211122_s_at	CXCL11	6373	0,02954	3,5
203915_at	CXCL9	4283	0,02211	3,4
235229_at			0,02400	3,3
210163_at	CXCL11	6373	0,02707	3,2
210354_at	IFNG	3458	0,00007	2,9
243541_at	IL31RA	133396	0,01200	2,5
236003_x_at	OR2I1P		0,04942	2,4
203131_at	PDGFRA	5156	0,00161	2,4
219991_at	SLC2A9	56606	0,00191	2,4
201860_s_at	PLAT	5327	0,00139	2,3
205692_s_at	CD38	952	0,04855	2,3
1555600_s_at	APOL4	80832	0,02610	2,3
215305_at	PDGFRA	5156	0,01180	2,2
236191_at			0,04037	2,1
204533_at	CXCL10	3627	0,04847	2,1
229915_at	FAM26F	441168	0,02912	2,0
210072_at	CCL19	6363	0,02827	2,0
236101_at			0,03246	2,0

(c) IL-26 là xytokin tiền viêm khác bị ức chế cộng gộp bởi bbmAb1 ở PBMC được kích thích bởi LPS/IL-12

Để xác nhận thêm rằng sự biểu hiện gen IL-26 và sự sản xuất protein IL-26 do LPS/IL-12 gây ra bị ức chế hiệu quả nhất bởi sự phong bế IL-1 β /IL-18 kết hợp bằng

cách sử dụng bbmAb1, nghiên cứu này đã được mở rộng cho tổng cộng $n=9$ người cho PBMC và khảo sát sự biểu hiện gen IL-26 bằng qPCR và sự sản xuất protein IL-26 bằng ELISA. Như được thể hiện trên Hình 10, đã khẳng định thêm tác dụng ức chế sự biểu hiện gen IL-26 thu được bằng phương pháp phân tích vi mảng (Hình 10A). Thú vị là, hàm lượng protein IL-26 trong dịch nổi chỉ bị giảm một phần tại 24 giờ bởi sự bổ sung mAb (Hình 10B). Lý do cho sự khác biệt này là chưa rõ, tuy nhiên có thể có liên quan đến sự khác nhau về mặt động lực giữa sự biểu hiện gen IL-26 và sự sản xuất IL-26 cũng như những khác biệt ở sự tiêu thụ IL-26 so với IFN γ . Tuy nhiên, bbmAb1 vượt trội trong việc làm giảm hàm lượng protein IL-26 trong dịch nổi PBMC so với mAb2 và mAb1. Hình 10 thể hiện tác dụng ức chế sự biểu hiện gen IL-26 được cảm ứng bởi LPS (0,3 μ g/ml) /IL-12 (bằng qPCR) (Hình 10A) và hàm lượng protein IL-26 (Hình 10B) bởi bbmAb1, mAb2 và mAb1 (10nM mỗi loại) ở PBMC người. Phần trăm ức chế của $n=9$ người cho PBMC riêng lẻ (giá trị trung bình và SEM). *** $p < 0,05$ (ANOVA một chiều).

(d) Các dấu hiệu truyền tín hiệu IL1 β /IL18 tương quan với bệnh

Điều kiện nuôi cấy PBMC được thiết lập từ trước trong đó sự kích thích IL-1 β tái tổ hợp dẫn đến sự sản xuất IL-6 hoặc sự kích thích IL-18/IL-12 tái tổ hợp dẫn đến sự sản xuất IFN γ được kết hợp để thể hiện các gen hoặc các dấu hiệu đích xuôi dòng cộng gộp hoặc hiệp đồng (dữ liệu không được thể hiện). Với PBMC từ $n = 4$ người cho được lấy mẫu ở hai thời điểm khác nhau (6 giờ và 24 giờ), sự đánh giá vi mảng Affymetrix để đánh giá không lệch biên dạng biểu hiện gen đã được tiến hành. Các gen mà được điều hòa tăng hiệp đồng tại 6 giờ và tại 24 giờ với sự kích thích kết hợp bởi IL-1 β và IL-18 được bộc lộ (dữ liệu không được thể hiện). Việc bổ sung IL-12 vào tổ hợp IL-1 β /IL-18 làm tăng mạnh tính hiệp đồng cho một loạt các gen được điều hòa tăng. Các dấu hiệu truyền tín hiệu được tạo ra của sự kích thích con đường đơn lẻ hoặc con đường kết hợp IL -1 β /IL-18 (chỉ các gen điều hòa tăng) được sử dụng để truy vấn dữ liệu từ các bệnh nhân trong một số bệnh tự miễn. Ví dụ, mối tương quan với các bộ dữ liệu bệnh sarcoit công khai được thể hiện như ví dụ trên Hình 11. Giá trị P (được tính với kiểm định chính xác Fisher) cho thấy mối tương quan đáng kể với một số nghiên cứu công khai so sánh các mô khỏe mạnh với các mô bệnh từ bệnh nhân bị bệnh sarcoit. Các

mô bao gồm da cũng như là phổi, tuyến lệ và hốc mắt trước. Qua tất cả các bộ dữ liệu, sự kết hợp của sự truyền tín hiệu IL-1 β /IL-18 thể hiện mối tương quan tốt nhất với bệnh, tiếp theo là IL-1 β và IL-18. Các gen được điều hòa tăng khác biệt (DEG) bởi IL-1 β /IL-18 trong PBMC (trục x) so với 5 DEG 'bị bệnh so với khỏe mạnh' mô bệnh sarcoit khác nhau. Giá trị P (trục y) thể hiện ý nghĩa thống kê của quan sát xếp chồng giữa dấu hiệu và 'danh sách gen bệnh'. Cột màu đen là da từ tổn thương bệnh sarcoit da so với da từ người khỏe mạnh. Cột màu xám nhạt là da từ tổn thương bệnh sarcoit da so với da không bị tổn thương. Cột màu trắng là tuyến lệ từ bệnh nhân bị bệnh sarcoit so với người bình thường. Cột màu xám đậm là mô hốc mắt từ bệnh nhân bị bệnh sarcoit và người bình thường. Cột sọc là các mẫu phổi với bệnh sarcoit phổi, xơ hóa tiến triển so với bệnh sarcoit phổi tự giới hạn dạng hạch.

(e) Kết luận

LPS và IL-12 tái tổ hợp đã được sử dụng để mô phỏng sự hoạt hóa NLRP3 inflammasom phụ thuộc vào mô hình phân tử liên quan đến tác nhân gây bệnh (PAMP) trong vòng 24 giờ đầu tiên của quy trình nuôi cấy in vitro. Đã chứng minh được rằng sự ức chế kết hợp IL-1 β và IL-18, bằng cách sử dụng bbmAb1, tác động cộng gộp để làm giảm/ức chế sự sản xuất IFN γ trong PBMC được kích thích bằng LPS/IL-12. IL-12 được mô tả trước đây là tác động hiệp đồng với IL-18 để cảm ứng sự sản xuất IFN γ trong các tế bào T, B, NK, đại thực bào và tế bào phân nhánh (như được xem xét bởi Nakanishi, 2001) nhưng hiện nay tác dụng kích thích bổ sung của IL-1 β đối với sự sản xuất IFN γ có thể được chứng minh trong các điều kiện thí nghiệm được sử dụng. Do đó, việc đồng nuôi cấy PBMC với LPS/IL-12 gây ra một cách hiệu quả sự sản xuất IL-1 β và IL-18 "tự nhiên" mà đóng góp vào sự đáp ứng IFN γ mạnh. Bằng cách sử dụng các hệ phiên mã vi mảng không lệch, các gen bổ sung được xác định là được điều hòa giảm cộng gộp bởi sự trung hòa IL-1 β /IL-18 kết hợp so với sự phong bế IL-1 β hoặc IL-18 đơn lẻ. Trong số đó có IL-26, thành viên của phân họ xytokin IL-20 (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, và IL-26), mà được bảo tồn ở hầu hết các loài động vật có xương sống nhưng không có mặt ở hầu hết các chủng thuộc loài gặm nhấm (bao gồm chuột nhắt và chuột cống) (Donnelly 2010). Nó truyền tín hiệu thông qua phức hợp thụ thể heterodimeric gồm có các chuỗi IL-20R1 và IL-10R2. Các thụ thể IL-26 được biểu hiện sơ cấp trên các loại tế bào không phải tế bào tạo máu, cụ thể là tế bào biểu mô. Hàm lượng IL-26 tăng được

báo cáo ở huyết thanh và cụ thể là ở hoạt dịch của bệnh nhân RA (Corvaisier 2012) trong đó nó có thể đóng vai trò là yếu tố tác động để thúc đẩy sự sinh trưởng và biệt hóa tế bào Th17. Không may là, sự phát hiện các gen/các con đường khác được cảm ứng bởi sự phong bế kết hợp IL-1 β và IL-18 bị cản trở bởi tác dụng kích thích LPS/IL-12 mạnh của các mẫu PBMC. Tuy nhiên, cả IFN γ và IL-26 và đến một mức nào đó còn cả IL-22 cũng nằm trong số các gen được điều hòa tăng một cách hiệp đồng bởi sự kích thích kết hợp bằng IL-1 β và IL-18 tái tổ hợp trong PBMC, xác nhận rằng hai yếu tố này là các tác nhân xuôi dòng trong con đường hoạt hóa này. Do đó, họ phụ IL-20 của các xytokin (bao gồm IL-26 và IL-22) dường như phụ thuộc mạnh vào các tín hiệu đồng thời từ IL-1 β và IL-18. Với tất cả sự thận trọng về tính chọn lọc của các dấu hiệu truyền tín hiệu riêng lẻ cũng như hiệu quả phong bế tiềm năng, những so sánh này rất hữu ích để chỉ ra rằng các con đường tương ứng đang hoạt động ở các bệnh như bệnh sarcoid.

8. Ví dụ 4: Sử dụng trị liệu

Việc hướng đích kết hợp của IL-1 β và IL-18 có thể là chiến lược điều trị hiệu quả hơn so với sự phong bế xytokin đơn lẻ trong tình trạng viêm do inflammasom gây ra, trong đó cả hai thành phần miễn dịch bẩm sinh và thu được đều được bao gồm. Sự trung hòa đồng thời của IL-1 β và IL-18 hướng đích cả hai thành phần miễn dịch bẩm sinh và tập nhiễm, bao gồm bạch cầu trung tính, tế bào Th1/Tc1 và NK, phân tử bám dính trên tế bào miễn dịch và tế bào nội mô và xytokin tiền viêm (ví dụ IL-6, IFN γ và IL-17). Ưu điểm của việc phong bế cả IL-1 β và IL-18 được củng cố bởi dữ liệu thu được trong mô hình chuột nhất tiền lâm sàng của hội chứng tự miễn nhiễm lạnh gia đình (Familial Cold Autoimmune Syndrome - FCAS) mà được gây ra bởi sự hoạt hóa inflammasom Nlrp3 cấu trúc và sự sản xuất quá mức IL-1 β và IL-18 (Brydges 2013). Ở đó, sự cứu chữa một phần khỏi tình trạng FCAS đã đạt được ở chuột nhất khi sự truyền tín hiệu IL-1 β hoặc IL-18 bị hủy bỏ về mặt di truyền chứng tỏ sự tham gia của cả hai xytokin trong sự phát sinh bệnh. Quan trọng là, chuột nhất FCAS thiếu cả sự truyền tín hiệu IL-18 và IL-1 β thậm chí còn phát triển ít bệnh hơn so với chuột nhất chỉ có một trong hai xytokin bị bất hoạt chứng minh tác dụng cộng gộp của sự trung hòa IL-1 β /IL-18 kép. Tác dụng cộng gộp của sự trung hòa IL-1 β và IL-18 cũng được chứng minh trong một mô hình chuột nhất khác, trong đó các liều cao của LPS được tiêm vào chuột nhất để gây sốc nhiễm trùng (van den Berghe 2014). Trong mô hình này, sự thiếu hụt di truyền đối với cả IL-

IL-1 β và IL-18 hoặc sự trung hòa kết hợp của cả hai xytokin bằng cách trung hòa các kháng thể đã ngăn chặn hoàn toàn LPS gây chết trong khi sự thiếu hụt/sự trung hòa xytokin đơn lẻ chỉ bảo vệ được một phần.

Chiến lược lâm sàng tổng quát cho kháng thể đặc hiệu kép, mà hướng đích đồng thời cả IL-1 β và IL-18, có thể là cách điều trị hiệu quả hơn so với các lựa chọn hiện có. Để xác định các bệnh ứng viên, nghiên cứu tiền lâm sàng và tịnh tiến đã được sử dụng để chứng minh sự tham gia tích cực của cả hai con đường xuôi dòng IL-1 β và IL-18 trong sinh lý bệnh tiềm ẩn của các bệnh ứng viên. Có bằng chứng mới cho thấy bệnh sarcoit phổi mạn tính là bệnh gây ra bởi inflammasom với sự tham gia của cả miễn dịch bẩm sinh và tập nhiễm. Hơn nữa, những phát hiện ban đầu cho thấy vai trò quan trọng đối với cả hai xytokin tác động IL-1 β và IL-18 ở bệnh này. Do đó, bệnh sarcoit là cơ hội lý tưởng để chứng minh tính đặc hiệu kép của bbmAb1 ở bệnh có chứng viêm mô mỡ mạn tính, đã thành lập. Hiệu quả của bbmAb1 ở bệnh sarcoit có thể dẫn đến sự phát triển ở các bệnh phổi kẽ khác như bệnh phổi quá mẫn (nghề nghiệp) do silic đioxit hoặc berili. Các bệnh ứng viên khác là chứng viêm u hạt liên quan đến các mô cơ quan khác, như bệnh Crohn.

Chứng viêm mạch với sự tổn thương mô và rối loạn chức năng nội mô cũng là đích tiềm năng của bbmAb1. Các tế bào nội mô rối loạn chức năng có thể đáp ứng với sự điều trị chống viêm, dẫn đến dòng mạch được cải thiện ngay cả khi có các khiếm khuyết trong mạch được cố định. Bằng chứng tài liệu gần đây đã xác định bệnh hồng cầu hình liềm (SCD) có thành phần được gây ra bởi inflammasom mạnh thông qua tỷ lệ cao của sự tan máu trong mạch cấu trúc. Sự hoạt hóa inflammasom do sự giải phóng của các tín hiệu nguy hiểm (axit uric, hem/Fe³⁺, các thành phần nội bào khác) từ sự dung giải RBC mạn tính kích hoạt các thụ thể inflammasom, sự hoạt hóa chúng và dẫn đến đợt viêm trong mạch, tạo ra sự điều hòa tăng các phân tử bám dính tế bào nội mô, hoạt hóa bạch cầu trung tính và tiểu cầu, dẫn đến sự hoạt hóa mạn tính các tế bào nội mô. Tình trạng viêm mạch máu không ngừng này ở bệnh nhân SCD dẫn đến sự tái phát, các cơn đau đốn do tắc tĩnh mạch và tổn thương mô cấp và mạn tính. Bằng chứng nội bộ sơ bộ đưa ra bằng chứng đối với sự tham gia của IL-18 cũng như IL-1 β trong quá trình bệnh tiềm tàng của SCD. Do đó, việc làm giảm chứng viêm cơ bản ở bệnh nhân SCD bằng cách điều trị bằng bbmAb1 có thể làm giảm chứng viêm nền mạn tính và ngăn

ngừa các cơn cấp tính với tổn thương nội tạng liên quan, ngăn ngừa các cơn tế bào hồng cầu hình liềm cấp tính và sự tổn thương nội tạng liên quan, cùng với việc cải thiện chất lượng cuộc sống chung của bệnh nhân bằng cách làm giảm cơn đau và mệt mỏi mạn tính. Sự chứng minh hiệu quả điều trị của bbmAb1 ở những bệnh nhân SCD có thể dẫn đến sự phát triển các thể mạn tính hoặc cấp tính khác ở các tình trạng viêm mạn tính liên quan đến tốc độ tan máu cao, như bệnh sốt rét và sự phụ thuộc thẩm tách máu, bệnh thận mạn tính. Các chỉ định khác mà có thể có lợi từ cả sự điều biến IL-1 β và IL-18 là các chỉ định liên quan đến tổn thương mô do thiếu máu cục bộ, như bệnh tim mạch hoặc sự liền vết thương được cải thiện của tất cả các loại, nhưng đặc biệt là tổn thương mô mềm nghiêm trọng nhất do bỏng.

Do đó, theo một phương án của sáng chế, phương pháp điều trị rối loạn liên quan đến inflammasom bao gồm bước sử dụng cho đối tượng, bị rối loạn liên quan đến inflammasom, lượng hữu hiệu của bbmAb được bộc lộ ở đây, như bbmAb1. Các rối loạn liên quan đến inflammasom tiềm tàng là hội chứng tự viêm liên quan đến cryopyrin (CAPS), sốt Địa Trung Hải gia đình (FMF), viêm khớp tự phát toàn thân tuổi thanh niên (SJIA), viêm thận lupus, bệnh lý thận do đái tháo đường, tổn thương thận cấp, tăng huyết áp thận, bệnh thận IgA, viêm tiểu cầu thận (GN), sa sút trí tuệ tiền đình thái dương (FTD), bệnh Alzheimer (AD), bệnh động kinh, đột quỵ, bệnh Parkinson (PD), trầm cảm, viêm sarcoit, như bệnh sarcoit phổi, viêm tụy, bệnh xơ hóa phổi tự phát (IPF), bệnh viêm gan nhiễm mỡ không phải do rượu (NASH), bệnh xơ vữa động mạch, bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ, bệnh viêm mạch liên quan đến kháng thể tế bào chất kháng bạch cầu trung tính (ANCA), sự thoái hóa cơ liên quan đến tuổi tác (AMD), bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép, bệnh tiểu đường typ 2, bệnh mụn trứng cá, bệnh hồng cầu hình liềm, bệnh lý mạch máu, tổn thương tái tưới máu-thiếu máu cục bộ, bệnh tim mạch, bệnh động mạch ngoại biên (PAD), bệnh xơ vữa động mạch, bệnh rối loạn mạch, bệnh thiếu máu cục bộ cơ xương, bệnh xơ hóa, bệnh sốt rét, bệnh thận mạn tính, phụ thuộc thẩm tách máu hoặc bệnh Crohn.

Theo một phương án, phương pháp điều trị bệnh hồng cầu hình liềm, bệnh lý mạch máu, tổn thương tái tưới máu-thiếu máu cục bộ, bệnh tim mạch, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh rối loạn mạch, bệnh thiếu máu cục bộ cơ xương, bệnh sarcoit phổi, bệnh xơ hóa, bệnh sốt rét, bệnh thận mạn tính, phụ thuộc thẩm

tách máu hoặc bệnh Crohn ở đối tượng được đề xuất, bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu của bbmAb được bộc lộ ở đây, như bbmAb1, cho đối tượng này.

9. Ví dụ 5: Dược phẩm

Sáng chế đề xuất ở đây được phẩm bao gồm kháng thể bbmAb, như bbmAb1, được bào chế cùng với chất mang dược dụng. Dược phẩm này có thể chứa thêm một hoặc nhiều chất trị liệu khác mà thích hợp để điều trị tình trạng bệnh. Chất mang dược dụng tăng cường hoặc làm ổn định dược phẩm, hoặc có thể được sử dụng để tạo thuận lợi cho quy trình bào chế chế phẩm này. Chất mang dược dụng bao gồm dung môi, môi trường phân tán, lớp phủ, các chất kháng khuẩn và kháng nấm, các chất làm trì hoãn đẳng trương và hấp thụ, và chất tương tự mà tương thích về mặt sinh lý.

Dược phẩm được mô tả ở đây có thể được dùng bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Con đường và/ hoặc chế độ sử dụng thay đổi phụ thuộc vào kết quả mong muốn. Được ưu tiên là sử dụng nội nhãn, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, hoặc dưới da, hoặc được sử dụng gần với vị trí đích. Chất mang dược dụng nên thích hợp để sử dụng nội nhãn, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, trong tủy sống hoặc biểu bì (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền). Tùy thuộc vào đường sử dụng, hoạt chất, tức là bbmAb, có thể được phủ trong vật liệu để bảo vệ hợp chất này khỏi sự tác động của axit và các điều kiện tự nhiên khác mà có thể làm bất hoạt hợp chất này.

Dược phẩm này nên là vô trùng và ở dạng lỏng. Độ lưu động thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp phủ như lecithin, bằng cách giữ kích thước hạt yêu cầu trong trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol hoặc sorbitol, và natri clorua trong chế phẩm này. Sự hấp thụ thời gian lâu của dược phẩm tiêm được có thể được tạo ra bằng cách bao gồm trong dược phẩm này chất làm trì hoãn sự hấp thụ, ví dụ, nhôm monostearat hoặc gelatin.

Dược phẩm được mô tả ở đây có thể được bào chế theo các phương pháp đã biết và được thực hiện theo cách thông thường trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; và Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker,

Inc., New York, 1978. Dược phẩm tốt hơn là được sản xuất trong điều kiện GMP. Thông thường, liều có hiệu quả để điều trị bệnh hoặc liều có hiệu quả của bbmAb được sử dụng trong dược phẩm được mô tả ở đây. bbmAb được bào chế thành các dạng liều lượng được dùng bằng phương pháp thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Chế độ liều lượng được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng trị liệu). Ví dụ, viên thuốc to đơn lẻ có thể được dùng, một vài liều lượng chia nhỏ có thể được dùng theo thời gian hoặc liều lượng có thể được làm giảm hoặc được làm tăng tương xứng như được chỉ thị bởi tình trạng khẩn cấp của tình huống trị liệu. Đặc biệt có lợi là bào chế dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng đơn vị liều để dễ sử dụng và cho độ đồng đều của liều dùng. Dạng đơn vị liều lượng như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp làm liều lượng đơn nguyên cho đối tượng cần điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính để tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn khi kết hợp với chất mang được cần thiết.

Mức liều thực tế của các hoạt chất trong dược phẩm được mô tả ở đây có thể được thay đổi để thu được lượng hoạt chất mà có hiệu quả để đạt được sự đáp ứng điều trị mong muốn cho bệnh nhân cụ thể, dược phẩm, và chế độ sử dụng cụ thể, mà không gây độc cho bệnh nhân. Mức liều lượng được lựa chọn phụ thuộc vào nhiều yếu tố được động học bao gồm hoạt tính của dược phẩm cụ thể được mô tả ở đây được sử dụng, hoặc este, muối hoặc amit của nó, đường dùng, thời gian dùng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể đang được sử dụng, thời gian điều trị, các loại thuốc khác, các hợp chất và/ hoặc nguyên liệu được sử dụng kết hợp với các dược phẩm cụ thể được sử dụng, độ tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe chung và tiền sử bệnh trước đó của bệnh nhân đang được điều trị, và các yếu tố tương tự.

Bác sĩ hoặc bác sĩ thú y có thể bắt đầu liều kháng thể được mô tả ở đây được sử dụng trong dược phẩm ở mức thấp hơn mức cần thiết để đạt được hiệu quả điều trị mong muốn và tăng dần liều lượng cho đến khi đạt được hiệu quả mong muốn. Nhìn chung, liều có hiệu quả của dược phẩm được mô tả ở đây, để điều trị rối loạn có hại được mô tả ở đây khác nhau tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm phương thức dùng, vị trí đích, tình trạng sinh lý của bệnh nhân, bệnh nhân là con người hay động vật, các loại thuốc khác được sử dụng, và điều trị là điều trị dự phòng hay trị liệu. Các liều lượng

điều trị cần được chuẩn độ để tối ưu hóa độ an toàn và hiệu quả. Để sử dụng toàn thân bằng kháng thể, liều lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,0001 đến 100 mg/kg, và ưu tiên hơn là từ 0,01 đến 15 mg/kg, của khối lượng cơ thể vật chủ. Để sử dụng nội nhãn bằng kháng thể, liều lượng có thể nằm trong khoảng từ 0,1 mg/mắt đến 5 mg/mắt. Phác đồ điều trị làm ví dụ cho việc sử dụng toàn thân là hai tuần một lần hoặc một tháng một lần hoặc từ 3 đến 6 tháng một lần. Phác đồ điều trị làm ví dụ cho việc sử dụng toàn thân là hai tuần một lần hoặc một tháng một lần hoặc từ 3 đến 6 tháng một lần, hoặc khi cần (PRN).

Các chất trị liệu sinh học, như bbmAb1, luôn được sử dụng nhiều lần. Khoảng cách giữa các liều đơn lẻ có thể là hàng tuần, hàng tháng hoặc hàng năm. Khoảng cách cũng có thể không đều như được chỉ định bằng cách đo hàm lượng trong máu của bbmAb1 ở bệnh nhân. Ngoài ra, khoảng thời gian dùng thuốc thay thế có thể được xác định bởi bác sĩ và được sử dụng hàng tháng hoặc khi cần để có hiệu quả. Trong một số phương pháp về sử dụng toàn thân, liều lượng được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể trong huyết tương là 1–1000 $\mu\text{g/ml}$ và trong một số phương pháp là 25–500 $\mu\text{g/ml}$. Ngoài ra, kháng thể có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm giải phóng chậm, trong trường hợp đó việc sử dụng được yêu cầu ít thường xuyên hơn. Liều dùng và tần suất thay đổi tùy thuộc vào thời gian bán thải của kháng thể ở bệnh nhân. Nói chung, các kháng thể người thể hiện thời gian bán thải lâu hơn là thời gian bán thải của các kháng thể khảm và các kháng thể không phải của người. Liều dùng và tần suất sử dụng có thể thay đổi phụ thuộc vào phương pháp điều trị là phòng ngừa hay chữa trị. Trong sử dụng phòng ngừa, liều dùng tương đối thấp được sử dụng ở khoảng thời gian tương đối ít thường xuyên trong khoảng thời gian dài. Một số bệnh nhân tiếp tục tiếp nhận điều trị trong suốt cuộc đời họ. Trong sử dụng chữa trị, liều dùng tương đối cao tại khoảng thời gian tương đối ngắn đôi khi được yêu cầu tới khi sự tiến triển bệnh được giảm hoặc kết thúc, và tốt hơn là tới khi bệnh nhân thể hiện sự cải thiện một phần hoặc hoàn toàn các triệu chứng bệnh. Sau đó, bệnh nhân có thể được sử dụng phác đồ phòng bệnh.

Bảng trình tự

Các trình tự axit amin và nucleotit hữu dụng để thực hiện sáng chế được bộc lộ trong bảng sau:

Bảng 15. Các trình tự theo các phương án của sáng chế

SEQ ID Số	Vùng Ab	Trình tự
mAb1		
SEQ ID NO: 1 (Kabat)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	NIIPMTGQTYYAQKFQG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 4 (Chothia)	HCDR1	GGTFKSY
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR2	IPMTGQ
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFKSYAISWVRQAPGQGLE WMGNIIPMTGQTYYAQKFQGRV TITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARAAAYHPLVFDNWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 8	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCG GCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGG CAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGC AAGGCCAGCGGCGGCACCTTCA AGAGCTACGCCATCAGCTGGGT GAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGC CTGGAGTGGATGGGCAACATCA TCCCCATGACCGGCCAGACCTA CTACGCCCAGAAGTTCCAGGGC AGGGTGACCATCACCGCCGACG AGAGCACCAGCACCGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGC GAGGACACCGCCGTGTACTACT

		GCGCCAGGGCCGCCTACCACCC CCTGGTGTTCGACAACTGGGCC AGGGCACCTGGTGACCGTGAG CAGC
SEQ ID NO: 9	Chuỗi Nặng	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFKSYAISWVRQAPGQGLE WMGNIIPMTGQTYYAQKFQGRV TITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARAAAYHPLVFDNWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSQSVMHREALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 10	ADN chuỗi nặng	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCG GCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGG CAGCAGCGTGAAGGTG AGCTGCAAGGCCAGCGGCGGCA CCTTCAAGAGCTACGCCATCAG CTGGGTGAGGCAGGCC

		CCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGA TGGGCAACATCATCCCCATGAC CGGCCAGACCTACTAC GCCCAGAAGTTCCAGGGCAGGG TGACCATCACCGCCGACGAGAG CACCAGCACCGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGA GCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGCGCCAGGGCCGCC TACCACCCCCTGGTGTTCGACA ACTGGGGCCAGGGCACCTGGT GACCGTGAGCAGCGCC AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAA GAGCACCAGCGGCGGC ACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGG TGAAGGACTACTTCCCCGAGCC CGTGACCGTGAGCTGG AACAGCGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACAGCCTGAGCAGCGTGG TGACCGTGCCCAGCAGCAGCCT GGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGGGTGGAGCCCAAG
--	--	--

		AGCTGCGACAAGACCCACACCT GCCCCCCTGCCCCGCCCCGA GGCCGCCGGCGGCCCC AGCGTGTTCTGTTCCCCCCTAA GCCCAAGGACACCCTGATGATC AGCAGGACCCCCGAG GTGACCTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAGGACCCCGAGGT GAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGAGCGTGC TGACCGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTGAGCAACA AGGCCCTGCCCCGCCCCATCGA GAAGACCATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGGGAG CCCCAGGTGTACACCCTGCCCC CCAGCAGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGAGCCTGA CCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCC AGCCCGAGAACAACCTACAAGAC CACCCCCCCCCGTGCTG
--	--	---

		GACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACAGCAAGCTGACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCG GCAAG
SEQ ID NO: 11 (Kabat)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 14 (Chothia)	LCDR1	SSSNIGNHY
SEQ ID NO: 15 (Chothia)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 16 (Chothia)	LCDR3	WDYSGFST
SEQ ID NO: 17	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSG SSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKL LIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQSEDEADYYCQSWDY SGFSTVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 18	ADN VL	GATATCGTCCTGACTCAGCCCC CTAGCGTCAGCGGCGCTCCCGG TCAGAGAGTGACTATTAGCTGT AGCGGCTCTAGCTCTAATATCG GTAATCACTACGTGAACTGGTA TCAGCAGCTGCCCCGGCACCGCC

		CCTAAGCTGCTGATCTATAGAA ACAATCACCGGCCTAGCGGCGT GCCCCGATAGGTTTAGCGGATCT AAGTCAGGCACTAGCGCTAGTC TGGCTATCACCGGACTGCAGTC AGAGGACGAGGCCGACTACTAC TGTCAGTCCTGGGACTATAGCG GCTTTAGCACCGTGTTTCGGCGG AGGCACTAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 19	Chuỗi Nhẹ	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSG SSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKL LIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQSEDEADYYCQSWDY SGFSTVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGA VTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
SEQ ID NO: 20	ADN Chuỗi Nhẹ	GATATCGTCCTGACTCAGCCCC CTAGCGTCAGCGGCGCTCCCGG TCAGAGAGTGACTATTAGCTGT AGCGGCTCTAGCTCTAATATCG GTAATCACTACGTGAACTGGTA TCAGCAGCTGCCCCGGCACCGCC CCTAAGCTGCTGATCTATAGAA ACAATCACCGGCCTAGCGGCGT GCCCCGATAGGTTTAGCGGATCT AAGTCAGGCACTAGCGCTAGTC TGGCTATCACCGGACTGCAGTC AGAGGACGAGGCCGACTACTAC

		TGTCAGTCCTGGGACTATAGCG GCTTTAGCACCGTGTTCGGCGG AGGCACTAAGCTGACCGTGCTG GGTCAGCCTAAGGCTGCCCCCA GCGTGACCCTGTTCCCCCCCAG CAGCGAGGAGCTGCAGGCCAAC AAGGCCACCCTGGTGTGCCTGA TCAGCGACTTCTACCCAGGCGC CGTGACCGTGGCCTGGAAGGCC GACAGCAGCCCCGTGAAGGCCG GCGTGGAGACCACCACCCCCAG CAAGCAGAGCAACAACAAGTAC GCCGCCAGCAGCTACCTGAGCC TGACCCCCGAGCAGTGGAAGAG CCACAGGTCCTACAGCTGCCAG GTGACCCACGAGGGCAGCACCG TGGAAAAGACCGTGGCCCCAAC CGAGTGCAGC
mAb2		
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	HCDR1	VYGMN
SEQ ID NO: 22 (Kabat)	HCDR2	IIWYDGDNQYYADSVKG
SEQ ID NO: 23 (Kabat)	HCDR3	DLRTGPFDY
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	HCDR1	GFTFSVY
SEQ ID NO: 25 (Chothia)	HCDR2	WYDGDN
SEQ ID NO: 26 (Chothia)	HCDR3	DLRTGPFDY

SEQ ID NO: 27	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGFTFSVYGMNWVRQAPGKGL EWVAIIWYDGDNQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNGLRAED TAVYYCARDLRTGPFDYWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 28	ADN VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCG GCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGG CAGGAGCCTGAGGCTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCGTGTACGGCATGAACTGGGT GAGGCAGGCCCCCGGCAAGGG CCTGGAGTGGGTGGCCATCATC TGGTACGACGGCGACAACCAGT ACTACGCCGACAGCGTGAAGGG CAGGTTCAACATCAGCAGGGAC AACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACGGCCTGAGGGC CGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCAGGGACCTG AGGACCGGCCCCTTCGACTACT GGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC CGTGAGCAGC
SEQ ID NO: 29	Chuỗi nặng	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGFTFSVYGMNWVRQAPGKGL EWVAIIWYDGDNQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNGLRAED TAVYYCARDLRTGPFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

		NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 30	ADN chuỗi nặng	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCG GCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGG CAGGAGCCTGAGGCTG AGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCA CCTTCAGCGTGTACGGCATGAA CTGGGTGAGGCAGGCC CCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGG TGGCCATCATCTGGTACGACGG CGACAACCAGTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGGCAGGT TCACCATCAGCAGGGACAACAG CAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAACGGCCTGAGGG CCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGCGCCAGGGACCTG

		AGGACCGGCCCCCTTCGACTACT GGGGCCAGGGCACCCTGGTGAC CGTGAGCAGCGCCAGC ACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCC CCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACC GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGAGCTGGAAC AGCGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCCGCCGTGCT GCAGAGCAGCGGCCTG TACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGA GGGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAGACCCACACCTGCC CCCCCTGCCCCGCCCCCGAGCT GCTGGGCGGCCCCAGC GTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCC CAAGGACACCCTGATGATCAGC AGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAGGACCCCGAGGTGAA GTTCAACTGGTACGTG
--	--	---

		GACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGGGAGG AGCAGTACAACAGCACC TACAGGGTGGTGAGCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCT GAACGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTGAGCAACAAG GCCCTGCCCCGCCCCATCGAGA AGACCATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCAG CAGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGAGCCTGACCT GCCTGGTGAAGGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAG CCCGAGAACAACACTACAAGACCA CCCCCCCCGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCA AG
SEQ ID NO: 31 (Kabat)	LCDR1	RASQSIGSSLH
SEQ ID NO: 32 (Kabat)	LCDR2	YASQSFS

SEQ ID NO: 33 (Kabat)	LCDR3	HQSSSLPFT
SEQ ID NO: 34 (Chothia)	LCDR1	SQSIGSS
SEQ ID NO: 35 (Chothia)	LCDR2	YAS
SEQ ID NO: 36 (Chothia)	LCDR3	SSSLPF
SEQ ID NO: 37	VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCR ASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLI KYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPF TFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 38	ADN VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCAC CCGACTTTCAGTCAGTGACCCCT AAAGAAAAAGTGACTATCACCT GTAGGGCCTCCCAGTCTATCGG CTCTAGCCTGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGATCAGTCACCTA AGCTGCTGATTAAGTACGCCTC TCAGTCCTTTAGCGGCGTGCCCT CTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTC AGGCACCGACTTCACCCTGACT ATCAATAGCCTGGAAGCCGAGG ACGCCGCTGCCTACTACTGTCAT CAGTCAAGTAGCCTGCCCTTCA CCTTCGGCCCTGGCACTAAAGT GGATATTAAG
SEQ ID NO: 39	Chuỗi nhẹ	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCR ASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLI

		KYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPF TFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKH KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 40	ADN Chuỗi Nhe	GAGATCGTGCTGACCCAGTCAC CCGACTTTCAGTCAGTGACCCCT AAAGAAAAAGTGACTATCACCT GTAGGGCCTCCCAGTCTATCGG CTCTAGCCTGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGATCAGTCACCTA AGCTGCTGATTAAGTACGCCTC TCAGTCCTTTAGCGGCGTGCCCT CTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTC AGGCACCGACTTCACCCTGACT ATCAATAGCCTGGAAGCCGAGG ACGCCGCTGCCTACTACTGTCAT CAGTCAAGTAGCCTGCCCTTCA CCTTCGGCCCTGGCACTAAAGT GGATATTAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCC CCCAGCGACGAGCAGCTGAAG AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT GCCTGCTGAACAACCTTCTACCC CCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGA GCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGA

		CTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCG ACTACGAGAAGCATAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCA AGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG C
Phần thứ hai từ mAb2		
SEQ ID NO: 41 (Được kết hợp)	HCDR1	GFTFSVYGMN
SEQ ID NO: 42 (Được kết hợp)	HCDR2	IIWYDGDNQYYADSVKG
SEQ ID NO: 43 (Được kết hợp)	HCDR3	DLRTGPFDY
SEQ ID NO: 44 (Kabat)	HCDR1	VYGMN
SEQ ID NO: 45 (Kabat)	HCDR2	IIWYDGDNQYYADSVKG
SEQ ID NO: 46 (Kabat)	HCDR3	DLRTGPFDY
SEQ ID NO: 47 (Chothia)	HCDR1	GFTFSVY
SEQ ID NO: 48 (Chothia)	HCDR2	WYDGDN
SEQ ID NO: 49 (Chothia)	HCDR3	DLRTGPFDY
SEQ ID NO: 50 (IMGT)	HCDR1	GFTFSVYG
SEQ ID NO: 51 (IMGT)	HCDR2	IWYDGDNQ
SEQ ID NO: 52 (IMGT)	HCDR3	ARDLRTGPFDY

SEQ ID NO: 53	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGFTFSVYGMNWVRQAPGKGL EWVAIIWYDGDNQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNGLRAED TAVYYCARDLRTGPFDYWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 54	ADN VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAG GCGGCGGAGTGGTGCAGCCTGG TAGATCACTGAGACTGAGCTGC GCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAG CGTCTACGGAATGAACTGGGTC CGACAGGCCCTGGGAAAGGCC TGGAGTGGGTGGCAATTATCTG GTACGACGGCGATAATCAGTAC TACGCCGATAGCGTGAAGGGAC GGTTCATCTCTAGGGATAA CTCTAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGAACGGCCTGAGAGCCG AGGACACCGCCGTCTACTACTG CGCTAGGGACCTGAGAACCGGC CCCTTCGACTACTGGGGACAGG GCACCCTGGTCACCGTGTCTAG C
SEQ ID NO: 55	Chuỗi nặng	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGFTFSVYGMNWVRQAPGKGL EWVAIIWYDGDNQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNGLRAED TAVYYCARDLRTGPFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

		NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 56	ADN chuỗi nặng	CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAG GCGGCGGAGTGGTGCAGCCTGG TAGATCACTGAGACTGAGCTGC GCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAG CGTCTACGGAATGAACTGGGTC CGACAGGCCCCTGGGAAAGGCC TGGAGTGGGTGGCAATTATCTG GTACGACGGCGATAATCAGTAC TACGCCGATAGCGTGAAGGGAC GGTTCACCTATCTCTAGGGATAA CTCTAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGAACGGCCTGAGAGCCG AGGACACCGCCGTCTACTACTG CGCTAGGGACCTGAGAACCGGC CCCTTCGACTACTGGGGACAGG GCACCCTGGTCACCGTGTCTAG CGCCTCTACTAAGGGCCCAAGC GTGTTCCCCCTGGCCCCTAGCTC

	TAAGTCTACTAGCGGAGGCACC GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTCAGCTGGAATAGCGGC GCTCTGACTAGCGGAGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGTCT AGCGGCCTGTATAGCCTGTCTA GCGTCGTGACCGTGCCTAGCTC TAGCCTGGGCACTCAGACCTAT ATCTGTAACGTGAACCACAAGC CCTCTAACACTAAGGTGGACAA GCGGGTGGAACCTAAGTCCTGC GATAAGACTCACACCTGTCCTC CCTGCCCTGCCCCTGAGGCTGC CGGAGGACCTAGCGTGTTCTG TTCCACCTAAGCCTAAAGACA CCCTGATGATCTCTAGGACCCC CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GACGTCTCACACGAGGACCCTG AAGTGAAGTTTAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAAGTGCACAAC GCTAAGACTAAGCCTAGAGAGG AACAGTATAACTCTACCTATAG GGTCGTCAGCGTGCTGACAGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTGTAAGT GTCTAACAAGGCCCTGCCAGCC CCTATCGAAAAGACTATCTCTA AGGCTAAGGGGCAGCCTAGAGA ACCCCAAGTGTGCACTCTGCCC CCTAGTAGAGAAGAGATGACTA
--	--

		AGAATCAGGTGTCACTGAGCTG TGCCGTGAAGGGCTTCTACCCT AGCGATATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAACGGCCAGCCCGAGA ACAACTACAAGACCACCCCCC AGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCTGGTGAGCAAGCTGA CCGTGGACAAGTCCAGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGTC CCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 57 (Được kết hợp)	LCDR1	RASQSIGSSLH
SEQ ID NO: 58 (Được kết hợp)	LCDR2	YASQSFS
SEQ ID NO: 59 (Được kết hợp)	LCDR3	HQSSSLPFT
SEQ ID NO: 60 (Kabat)	LCDR1	RASQSIGSSLH
SEQ ID NO: 61 (Kabat)	LCDR2	YASQSFS
SEQ ID NO: 62 (Kabat)	LCDR3	HQSSSLPFT
SEQ ID NO: 63 (Chothia)	LCDR1	SQSIGSS
SEQ ID NO: 64 (Chothia)	LCDR2	YAS
SEQ ID NO: 65 (Chothia)	LCDR3	SSSLPF
SEQ ID NO: 66 (IMGT)	LCDR1	QSIGSS

SEQ ID NO: 67 (IMGT)	LCDR2	YASQSFSGVP
SEQ ID NO: 68 (IMGT)	LCDR3	HQSSSLPFT
SEQ ID NO: 69	VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCR ASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLI KYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPF TFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 70	ADN VL	GAGATCGTGCTGACCCAGTCAC CCGACTTTCAGTCAGTGACCCCT AAAGAAAAAGTGACTATCACCT GTAGGGCCTCCCAGTCTATCGG CTCTAGCCTGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGATCAGTCACCTA AGCTGCTGATTAAGTACGCCTC TCAGTCCTTTAGCGGCGTGCCCT CTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTC AGGCACCGACTTCACCCTGACT ATCAATAGCCTGGAAGCCGAGG ACGCCGCTGCCTACTACTGTCAT CAGTCAAGTAGCCTGCCCTTCA CCTTCGGCCCTGGCACTAAAGT GGATATTAAG
SEQ ID NO: 71	Chuỗi Nhe	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCR ASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLI KYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPF TFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTTLTKADYEKH

		KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 72	ADN Chuỗi Nhe	GAGATCGTGCTGACCCAGTCAC CCGACTTTCAGTCAGTGACCCCT AAAGAAAAAGTGACTATCACCT GTAGGGCCTCCCAGTCTATCGG CTCTAGCCTGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGATCAGTCACCTA AGCTGCTGATTAAGTACGCCTC TCAGTCCTTTAGCGGCGTGCCCT CTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTC AGGCACCGACTTCACCCTGACT ATCAATAGCCTGGAAGCCGAGG ACGCCGCTGCCTACTACTGTCAT CAGTCAAGTAGCCTGCCCTTCA CCTTCGGCCCTGGCACTAAAGT GGATATTAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCC CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT GCCTGCTGAACAACCTTCTACCC CCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGA GCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCG ACTACGAGAAGCATAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCA

		AGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG C
Phần thứ nhất từ mAb1		
SEQ ID NO: 73 (Được kết hợp)	HCDR1	GGTFKSYAIS
SEQ ID NO: 74 (Được kết hợp)	HCDR2	NIIPMTGQTYYYAQKFQG
SEQ ID NO: 75 (Được kết hợp)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 76 (Kabat)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO: 77 (Kabat)	HCDR2	NIIPMTGQTYYYAQKFQG
SEQ ID NO: 78 (Kabat)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 79 (Chothia)	HCDR1	GGTFKSY
SEQ ID NO: 80 (Chothia)	HCDR2	IPMTGQ
SEQ ID NO: 81 (Chothia)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 82 (IMGT)	HCDR1	GGTFKSYA
SEQ ID NO: 83 (IMGT)	HCDR2	IIPMTGQT
SEQ ID NO: 84 (IMGT)	HCDR3	ARAAHPLVFDN
SEQ ID NO: 85	VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGGTFKSYAISWVRQAPGQGLE WMGNIIPMTGQTYYYAQKFQGRV TITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARAAHPLVFDNWGQGTL VTVSS

SEQ ID NO: 86	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAG GCGCCGAAGTGAAGAAACCCGG CTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGT AAAGCTAGTGGCGGCACCTTCA AGTCCTACGCTATTAGCTGGGT CAGACAGGCCCCAGGTCAGGGC CTGGAGTGGATGGGCAATATTA TCCCTATGACCGGTCAGACCTA CTACGCTCAGAAATTTCAAGGT AGAGTGACTATCACCGCCGACG AGTCTACTAGCACCGCCTATAT GGAAGTGTCTAGCCTGAGATCA GAGGACACCGCCGTCTACTACT GCGCTAGAGCCGCCTATCACCC CCTGGTGTTCGATAACTGGGGT CAGGGCACCTGGTCACCGTGT CTAGC
SEQ ID NO: 87	Chuỗi Nặng	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGGTFKSYAISWVRQAPGQGLE WMGNIIPMTGQTYYAQKFQGRV TITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARAAHYHPLVFLNWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

		YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSOSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 88	ADN chuỗi nặng	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAG GCGCCGAAGTGAAGAAACCCGG CTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGT AAAGCTAGTGGCGGCACCTTCA AGTCCTACGCTATTAGCTGGGT CAGACAGGCCCCAGGTCAGGGC CTGGAGTGGATGGGCAATATTA TCCCTATGACCGGTCAGACCTA CTACGCTCAGAAATTTCAAGGT AGAGTGACTATCACCGCCGACG AGTCTACTAGCACCGCCTATAT GGAAGTGTCTAGCCTGAGATCA GAGGACACCGCCGTCTACTACT GCGCTAGAGCCGCCTATCACCC CCTGGTGTTCGATAACTGGGGT CAGGGCACCTGGTCACCGTGT CTAGCGCTAGCACTAAGGGCCC CTCAGTGTTCCCCCTGGCCCCTA GCTCTAAGTCTACTAGCGGCGG CACCGCCGCTCTGGGCTGCCTG GTGAAAGACTACTTCCCCGAGC CCGTGACCGTGTTCATGGAATAG CGGCGCTCTGACTAGCGGAGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGC AGTCTAGCGGCCTGTATAGCCT

	GTCTAGCGTGGTGACCGTGCCT AGCTCTAGCCTGGGCACTCAGA CCTACATCTGTAACGTGAACCA CAAGCCCTCTAACACTAAGGTG GACAAGCGGGTGGAACCTAAGT CCTGCGATAAGACTCACACCTG TCCCCCTGCCCTGCCCTGAG GCTGCCGGAGGACCTAGCGTGT TCCTGTTCCACCTAAGCCTAAG GACACCCTGATGATCTCTAGGA CCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCTCACGAGGAC CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCTAAGACTAAGCCTAGA GAGGAACAGTATAACTCCACCT ATAGAGTGGTGTGCTGCTGAC CGTGCTGCATCAGGACTGGCTG AACGGCAAAGAGTATAAGTGTA AAGTCTCTAACAAGGCCCTGCC AGCCCCTATCGAAAAGACTATC TCTAAGGCTAAGGGCCAGCCTA GAGAACCTCAGGTGTACACCCT GCCCCCTGTAGAGAAGAGATG ACTAAGAATCAGGTGTCCCTGT GGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTA CCCTAGCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGTCTAACGGCCAGCCCG AGAACAACTATAAGACTACCCC CCCTGTGCTGGATAGCGACGGC TCATTCTTCCTGTACTCTAAGCT
--	--

		GACCGTGGACAAGTCTAGGTGG CAGCAGGGCAATGTGTTTAGCT GTAGCGTGATGCACGAGGCCCT GCATAATCACTACACTCAGAAG TCACTGAGCCTGAGCCCCGGCA AG
SEQ ID NO: 89 (Được kết hợp)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 90 (Được kết hợp)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 91 (Được kết hợp)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 92 (Kabat)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 94 (Kabat)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 95 (Chothia)	LCDR1	SSSNIGNHY
SEQ ID NO: 96 (Chothia)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 97 (Chothia)	LCDR3	WDYSGFST
SEQ ID NO: 98 (IMGT)	LCDR1	SSNIGNHY
SEQ ID NO: 99 (IMGT)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 100 (IMGT)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 101	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSG SSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKL LIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGTS

		ASLAITGLQSEDEADYYCQSWDY SGFSTVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 102	ADN VL	GATATCGTCCTGACTCAGCCCC CTAGCGTCAGCGGCGCTCCCGG TCAGAGAGTGACTATTAGCTGT AGCGGCTCTAGCTCTAATATCG GTAATCACTACGTGAACTGGTA TCAGCAGCTGCCCCGGCACC GCC CCTAAGCTGCTGATCTATAGAA ACAATCACCGGCCTAGCGGCGT GCCCCGATAGGTTTAGCGGATCT AAGTCAGGCACTAGCGCTAGTC TGGCTATCACCGGACTGCAGTC AGAGGACGAGGCCGACTACTAC TGTCAGTCCTGGGACTATAGCG GCTTTAGCACCGTGTTTCGGCGG AGGCACTAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 103	Chuỗi Nhẹ	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSG SSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKL LIYRNNHRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQSEDEADYYCQSWDY SGFSTVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGA VTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
SEQ ID NO: 104	ADN Chuỗi Nhẹ	GATATCGTCCTGACTCAGCCCC CTAGCGTCAGCGGCGCTCCCGG TCAGAGAGTGACTATTAGCTGT

	AGCGGCTCTAGCTCTAATATCG GTAATCACTACGTGAACTGGTA TCAGCAGCTGCCCCGGCACCGCC CCTAAGCTGCTGATCTATAGAA ACAATCACCGGCCTAGCGGCGT GCCCCGATAGGTTTAGCGGATCT AAGTCAGGCACTAGCGCTAGTC TGGCTATCACCGGACTGCAGTC AGAGGACGAGGCCGACTACTAC TGTCAGTCCTGGGACTATAGCG GCTTTAGCACCGTGTTTCGGCGG AGGCACTAAGCTGACCGTGCTG GGTCAGCCTAAGGCTGCCCCCA GCGTGACCCTGTTCCCCCCCAG CAGCGAGGAGCTGCAGGCCAAC AAGGCCACCCTGGTGTGCCTGA TCAGCGACTTCTACCCAGGCGC CGTGACCGTGGCCTGGAAGGCC GACAGCAGCCCCGTGAAGGCCG GCGTGAGAGACCACCACCCCAG CAAGCAGAGCAACAACAAGTAC GCCGCCAGCAGCTACCTGAGCC TGACCCCCGAGCAGTGGAAGAG CCACAGGTCCTACAGCTGCCAG GTGACCCACGAGGGCAGCACCG TGGAAAAGACCGTGGCCCCAAC CGAGTGCAGC
--	---

Trong toàn bộ bản mô tả này, nếu có sự không thống nhất giữa nội dung của bản mô tả (ví dụ **Bảng 15**) và danh mục trình tự, nội dung của bản mô tả sẽ được áp dụng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đặc hiệu kép thích hợp cho sự đồng biểu hiện ở tế bào chủ thông thường, trong đó kháng thể này bao gồm:
 - a. phần thứ nhất mà là globulin miễn dịch có chuỗi nhẹ biến đổi thứ nhất thuộc kiểu đại lambda (VL1) và chuỗi nặng biến đổi thứ nhất thuộc kiểu đại (VH1), mà gắn kết đặc hiệu với đích thứ nhất, và chuỗi nặng cố định thứ nhất (CH1) với sự cải biến heterodime hóa, và
 - b. phần thứ hai mà là globulin miễn dịch có chuỗi nhẹ biến đổi thứ hai thuộc kiểu đại kappa (VL2) và chuỗi nặng biến đổi thứ hai thuộc kiểu đại (VH2), mà gắn kết đặc hiệu với đích thứ hai, khác với đích thứ nhất, và chuỗi nặng cố định thứ hai (CH2) có sự cải biến heterodime hóa mà bổ sung với sự cải biến heterodime hóa của chuỗi nặng cố định thứ nhất,

trong đó phần thứ nhất và phần thứ hai, khi được đồng biểu hiện ở tế bào chủ thông thường, tạo thành kháng thể đặc hiệu kép, trong đó chuỗi nặng cố định thứ nhất và thứ hai là IgA, IgD, IgE, IgG, hoặc IgM người, tốt hơn là IgD, IgE hoặc IgG, chẳng hạn như IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 người, tốt hơn là IgG1, và trong đó chuỗi nhẹ biến đổi thứ nhất thuộc loại lambda 1, và chuỗi nhẹ biến đổi thứ hai thuộc loại kappa 6.
2. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó chuỗi nặng cố định thứ nhất và thứ hai là IgG1, và trong đó:
 - a. chuỗi nặng cố định thứ nhất có các đột biến điểm tạo thành cấu trúc núp và chuỗi nặng cố định thứ hai có các đột biến điểm tạo thành cấu trúc lỗ, hoặc
 - b. chuỗi nặng cố định thứ nhất có các đột biến điểm tạo thành cấu trúc lỗ và chuỗi nặng cố định thứ hai có các đột biến điểm tạo thành cấu trúc núp, và tùy ý
 - c. các chuỗi nặng cố định thứ nhất và thứ hai có các đột biến tạo thành cầu nối disulfua.
3. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, bao gồm miền VH1 globulin miễn dịch thứ nhất, miền VL1 globulin miễn dịch thứ nhất, miền

VH2 globulin miễn dịch thứ hai và miền VL2 globulin miễn dịch thứ hai, trong đó:

- a. miền VH1 globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm (ví dụ trong trình tự):
 - i. các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:76, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:77, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:78; hoặc
 - ii. các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:79, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:80, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:81; và
- b. miền VL1 globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm (ví dụ trong trình tự):
 - i. các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:92, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:93, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:94 hoặc
 - ii. các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:95, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:96, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:97; và
- c. miền VH2 globulin miễn dịch thứ hai bao gồm (ví dụ trong trình tự):
 - i. các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:44, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:45, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:46; hoặc
 - ii. các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:47, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:48, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:49; và
- d. miền VL2 globulin miễn dịch thứ hai bao gồm (ví dụ trong trình tự):
 - i. các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:60, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:61, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:62 hoặc
 - ii. các vùng siêu biến CDR1, CDR2 và CDR3, CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO:63, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO:64, và CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO:65.

4. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, bao gồm miền VH1 globulin miễn dịch thứ nhất, miền VL1 globulin miễn dịch thứ nhất, miền VH2 globulin miễn dịch thứ hai và miền VL2 globulin miễn dịch thứ hai, trong đó:
 - a. miền VH1 globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 85,
 - b. miền VL1 globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 101,
 - c. miền VH2 globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 53, và
 - d. miền VL2 globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 69.
5. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, bao gồm chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ nhất, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ nhất, chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ hai và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ hai, trong đó:
 - a. chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 87,
 - b. chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 103,
 - c. chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 55, và
 - d. chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 71.
6. Phương pháp chọn lọc kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, phương pháp này bao gồm:
 - a. bước thứ nhất là chọn lọc phần thứ nhất, và phần thứ hai;
 - b. bước thứ hai là đồng biểu hiện phần thứ nhất và phần thứ hai ở tế bào chủ thông thường, tạo thành kháng thể đặc hiệu kép bao gồm phần thứ nhất và phần thứ hai;
 - c. bước thứ ba là tinh chế kháng thể đặc hiệu kép bằng cách loại bỏ các mảnh ghép đôi nhằm khỏi kháng thể đặc hiệu kép được ghép đôi chính xác.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó bước thứ ba là tinh chế tạo thành kháng thể đặc hiệu kép mà có độ tinh khiết ít nhất là 60% (khối lượng), 70% (khối lượng), 80% (khối lượng), 85% (khối lượng), chẳng hạn như độ tinh khiết ít nhất là 90% (khối lượng), 95% (khối lượng), 96% (khối lượng), 97% (khối lượng), 98% (khối lượng), hoặc 99% (khối lượng).
8. Phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 bằng cách đồng biểu hiện ở tế bào chủ thông thường, phương pháp này bao gồm:
 - a. bước thứ nhất là tạo ra ít nhất là một vector mã hóa phần thứ nhất và phần thứ hai;
 - b. bước thứ hai là đưa ít nhất là một vector này vào trong tế bào chủ thông thường;
 - c. bước thứ ba là chọn lọc các tế bào biểu hiện đặc hiệu kháng thể đặc hiệu kép này;
 - d. bước thứ tư là nuôi cấy các tế bào được chọn lọc trong điều kiện trong đó các tế bào này biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép; và
 - e. bước thứ năm là tinh chế kháng thể đặc hiệu kép mà có độ tinh khiết ít nhất là 60% (khối lượng), 70% (khối lượng), 80% (khối lượng), hoặc 85% (khối lượng), chẳng hạn như độ tinh khiết ít nhất là 90% (khối lượng), 95% (khối lượng), 96% (khối lượng), 97% (khối lượng), 98% (khối lượng), hoặc 99% (khối lượng).
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bước thứ nhất bao gồm việc tạo ra vector thứ nhất mã hóa phần thứ nhất và vector thứ hai mã hóa phần thứ hai.
10. Hệ thống biểu hiện bao gồm ít nhất là một vector bao gồm polynucleotit mã hóa phần thứ nhất hoặc phần thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, và chỉ thị chọn lọc.
11. Hệ thống biểu hiện theo điểm 10 bao gồm:
 - a. polynucleotit mã hóa chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I);
 - b. polynucleotit mã hóa chỉ thị chọn lọc thứ hai (sm II), mà khác với chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I).

12. Hệ thống biểu hiện theo điểm 10 hoặc 11, trong đó chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I) là yếu tố vận chuyển folat hoặc polynucleotit mã hóa thụ thể folat đột biến, trong đó thụ thể folat đột biến có ái lực gắn kết folat giảm đi so với thụ thể folat kiểu dại và chỉ thị chọn lọc thứ hai (sm II) là DHFR.
13. Hệ thống biểu hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12, trong đó chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I) là hygromycin và chỉ thị chọn lọc thứ hai (sm II) là Neo/G418.
14. Hệ thống biểu hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 13, bao gồm hai vectơ biểu hiện trong đó:
 - a. vectơ thứ nhất bao gồm polynucleotit mã hóa ít nhất là chỉ thị chọn lọc thứ nhất (sm I) và ít nhất là các polynucleotit mã hóa phân thứ nhất; và
 - b. vectơ thứ hai bao gồm polynucleotit mã hóa ít nhất là chỉ thị chọn lọc thứ hai (sm II) và ít nhất là các polynucleotit mã hóa phân thứ hai.
15. Hệ thống biểu hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 14, bao gồm bộ ba kết thúc xuôi dòng của các polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và polynucleotit mã hóa vùng neo màng globulin miễn dịch xuôi dòng của bộ ba kết thúc này.
16. Phương pháp chọn lọc tế bào chủ thông thường để sử dụng trong các phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 9, bao gồm:
 - a. bước thứ nhất là tạo ra nhiều tế bào chủ, bao gồm hệ thống biểu hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 15; và
 - b. nuôi cấy nhiều tế bào chủ này trong điều kiện chọn lọc đối với chỉ thị chọn lọc, nhờ đó thu được tế bào chủ biểu hiện sản phẩm quan tâm.
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó môi trường nuôi cấy chọn lọc được sử dụng:
 - a. bao gồm nồng độ folat giới hạn; và/ hoặc
 - b. bao gồm axit folic ở nồng độ 500nM hoặc thấp hơn; và/ hoặc
 - c. bao gồm axit folic ở nồng độ được chọn từ:
 - i. 1000nM – 100 pM;

- ii. 100nM – 1nM;
 - iii. 15nM – 1nM;
 - iv. 10nM – 1nM; và
 - v. 10nM – 2,5nM; và/ hoặc
 - d. bao gồm chất ức chế DHFR; và/ hoặc
 - e. bao gồm chất kháng folat; và/ hoặc
 - f. bao gồm chất kháng folat ở nồng độ 500nM hoặc thấp hơn; và/ hoặc
 - g. bao gồm MTX ở nồng độ được chọn từ:
 - i. 500nM – 3nM;
 - ii. 100nM – 10nM;
 - iii. 50nM – 10nM; và
 - iv. 50nM; và/ hoặc
 - h. bao gồm nồng độ chất kháng folat gấp lên đến 20 lần nồng độ folat; và/ hoặc
 - i. bao gồm nồng độ chất kháng folat gấp 10 – 20 lần nồng độ folat; và/ hoặc
 - j. bao gồm axit folic ở nồng độ lên đến 15nM và nồng độ đẳng mol lên đến 20 lần MTX.
18. Phương pháp theo điểm 16 hoặc 17, trong đó tế bào chủ bao gồm hệ thống biểu hiện theo điểm 15, trong đó ít nhất là một phần của phần thứ nhất hoặc phần thứ hai được biểu hiện dưới dạng polypeptit dung hợp bao gồm vùng neo xuyên màng globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó, và trong đó polypeptit dung hợp này được biểu hiện trên bề mặt của tế bào chủ này, còn bao gồm bước:
- a. cho nhiều tế bào chủ tiếp xúc với hợp chất phát hiện gắn kết với polypeptit dung hợp;
 - b. chọn lọc ít nhất là một tế bào chủ dựa vào sự có mặt hoặc lượng hợp chất phát hiện được gắn kết với bề mặt tế bào này.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó hợp chất phát hiện bao gồm đích thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc dẫn xuất của nó, và ít nhất là một chất đánh dấu phát hiện.
20. Phương pháp theo điểm 8 hoặc 9, trong đó bước thứ năm là tinh chế kháng thể đặc hiệu kép bao gồm kỹ thuật sắc ký ái lực và/ hoặc sắc ký trao đổi ion.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó sắc ký bao gồm:
 - a. bước thứ nhất là bắt giữ;
 - b. bước thứ hai là làm bóng; và tùy ý
 - c. bước thứ ba là hoàn thiện thêm.
22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó bước thứ nhất là bắt giữ được thực hiện bằng kỹ thuật được chọn từ nhóm gồm có sắc ký ái lực gắn kết Fc, như Protein A hoặc Protein G, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ lambda, như LambdaFabSelect™, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ kappa, như KappaSelect™, sắc ký ái lực kháng idiotyp, chẳng hạn như phần thứ nhất hoặc phần thứ hai, sắc ký ái lực dựa vào đích, chẳng hạn như sắc ký ái lực sử dụng đích thứ nhất hoặc đích thứ hai, sắc ký trao đổi ion, chẳng hạn như chất dính Capto™, hoặc Fractogel™ EMD SO₃, và sắc ký tương tác kỵ nước.
23. Phương pháp theo điểm 21 hoặc 22, trong đó bước thứ hai là hoàn thiện được thực hiện bằng kỹ thuật được chọn từ nhóm gồm có sắc ký ái lực gắn kết Fc, chẳng hạn như Protein A hoặc Protein G, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ lambda, chẳng hạn như LambdaFabSelect™, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ kappa, chẳng hạn như KappaSelect™, sắc ký ái lực kháng idiotyp, chẳng hạn như phần thứ nhất hoặc phần thứ hai, sắc ký ái lực dựa vào đích, chẳng hạn như sắc ký ái lực sử dụng đích thứ nhất hoặc đích thứ hai, sắc ký trao đổi ion, chẳng hạn như chất dính Capto™, hoặc Fractogel™ EMD SO₃, sắc ký tương tác kỵ nước, và sự bất hoạt virus.
24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó bước thứ ba là hoàn thiện thêm được thực hiện bằng kỹ thuật được chọn từ nhóm gồm có sắc ký ái lực gắn kết Fc, chẳng hạn như Protein A hoặc Protein G, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ lambda, chẳng hạn như LambdaFabSelect™, sắc ký ái lực đặc hiệu chuỗi nhẹ kappa, chẳng hạn như KappaSelect™, sắc ký ái lực kháng idiotyp, chẳng hạn như phần thứ nhất hoặc phần thứ hai, sắc ký ái lực dựa vào đích, chẳng hạn như sắc ký ái lực sử dụng đích thứ nhất hoặc đích thứ hai, sắc ký trao đổi ion, chẳng hạn như chất dính Capto™,

hoặc Fractogel™ EMD SO₃, sắc ký tương tác kỵ nước, và sự bất hoạt virus, một mình hoặc ở dạng kết hợp.

25. Phương pháp theo điểm 23, được chọn từ:
 - a. bước thứ nhất là bắt giữ bằng Protein A, như MabSelect™ SuRe™, bước thứ hai sắc ký ái lực chuỗi nhẹ lambda, chẳng hạn như LambdaFabSelect™, và bước thứ ba sắc ký ái lực chuỗi nhẹ kappa chẳng hạn như KappaSelect™; hoặc
 - b. bước thứ nhất Protein A, như MabSelect™, SuRe™, bước thứ hai sắc ký ái lực chuỗi nhẹ kappa như KappaSelect™, và bước thứ ba sắc ký ái lực chuỗi nhẹ lambda, chẳng hạn như LambdaFabSelect™; hoặc
 - c. bước thứ nhất sắc ký ái lực chuỗi nhẹ kappa như KappaSelect™ và bước thứ hai sắc ký ái lực chuỗi nhẹ lambda, chẳng hạn như LambdaFabSelect™; hoặc
 - d. bước thứ nhất sắc ký ái lực chuỗi nhẹ lambda, chẳng hạn như LambdaFabSelect™ và bước thứ hai sắc ký ái lực chuỗi nhẹ kappa chẳng hạn như KappaSelect™.
26. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 9 hoặc từ 16 đến 25, trong đó dòng tế bào được chọn từ nhóm gồm có tế bào CHO, tế bào lai không sản xuất, như Sp 2/0 hoặc NS0, dòng tế bào thu được từ người, như HEK hoặc PER.C6, có nguồn gốc từ thận chuột đồng non (BHK), nấm men hoặc nấm sợi, vi khuẩn nhân sơ, chẳng hạn như *E. coli* hoặc *Pseudomonas fluorescens*, có nguồn gốc từ thực vật, tảo và sinh vật có lông mao.
27. Được phẩm bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và chất mang được dùng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NOVARTIS AG

<120> KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP,
VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

<130> PAT057716-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 62/518,090

<151> 2017-06-12

<160> 104

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 1

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 2

Asn Ile Ile Pro Met Thr Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 3

Ala	Ala	Tyr	His	Pro	Leu	Val	Phe	Asp	Asn
1				5					10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 4

Gly	Gly	Thr	Phe	Lys	Ser	Tyr
1				5		

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 5

Ile	Pro	Met	Thr	Gly	Gln
1				5	

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 6

Ala	Ala	Tyr	His	Pro	Leu	Val	Phe	Asp	Asn
1				5					10

<210> 7

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

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

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

Gly Asn Ile Ile Pro Met Thr Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Ala Tyr His Pro Leu Val Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 8
 gaggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaagggtg 60
 agctgcaagg ccagcggcgg caccttcaag agctacgcca tcagctgggt gaggcaggcc 120

cccggccagg gcctggagtg gatgggcaac atcatcccca tgaccggcca gacctactac 180
 gcccagaagt tccagggcag ggtgaccatc accgccgacg agagcaccag caccgcctac 240
 atggagctga gcagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggccgcc 300
 taccaccccc tgggtgttcga caactgggcc agggcaccct ggtgaccgtg agcagc 356

<210> 9

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 9

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

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

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

Gly Asn Ile Ile Pro Met Thr Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Ala Tyr His Pro Leu Val Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

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

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 10

<211> 1347

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 10

gaggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaggtg	60
agctgcaagg ccagcggcgg caccttcaag agctacgcca tcagctgggt gaggcaggcc	120
cccggccagg gcctggagtg gatgggcaac atcatcccca tgaccggcca gacctactac	180
gccagaagt tccagggcag ggtgaccatc accgccgacg agagcaccag caccgcctac	240
atggagctga gcagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggccgcc	300
taccaccccc tgggtgttcga caactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagcgcc	360
agcaccaagg gccccagcgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc	420
accgccgcc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgagctgg	480

```

aacagcggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc      540
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctggggcac ccagacctac      600
atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagggg ggagcccaag      660
agctgcgaca agaccacac ctgccccccc tgccccgccc ccgaggccgc cggcggcccc      720
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag gacccccgag      780
gtgacctgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaggaccccc aggtgaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagccca gggaggagca gtacaacagc      900
acctacaggg tggtgagcgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag      960
tacaagtgca aggtgagcaa caaggccctg cccgccccca tcgagaagac catcagcaag     1020
gccaagggcc agcccaggga gccccagggtg tacaccctgc cccccagcag ggaggagatg     1080
accaagaacc aggtgagcct gacctgcctg gtgaaggggt tctaccccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccagag aacaactaca agaccacccc ccccgctgctg     1200
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag caggtggcag     1260
cagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag     1320
aagagcctga gcctgagccc cggcaag                                           1347

```

```

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

```

```

<400> 11
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His Tyr Val Asn
1           5           10

```

```

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

```

<400> 12

Arg Asn Asn His Arg Pro Ser
1 5

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 13

Gln Ser Trp Asp Tyr Ser Gly Phe Ser Thr Val
1 5 10

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 14

Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His Tyr
1 5

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 15

Arg Asn Asn
1

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 16

Trp Asp Tyr Ser Gly Phe Ser Thr
1 5

<210> 17

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 17

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His
20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Tyr Ser Gly
85 90 95

Phe Ser Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 18

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 18
 gatatcggtcc tgactcagcc ccctagcgctc agcggcgctc ccggtcagag agtgactatt 60
 agctgtagcg gctctagctc taatatcggg aatcactacg tgaactggta tcagcagctg 120
 cccggcaccg cccctaagct gctgatctat agaaacaatc accggcctag cggcgtgccc 180
 gataggttta gcggtatctaa gtcaggcact agcgctagtc tggctatcac cggactgcag 240
 tcagaggacg aggccgacta ctactgtcag tcctgggact atagcggctt tagcaccgtg 300
 ttcggcggag gcactaagct gaccgtgctg 330

<210> 19
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 19
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His
 20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Tyr Ser Gly
 85 90 95

Phe Ser Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 20

<211> 648

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 20

gatatcggtcc tgactcagcc ccctagcgctc agcggcgctc ccggtcagag agtgactatt	60
agctgtagcg gctctagctc taatatcggt aatcactacg tgaactggta tcagcagctg	120
cccggcaccg cccctaagct gctgatctat agaaacaatc accggcctag cggcgtgccc	180
gataggttta gcggatctaa gtcaggcact agcgctagtc tggctatcac cggactgcag	240
tcagaggacg aggccgacta ctactgtcag tcctgggact atagcggctt tagcacctg	300
ttcggcggag gcactaagct gaccgtgctg ggtcagccta aggctgcccc cagcgtgacc	360
ctgttcccc ccagcagcga ggagctgcag gccacaagc ccaccctggt gtgcctgac	420
agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgatgaag	480
gccggcgtgg agaccaccac cccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc	540

tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga aaagaccgtg gcccgaaccg agtgcagc 648

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 21

Val Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 22

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 23

Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 24

Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr

1

5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 25

Trp Tyr Asp Gly Asp Asn

1

5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 26

Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr

1

5

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr

20

25

30

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

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 28

caggtgcagc tgggtggagag cggcgggcggc gtgggtgcagc ccggcaggag cctgaggctg 60

agctgcgccg ccagcggcctt caccttcagc gtgtacggca tgaactgggt gaggcaggcc 120

cccggcaagg gcctggagtg ggtggccatc atctggtacg acggcgacaa ccagtactac 180

gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acggcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg 300

aggaccggcc ccttcgacta ctgggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 29

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 29

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

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

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

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30

<211> 1344

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 30

caggtgcagc tgggtggagag cggcggcggc gtggtgcagc ccggcaggag cctgaggctg	60
agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gtgtacggca tgaactgggt gaggcaggcc	120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggccatc atctggtacg acggcgacaa ccagtactac	180
gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac	240
ctgcagatga acggcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg	300
aggaccggcc ccttcgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagcgccagc	360
accaagggcc ccagcgtgtt ccccctggcc ccagcagca agagcaccag cggcggcacc	420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gagctggaac	480
agcggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg	540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgccc agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc	600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaggggtgga gcccagagc	660
tgcgacaaga cccacacctg cccccctgc cccgccccg agctgctggg cggccccagc	720
gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccagggtg	780
acctgcgtgg tgggtggacgt gagccacgag gaccccagag tgaagttcaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccaggg aggagcagta caacagcacc	900
tacaggggtg tgagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	960
aagtgaagg tgagcaacaa ggccctgccc gccccatcg agaagaccat cagcaaggcc	1020

```

aagggccagc ccagggagcc ccaggtgtac accctgcccc ccagcagggg ggagatgacc 1080
aagaaccagg tgagcctgac ctgcctggtg aagggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc cgtgctggac 1200
agcgacggca gcttcttcct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta caccagaag 1320
agcctgagcc tgagccccgg caag 1344

```

```

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

```

```

<400> 31
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1          5          10

```

```

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

```

```

<400> 32
Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1          5

```

```

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

```

```

<400> 33
His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe Thr
1          5

```

<210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 34
 Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 1 5

<210> 35
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 35
 Tyr Ala Ser
 1

<210> 36
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 36
 Ser Ser Ser Leu Pro Phe
 1 5

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 37
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

```
<210> 38
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

```
<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"
```

<400> 38							
gagatcgtgc	tgacccagtc	acccgacttt	cagtcagtga	cccctaaaga	aaaagtgact		60
atcacctgta	gggcctccca	gtctatcggc	tctagcctgc	actggtatca	gcagaagccc		120
gatcagtcac	ctaagctgct	gattaagtac	gcctctcagt	ccttttagcgg	cgtgccctct		180
aggttttagcg	gctcaggctc	aggcaccgac	ttcacccctga	ctatcaatag	cctggaagcc		240
gaggacgccg	ctgcctacta	ctgtcatcag	tcaagtagcc	tgcccttcac	cttcggccct		300
ggcactaaag	tggaatttaa	g					321

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 39

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 40

<211> 642

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 40

gagatcgtgc tgaccagtc acccgacttt cagtcagtga cccctaaaga aaaagtgact	60
atcacctgta gggcctccca gtctatcggc tctagcctgc actggtatca gcagaagccc	120
gatcagtcac ctaagctgct gattaagtac gcctctcagt ccttttagcgg cgtgccctct	180
aggtttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctatcaatag cctggaagcc	240
gaggacgccg ctgcctacta ctgtcatcag tcaagtagcc tgcccttcac cttcggccct	300
ggcactaaag tggatattaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgagagcgg caacagccag	480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 41

Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 42
 Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 43
 Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 44
 Val Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 45

Ile	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 46

Asp	Leu	Arg	Thr	Gly	Pro	Phe	Asp	Tyr
1				5				

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 47

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Val	Tyr
1				5		

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 48

Trp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Asn
1				5	

<210> 49

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 49
 Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 50
 Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr Gly
 1 5

<210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 51
 Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln
 1 5

<210> 52
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 52
 Ala Arg Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 53
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 53
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

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

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 54
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 54
 caggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga gtggtgcagc ctggtagatc actgagactg

60

```

agctgcgctg ctagtggctt cacctttagc gtctacggaa tgaactgggt ccgacaggcc      120
cctgggaaag gcctggagtg ggtggcaatt atctggtacg acggcgataa tcagtactac      180
gccgatagcg tgaagggacg gttcactatc tctagggata actctaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acggcctgag agccgaggac accgccgtct actactgcgc tagggacctg      300
agaaccggcc ccttcgacta ctggggacag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagc          354

```

<210> 55

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 55

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50              55              60

```

```

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

```

```

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90              95

```

```

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

```

```

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

```

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 56

<211> 1344

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 56

caggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga gtggtgcagc ctggtagatc actgagactg	60
agctgcgctg ctagtggctt cacctttagc gtctacggaa tgaactgggt ccgacaggcc	120
cctgggaaag gcctggagtg ggtggcaatt atctggtagc acggcgataa tcagtactac	180
gccgatagcg tgaaggagcg gttcactatc tctagggata actctaagaa caccctgtac	240
ctgcagatga acggcctgag agccgaggac accgccgtct actactgcgc tagggacctg	300
agaaccggcc ctttcgacta ctggggacag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagcgccctt	360
actaagggcc caagcgtggt ccccttgccc cctagctcta agtctactag cggaggcacc	420
gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt cagctggaat	480
agcggcgctc tgactagcgg agtgacacacc ttccccgccg tgctgcagtc tagcggcctg	540

tatagcctgt ctagegctgt gaccgtgcct agctctagcc tgggcactca gacctatattc 600
 tgtaacgtga accacaagcc ctctaact aagggtggaca agcggttgga acctaatgtc 660
 tgcgataaga ctacacactg tcctccctgc cctgcccctg aggtgcccgg aggacctagc 720
 gtgttcctgt tcccacctaa gcctaaagac accctgatga tctctaggac ccccgaaagt 780
 acctgcgtgg tgggtggacgt ctacacagag gacctgaag tgaagtttaa ttggtacgtg 840
 gacggcgtgg aagtgcacaa cgctaagact aagcctagag aggaacagta taactctacc 900
 tatagggctg tcagcgtgct gacagtgtg caccaggact ggctgaacgg gaaagagtat 960
 aagtgtaaag tgtctaaca ggcctgcc gcccctatcg aaaagactat ctctaaggct 1020
 aaggggcagc ctagagaacc ccaagtgtgc actctgcccc ctagtagaga agagatgact 1080
 aagaatcagg tgtcactgag ctgtgccgtg aagggttct accctagcga tctgcctgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttctt ggtgagcaag ctgaccgtgg acaagtccag gtggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 tccctgagcc tgagccccgg caag 1344

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His

1

5

10

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 58

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1

5

<210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 59
 His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe Thr
 1 5

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 60
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
 1 5 10

<210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 61
 Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
 1 5

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 62

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 63

Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
1 5

<210> 64

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 64

Tyr Ala Ser
1

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 65

Ser Ser Ser Leu Pro Phe
1 5

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 66

Gln Ser Ile Gly Ser Ser
1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 67

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro
1 5 10

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 68

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 69

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 70

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 70

gagatcgtgc tgaccagtc acccgacttt cagtcagtgga cccctaaaga aaaagtgact 60
atcacctgta gggcctccca gtctatcggc tctagcctgc actggtatca gcagaagccc 120
gatcagtcac ctaagctgct gattaagtac gcctctcagt ccttttagcgg cgtgccctct 180
aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctatcaatag cctggaagcc 240
gaggacgccg ctgcctacta ctgtcatcag tcaagtagcc tgcccttcac cttcggcctt 300
ggcactaaaag tggatattaa g 321

<210> 71

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 71

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 72
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 72
 gagatcgtgc tgacccagtc acccgacttt cagtcagtga cccctaaaga aaaagtgact 60
 atcacctgta gggcctccca gtctatcggc tctagcctgc actggtatca gcagaagccc 120
 gatcagtcac ctaagctgct gattaagtac gcctctcagt ccttttagcgg cgtgccctct 180
 aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctatcaatag cctggaagcc 240
 gaggacgccg ctgcctacta ctgtcatcag tcaagtagcc tgcccttcac cttcggccct 300
 ggcactaaag tggatattaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
 ccccgaggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480
 gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac agggggcgagt gc 642

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 73
 Gly Gly Thr Phe Lys Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10

<210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 74

Asn	Ile	Ile	Pro	Met	Thr	Gly	Gln	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 75

Ala	Ala	Tyr	His	Pro	Leu	Val	Phe	Asp	Asn
1				5				10	

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 76

Ser	Tyr	Ala	Ile	Ser
1			5	

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 77

Asn	Ile	Ile	Pro	Met	Thr	Gly	Gln	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 78
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 78
 Ala Ala Tyr His Pro Leu Val Phe Asp Asn
 1 5 10

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 79
 Gly Gly Thr Phe Lys Ser Tyr
 1 5

<210> 80
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 80
 Ile Pro Met Thr Gly Gln
 1 5

<210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 81

Ala Ala Tyr His Pro Leu Val Phe Asp Asn
1 5 10

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 82

Gly Gly Thr Phe Lys Ser Tyr Ala
1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 83

Ile Ile Pro Met Thr Gly Gln Thr
1 5

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 84

Ala Arg Ala Ala Tyr His Pro Leu Val Phe Asp Asn
1 5 10

<210> 85

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 85

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

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

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

Gly Asn Ile Ile Pro Met Thr Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Ala Tyr His Pro Leu Val Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 86

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 86

gaggtgcagc tgggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaaac ccggctctag cgtgaaagtc 60

agctgtaaaag ctagtggcgg caccttcaag tcctacgcta ttagctgggt cagacaggcc 120

ccaggtcagg gcctggagtg gatgggcaat attatcccta tgaccggtca gacctactac 180

gctcagaaat ttcagggtag agtgactatc accgccgacg agtctactag caccgcctat 240

atggaactgt ctagcctgag atcagaggac accgccgtct actactgcgc tagagccgcc 300

tatcaccccc tgggtgttcga taactgggggt cagggcaccc tggtcaccgt gtctagc

357

<210> 87

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 87

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

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

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

Gly Asn Ile Ile Pro Met Thr Gly Gln Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Ala Tyr His Pro Leu Val Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

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

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 88

<211> 1347

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 88

gaggtgcagc tggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaaac ccggtctag cgtgaaagtc	60
agctgtaaag ctagtggcgg caccttcaag tcctacgcta ttagctgggt cagacaggcc	120
ccaggtcagg gcctggagtg gatgggcaat attatcccta tgaccggtca gacctactac	180
gctcagaaat ttcagggtag agtgactatc accgccgacg agtctactag caccgcctat	240
atggaactgt ctagcctgag atcagaggac accgccgtct actactgcgc tagagccgcc	300
tatcaccccc tggtgttcga taactgggggt cagggcaccc tggtcaccgt gtctagcgct	360
agcactaagg gcccctcagt gttccccctg gccctagct ctaagtctac tagcggcggc	420
accgccgctc tgggctgcct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcatgg	480
aatagcggcg ctctgactag cggagtgcac accttccccg ccgtgctgca gtctagcggc	540
ctgtatagcc tgtctagcgt ggtgaccgtg cctagctcta gcctgggcac tcagacctac	600
atctgtaacg tgaaccacaa gccctctaac actaaggtgg acaagcgggt ggaacctaac	660

```

tcctgcgata agactcacac ctgtccccc tgccctgccc ctgaggctgc cggaggacct      720
agcgtgttcc tgttcccacc taagcctaag gacaccctga tgatctctag gacccccgaa      780
gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtctcac gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac      840
gtggacggcg tggaagtgca caacgctaag actaagccta gagaggaaca gtataactcc      900
acctatagag tgggtgtcagt gctgaccctg ctgcatcagg actggctgaa cggcaaagag      960
tataagtgta aagtctctaa caaggccctg ccagccccta tcgaaaagac tatctctaag     1020
gctaagggcc agcctagaga acctcaggtg tacaccctgc ccccctgtag agaagagatg     1080
actaagaatc aggtgtccct gtggtgtctg gtgaaaggct tctaccctag cgatatcgcc     1140
gtggaatggg agtctaacgg ccagcccgag aacaactata agactacccc ccctgtgctg     1200
gatagcgacg gctcattctt cctgtactct aagctgaccg tggacaagtc taggtggcag     1260
cagggcaatg tgtttagctg tagcgtgatg cacgaggccc tgcataatca ctacactcag     1320
aagtcactga gcctgagccc cggcaag                                           1347

```

<210> 89

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 89

```

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His Tyr Val Asn
1           5           10

```

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 90

```

Arg Asn Asn His Arg Pro Ser
1           5

```

<210> 91

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 91
 Gln Ser Trp Asp Tyr Ser Gly Phe Ser Thr Val
 1 5 10

<210> 92
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 92
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 93
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 93
 Arg Asn Asn His Arg Pro Ser
 1 5

<210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 94
 Gln Ser Trp Asp Tyr Ser Gly Phe Ser Thr Val
 1 5 10

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 95
 Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His Tyr
 1 5

<210> 96
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 96
 Arg Asn Asn
 1

<210> 97
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 97
 Trp Asp Tyr Ser Gly Phe Ser Thr
 1 5

<210> 98
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 98
 Ser Ser Asn Ile Gly Asn His Tyr

1

5

<210> 99
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 99
 Arg Asn Asn
 1

<210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 100
 Gln Ser Trp Asp Tyr Ser Gly Phe Ser Thr Val
 1 5 10

<210> 101
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 101
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His
 20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln	
65 70 75 80	

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Tyr Ser Gly	
85 90 95	

Phe Ser Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
100 105 110	


```
<210> 102
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 102
gatatcgtcc tgactcagcc ccctagcgtc agcggcgctc ccggtcagag agtgactatt      60
agctgtagcg gctctagctc taatatcggg aatcactacg tgaactggta tcagcagctg      120
cccggcaccg cccctaagct gctgatctat agaaacaatc accggcctag cggcgtgccc      180
gataggttta gcggatctaa gtcaggcact agcgctagtc tggctatcac cggaactgcag      240
tcagaggacg aggccgacta ctactgtcag tcctgggact atagcggctt tagcaccgtg      300
ttcggcggag gcactaagct gaccgtgctg                                     330


<210> 103
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 103
Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1           5           10          15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn His
20          25          30
```

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

Ile Tyr Arg Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Tyr Ser Gly
 85 90 95

Phe Ser Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 104

<211> 648

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

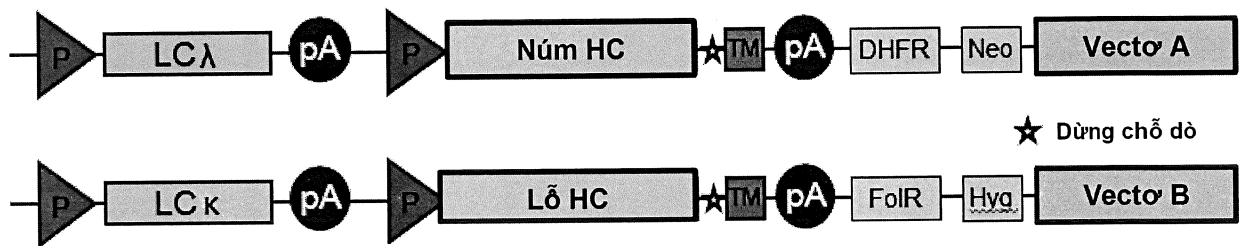
<220>

<221> nguồn

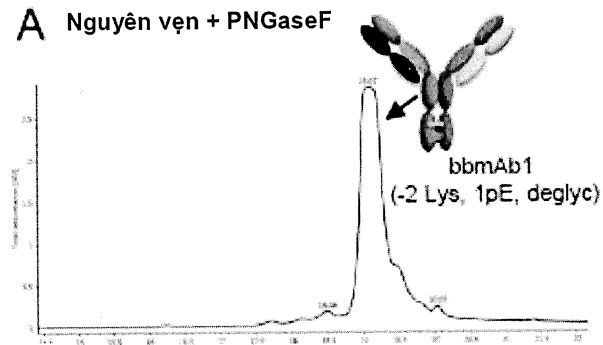
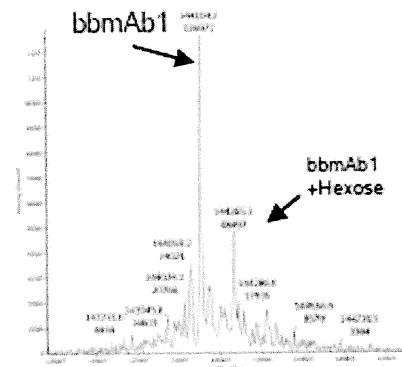
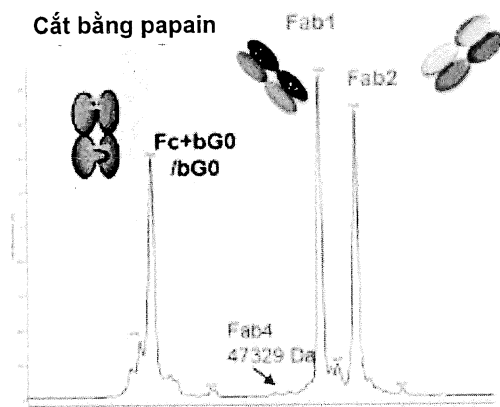
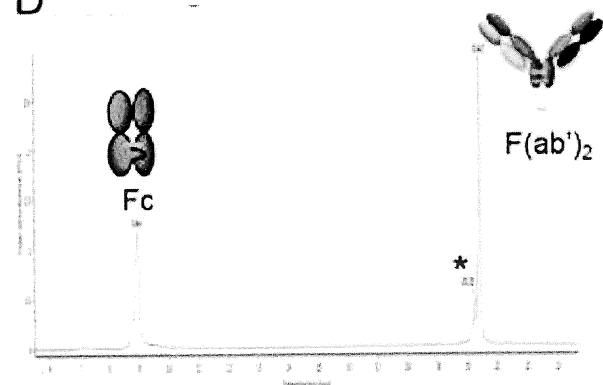
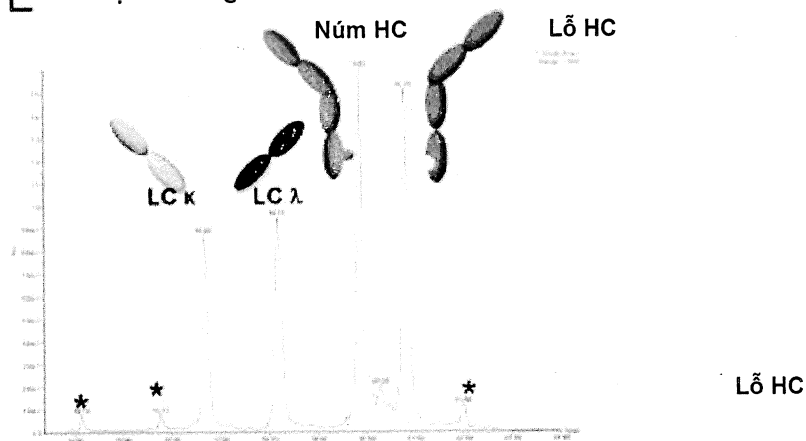
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 104

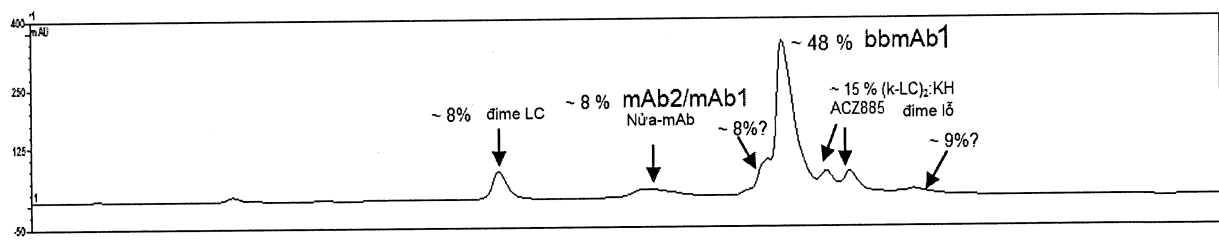
gatatcgtcc tgactcagcc ccctagcgctc agcggcgctc ccggtcagag agtgactatt	60
agctgtagcg gctctagctc taatatcggc aatcactacg tgaactggta tcagcagctg	120
cccggcaccg cccctaagct gctgatctat agaaacaatc accggcctag cggcgtgccc	180
gataggttta gcggatctaa gtcaggcact agcgctagtc tggctatcac cggactgcag	240
tcagaggacg aggccgacta ctactgtcag tcctgggact atagcggctt tagcaccgtg	300
ttcggcggag gcactaagct gaccgtgctg ggtcagccta aggctgcccc cagcgtgacc	360
ctgttcccc ccagcagcga ggagctgcag gccacaagg ccaccctggt gtgcctgac	420
agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgatgaag	480
gccggcgtgg agaccaccac cccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc	540
tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc	600
cacgagggca gcaccgtgga aaagaccgtg gcccacaaccg agtgcagc	648



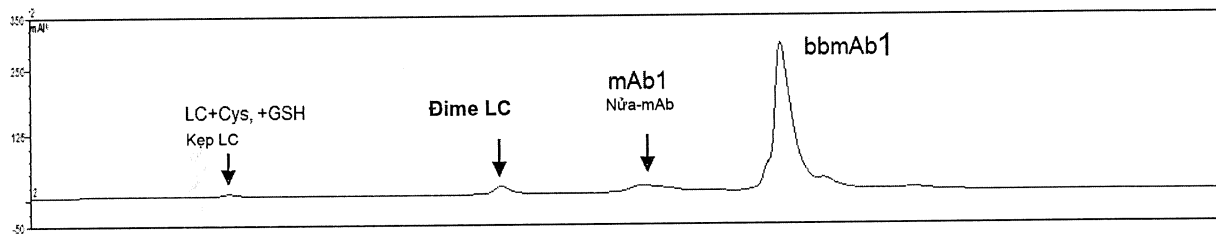
HÌNH 1

A Nguyên vẹn + PNGaseF**HÌNH 2A****B** MS**HÌNH 2B****C** Cắt bằng papain**HÌNH 2C****D** Cắt bằng IdeS**HÌNH 2D****E** Bị khử bằng DTT + PNGaseF**HÌNH 2E**

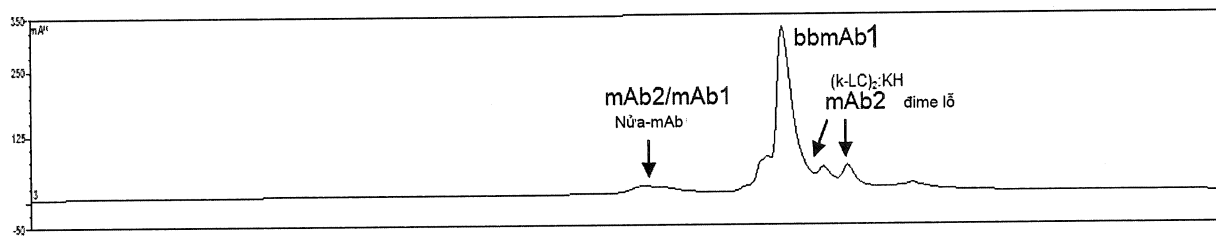
* sự giả tạo kẹp



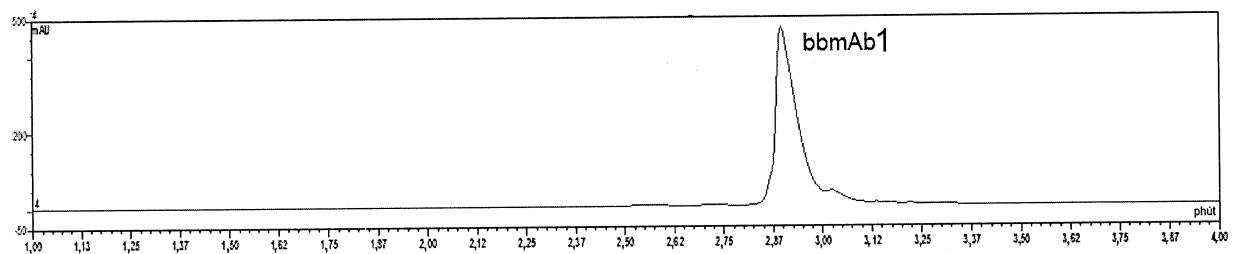
HÌNH 3A



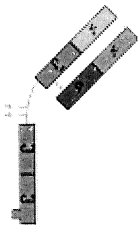
HÌNH 3B



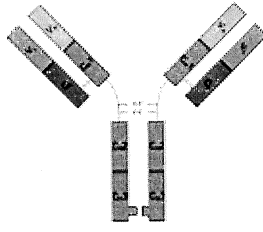
HÌNH 3C



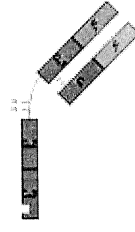
HÌNH 3D



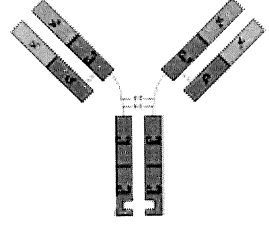
HÌNH 4A



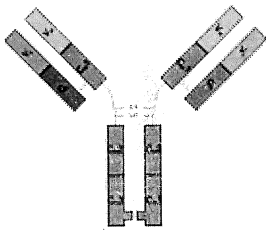
HÌNH 4B



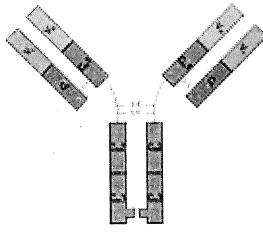
HÌNH 4C



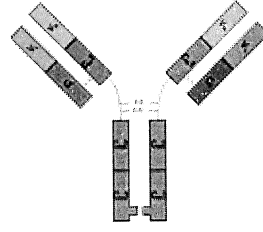
HÌNH 4D



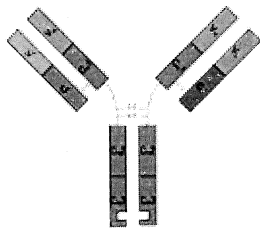
HÌNH 4E



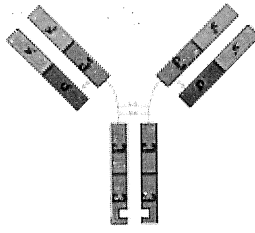
HÌNH 4F



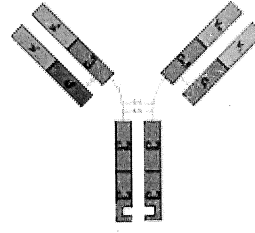
HÌNH 4G



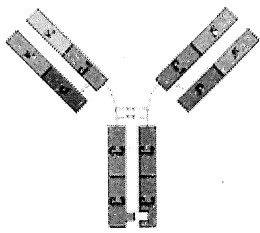
HÌNH 4H



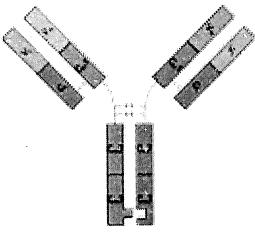
HÌNH 4I



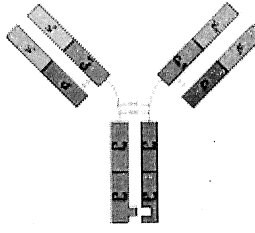
HÌNH 4J



HÌNH 4K



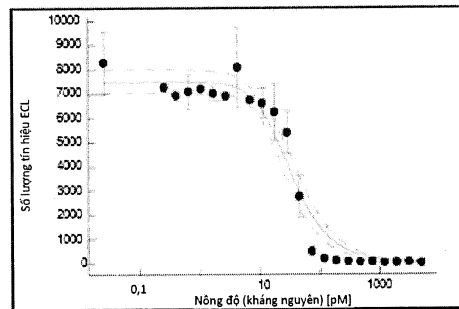
HÌNH 4L



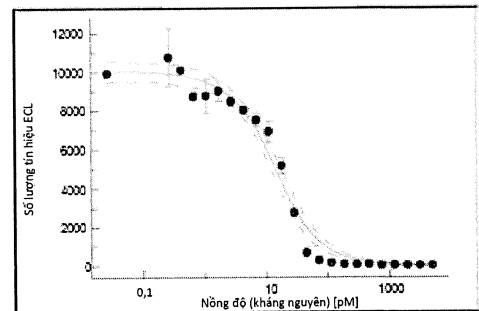
HÌNH 4M

huL-18

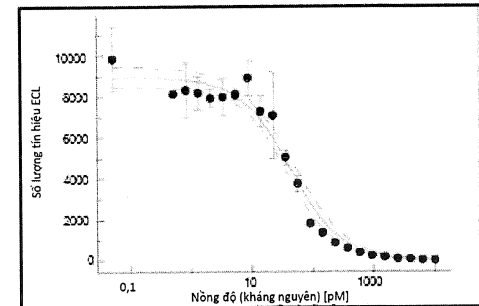
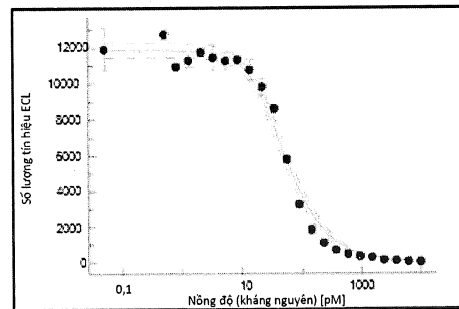
mAb1



bbmAb1

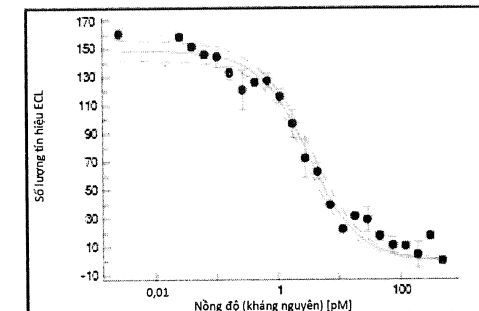
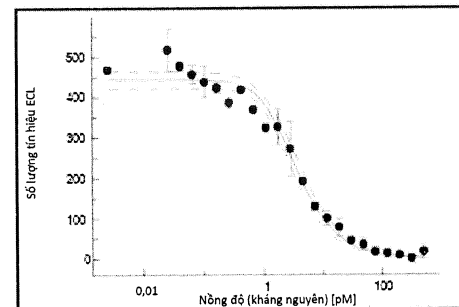


marL-18

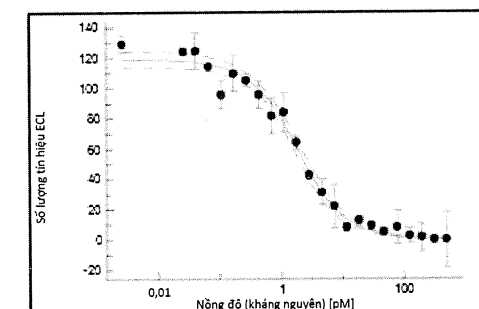
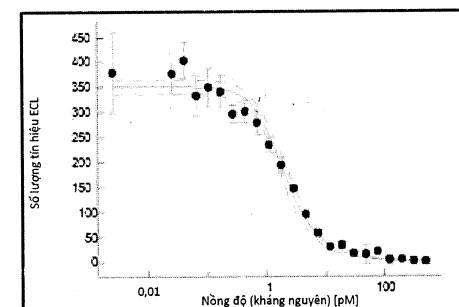


mAb2

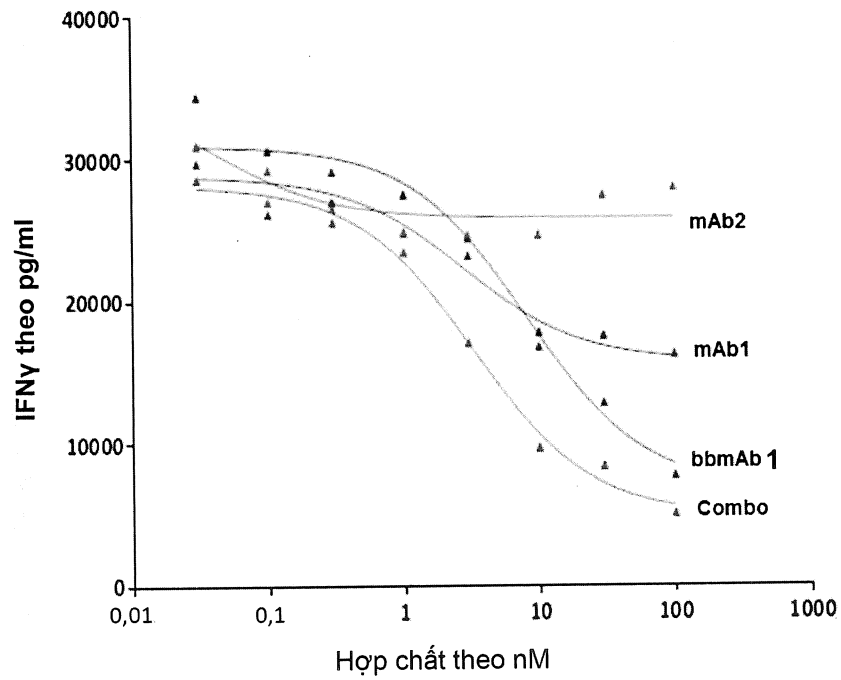
huL-1 β



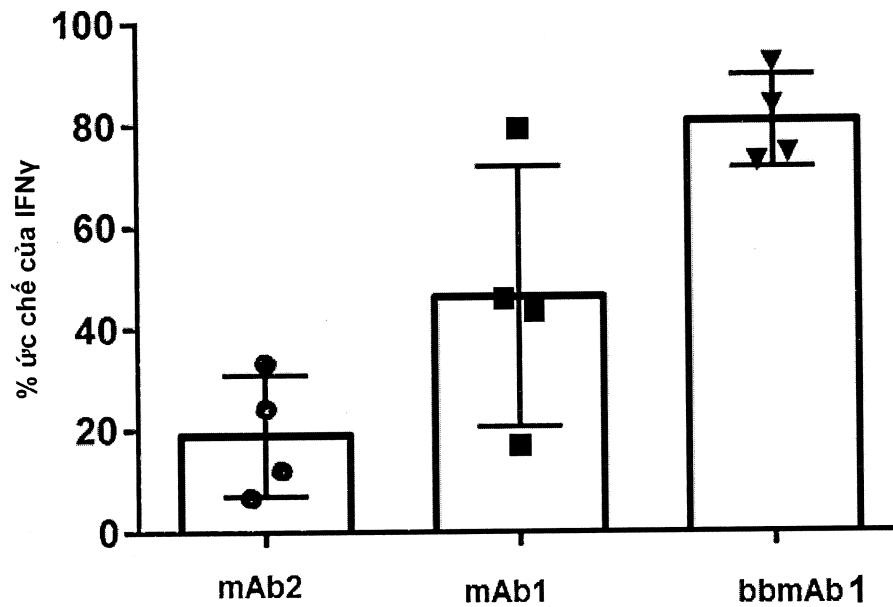
marL-1 β



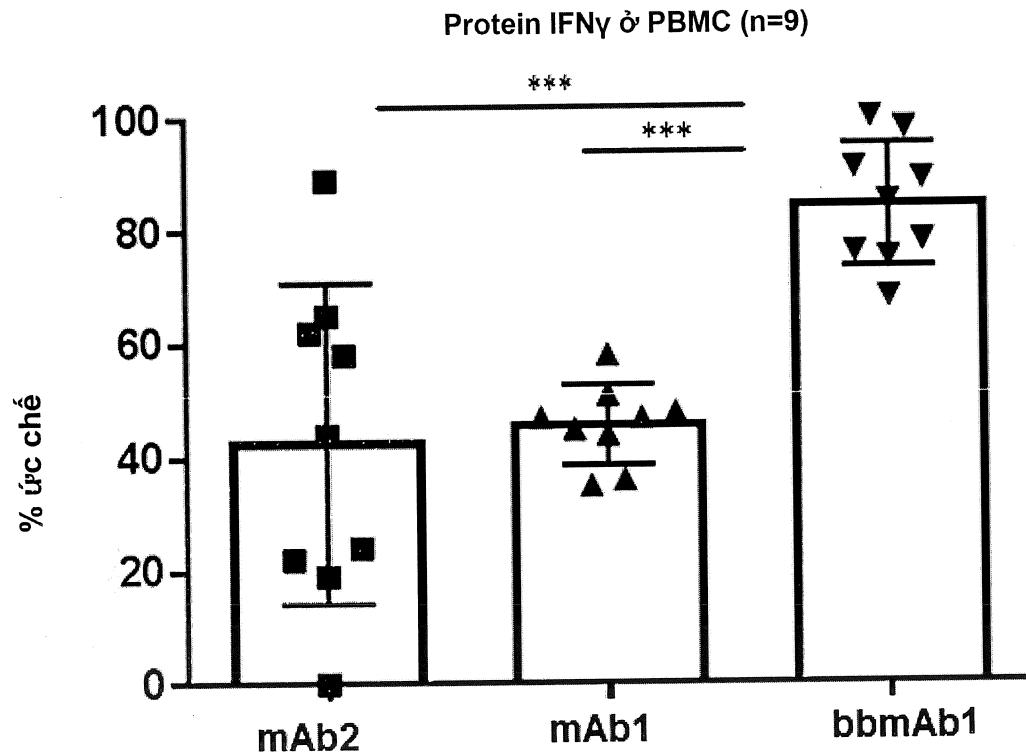
HÌNH 5

Máu toàn phần protein IFN γ (ví dụ)

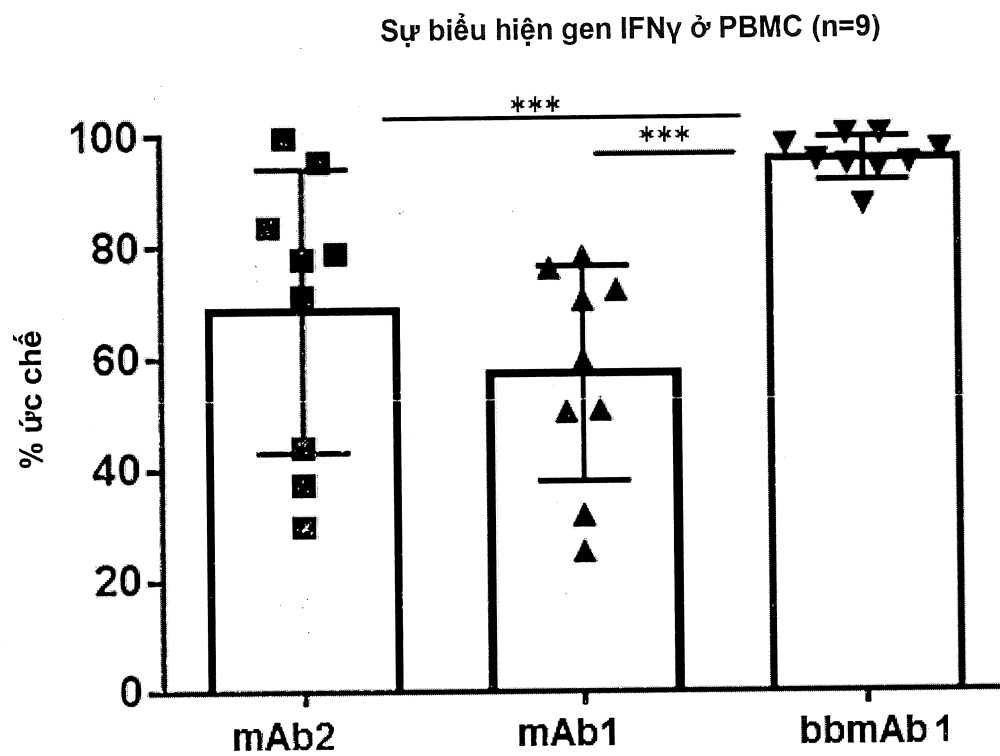
HÌNH 6A

Máu toàn phần protein IFN γ (n=4)

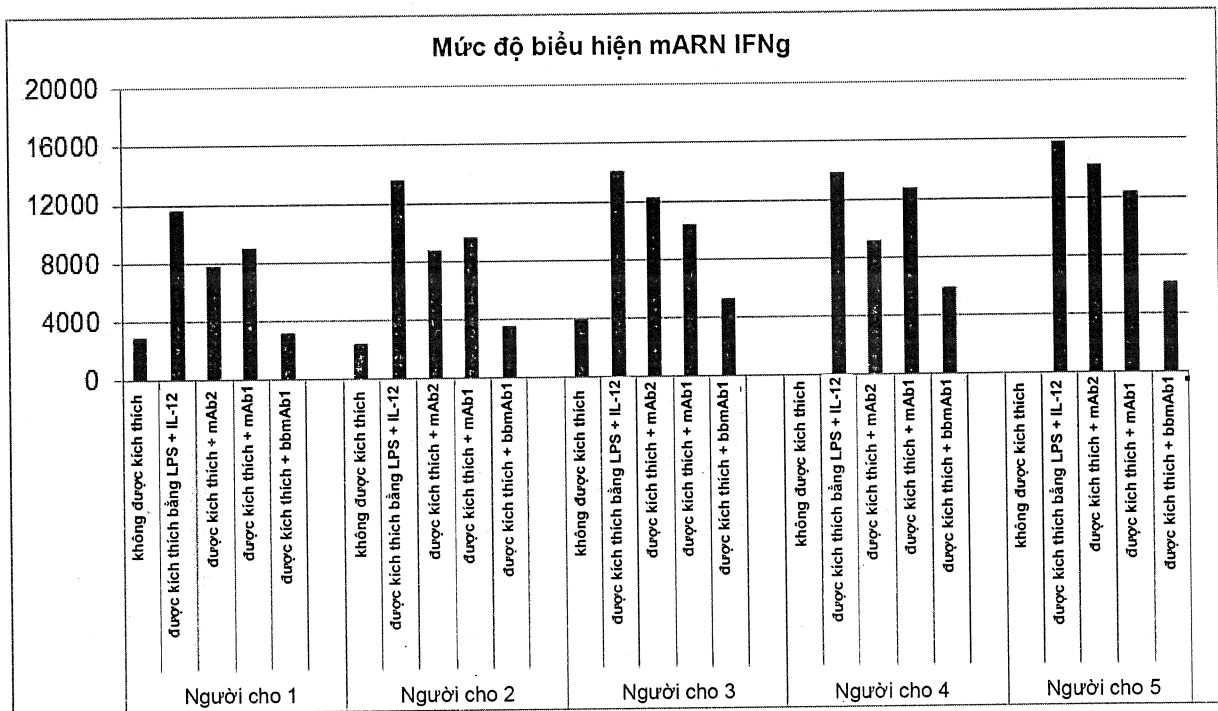
HÌNH 6B



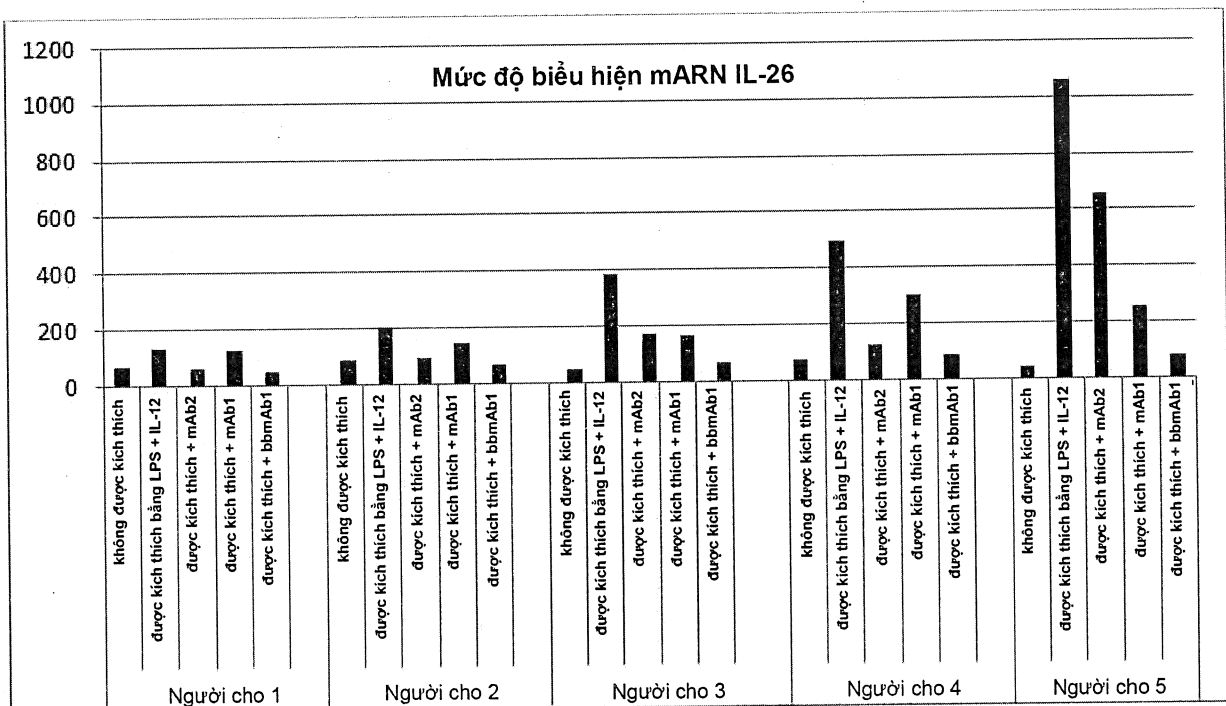
HÌNH 7A



HÌNH 7B

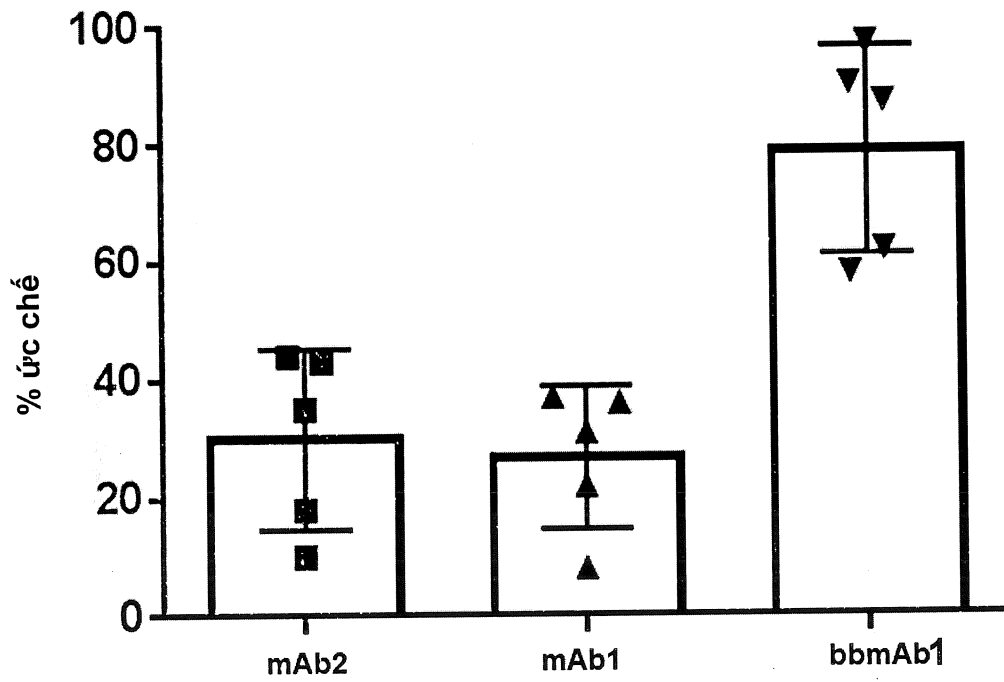


HÌNH 8A



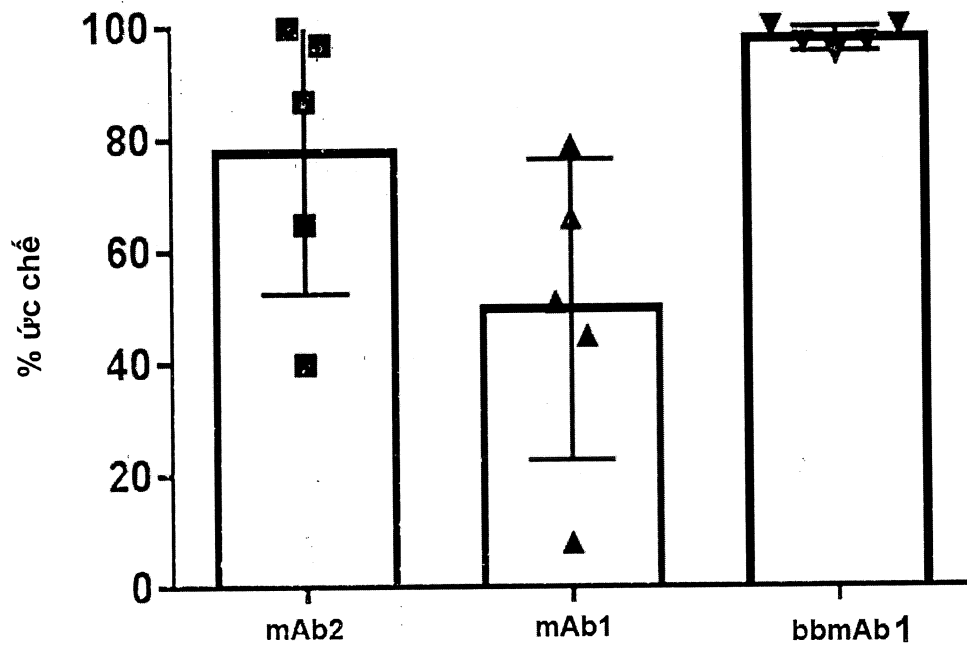
HÌNH 8B

Sự biểu hiện gen IFN γ ở PBMC (n=5)



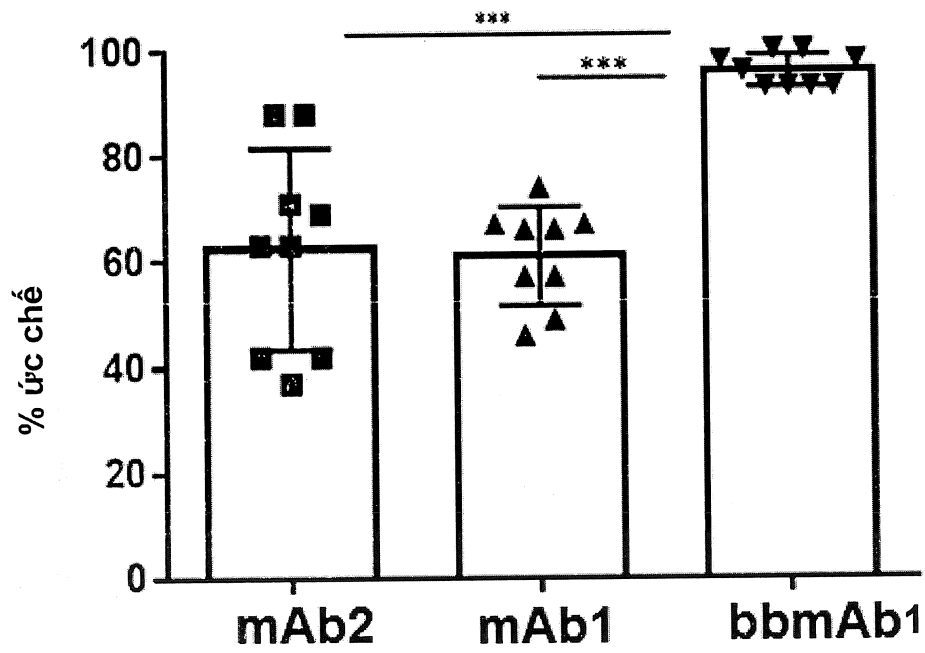
HÌNH 9A

Sự biểu hiện gen IL-26 ở PBMC (n=5)



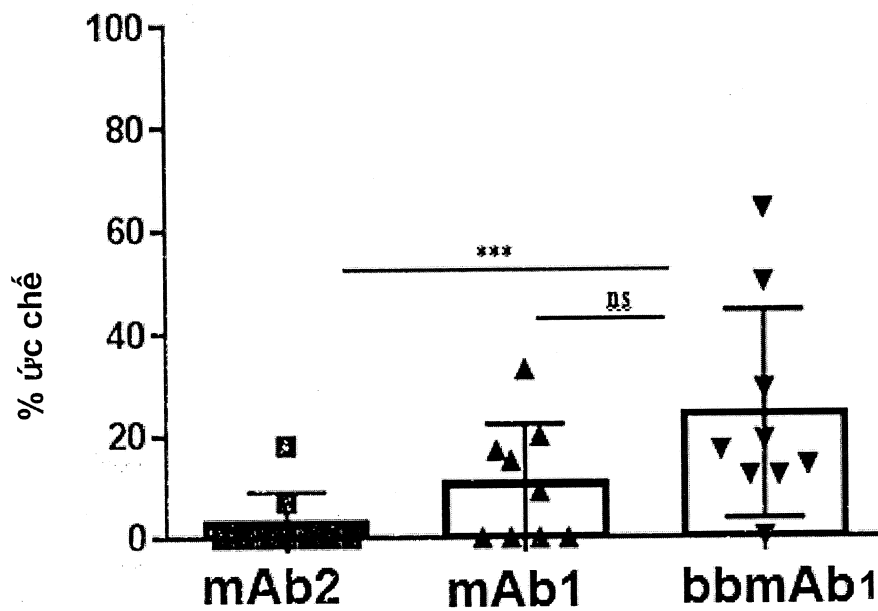
HÌNH 9B

Sự biểu hiện gen IL-26 ở PBMC (n=9)

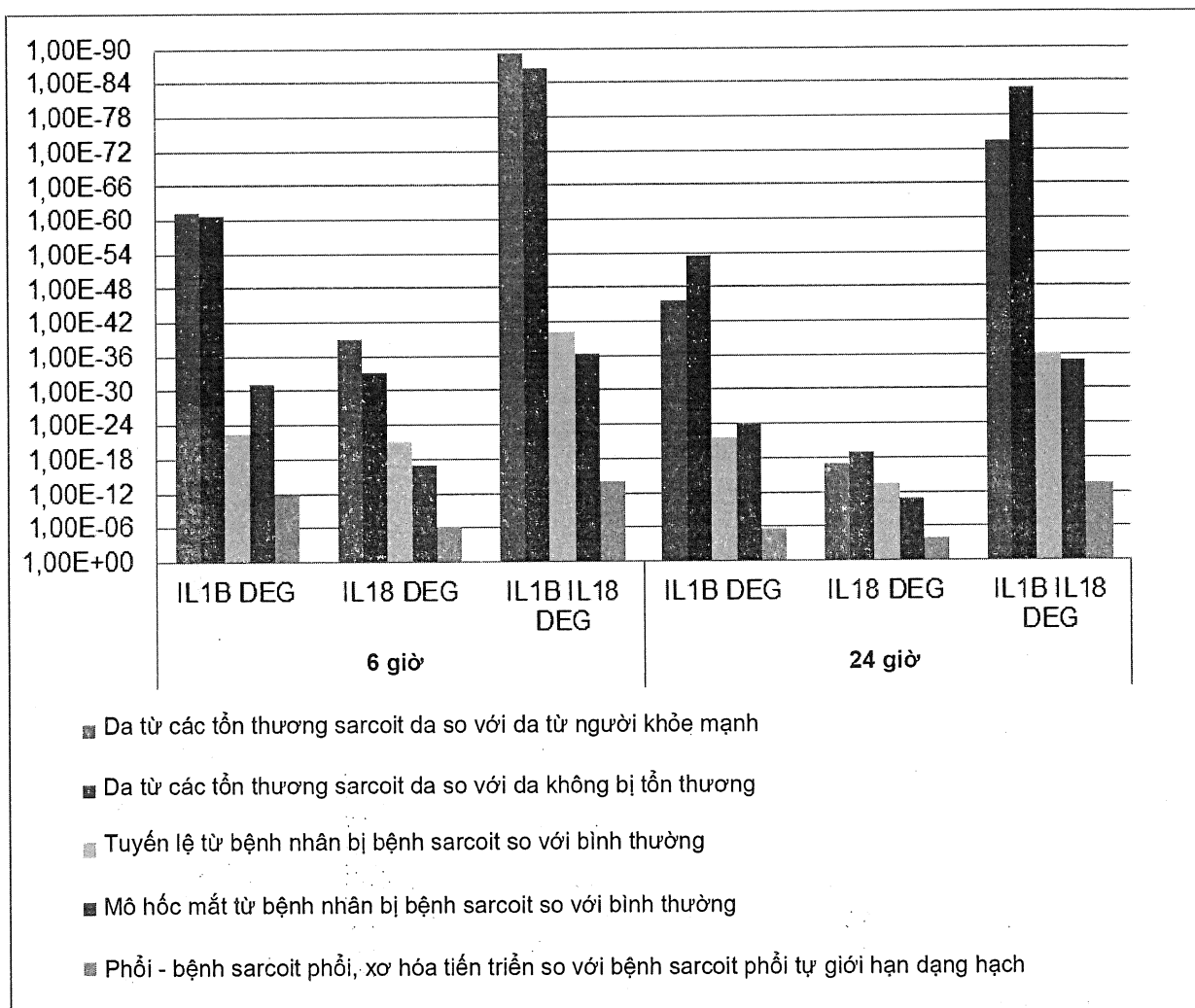


HÌNH 10A

Protein IL-26 ở PBMC (n=9)



HÌNH 10B



HÌNH 11