



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

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

(11)



1-0041632

(51)^{2020.01} C07K 16/28; C12N 15/13; A61K
39/395; A61P 37/02

(13) B

- (21) 1-2021-01445 (22) 23/08/2019
(86) PCT/CN2019/102169 23/08/2019 (87) WO2020/038454 27/02/2020
(30) 201810971269.2 24/08/2018 CN; 201811472752.2 04/12/2018 CN; 201910221311.3
22/03/2019 CN; 201910401923.0 15/05/2019 CN
(45) 25/11/2024 440 (43) 25/06/2021 399
(73) 1. JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)
No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone,
Lianyungang, Jiangsu 222047, China
2. SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)
No.279 Wenjing Road, Minhang District, Shanghai, 200245, China
(72) LIAO, Cheng (US); XU, Zupeng (CN); JIANG, Jiahua (US); ZHANG, Lianshan
(US); QIAN, Xueming (CN); TENG, Fei (CN).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG IL-4R CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (I) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; hoặc (II) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13; và/hoặc, vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (I) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8; hoặc (II) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO. 15 và SEQ ID NO.16; hoặc (III) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.40; hoặc (IV) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.42, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.8; polynucleotit mã hóa kháng thể này; vector chứa polynucleotit này; tế bào vật chủ chứa vector này; thuốc thử chứa kháng thể này; dược phẩm chứa kháng thể này; và phương pháp sản xuất kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với IL-4R của người, và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể thể khảm hoặc kháng thể nhân tạo chứa vùng CDR từ kháng thể nêu trên, và được phẩm chứa kháng thể gắn kết với IL-4R của người này, và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh dị ứng là một tình trạng bệnh lý nghiêm trọng, bao gồm: các phản ứng dị ứng không đe dọa đến tính mạng, có thể chữa khỏi trong một khoảng thời gian; và các bệnh dị ứng đe dọa tính mạng.

Các phương pháp hiện tại để điều trị dị ứng bao gồm tránh các chất gây dị ứng, điều trị bằng dược lý cho các triệu chứng và phòng ngừa bằng liệu pháp miễn dịch đặc hiệu với chất gây dị ứng.

Interleukin-4 (IL-4, còn được gọi là yếu tố kích thích tế bào B hoặc BSF- 1) được đặc trưng cho khả năng kích thích tăng sinh tế bào B để đáp ứng với nồng độ thấp của kháng thể globulin miễn dịch kháng bề mặt. IL-4 đã được chứng minh là có nhiều hoạt tính sinh học, bao gồm kích thích sự phát triển của tế bào T, tế bào mast, bạch cầu hạt, tế bào nhân khổng lồ và tế bào hồng cầu, v.v. IL-4 gây ra sự biểu hiện của MHC-II trong tế bào B đang không hoạt động, và tăng cường tiết globulin miễn dịch IgE và IgG1 bởi các tế bào B được hoạt hóa.

Hoạt tính sinh học của IL-4 được điều hòa bởi các thụ thể IL-4 trên bề mặt tế bào cụ thể (IL-4R). Thụ thể IL-4 (IL-4R) bao gồm 802 gốc axit amin, và IL-4R được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T, tế bào B, tế bào tuyến giáp, tế bào tủy xương, đại thực bào và tế bào mast. Chuỗi α của IL-4R cũng là thành phần của thụ thể IL-13 (IL-13R), vì vậy IL-4R cũng có thể điều hòa hoạt tính sinh học của IL-13. Theo phương pháp điều trị mới, thuốc hoặc chế phẩm chứa chất đối kháng IL-4R có thể được sử dụng cho đối tượng, trước, trong hoặc sau khi đối tượng tiếp xúc với chất gây dị ứng hoặc có các triệu chứng dị ứng.

Hiện nay, nhiều công ty dược phẩm ở các quốc gia khác nhau đang phát triển các kháng thể đơn dòng kháng IL-4R để điều trị các bệnh dị ứng liên quan khác nhau. Các đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế liên quan bao gồm, ví dụ, WO2010053751, WO2001092340, WO2008054606, WO2014031610, v.v. Trong số đó, dupilumab, là thuốc điều trị bệnh hen phế quản được phát triển bởi Sanofi Regeneron, đã được chấp thuận để lưu hành trên thị trường để điều trị bệnh viêm da. Đối với các chỉ định điều trị bệnh hen phế quản, các thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III cũng đã được hoàn thành và bước vào giai đoạn được chấp thuận để lưu hành trên thị trường.

Các phương pháp điều trị hiện tại không hiệu quả hoặc có nguy cơ lớn hơn. Do đó, vẫn có nhu cầu kháng thể gắn kết với IL-4R của người với độ chọn lọc và hoạt tính sinh học cao, để sử dụng làm thuốc và dược phẩm, cũng như phương pháp điều trị có thể điều trị bệnh dị ứng qua trung gian IL-4R bằng cách gắn kết với IL-4R của người có ái lực cao và trung hòa hoạt tính sinh học của IL-4R (bao gồm phong bế tương tác với IL-4R).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với IL-4R (còn được gọi là kháng thể gắn kết với IL-4R của người, kháng thể kháng IL-4R của người) hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

(I) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; hoặc các biến thể HCDR với 3, 2 hoặc 1 khác biệt axit amin khi so với HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, 4 và 5, tương ứng; hoặc

(II) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13, tương ứng; hoặc HCDR các biến thể với 3, 2 hoặc 1 khác biệt axit amin khi so với HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13;

và/hoặc, vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

(I) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8; hoặc các biến thể LCDR với 3, 2 hoặc 1 khác biệt axit

amin khi so với LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.6, 7 và 8; hoặc

(II) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16; hoặc các biến thể LCDR với 3, 2 hoặc 1 khác biệt axit amin khi so với LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16; hoặc

(III) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trên SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.40; hoặc các biến thể LCDR với 3, 2 hoặc 1 khác biệt axit amin khi so với LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.40; hoặc

(IV) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trên SEQ ID NO.42, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.8; hoặc các biến thể LCDR với 3, 2 hoặc 1 khác biệt axit amin khi so với LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.42, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.8.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Trong mô hình chuột nhất bị bệnh viêm da, sau khi được miễn cảm bằng axeton, các kháng thể nhân tạo hu25G7-A, hu25G7-B và kháng thể đối chứng dương dupilumab được tiêm dưới da hai lần mỗi tuần, chiều dày tai của chuột nhất được đo vào ngày 27. Kết quả cho thấy rằng, so với nhóm đối chứng, hu25G7-A, hu25G7-B và dupilumab có thể làm giảm chiều dày tai của chuột nhất một cách hiệu quả, và hu25G7-B cho thấy hiệu quả tốt hơn so với dupilumab.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa đoạn bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm (I) đến (IV) sau:

(I) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8;

(II) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16;

(III) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.40; và

(IV) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.42, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.8.

Theo một số phương án của kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.1 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.1; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.9 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.9; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.43 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.43; và/hoặc,

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.2 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.2; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.10 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.10; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.37 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.37; hoặc

(IV) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.41 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.41.

Theo ít nhất một phương án của kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.2; hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.10; hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.43, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.37; hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.43, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.41.

Theo một số phương án của kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.25-SEQ ID NO.27 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với một trong các SEQ ID NO.25-SEQ ID NO.27; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.31-SEQ ID NO.33 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với một trong các SEQ ID NO.31-SEQ ID NO.33;

và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.28-SEQ ID NO.30 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với một trong các SEQ ID NO.28-SEQ ID NO.30; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.34-SEQ ID NO.36 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với một trong các SEQ ID NO.34-SEQ ID NO.36.

Theo một số phương án cụ thể, vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.25-SEQ ID NO.27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.28-SEQ ID NO.30.

Theo các phương án cụ thể khác, vùng biến đổi chuỗi nặng là như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.31-SEQ ID NO.33, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.34-SEQ ID NO.36.

Theo một số phương án, chuỗi nặng của kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.17 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.17; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.19 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.19; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.44.

Theo một số phương án, chuỗi nhẹ của kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.18 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.18; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.20 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.20; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.45 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.45; hoặc

(IV) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.46 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.46.

Theo ít nhất một phương án, chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.17 và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.18.

Theo một phương án khác, chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.19 và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.20.

Theo một phương án khác, chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.45.

Theo một phương án khác, chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.46.

Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể của chuột nhắt, kháng thể thể khảm, kháng thể của người, kháng thể nhân tạo hoặc mảnh của chúng.

Theo một số phương án cụ thể, kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể nhân tạo.

Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa mảnh hoặc tổ hợp của chúng được chọn từ nhóm bao gồm:

- trình tự vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01;

- trình tự đột biến ngược có độ tương đồng ít nhất bằng 95% so với vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01. Theo một số phương án cụ thể, đột biến ngược này là đột biến bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm L46P, L47W và F71Y, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa mảnh hoặc tổ hợp của chúng được chọn từ nhóm bao gồm:

- trình tự vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01;

- trình tự đột biến ngược có độ tương đồng ít nhất bằng 95% so với vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01. Theo một số phương án cụ thể, đột biến ngược này là đột biến bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm S49A, F67S và A93T, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa mảnh hoặc tổ hợp của chúng được chọn từ nhóm bao gồm:

- trình tự vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV2D-29*01;

- trình tự đột biến ngược có độ tương đồng ít nhất bằng 95% so với vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV2D-29*01. Theo một số phương án cụ thể, đột biến ngược này được chọn từ nhóm bao gồm M4L và/hoặc V58I.

Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn chứa mảnh hoặc tổ hợp của chúng được chọn từ nhóm bao gồm:

- trình tự vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV1-2*02;

- trình tự đột biến ngược có độ tương đồng ít nhất bằng 95% so với vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV1-2*02. Theo một số phương án cụ thể, đột biến ngược này là đột biến bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm M69L, R71I, T73K và R94K, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng khung chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc các biến thể của chúng. Theo một số phương án cụ thể, vùng biến đổi chuỗi nặng chứa vùng khung chuỗi nặng của IgG1 của người hoặc các biến thể của chúng, ví dụ vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.43 hoặc biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.43.

Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các vùng hằng định của chuỗi κ , λ hoặc các biến thể của chúng, ví dụ vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 hoặc biến thể của vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.44.

Theo một số phương án, kháng thể IL-4R nhân tạo hoặc mảnh của nó như nêu trên còn chứa các vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc các biến thể của chúng.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể bao gồm các vùng hằng định chuỗi nặng của IgG2 hoặc IgG4 của người. IgG2 hoặc IgG4 không có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể. Theo cách khác, IgG1 không có hoạt tính gây

độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể sau khi gây đột biến axit amin có thể được sử dụng.

Theo ít nhất một phương án, biến thể bao gồm các đột biến vùng hằng định chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: các đột biến làm giảm hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, hoặc làm tổn thất hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở N297A, L234A, L235A trong IgG1.

Theo một số phương án của kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân tạo, và trình tự chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.17 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.17; trình tự chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.18 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.18.

Theo một số phương án của kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân tạo, và trình tự chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.19 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.19; trình tự chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.20 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.20.

Theo một số phương án của kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân tạo, và trình tự chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.44; trình tự chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.45 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.45.

Theo một số phương án của kháng thể kháng IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân tạo, và trình tự chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.44; trình tự chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO.46 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.46.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ kháng thể này cạnh tranh

gắn kết với IL-4R của người với kháng thể gắn kết với IL-4R của người bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể chuỗi đơn chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến polynucleotit, mã hoá kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit, mã hoá kháng thể cạnh tranh gắn kết với IL-4R hoặc epitop của nó với kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit, trong đó polynucleotit này mã hoá kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể đa đặc hiệu, hoặc kháng thể chuỗi đơn nêu trên.

Theo một số phương án, polynucleotit theo sáng chế là ADN hoặc ARN.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vector chứa polynucleotit nêu trên, trong đó vector này là vector biểu hiện sinh vật nhân thật, vector biểu hiện sinh vật nhân sơ hoặc vector virus.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ, trong đó tế bào vật chủ này được biến nạp bằng vector nêu trên, và tế bào vật chủ này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thật.

Theo ít nhất một phương án, tế bào nhân sơ được chọn từ vi khuẩn, như *E. coli*.

Theo ít nhất một phương án, tế bào nhân thật được chọn từ nhóm bao gồm tế bào nấm men và tế bào động vật có vú, như *Pichia pastoris* hoặc tế bào CHO.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phát hiện hoặc đo IL-4R, bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với kháng thể kháng IL-4R nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến thuốc thử để phát hiện hoặc đo IL-4R của người, và thuốc thử này chứa kháng thể kháng IL-4R nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến thuốc thử để phát hiện hoặc đo IL-4R của người chứa kháng thể cạnh tranh gắn kết với IL-4R hoặc epitop của nó với kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến thuốc thử để phát hiện hoặc đo IL-4R của người chứa kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể đa đặc hiệu, và kháng thể chuỗi đơn nêu trên.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm chẩn đoán để chẩn đoán bệnh liên quan đến tế bào biểu hiện IL-4R của người, chứa kháng thể kháng IL-4R nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Theo một phương án khác, chế phẩm chẩn đoán này chứa kháng thể cạnh tranh gắn kết với IL-4R hoặc epitop của nó với kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể gắn kết với IL-4R của người theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Theo một số phương án cụ thể, liều đơn vị của dược phẩm chứa kháng thể IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế ở lượng nằm trong khoảng từ 1mg đến 1000mg.

Theo một số phương án cụ thể, nồng độ của kháng thể IL-4R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm nằm trong khoảng từ 1mg/L đến 1000mg/L.

Theo một số phương án cụ thể, dược phẩm chứa dung dịch đậm, nồng độ của dung dịch đậm này nằm trong khoảng từ 1mM đến 1000 mM.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng kháng thể gắn kết với IL-4R của người nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sản xuất thuốc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh qua trung gian IL-4R.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng được phẩm nêu trên để sản xuất thuốc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh qua trung gian IL-4R.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với IL-4R nêu trên của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến được phẩm nêu trên để sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh .

Theo sáng chế, tình trạng bệnh hoặc bệnh có thể là bệnh hoặc tình trạng miễn dịch.

Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh hen phế quản, bệnh polyp mũi, bệnh viêm xoang mãn tính, bệnh da dị ứng, bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ái toan, bệnh tắc nghẽn phổi mãn tính, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm khớp, bệnh viêm, phản ứng dị ứng, hội chứng tăng sinh bạch huyết tự miễn, bệnh thiếu máu tan máu tự miễn, Barrett thực quản, bệnh viêm màng mạch nhỏ tự miễn, bệnh lao và bệnh thận.

Theo ít nhất một phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh này là bệnh hen phế quản. Theo một phương án khác, bệnh hoặc tình trạng bệnh này là bệnh da dị ứng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với IL-4R của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên này là mảnh Fab, mảnh Fv, mảnh scFv hoặc mảnh $F(ab')_2$.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng qua trung gian IL-4R, bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng) cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu điều trị bệnh (hoặc lượng hữu hiệu phòng ngừa bệnh) của kháng thể gắn kết với IL-4R của người nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng qua trung gian IL-4R, bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng) cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu điều trị bệnh (hoặc lượng hữu hiệu phòng ngừa bệnh) của

được phẩm nêu trên. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh miễn dịch, bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng) cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu điều trị bệnh (hoặc lượng hữu hiệu phòng ngừa bệnh) của kháng thể gắn kết với IL-4R của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm nêu trên.

Thuật ngữ

Để mô tả chi tiết hơn sáng chế, một số thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được thể hiện cụ thể dưới đây. Trừ khi có quy định khác, toàn bộ các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học khác được sử dụng trong sáng chế có nghĩa thông thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “IL-4R của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thụ thể xytokin của người gắn kết đặc hiệu với interleukin-4 (IL-4), IL-4R α .

Mã một ký tự và mã ba ký tự được sử dụng trong sáng chế để mô tả các axit amin được mô tả trong J. Biol. Chem, 243, (1968) p3558.

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ globulin miễn dịch, là cấu trúc chuỗi bốn peptit được hình thành bằng cách liên kết hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống hệt nhau bằng liên kết disulfua giữa các chuỗi. Các vùng hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch khác nhau thể hiện các thành phần axit amin và sự sắp xếp trình tự khác nhau, do đó thể hiện tính kháng nguyên khác nhau. Theo đó, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm loại (hoặc được gọi là các isotyp globulin miễn dịch), đó là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, các chuỗi nặng của chúng tương ứng là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ . Theo thành phần axit amin của vùng bản lề cũng như số lượng và vị trí của các liên kết disulfua chuỗi nặng, cùng một loại Ig có thể được chia thành các typ phụ khác nhau; ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Chuỗi nhẹ có thể được chia thành chuỗi κ hoặc λ , xét các vùng hằng định khác nhau. Mỗi trong số năm Ig có thể có chuỗi κ hoặc λ .

Chuỗi nhẹ kháng thể còn chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ, vùng này bao gồm chuỗi λ , λ của người hoặc chuột nhắt hoặc các biến thể của chúng.

Chuỗi nặng kháng thể còn chứa vùng hằng định chuỗi nặng chứa IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người hoặc chuột nhắt hoặc các biến thể của chúng.

Gần đầu tận cùng N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự gồm khoảng 110 axit amin thay đổi phần lớn, được gọi là vùng biến đổi (vùng V); phần còn lại của trình tự axit amin gần đầu cuối C là tương đối ổn định, được gọi là vùng hằng định (vùng C). Vùng biến đổi bao gồm ba vùng siêu biến (HVR) và bốn vùng khung (FR) có trình tự tương đối được bảo tồn. Ba vùng siêu biến đôi xác định độ đặc hiệu của kháng thể, còn được gọi là vùng xác định tính bổ trợ (CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) bao gồm ba CDR và bốn FR, với thứ tự từ đầu cuối amin đến đầu cuối carboxyl là: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3; ba CDR chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3.

Kháng thể bao gồm kháng thể của chuột nhắt, kháng thể thể khảm, kháng thể nhân tạo, và kháng thể của người, có thể thu được bằng cách tái tổ hợp, ví dụ có thể là kháng thể tái tổ hợp của người thu được bằng quá trình trưởng thành ái lực.

Thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các kháng thể của người được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương pháp tái tổ hợp và các kỹ thuật và phương pháp liên quan đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này, như: (1) các kháng thể được phân lập từ động vật chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể globulin miễn dịch của người - động vật chuyển gen nhiễm sắc thể (ví dụ chuột nhắt), hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó; (2) các kháng thể được phân lập từ các tế bào vật chủ được biến nạp để biểu hiện các kháng thể, như bệnh chuyển nhiễm; (3) các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người tổ hợp tái tổ hợp; và (4) các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách nối trình tự gen globulin miễn dịch của người với trình tự ADN khác hoặc tương tự. Các kháng thể tái tổ hợp của người như vậy bao gồm vùng biến đổi và vùng hằng định, các vùng này liên quan đến trình tự globulin miễn dịch dòng mầm cụ thể của người được mã hóa bởi các gen dòng mầm, nhưng cũng liên quan đến sự sắp xếp lại và đột biến tiếp theo, như những đột biến xảy ra trong quá trình trưởng thành của kháng thể.

Thuật ngữ “kháng thể của chuột nhắt” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể đơn dòng kháng IL-4R của người, được điều chế theo kiến thức và kỹ năng trong lĩnh vực này. Trong quá trình chuẩn bị, đối tượng thử nghiệm được tiêm kháng nguyên IL-4R hoặc polypeptit bao gồm các epitop của chúng, sau đó tế bào lai biểu hiện kháng thể sở

hữu các đặc điểm trình tự hoặc chức năng mong muốn được tách ra. Theo một số phương án cụ thể, kháng thể IL-4R của chuột nhắt hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng còn chứa các vùng hằng định chuỗi nhẹ của chuột nhắt, chuỗi λ hoặc các biến thể của chúng, hoặc còn chứa các vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của chuột nhắt, hoặc các biến thể của chúng.

Thuật ngữ “kháng thể của người” bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và hằng định từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Các kháng thể của con người trong đơn sáng chế này có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào do đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu tại vị trí *in vitro* hoặc do đột biến soma *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể của người” không bao gồm kháng thể trong đó trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác (như chuột) đã được liên hợp vào trình tự khung của người (tức là “kháng thể nhân tạo”).

Thuật ngữ “kháng thể nhân tạo”, còn được gọi là kháng thể liên hợp CDR, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các kháng thể được tạo ra bằng cách liên hợp các trình tự CDR của loài không phải của người vào vùng khung vùng biến đổi của kháng thể của người. Các kháng thể nhân tạo khác phục được phản ứng kháng thể mạnh gây ra bởi các kháng thể thể khảm mang lượng lớn các thành phần protein không đồng nhất. Để tránh giảm hoạt tính cùng với giảm tính sinh miễn dịch, vùng biến đổi của kháng thể của người sẽ phải chịu đột biến ngược tối thiểu để duy trì hoạt tính.

Thuật ngữ “kháng thể thể khảm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể được hình thành bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể của chuột nhắt với vùng hằng định của kháng thể của người, kháng thể thể khảm có thể làm giảm bớt đáp ứng miễn dịch do kháng thể chuột nhắt gây ra. Để thiết lập một kháng thể thể khảm, trước tiên, tế bào lai tiết ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu của chuột nhắt được thiết lập, gen vùng biến đổi sau đó được tách dòng từ tế bào lai của chuột nhắt, sau đó gen vùng hằng định của kháng thể của người được tách dòng như mong muốn, gen vùng biến đổi của chuột nhắt được liên kết với gen vùng hằng định của con người để tạo thành gen thể khảm có thể được chèn vào vector của người, và cuối cùng là phân tử kháng thể thể khảm được biểu hiện trong hệ sinh vật nhân chuẩn hoặc hệ sinh vật nhân sơ. Vùng hằng định của kháng thể của người được chọn từ các vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2,

IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc các biến thể của chúng, tốt hơn nếu các vùng hằng định chuỗi nặng của IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc IgG1 không có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể sau khi đột biến axit amin.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh Fab, mảnh Fab', đoạn F (ab')₂ có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, mảnh Fv, đoạn scFv gắn kết với IL-4R của người, cũng như polypeptit hoặc protein bao gồm các đoạn nêu trên. Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” nêu trên bao gồm một hoặc nhiều CDR của kháng thể theo sáng chế. Mảnh Fv là mảnh kháng thể tối thiểu mang toàn bộ các vị trí gắn kết kháng nguyên, nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, nhưng không có vùng hằng định. Nói chung, kháng thể Fv còn chứa trình tự liên kết polypeptit giữa vùng VH và vùng VL, và có khả năng hình thành cấu trúc cần thiết để gắn kết với kháng nguyên. Ngoài ra, các trình tự liên kết khác nhau có thể được sử dụng để kết nối các vùng biến đổi của hai kháng thể để tạo thành chuỗi polypeptit, cụ thể là kháng thể chuỗi đơn hoặc Fv chuỗi đơn (scFv).

Thuật ngữ “gắn kết với IL-4R” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khả năng tương tác với IL-4R của người. Thuật ngữ “vị trí gắn kết kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các vị trí ba chiều được nhận biết bởi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của đơn sáng chế này.

Thuật ngữ “epitop” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các vị trí trên kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc kháng thể. Các epitop có thể được hình thành bởi các axit amin liên kề, hoặc bởi các axit amin không liên kề được đưa đến gần nhau hơn do sự cuộn gập bậc ba của một protein. Các epitop hình thành bởi các axit amin liên kề thường được giữ lại sau khi tiếp xúc với dung môi biến tính, trong khi các epitop được hình thành bởi cuộn gập bậc ba thường không có sau khi xử lý với dung môi biến tính. Epitop thường bao gồm ít nhất 3-15 axit amin trong cấu trúc không gian độc đáo. Các phương pháp xác định epitop gắn kết bởi một kháng thể nhất định đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này, bao gồm thử nghiệm kết tủa miễn dịch và thẩm tách miễn dịch, và các phương pháp tương tự. Các phương pháp xác định cấu trúc không gian của epitop bao gồm các kỹ thuật trong lĩnh vực này và kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này, như tinh thể học tia X và cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều, v.v..

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu với” và “gắn kết chọn lọc với” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gắn kết của kháng thể với epitop trên một kháng nguyên xác định trước.

Thông thường, kháng thể gắn kết với kháng nguyên xác định trước có hằng số phân ly cân bằng (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-7} M hoặc thậm chí thấp hơn, và ái lực của kháng thể để gắn kết với kháng nguyên xác định trước cao hơn ít nhất hai lần so với gắn kết với các kháng nguyên không đặc hiệu (như BSA) khác với kháng nguyên được xác định trước hoặc các kháng nguyên có liên quan chặt chẽ, như được đo trong một thiết bị thông qua kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), trong đó IL-4R tái tổ hợp của người được sử dụng làm chất phân tích trong khi kháng thể được sử dụng như một phối tử. Thuật ngữ “kháng thể nhận biết kháng nguyên” và thuật ngữ “kháng thể gắn kết đặc hiệu với” có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả.

Thuật ngữ “phản ứng chéo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khả năng của kháng thể theo sáng chế gắn kết với IL-4R từ các loài khác nhau. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế gắn kết với IL-4R của người cũng có thể gắn kết với IL-4R từ loài khác. Phản ứng chéo được đo bằng cách phát hiện phản ứng cụ thể với kháng nguyên tinh khiết trong các thử nghiệm liên kết (ví dụ, SPR và ELISA), hoặc bằng cách phát hiện tương tác chức năng hoặc gắn kết với các tế bào biểu hiện IL-4R về mặt sinh lý. Các phương pháp xác định phản ứng chéo bao gồm các thử nghiệm liên kết tiêu chuẩn như được mô tả trong bản mô tả này, như phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) hoặc phép đo tế bào dòng chảy chuyên dụng.

Thuật ngữ kháng thể “trung hòa” hoặc “phong bế” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể gắn kết với IL-4R của người và dẫn đến ức chế hoạt tính sinh học của hIL-4 và/hoặc hIL-3. Sự ức chế hoạt tính sinh học hIL-4 và/hoặc IL-13 này có thể được đánh giá bằng cách đo một hoặc nhiều chỉ số về hoạt tính sinh học hIL-4/hoặc hIL-13 đã biết trong lĩnh vực này, như hoạt hóa tế bào gây ra do hIL-4 và/hoặc hIL-13 và liên kết của hIL-4 với IL-4R của người, ví dụ phương pháp nêu trong CN103739711A. Thuật ngữ “ức chế sinh trưởng” (ví dụ khi liên quan đến tế bào) bao gồm bất kỳ sự giảm phát triển tế bào nào có thể đo lường được.

Thuật ngữ “tạo ra đáp ứng miễn dịch” và “tăng cường phản ứng miễn dịch” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ đáp ứng miễn dịch đối với sự kích thích của kháng nguyên cụ thể (tức là thụ động hoặc thích ứng).

Thuật ngữ “gây cảm ứng”, đối với CDC hoặc ADCC, đề cập đến việc kích thích cơ chế cụ thể để trực tiếp tiêu diệt tế bào.

Thuật ngữ “hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các tế bào biểu hiện thụ thể Fc trực tiếp tiêu diệt các tế bào đích được phủ bằng kháng thể thông qua việc nhận biết phân đoạn Fc của kháng thể. Hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể của kháng thể có thể bị giảm hoặc bị loại bỏ thông qua sửa đổi trên phân đoạn Fc của IgG. Việc sửa đổi đề cập đến các đột biến được thực hiện trên vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể, như các đột biến được chọn từ nhóm bao gồm N297A, L234A và L235A trong IgG1, thể khảm IgG2/4 và F235E hoặc đột biến L234A/E235A trong IgG4.

Protein dung hợp là protein được đồng biểu hiện bởi hai gen thông qua tái tổ hợp ADN. Protein dung hợp Fc vùng ngoại bào IL-4R tái tổ hợp là protein dung hợp thu được bằng cách đồng biểu hiện IL-4R vùng ngoại bào với đoạn Fc kháng thể của người, thông qua tái tổ hợp ADN. Vùng ngoại bào IL-4R là một phần của protein IL-4R được biểu hiện bên ngoài màng tế bào.

Các phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên đã được biết đến trong lĩnh vực này và có thể được tìm thấy, ví dụ, trong Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Chapters 5-8 and 15. Ví dụ, các chuột nhất có thể được gây miễn dịch bằng IL-4R của người hoặc mảnh của nó, và sau đó các kháng thể thu được có thể được biến tính lại, tinh chế và giải trình tự bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Các mảnh gắn kết kháng nguyên cũng có thể được điều chế bằng các phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả được thiết kế di truyền để bổ sung một hoặc nhiều FR của người vào CDR không phải của người. Trình tự dòng mầm FR của người có thể được lấy từ ImMunoGeneTics (IMGT) qua trang web <http://imgt.cines.fr>, hoặc The Immunoglobulin FactsBook, 2001 ISBN012441351.

Kháng thể được thiết kế di truyền hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể được điều chế và tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, trình tự ADN bổ sung mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được tách dòng và tái tổ hợp thành vector biểu hiện GS. Sau đó vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định vào các tế bào CHO. Trình tự của kháng thể nhân tạo theo sáng chế được chèn

vào vector biểu hiện tương ứng bằng phương pháp tách dòng phân tử và kháng thể nhân tạo tương ứng thu được bằng cách biểu hiện trong hệ biểu hiện tế bào HEK293. Theo phương pháp được khuyến cáo hơn trong lĩnh vực này, hệ biểu hiện của động vật có vú có thể dẫn đến quá trình glycosyl hóa các kháng thể, điển hình là ở đầu cuối N được bảo thủ cao trong vùng FC. Các dòng vô tính ổn định có thể thu được thông qua sự biểu hiện của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên của người. Các dòng biểu hiện có thể được tăng sinh trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh để sản xuất kháng thể trong thiết bị phản ứng sinh học. Môi trường nuôi cấy, trong đó một kháng thể đã được tiết ra, có thể được thu thập và tinh sạch bằng các kỹ thuật thông thường. Kháng thể có thể được lọc và cô đặc bằng các kỹ thuật thông thường. Các hỗn hợp hòa tan và các chất đa lượng có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, như sàng phân tử hoặc trao đổi ion. Sản phẩm thu được phải được làm đông lạnh ngay lập tức, ví dụ ở nhiệt độ -70°C , hoặc có thể được đông khô.

Kháng thể này có thể là kháng thể đơn dòng (mAb), sử dụng để chỉ kháng thể thu được từ một dòng tế bào đơn lẻ, nhưng không giới hạn ở dòng tế bào nhân thực, sinh vật nhân sơ hoặc thực khuẩn thể. Có thể thu được kháng thể đơn dòng và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, ví dụ, bằng phương pháp tế bào lai, phương pháp tái tổ hợp, phương pháp hiển thị thể thực khuẩn, phương pháp tổng hợp (ví dụ, liên hợp CDR) hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này.

Các kháng thể có thể là kháng thể đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu cho thấy độ đặc hiệu đối với các epitop khác nhau của peptit đích, hoặc cũng có thể chứa các vùng gắn kết kháng nguyên thể hiện độ đặc hiệu cho nhiều hơn một peptit đích. Kháng thể kháng IL-4R của người có thể được liên kết hoặc cùng biểu hiện với một phân tử chức năng khác (như một peptit hoặc protein khác). Ví dụ, kháng thể hoặc các mảnh của chúng có thể được kết nối có chức năng (ví dụ bằng cách ghép nối hóa học, dung hợp gen, liên kết không cộng hóa trị hoặc các phương pháp khác) với một hoặc nhiều phân tử khác (ví dụ, một kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên khác) để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu có độ đặc hiệu gắn kết thứ hai.

Thuật ngữ “sử dụng” và “điều trị”, khi áp dụng cho động vật, con người, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, đề cập đến việc tiếp xúc với được

phẩm, chất điều trị, chất chẩn đoán hoặc chế phẩm ngoại sinh với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học. “Việc sử dụng”, “sử dụng” và “điều trị” có thể đề cập đến như phương pháp điều trị, dược động học, chẩn đoán, nghiên cứu và thử nghiệm. Việc xử lý tế bào bao gồm việc cho thuốc thử tiếp xúc với tế bào, cũng như tiếp xúc thuốc thử với chất lỏng trong đó chất lỏng đó tiếp xúc với tế bào. “Việc sử dụng”, “sử dụng” và “điều trị” cũng có nghĩa là xử lý *in vitro* và *ex vivo* đối với tế bào, bằng cách sử dụng thuốc thử, chế phẩm chẩn đoán, liên kết, hoặc bằng cách sử dụng tế bào khác. “Điều trị” khi áp dụng cho con người, thú y hoặc đối tượng nghiên cứu, đề cập đến điều trị triệu chứng, các biện pháp dự phòng hoặc phòng ngừa, nghiên cứu cũng như các ứng dụng chẩn đoán.

Thuật ngữ “để điều trị” có nghĩa là sử dụng bên trong hoặc bên ngoài dược chất điều trị (như chế phẩm bao gồm bất kỳ kháng thể nào của mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế) cho đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng) bị, nghi ngờ có hoặc nhạy cảm với một hoặc nhiều triệu chứng bệnh mà dược chất đã biết hoạt tính điều trị. Thông thường, dược chất điều trị được sử dụng với một lượng có hữu hiệu để làm giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng) hoặc quần thể được điều trị, bằng cách gây ra sự thuyên giảm của các triệu chứng đó, hoặc bằng cách ức chế sự tiến triển của các triệu chứng đó ở bất kỳ mức độ nào đó có thể đo lường được về mặt lâm sàng. Lượng dược chất điều trị hữu hiệu để giảm bớt bất kỳ triệu chứng bệnh cụ thể nào (còn được gọi là “lượng hữu hiệu điều trị bệnh”) có thể thay đổi tùy theo các yếu tố như tình trạng bệnh, tuổi và cân nặng của đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng) và khả năng của dược chất để tạo ra tác dụng mong muốn ở đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng). Liệu một triệu chứng bệnh đã thuyên giảm hay chưa có thể được đánh giá bằng phương pháp lâm sàng bất kỳ thường được bác sĩ hoặc các nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe chuyên môn khác sử dụng để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng đó. Mặc dù một phương án của đơn sáng chế này (ví dụ, một phương pháp điều trị hoặc sản phẩm sản xuất) có thể không hiệu quả trong việc làm giảm bớt các triệu chứng bệnh quan tâm ở mỗi đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng), nó sẽ làm giảm bớt các triệu chứng bệnh mục tiêu quan tâm đến một số lượng đối tượng bị bệnh (hoặc đối tượng) có ý nghĩa thống kê được xác định bởi phép kiểm định thống kê nào bất kỳ biết đến trong lĩnh vực này như phép kiểm định Student, phép kiểm định chi bình phương, phép kiểm

định U theo Mann và Whitney, phép kiểm định Kruskal-Wallis (phép kiểm định H), phép kiểm định Jonckheere Terpstra và phép kiểm định Wilcoxon.

Thuật ngữ “cải biến bảo thủ” hoặc “thay thế hoặc thay thế bảo thủ” có nghĩa là sự thay thế các axit amin khác có các đặc điểm tương tự (như điện tích, kích cỡ chuỗi bên, tính kỵ nước/tính ưa nước, cấu trúc và độ cứng của chuỗi chính, v.v.) cho các axit amin trong protein, sao cho việc cải biến có thể được thực hiện thông thường mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein. Nhìn chung, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rằng một sự thay thế axit amin đơn lẻ trong vùng không thiết yếu của polypeptit không làm thay đổi về cơ bản hoạt tính sinh học (ví dụ, xem Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Page 224 (4th edition)). Ngoài ra, sự thay thế của các axit amin có cấu trúc hoặc chức năng tương tự không có khả năng làm gián đoạn hoạt tính sinh học.

“Lượng hữu hiệu” bao gồm lượng đủ để cải thiện hoặc phòng ngừa triệu chứng hoặc dấu hiệu của một tình trạng y tế. Lượng hữu hiệu cũng có nghĩa là lượng đủ để cho phép hoặc tạo điều kiện cho chẩn đoán. Liều lượng hữu hiệu cho đối tượng hoặc đối tượng thú y cụ thể có thể khác nhau phụ thuộc vào các yếu tố như tình trạng đang được điều trị, sức khỏe chung của đối tượng, đường sử dụng và liều lượng sử dụng và mức độ nghiêm trọng của các tác dụng phụ. Một lượng hữu hiệu có thể là liều tối đa hoặc quy trình sử dụng thuốc để tránh các tác dụng phụ hoặc tác dụng độc hại đáng kể.

Thuật ngữ “ngoại sinh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các chất được tạo ra bên ngoài cơ thể sinh vật, tế bào hoặc cơ thể người, phụ thuộc vào ngữ cảnh.

Thuật ngữ “nội sinh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các chất được tạo ra trong tế bào, sinh vật hoặc cơ thể người, phụ thuộc vào ngữ cảnh.

Thuật ngữ “độ tương đồng” hoặc “độ tương tự” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự giống nhau về trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai polypeptit. Khi một vị trí trong hai trình tự được so sánh được chiếm bởi cùng một đơn vị gốc hoặc đơn vị axit amin, ví dụ, khi một vị trí trong mỗi hai phân tử ADN bị chiếm bởi adenin, thì các phân tử là tương đồng tại vị trí này. Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là một hàm của số vị trí phù hợp/tương đồng được chia sẻ bởi hai trình tự chia cho số vị trí được so sánh, sau đó nhân với $\times 100\%$. Ví dụ nếu 6 trong số 10 vị trí trong hai trình tự trùng khớp hoặc

tương đồng khi các trình tự được sắp hàng tối ưu, thì hai trình tự có độ tương đồng bằng 60%. Nói chung, so sánh được thực hiện khi hai chuỗi được sắp thẳng hàng trình tự để cung cấp phần trăm nhận dạng tối đa. Thuật ngữ “độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85%” có nghĩa là biến thể có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% tương đồng với trình tự gốc, hai trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 85%. Theo một số phương án, độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%; theo một số phương án cụ thể, độ tương đồng trình tự bằng 90%, 95% hoặc 99% hoặc cao hơn; theo các phương án cụ thể khác, độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%. Trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% bao gồm một hoặc nhiều đột biến mất đoạn, chèn hoặc thay thế axit amin khi so sánh với trình tự gốc.

Thuật ngữ “tế bào”, “dòng tế bào” và “chủng tế bào” được sử dụng thay thế cho nhau và toàn bộ các chỉ định như vậy bao gồm cả tế bào thể hệ sau của chúng. Do đó, thuật ngữ “biến nạp” và “tế bào được biến nạp” bao gồm các tế bào vật đối tượng chính và các chủng tế bào có nguồn gốc từ đó mà không tính đến số lần cấy chuyển. Cũng được hiểu rằng toàn bộ các tế bào thể hệ sau có thể không hoàn toàn giống nhau về hàm lượng ADN, do đột biến có chủ ý hoặc ngẫu nhiên. Tế bào thể hệ sau đột biến thu được bằng cách sàng lọc, có chức năng hoặc hoạt tính sinh học tương tự như tế bào được biến nạp ban đầu, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “tùy ý” có nghĩa là sự kiện hoặc tình huống sau đó có thể xảy ra, nhưng không nhất thiết phải xảy ra. Mô tả bao gồm các trường hợp mà sự kiện hoặc tình huống xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, “tùy ý bao gồm 1-3 các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể” có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có trình tự cụ thể có thể có nhưng không nhất thiết phải có.

Thuật ngữ “được phẩm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chế phẩm bao gồm hỗn hợp của một hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng như được mô tả trong bản mô tả này hoặc muối sinh lý/được dụng hoặc tiền chất của chúng cùng với các thành phần hóa học khác, cũng như các thành phần bổ sung như chất mang và tá dược sinh lý/được dụng. Dược phẩm nhằm mục đích thúc đẩy hoạt động đối với cơ thể, tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu hoạt chất và do đó tạo ra tác dụng sinh học.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ dưới đây, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này. Trong các ví dụ theo sáng chế, khi các điều kiện cụ thể không được bộc lộ, thì các thử nghiệm thường được thực hiện trong các điều kiện thông thường được mô tả trong Antibodies, A Laboratory Manual and Molecular Cloning Manual, của Cold Spring Harbour hoặc các điều kiện được đề xuất bởi các nhà sản xuất nguyên liệu hoặc chế phẩm. Khi nguồn của các thuốc thử không được bộc lộ cụ thể, thì các thuốc thử là các thuốc thử thông thường có bán trên thị trường.

Ví dụ 1: Gây miễn dịch cho chuột nhắt và thử nghiệm

Protein tái tổ hợp IL-4R của người được đánh dấu trình tự His (h-IL-4R-his), protein tái tổ hợp IL-4R của chuột nhắt được đánh dấu trình tự His (m-IL-4R-his) và protein tái tổ hợp IL-4R của khỉ vàng được đánh dấu trình tự His (khỉ-IL-4R-his) được tổng hợp bởi Acrobiosystems, biểu hiện trong HEK293 và tinh chế.

Protein tái tổ hợp IL-4R của người được đánh dấu trình tự Fc của người (h-IL-4R-Fc) được thiết kế, biểu hiện và tinh chế bởi các tác giả sáng chế. Protein tinh khiết được sử dụng trong mỗi thử nghiệm sau trong các ví dụ.

Số lượng và vị trí của các gốc axit amin CDR trong vùng VL và vùng VH của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên trong ví dụ này được đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat đã biết (LCDR1-3, HCDR2-3), hoặc hệ thống đánh số thứ tự Kabat và CHOTHIA (ABM) (HCDR1).

Bảng 1. Thông tin về chất sinh miễn dịch

Tên	Trình tự axit amin (từ đầu đến cuối)	Cơ sở dữ liệu số/ Danh mục số
h-IL-4R-his	Met26-His232	NP_000409.1
m-IL-4R-his	Ile26-Arg233	NP_001008700
IL-4R-his của khỉ vàng	Met26-Arg232	G7Q0S7
h-IL-4R-Fc	Met1-His232	NP_000409.1

Kháng thể đơn dòng kháng IL-4R của người được sản xuất bằng cách gây miễn dịch cho các chuột nhắt. Các chuột nhắt cái 57BL/6, 6-8 tuần tuổi (JOINN Laboratories (Suzhou) Research Center Co., Ltd., animal production license number: 201503052) được sử dụng trong thử nghiệm.

Môi trường nuôi dưỡng: mức độ SPF. Sau khi được mua, các chuột nhắt được duy trì trong môi trường phòng thử nghiệm trong 1 tuần, thích nghi với chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ 20-25°C; và độ ẩm 40-60%. Các chuột nhắt thích nghi được chia thành 3 lồng, mỗi lồng 5 chuột nhắt. Kháng nguyên miễn dịch là protein tái tổ hợp IL-4R của người được đánh dấu trình tự Fc (h-IL-4R-Fc, nồng độ bằng 0,73mg/mL). Kháng nguyên được nhũ hóa bằng tá dược bổ trợ Freund (sigma, mã sản phẩm số :F5881): tá dược bổ trợ Freund hoàn chỉnh (CFA, Pierce, mã sản phẩm số 77140) được sử dụng để gây miễn dịch lần đầu, và tá dược bổ trợ axit nucleic (CpG, Shanghai Sangon) và tá dược bổ trợ nhôm (Alum, Thermo Cat# 7161) được sử dụng để tăng cường miễn dịch tiếp theo.

Vào ngày 0, kháng nguyên được nhũ hóa (70µg/chuột nhắt) được tiêm vào màng bụng. Vào ngày 14, 28, 42, 56, 77, theo khối lượng ở lưng và mức độ trương bụng, kháng nguyên được tiêm vào lưng và màng bụng (mỗi lần tiêm 0,1mL). Máu được lấy vào ngày 21, 35, 49, 63 và 84 để xét nghiệm máu. Thử nghiệm ELISA được thực hiện trên huyết thanh chuột nhắt theo ví dụ thử nghiệm 1 để xác định nồng độ chuẩn của kháng thể trong huyết thanh chuột. Sau lần gây miễn dịch thứ tư, các chuột nhắt có nồng độ chuẩn của kháng thể cao trong huyết thanh và nồng độ chuẩn có xu hướng ổn định được chọn để dung hợp tế bào lá lách; bước tăng cường miễn dịch được thực hiện 3 ngày trước khi dung hợp; dung dịch kháng nguyên được điều chế bằng cách sử dụng dung dịch đệm phosphat được tiêm vào màng bụng với liều lượng bằng 10µg/chuột. Bằng cách sử dụng các bước dung hợp tối ưu hóa qua trung gian PEG, các tế bào lympho lách và tế bào u tủy Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) được dung hợp để thu được các tế bào lai.

Ví dụ 2: Thử nghiệm ELISA và sàng lọc các kháng thể

1. Thử nghiệm gắn kết ELISA:

Thử nghiệm ELISA được sử dụng để phát hiện đặc tính gắn kết của kháng thể IL-4R. Đĩa vi chuẩn độ được phủ trực tiếp với protein tái tổ hợp IL-4R được đánh dấu his, kháng thể được bổ sung vào mỗi giếng, và sau đó hoạt tính gắn kết của kháng thể với kháng nguyên được phát hiện bằng cách bổ sung kháng thể thứ cấp (Fc kháng thể kháng nguyên liên hợp HRP) và cơ chất HRP TMB.

Protein IL-4R-his của người hoặc khi vàng được phủ lên đĩa vi chuẩn độ 96 giếng, 100µL mỗi giếng ở nồng độ 0,5µg/mL, và ủ qua đêm ở 4°C. Đĩa được rửa bằng dung dịch

rửa ba lần, 250µL mỗi giếng. Mỗi bước rửa được thực hiện với lắc trong 10 giây để đảm bảo rửa đủ. Dung dịch phong bế 200µL/giếng được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần, 250µL mỗi giếng. Mỗi bước rửa được thực hiện với lắc trong 10 giây để đảm bảo rửa đủ. 100µL kháng thể kháng IL-4R cần thử nghiệm đã được pha loãng bằng dung dịch pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần, 250µL mỗi giếng. 100µL kháng thể thứ cấp của dê kháng IgG của người được đánh dấu HRP (được pha loãng với tỷ lệ 1:20000 bằng dung dịch pha loãng) được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần, 250µL mỗi giếng. 100µL TMB được bổ sung vào mỗi giếng và phản ứng được duy trì trong 15 phút trong bóng tối. 50µL axit sulfuric 0,16 M/L được bổ sung vào mỗi giếng. Trị số OD ở bước sóng bằng 450nm được xác định bằng thiết bị đọc vi đĩa Thermo MultiSkanFc, trị số EC₅₀ của kháng thể IL-4R gắn kết với IL-4R được tính toán.

2. Thử nghiệm phong bế ELISA:

Trong thử nghiệm này, bằng thử nghiệm phong bế *in vitro*, tác dụng phong bế gắn kết IL-4R của người với IL-4 của người bởi các kháng thể kháng IL-4R của người được chọn lọc được phát hiện. Cụ thể, protein tái tổ hợp IL-4R được đánh dấu trình tự Fc được phủ lên đĩa vi chuẩn độ 96 giếng, kháng thể gắn kết với IL-4R của người được bổ sung vào để gắn kết hoàn toàn với epitop, sau đó là IL-4 (Biolegend, mã sản phẩm số 574004) được bổ sung vào, kháng thể kháng IL-4 được tiếp hợp với biotin và neutravidin-HRP (Pierce, mã sản phẩm số 31001) được sử dụng để phát hiện liệu IL-4 có thể gắn kết với IL-4R hay không, trị số IC₅₀ được tính toán cho kháng thể IL-4R để phong bế gắn kết IL-4/IL-4R.

Protein IL-4R-Fc của người được phủ lên đĩa vi chuẩn độ 96 giếng, 100µL mỗi giếng ở nồng độ 0,5µg/mL và được ủ qua đêm ở 4°C. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần, 250µL mỗi giếng. Mỗi bước giặt được thực hiện với lắc trong 10 giây để đảm bảo rửa đủ. Dung dịch phong bế 200µL/giếng được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần, 250µL mỗi giếng. Mỗi bước rửa được thực hiện với lắc trong 10 giây để đảm bảo rửa đủ. 100µL kháng thể kháng IL-4R cần thử nghiệm đã được pha loãng bằng dung dịch pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần, 250µL mỗi giếng.

100µL IL-4 pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần. 100µL kháng thể kháng IL-4 được tiếp hợp với biotin pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần. Neutravidin được đánh dấu trình tự HRP (được pha loãng với tỷ lệ 1:5000 với chất pha loãng) được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch rửa ba lần, 250µL mỗi giếng. 100µL TMB được bổ sung vào mỗi giếng và phản ứng được duy trì trong 15 phút trong bóng tối. 50µL axit sulfuric 0,16 M/L được bổ sung vào mỗi giếng. Trị số OD ở bước sóng bằng 450nm được xác định bằng thiết bị đọc vi đĩa Thermo MultiSkanFc, trị số IC₅₀ được tính toán cho kháng thể IL-4R để phong bế gắn kết của IL-4R với IL-4.

Ví dụ 3: Thử nghiệm hoạt tính tế bào thông báo của các kháng thể gắn kết với IL-4R của người

Tế bào IL-4 HEK-Blue được mua từ Invivogen (mã sản phẩm số hkb-stat6). Các tế bào được chuyển nạp ổn định với gen IL-4R của người và bộ gen SEAP qua trung gian STAT6. SEAP được tiết vào dịch nổi có thể được phát hiện bởi cơ chất SEAP QUANTI-Blue để xác định mức độ hoạt hóa của quá trình truyền tín hiệu IL-4R.

Trong thử nghiệm này, quá trình hoạt hóa của tế bào HEK-Blue IL-4 được phát hiện, và hoạt tính tế bào *in vitro* của kháng thể IL-4R được đánh giá theo IC₅₀. Tế bào HEK-Blue IL-4 được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% FBS, 100µg/mL Zeocin (Invivogen, mã sản phẩm số ant-zn-05) và 10µg/mL Blastidin (Invivogen, mã sản phẩm số ant-bl-05); tế bào được nuôi cấy cấp hai từ 2 đến 3 lần một tuần, theo tỷ lệ 1:5 hoặc 1:10. Đối với nuôi cấy cấp hai, môi trường được loại bỏ, và rửa lớp tế bào bằng 5ml 0,25% trypsin, sau đó trypsin được loại bỏ, các tế bào được đặt trong tủ cấy từ 3 đến 5 phút, và môi trường mới được bổ sung vào để tạo hỗn dịch lại các tế bào. 100µL hỗn dịch tế bào được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng, với mật độ bằng 5×10^5 tế bào/mL, môi trường là DMEM chứa 10% FBS, 100ug/mL Zeocin và 30ug/mL Blastidin, và 100µL nước vô trùng được bổ sung vào xung quanh đĩa 96 giếng. Đĩa nuôi cấy được ủ trong tủ cấy trong 24 giờ (37°C, 5% CO₂). Sau khi các tế bào bám vào thành, 100µL kháng thể pha loãng theo cách thử nghiệm sẽ được bổ sung vào mỗi giếng. Đĩa nuôi cấy được ủ trong tủ cấy 20-24 giờ (37°C, 5% CO₂). 20µL chất nổi của tế bào được chuyển từ mỗi giếng sang đĩa đáy phẳng 96 giếng mới, dung dịch cơ chất

QUANTI-Blue 180µL được bổ sung vào, và đĩa nuôi cấy được ủ trong tủ cấy trong bóng tối từ 1-3 giờ. Độ hấp thụ ở bước sóng 620nm được đo bằng thiết bị đọc vi đĩa (Thermo MultiSkanFc).

Ví dụ 4: Kháng thể gắn kết với IL-4R của người ức chế tăng sinh của tế bào TF-1

Tế bào TF-1 (ATCC CRL-2003) là tế bào u lympho biểu hiện IL-4R và nhạy cảm với các xytokin như IL-4/IL-13. IL-4 có thể kích thích tế bào TF-1 tăng sinh trong trường hợp không có GM-CSF. Các hoạt tính trung hòa của các kháng thể IL-4R khác nhau được so sánh trong thử nghiệm bằng cách bổ sung các kháng thể trung hòa để phong bế quá trình của IL-4 và ức chế tăng sinh của tế bào TF-1. Tế bào TF-1 được nuôi cấy trong môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS, 2ng/mL GM-CSF (R&D, mã sản phẩm số 215-GM-010); các tế bào được nuôi cấy cấp hai từ 2 đến 3 lần một tuần với tỷ lệ 1:10. 100µL hỗn dịch tế bào được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng, với mật độ bằng 2×10^5 tế bào/mL, môi trường là môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS, và 100µL nước vô trùng được bổ sung vào xung quanh đĩa 96 giếng. 50µL kháng thể pha loãng theo thứ tự cần thử nghiệm và 50µL IL-4 (R&D, mã sản phẩm số 204-IL-050) ở nồng độ cuối cùng bằng 0,7ng/mL được bổ sung vào mỗi giếng, đĩa nuôi cấy được ủ trong tủ cấy trong 72 giờ (37°C, 5% CO₂). Khi quá trình nuôi cấy kết thúc, quá trình tăng sinh của tế bào được phát hiện bằng cách sử dụng kit CTG (Promega, mã sản phẩm số G7572).

Ví dụ 5: Thử nghiệm động học và ái lực gắn kết *in vitro*

Thiết bị Biacore, GE được sử dụng để xác định ái lực gắn kết của kháng thể nhân tạo kháng IL-4R của người với IL-4R của người.

Kháng thể chống bắt giữ của người được liên hợp cộng hóa trị với chip cảm biến sinh học CM5 của thiết bị Biacore (Biacore X100, GE) theo phương pháp được mô tả trong hướng dẫn của kit kháng thể chống bắt giữ của người (mã sản phẩm số BR-1008-39, GE), do đó lượng kháng thể nhất định cần thử nghiệm đã được bắt giữ bằng ái lực; một loạt các gradient nồng độ của kháng nguyên IL-4R (kháng nguyên IL-4R được mua từ Acrobiosystems, Ca#ILR-H5221) chảy qua bề mặt của chip, tín hiệu phản ứng được phát hiện trong thời gian thực bằng cách sử dụng thiết bị Biacore (Biacore X100, GE) để thu được các đường cong gắn kết và phân ly. Sau khi hoàn thành quá trình phân ly của mỗi chu kỳ, chip sinh học được làm sạch và tái sinh bằng dung dịch tái sinh được cung cấp

bên trong kit kháng thể chống bắt giữ của người. Kit liên hợp amin được sử dụng trong thử nghiệm được mua từ GE (mã sản phẩm số #BR-1000- 50, GE), và dung dịch đệm là dung dịch đệm HBS-EP+10× (mã sản phẩm số #BR-1006-69, GE) được pha loãng với nước khử ion đến $1 \times$ (độ pH bằng 7,4).

Dữ liệu thu được từ thử nghiệm được gắn vào mô hình gắn kết (1:1) bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá BiacoreX1002.0 GE, và trị số ái lực được xác định.

Ví dụ 6: Trình tự và sản xuất kháng thể

Bằng thử nghiệm gắn kết ELISA (gắn kết ELISA của IL-4R-his của người) và thử nghiệm phong bế ELISA (ELISA phong bế hIL-4/IL-4R) trong ví dụ 2, thử nghiệm ức chế hoạt hóa tế bào HEK293-Blue IL-4 được kích thích bằng IL-4 trong ví dụ 3, và thử nghiệm ức chế tăng sinh của tế bào TF-1 được kích thích bởi IL-4 trong ví dụ 4, hai dòng tế bào lai đơn dòng cho thấy hoạt tính *in vitro* tốt nhất được chọn lọc. Kết quả thử nghiệm hoạt tính được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Các dòng tế bào lai được chọn lọc có hoạt tính *in vitro* tốt nhất

Số lượng chuột nhất	Tế bào lai	ELISA (EC ₅₀) (ng/mL)			Phong bế hIL-4/IL-4R bằng ELISA (IC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế gắn kết của tế bào HEK293-Blue IL-4 (với IL-4) (IC ₅₀) (ng/mL)	Ức chế tăng sinh của tế bào TF-1 bằng IL-4 (IC ₅₀) (ng/mL)
		IL-4R-his của người	IL-4R-his của khỉ vàng	IL-4R-his của chuột nhất			
11	25G7	3,319	không gắn kết	không gắn kết	8,132	0,9749	51,26
3	7B10	45,78	không gắn kết	không gắn kết	29,86	79,76	418,1
	Dupilumab	27,62	không gắn kết	không gắn kết	52,08	5,069	102,2

Các dòng tế bào lai đơn dòng 25G7 và 7B10 có hoạt tính *in vitro* tốt nhất được chọn lọc và trình tự kháng thể đơn dòng được tách dòng từ đó. Quá trình tách dòng trình tự từ tế bào lai là như sau. Tế bào lai ở giai đoạn sinh trưởng logarit được thu thập, ARN được chiết xuất bởi Trizol (Invitrogen, 15596-018) (theo hướng dẫn của kit), quá trình phiên mã ngược được thực hiện (enzym phiên mã ngược PrimeScript™, Takara, cat #2680A). ADN bổ sung thu được bằng cách phiên mã ngược được khuếch đại bằng PCR sử dụng bộ đoạn môi Ig của chuột nhất (Novagen, TB326 Rev. B0503), sau đó được chuyển đến công ty giải trình tự để giải trình tự, và trình tự kháng thể thu được được phân tích.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng của chuột nhắt 25G7 là như sau:

25G7 HCVR

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAPEKGLEWV
AFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNANTLFLQMTSLRSEDAMYYCTRGNKRGF
FDYWGQGTLTIVSS (SEQ ID NO.1);

25G7 LCVR

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSNASSSVSYMYWYQRKPRSSPKPWYLT
SNLASGVPVRFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWRSNPPMLTFGSGTKL
EVK (SEQ ID NO.2);

Các trình tự CDR được chứa trong các vùng này được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. các trình tự CDR của kháng thể đơn dòng 25G7

Tên	Trình tự	SEQ ID NO.
HCDR1	GFTFSQYGMH	SEQ ID NO.3
HCDR2	FISSGSSIIYYADIVKG	SEQ ID NO.4
HCDR3	GNKRGFFDY	SEQ ID NO.5
LCDR1	NASSSVSYMY	SEQ ID NO.6
LCDR2	LTSNLA	SEQ ID NO.7
LCDR3	QQWRSNPPMLT	SEQ ID NO.8

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng của chuột nhắt 7B10 là như sau:

7B10 HCVR

QVQLQQPGTELLKPGASVSLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG
LIHPNSDTTKFSENFKTRATLTIDKSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYYCAKSKIITIV
ARHWYFDVWGTTGTTVTVSS(SEQID NO: 9);

7B10 LCVR

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCKASQSVQYGGDSYMNWYQQKLGQPPKV
LIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDVATYYCQHSNENPPTFGGGT
KLEIK(SEQID NO: 10);

Các trình tự CDR được chứa trong các vùng này được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Các trình tự CDR của kháng thể đơn dòng 7B10

Tên	Trình tự	SEQ ID NO.
HCDR1	GYTFTSYWMH	SEQ ID NO.11
HCDR2	LIHPNSDTTKFSENFKT	SEQ ID NO.12
HCDR3	SKIITTIVARHWYFDV	SEQ ID NO.13
LCDR1	KASQSVDYGGDSYMN	SEQ ID NO.14
LCDR2	AASNLES	SEQ ID NO.15
LCDR3	QHSNENPPT	SEQ ID NO.16

Trình tự vùng biến đổi thu được được gắn kết với trình tự vùng hằng định của người để thu được trình tự kháng thể thể khảm của người-chuột. Bằng cách sử dụng phương pháp tách dòng phân tử, trình tự kháng thể thể khảm được chèn vào vector biểu hiện tương ứng. Bằng cách sử dụng hệ biểu hiện tế bào HEK293, có thể thu được các kháng thể thể khảm 25G7-C và 7B10-C của người-chuột.

Theo phương pháp của ví dụ 2 đến 5, kháng thể thể khảm tinh khiết được thử nghiệm hoạt tính *in vitro*. Dữ liệu được thể hiện trong bảng 5. Kết quả cho thấy đối với kháng thể 25G7-C, cả tác dụng phong bế gắn kết IL-4 và tác dụng ức chế tăng sinh của tế bào đều tốt hơn đáng kể so với kháng thể đối chứng dupilumab (được tổng hợp theo WHO Drug Information, Vol. 26, No. 4, 2012 synthesis).

Bảng 5. Phát hiện hoạt tính *in vitro*

	Gắn kết ELISA IL-4R-his của người (EC_{50}) (ng/mL)	Gắn kết ELISA IL-4R-his của khi vàng (EC_{50}) (ng/mL)	Phong bế ELISA hIL-4/IL-4R (IC_{50}) (ng/mL)	Phong bế gắn kết của tế bào HEK293-Blue IL-4 (với IL-4) (IC_{50}) (ng/mL)	Ức chế tăng sinh của tế bào TF-1 bằng IL-4 (IC_{50}) (ng/mL)	K_D (nM) (Biacore)
25G7-C	9,094	không gắn kết	39,69	2,025	20,27	0,725
7B10-C	11,83	không gắn kết	162,3	9,034	46,43	0,278
Dupilumab	55,84	không gắn kết	209,4	3,235	207,2	0,126

Ví dụ 7: Thử nghiệm làm tương thích với người của kháng thể của chuột nhất

Hai chủng (25G7 và 7B10) có hoạt tính chức năng mạnh nhất trong số các kháng thể của chuột nhất thu được nhân tạo hóa. Trên cơ sở cấu trúc điển hình thu được của VH/VLCDR kháng thể của chuột nhất, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng, chuỗi nhẹ được sắp thẳng hàng trình tự với cơ sở dữ liệu kháng thể dòng mầm, để thu được mẫu dòng mầm của người có độ tương đồng cao. Trong số đó, vùng khung chuỗi nhẹ dòng mầm của người có nguồn gốc từ gen chuỗi nhẹ kappa của người, tốt hơn nếu các khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01 (SEQ ID NO.22, đối với kháng thể 25G7) và IGKV2D-29*01 (SEQ ID NO.24, đối với kháng thể 7B10). Vùng khung chuỗi nặng dòng

mầm của người có nguồn gốc từ chuỗi nặng của người, tốt hơn nếu khuôn chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01 (SEQ ID NO.21, đối với kháng thể 25G7) và IGHV1-2*02 (SEQ ID NO.23, đối với kháng thể 7B10).

Trình tự khuôn dòng mầm của người được thể hiện dưới đây.

Khuôn chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS
YISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID
NO.21);

Khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA
SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWP (SEQ ID NO.22);

Khuôn chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV1-2*02:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEW
MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
(SEQ ID NO.23);

Khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV2D-29*01:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQL
LIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLP (SEQ ID
NO.24).

Các vùng CDR của kháng thể của chuột nhất được liên hợp vào khuôn nhân tạo được chọn lọc, để thay thế vùng biến đổi nhân tạo sau đó được tái tổ hợp với vùng hằng định IgG. Sau đó, dựa trên cấu trúc ba chiều của kháng thể của chuột nhất, các gốc gắn vào, các gốc tương tác trực tiếp với các vùng CDR và các gốc có tác động quan trọng đến cấu trúc của VL và VH được đột biến ngược để thu được một loạt các phân tử nhân tạo.

Trong số đó, Hu7B10-VH-a, hu7B10-VH-b và hu7B10-VH-c được cải biến để sử dụng cho mục đích sản xuất dược phẩm, và vị trí thứ nhất của khuôn chuỗi nặng dòng mầm của người được thay đổi từ Q thành E. hu25G7 cũng được cải biến để sử dụng cho mục đích sản xuất dược phẩm. Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của hai kháng thể được nhân tạo này tương ứng được thể hiện trong SEQ ID NO.25-SEQ ID NO.27 và SEQ ID

NO.31-SEQ ID NO.33; trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ tương ứng được thể hiện trong SEQ ID NO.28-SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.34-SEQ ID NO.36.

hu25G7-VH-a:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWV
AFISSGSSIIYYADIVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNKRK
FFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.25);

hu25G7-VH-b:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWV
AFISSGSSIIYYADIVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKRKF
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.26);

hu25G7-VH-c:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWV
AFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKRKF
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.27);

hu25G7-VL-a:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYLT
NLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO.28);

hu25G7-VL-b:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYLT
NLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO.29);

hu25G7-VL-c:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRPWIYLT
NLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO.30);

hu7B10-VH-a:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEW
MGLIHPNSDTTKFSSENFKTRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARSKIIT
TIVARHWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO.31);

hu7B10-VH-b:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEW
MGLIHPNSDTTKFSSENFKTRVTMTIDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAKSKIIT
TIVARHWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO.32);

hu7B10-VH-c:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEW
MGLIHPNSDTTKFSSENFKTRVTLTIDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAKSKIIT
TIVARHWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO.33);

hu7B10-VL-a:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYGGDSYMNWYLQKPGQPPQL
LIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.34);

hu7B10-VL-b:

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYGGDSYMNWYLQKPGQPPQL
LIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.35);

hu7B10-VL-c:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYGGDSYMNWYLQKPGQPPQL
LIYAASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFGGGT
KVEIK (SEQ ID NO.36).

Chọn lọc các khuôn và thiết kế đột biến ngược cho dòng tế bào lai 25G7 được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Chọn lọc các khuôn và thiết kế đột biến ngược

25G7-VL		25G7-VH	
hu25G7-VL-a	được liên hợp	hu25G7-VH-a	S49A
hu25G7-VL-b	F71Y	hu25G7-VH-b	S49A, A93T
hu25G7-VL-C	L46P, L47W, F71Y	hu25G7-VH-c	S49A, F67S, A93T

Chọn lọc các khuôn và thiết kế đột biến ngược cho dòng tế bào lai 7B10 được thể hiện trong bảng 7 sau:

Bảng 7. Chọn lọc các khuôn và thiết kế đột biến ngược

7B10-VL		7B10-VH	
hu7B10-VL-a	được liên hợp	hu7B10-VH-a	được liên hợp
hu7B10-VL-b	M4L	hu7B10-VH-b	R71I, R94K
hu7B10-VL-C	V58I	hu7B10-VH-c	M69L, R71I, T73K, R94K

Sau khi thử nghiệm biểu hiện quy mô nhỏ của các tổ hợp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nêu trên và so sánh số lượng của các đột biến ngược, kháng thể nhân tạo cuối cùng hu25G7 (với chuỗi nặng VH-c và chuỗi nhẹ VL-a) và phân tử kháng thể hu7B10 (với chuỗi nặng VH-b và chuỗi nhẹ VL-b) được đánh giá và chọn lọc toàn diện; trình tự chuỗi nhẹ và trình tự chuỗi nặng hoàn chỉnh tương ứng của chúng được thể hiện trong SEQ ID NO.17-SEQ ID NO.20.

hu25G7 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLEWV
AFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKRGF
FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDK
RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVNS
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO.17);

hu25G7 LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYLT
NLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO.18);

hu7B10 HC

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEW
MGLIHPNSDTTKFSENFKTRVTMTIDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAKSKIIT
TIVARHWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.19);

hu7B10 LC

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYGGDSYMNWYLQKPGQPPQL
LIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFGGG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO.20).

Trình tự của kháng thể nhân tạo được chèn vào vectơ biểu hiện tương ứng bằng phương pháp tách dòng phân tử, và các kháng thể nhân tạo tương ứng thu được bằng cách biểu hiện trong hệ biểu hiện tế bào HEK293.

Ví dụ 8: Dữ liệu hoạt tính của kháng thể nhân tạo

Các kháng thể nhân tạo hu25G7 và hu7B10 được thử nghiệm *in vitro* như được mô tả trong ví dụ 2-5, và kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng 8. Kết quả cho thấy cả hu25G7 và hu7B10 chỉ gắn kết với IL-4R của người, nhưng không gắn kết với IL-4R của khỉ vàng, chỉ ra rằng cả hai kháng thể gắn kết với các biểu mô của IL-4R của người không tương đồng với IL-4R của khỉ vàng; và có thể gắn kết đặc biệt với IL-4R của người. Cả hai kháng thể có thể phong bế các quá trình truyền tín hiệu nội bào và gắn kết IL-4/IL-4R, dẫn đến trung hòa tác dụng hoạt hóa IL-4 và ức chế tăng sinh của tế bào TF-1, trong đó hoạt tính phong bế và ức chế của hu25G7 vẫn còn tốt hơn đáng kể so với kháng thể đối chứng dupilumab, trong khi trị số ái lực K_D tương đối thấp hơn.

Bảng 8. Phát hiện hoạt tính *in vitro*

	Gắn kết ELISA IL- 4R-his của người (EC ₅₀) (ng/mL)	Gắn kết ELISA IL- 4R-his của khí vàng (EC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế ELISA IL- 4/IL-4R của người (IC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế gắn kết của tế bào HEK293-Blue IL-4 (với IL-4) (IC ₅₀) (ng/mL)	Ức chế tăng sinh của tế bào TF-1 bằng IL- 4 (IC ₅₀) (ng/mL)	K _D (nM) (Biacore)
hu25G7	3,413	không gắn kết	23,6	0,9431	29,56	1,07
hu7B10	12,010	không gắn kết	75,3	6,8700	112,4	0,284
Dupilumab	42,560	không gắn kết	178,7	0,6668	491,2	0,126

Ví dụ 9: Thử nghiệm trưởng thành ái lực của kháng thể hu25G7 nhân tạo

Để thu được các kháng thể kháng IL-4R của người hiệu quả hơn, kháng thể 25G7 đã được làm trưởng thành ái lực thông qua phương pháp nền hiển thị nấm men và thư viện nấm men trưởng thành ái lực hướng đích 6 CDR được thiết kế và điều chế trên cơ sở kháng thể hu25G7, và môi thoái hóa đã được thiết kế. Các axit amin đột biến đã thiết kế được đưa vào thư viện kháng thể hu25G7-scFv bằng PCR và tái tổ hợp tương đồng; kích cỡ của mỗi thư viện khoảng 10^9 . Thư viện nấm men được tạo cấu trúc được xác minh bằng phương pháp giải trình tự thế hệ thứ hai (GENEWIZ) để xác nhận tính đa dạng của thư viện.

IL-4R của người được đánh dấu biotin được sử dụng để chọn các kháng thể có ái lực cao từ thư viện nấm men hu25G7-scFv. Sau hai vòng sàng lọc MACS (hạt từ tính streptomycin, Invitrogen) và hai vòng sàng lọc FACS (BD FACSAria™ FUSION), dòng đơn dòng nấm men được chọn để nuôi cấy đơn dòng và cảm ứng biểu hiện. FACS (BD FACSCanto II) được sử dụng để phát hiện sự gắn kết của một dòng nấm men đơn với IL-4R của người và dòng nấm men đơn có ái lực cao hơn với ái lực của kháng thể 25G7 kiểu đại được chọn để xác minh trình tự. Sau khi sắp thẳng hàng trình tự và phân tích các dòng trình tự sắp xếp, trình tự thừa được loại bỏ, trình tự không dư thừa được chuyển đổi thành phân tử kháng thể của người có chiều dài đầy đủ để biểu hiện trong tế bào động vật có vú. Kháng thể có chiều dài đầy đủ sau khi tinh sạch ái lực đã được kiểm tra ái lực bằng cách sử dụng Biacore™ X-100 (GE Life Sciences) và các phân tử kháng thể ứng viên có ái lực cao hơn với IL-4R của người được chọn như sau. Ái lực của các phân tử kháng thể với IL-4R của người cao hơn ái lực của kháng thể hu25G7 thể đại, trong đó ái lực của phân tử kháng thể hu25G7-A so với ái lực của phân tử dupilumab, trong khi ái lực của phân tử hu25G7-B tốt hơn đáng kể so với của dupilumab.

Sau khi thành thực ái lực, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu25G7-A là như sau:

hu25G7-A LCVR

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVPYMYWYQQKPGQAPRLLIYLTSLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQWRAYPPMLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO.37).

Các trình tự CDR được chứa trong vùng này được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9. các trình tự CDR

Tên	Trình tự	SEQ ID NO.
LCDR1	RASSSVPYMY	SEQ ID NO.38
LCDR2	LTSNLAS	SEQ ID NO.7
LCDR3	QQWRAYPPMLT	SEQ ID NO.40

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu25G7-B là như sau:

hu25G7-B LCVR

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASPGVPPLAWYQQKPGQAPRLLIYLASSRPSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO.41);

Các trình tự CDR được chứa trong vùng này được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10. các trình tự CDR

Tên	Trình tự	SEQ ID NO.
LCDR1	RASPGVPPLA	SEQ ID NO.42
LCDR2	LASSRPS	SEQ ID NO.39
LCDR3	QQWRSNPPMLT	SEQ ID NO.8

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu25G7-A LCVR nêu trên được tái tổ hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ hu25G7 để thu được chuỗi nhẹ kháng thể hu25G7-A; vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu25G7-B LCVR nêu trên được tái tổ hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ hu25G7 để thu được chuỗi nhẹ kháng thể hu25G7-B.

Các gốc axit amin không ổn định trong hu25G7-VH-c được tối ưu hóa để tăng cường sinh khả dụng, dẫn đến vùng biến đổi chuỗi nặng hu25G7-VH:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKRGFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.43).

Vùng biến đổi chuỗi nặng được mô tả nêu trên có thể được tái tổ hợp với vùng hằng định chuỗi nặng hu25G7 để thu được chuỗi nặng kháng thể hu25G7-A/hu25G7-B.

Trình tự chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ hu25G7-A và hu25G7-B được thể hiện trên SEQ ID NO.44.

hu25G7 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWV
AFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKRGF
FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK
RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO.44);

Mỗi trình tự chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ được thể hiện trong SEQ ID NO.45-
SEQ ID NO.46.

hu25G7-A LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVPYMYWYQQKPGQAPRLLIYLT
NLASGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWRAYPPMLTFGGGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO.45);

hu25G7-B LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASPGVPPLAWYQQKPGQAPRLLIYLASS
RPSGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO.46).

Ví dụ 10: Dữ liệu hoạt tính trưởng thành ái lực của kháng thể nhân tạo

Hai kháng thể hu25G7-A và hu25G7-B được thử nghiệm như được mô tả trong
ví dụ 3 và Ví dụ 4; cả hai kháng thể của hu25G7-A và hu25G7-B có thể phong bế gắn kết

của IL-4/IL-4R, và quá trình truyền tín hiệu nội bào, dẫn đến trung hòa tác dụng hoạt hóa của IL-4 và IL-13, và ức chế tăng sinh của tế bào TF-1; dữ liệu hoạt tính được thể hiện trong bảng 11.

Bảng 11. So sánh dữ liệu hoạt tính

Kháng thể	Phong bế ELISA IL-4/IL-4R của người (IC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế gắn kết của các tế bào HEK293-Blue (bằng IL-4) (IC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế gắn kết của các tế bào HEK293-Blue (bằng IL-13) (IC ₅₀) (ng/mL)	Ức chế tăng sinh của tế bào TF-1 bằng IL-4 (IC ₅₀) (ng/mL)	Ức chế tăng sinh của tế bào TF-1 bằng IL-13 (IC ₅₀) (ng/mL)
hu25G7-A	144,2	6,49	10,02	83,72	13,24
hu25G7-B	108,4	6,598	8,38	50,95	13,71
Dupilumab	156,3	12,48	14,75	100,9	18,10

Trong thử nghiệm ức chế tăng sinh của tế bào TF-1 do kích thích IL-13, cả hu25G7-A và hu25G7-B đều cho thấy tác dụng có lợi. Tác dụng này đã được kiểm chứng nhiều lần và kết quả cho thấy trong cùng điều kiện, trị số ức chế (IC₅₀) của hu25G7-A đối với tăng sinh của tế bào TF-1 được kích thích bởi IL-13 bằng 11,68, và trị số ức chế (IC₅₀) của dupilumab đối chứng đối với tăng sinh của tế bào TF-1 được kích thích bởi IL-13 bằng 22,85. Khi so sánh với dupilumab, hu25G7 có tác dụng cải thiện đáng kể trong phong bế gắn kết của IL-4, IL-13 với IL-4R, cũng như tăng sinh của tế bào gây ra bởi gắn kết đó.

Ví dụ 11: Nghiên cứu tác dụng của kháng thể nhân tạo đối với bệnh viêm da ở chuột nhắt

Để thiết lập mô hình chuột nhắt bị bệnh viêm da, chuột nhắt chuyển gen IL-4/IL-4R α (được mua từ Cyagen Bioscience Biological Research Center (Taicang) Co., Ltd.) được sử dụng. 100 μ L dung dịch dầu oliu axeton OXZ 1,5% (axeton:dầu oliu = 4:1) được thoa đều lên bụng của mỗi chuột nhắt, kích cỡ từ khoảng 3cm x 3cm, để gây mẫn cảm. Ngày gây mẫn cảm được tính là D0 (ngày 0). Vào ngày thứ 7, 20 μ L dung dịch dầu oliu axeton OXZ 1% được thoa đều lên cả hai tai (cả hai bên) của chuột nhắt để thử thách, và thử thách cứ 72 giờ một lần.

Tổng cộng có 5 nhóm, bao gồm nhóm đối chứng bình thường (chỉ sử dụng dung dịch dầu oliu axeton để gây mẫn cảm và thử thách), nhóm đối chứng mô hình, hu25G7-A, hu25G7-B và nhóm dupilumab, được thiết lập trong thử nghiệm này, với 3 đến 5 chuột nhắt mỗi nhóm. Liều sử dụng cho nhóm sử dụng bằng 50mg/kg, và đường sử dụng là tiêm dưới da, hai lần mỗi tuần (xem bảng 12 để biết thông tin chi tiết). Vào ngày

27, chiều dày của tai được đo bằng thước cặp vernier, và kết quả được thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12. Sơ đồ liều lượng cho mỗi nhóm

Nhóm	Số lượng chuột nhất	Đường sử dụng	Liều sử dụng	Tần suất sử dụng*
Nhóm đối chứng bình thường	3 (chuột nhất đực)	Tiêm dưới da	-	hai lần mỗi tuần
Nhóm đối chứng mô hình	5 (3 chuột nhất cái+2 chuột nhất đực)	Tiêm dưới da	-	hai lần mỗi tuần
hu25G7-A	5 (3 chuột nhất cái+2 chuột nhất đực)	Tiêm dưới da	50mg/kg	hai lần mỗi tuần
hu25G7-B	3 (2 chuột nhất cái+1 male)	Tiêm dưới da	50mg/kg	hai lần mỗi tuần
Dupilumab	4 (2 chuột nhất cái+2 chuột nhất đực)	Tiêm dưới da	50mg/kg	hai lần mỗi tuần

Kết quả cho thấy tai chuột ở nhóm đối chứng có biểu hiện bệnh lý rõ ràng, chiều dày tai cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng bình thường. Chiều dày tai của chuột ở nhóm hu25G7-A, hu25G7-B và dupilumab thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng mô hình vào ngày 27. Nghĩa là, hu25G7-A, hu25G7-B và dupilumab có thể được sử dụng để điều trị viêm da, và hu25G7-B hiệu quả hơn dupilumab.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

(I) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; hoặc

(II) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13;

và/hoặc, vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

(I) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8; hoặc

(II) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16; hoặc

(III) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.40; hoặc

(IV) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.42, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.8.

2. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa chứa vùng bất kỳ được chọn từ (I) đến (IV) sau:

(I) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8;

(II) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO. 13; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16;

(III) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; và vùng biến đổi

chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.40;

(IV) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.42, SEQ ID NO.39 và SEQ ID NO.8.

3. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này còn chứa mảnh hoặc tổ hợp của chúng được chọn từ nhóm bao gồm:

- trình tự vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01; và

- trình tự đột biến ngược có độ tương đồng ít nhất bằng 95% so với vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01; tốt hơn nếu, đột biến ngược này được chọn từ nhóm bao gồm L46P, L47W và F71Y, hoặc tổ hợp của chúng;

và/hoặc, kháng thể kháng IL-4R này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn chứa mảnh hoặc tổ hợp của chúng được chọn từ nhóm bao gồm:

- trình tự vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01; và

- trình tự đột biến ngược có độ tương đồng ít nhất bằng 95% so với vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01; tốt hơn nếu, đột biến ngược này được chọn từ nhóm bao gồm S49A, F67S và A93T, hoặc tổ hợp của chúng.

4. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này còn chứa mảnh hoặc tổ hợp của chúng được chọn từ nhóm bao gồm:

- trình tự vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV2D-29*01; và

- trình tự đột biến ngược có độ tương đồng ít nhất bằng 95% so với vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV2D-29*01; tốt hơn nếu, đột biến ngược này được chọn từ nhóm bao gồm M4L và/hoặc V58I;

và/hoặc, kháng thể kháng IL-4R này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn chứa mảnh hoặc tổ hợp của chúng được chọn từ nhóm bao gồm:

- trình tự vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV1-2*02; và

- trình tự đột biến ngược có độ tương đồng ít nhất bằng 95% so với vùng FR có nguồn gốc từ chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV1-2*02; tốt hơn nữa, đột biến ngược này được chọn từ nhóm bao gồm M69L, R71I, T73K và R94K, hoặc tổ hợp của chúng.

5. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm mảnh Fab, mảnh Fab'-SH, mảnh Fv, mảnh scFv, và mảnh (Fab')₂; vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể này chứa các vùng khung chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc các biến thể của chúng; tốt hơn nữa, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể này chứa các vùng khung chuỗi nặng của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người; tốt hơn nữa nếu, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể này chứa các vùng khung chuỗi nặng của IgG4 của người.

6. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.1 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.1; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.9 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.9; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.43 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.43;

và/hoặc, vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.2 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.2; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.10 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.10; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.37 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.37; hoặc

(IV) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.41 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, 99% so với SEQ ID NO.41;

tốt hơn nếu, kháng thể kháng IL-4R này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.1 và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.2; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.9 và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.10; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.43, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.37; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.43, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.41.

7. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.25-SEQ ID NO.27 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với một trong số các SEQ ID NO.25-SEQ ID NO.27; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.31-SEQ ID NO.33 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với một trong số các SEQ ID NO.31-SEQ ID NO.33;

và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.28-SEQ ID NO.30 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với một trong số các SEQ ID NO.28-SEQ ID NO.30; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trên một trong số các SEQ ID NO.34-SEQ ID NO.36 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với một trong số các SEQ ID NO.34-SEQ ID NO.36.

8. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó:

chuỗi nặng chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.17 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.17; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.19 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.19; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.44;

và/hoặc chuỗi nhẹ chứa:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.18 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.18; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.20 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.20; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.45 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.45; hoặc

(IV) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.46 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.46;

tốt hơn nếu, kháng thể kháng IL-4R này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm:

chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.17 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.18; hoặc

chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.19 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.20; hoặc

chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.45; hoặc

chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.44 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.46.

9. Kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này là kháng thể của chuột nhắt, kháng thể thể khảm, kháng thể của người, kháng thể nhân tạo hoặc mảnh của chúng.

10. Polynucleotit mã hoá kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

11. Vector chứa polynucleotit theo điểm 10, trong đó vector này là vector biểu hiện sinh vật nhân thật, vector biểu hiện sinh vật nhân sơ, hoặc vector virut.

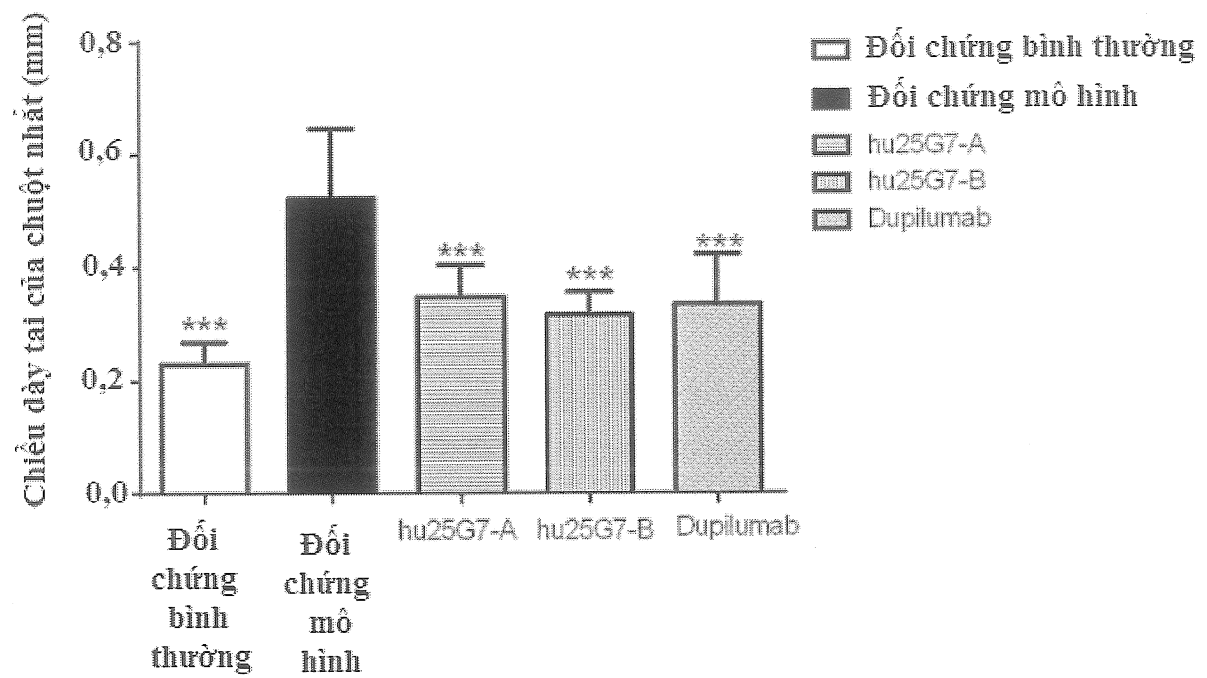
12. Tế bào vật chủ chứa vector theo điểm 11, tốt hơn nếu, tế bào vật chủ này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào động vật có vú, tốt hơn nữa nếu, tế bào vật chủ được chọn từ nhóm bao gồm *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, tế bào buồng trứng của chuột nhắt đồng Trung Quốc, tế bào thận phôi của người 293.

13. Thuốc thử chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

14. Thuốc thử chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, để sử dụng trong chẩn đoán bệnh liên quan đến tế bào biểu hiện IL-4R của người.

15. Dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9; và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

16. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm các bước sau: biểu hiện kháng thể kháng IL-4R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó trong tế bào vật chủ theo điểm 12, và phân lập kháng thể kháng IL-4R này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó từ tế bào vật chủ.

**Fig.1**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.
 SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 <120> KHÁNG THỂ KHÁNG IL-4R VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> 719056CPCT
 <160> 46
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miễn
 <222> (1)..(118)
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng mAb 25G7 của chuột nhắt
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ile Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miễn
 <222> (1)..(108)
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ mAb 25G7 của chuột nhắt
 <400> 2
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
 100 105
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miễn
 <222> (1)..(10)
 <223> mAb 25G7 HCDR1 của chuột nhắt
 <400> 3
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miễn
 <222> (1)..(17)
 <223> mAb 25G7 HCDR2 của chuột nhắt
 <400> 4
 Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(9)
 <223> mAb 25G7 HCDR3 của chuột nhắt
 <400> 5
 Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(10)
 <223> mAb 25G7 LCDR1 của chuột nhắt
 <400> 6
 Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(7)
 <223> mAb 25G7 LCDR2 của chuột nhắt
 <400> 7
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(11)
 <223> mAb 25G7 LCDR3 của chuột nhắt
 <400> 8
 Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met Leu Thr
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(125)
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng mAb 7B10 của chuột nhắt
 <400> 9
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Leu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Ser Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 10
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(111)
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ mAb 7B10 của chuột nhắt

```

<400> 10
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Cys Gln His Ser Asn
85 90 95
Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<222> (1)..(10)
<223> mAb 7B10 HCDR1 của chuột nhắt
<400> 11
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<222> (1)..(17)
<223> mAb 7B10 HCDR2 của chuột nhắt
<400> 12
Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15
Thr
<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<222> (1)..(16)
<223> mAb 7B10 HCDR3 của chuột nhắt
<400> 13
Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<222> (1)..(14)
<223> mAb 7B10 LCDR1 của chuột nhắt
<400> 14
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<222> (1)..(7)
<223> mAb 7B10 LCDR2 của chuột nhắt
<400> 15
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<222> (1)..(9)

```

```

<223> mAb 7B10 LCDR3 của chuột nhắt
<400> 16
Gln His Ser Asn Glu Asn Pro Pro Thr
1          5
<210> 17
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Chuỗi
<222> (1)..(445)
<223> Chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo hu25G7
<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
50          55          60
Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195          200          205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210          215          220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225          230          235          240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245          250          255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260          265          270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275          280          285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290          295          300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305          310          315          320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325          330          335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340          345          350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355          360          365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370          375          380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385          390          395          400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405          410          415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420          425          430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435          440          445
<210> 18
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Chuỗi
<222> (1)..(215)
<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo hu25G7
<400> 18

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 19
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Chuỗi
 <222> (1)..(455)
 <223> Chuỗi nặng của kháng thể nhân tạo hu7B10
 <400> 19
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

```

          325          330          335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
          340          345          350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
          355          360          365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
          370          375          380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385          390          395          400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
          405          410          415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
          420          425          430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
          435          440          445
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          450          455
<210> 20
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Chuỗi
<222> (1)..(218)
<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tạo hu7B10
<400> 20
Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
          20          25          30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35          40          45
Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
          50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65          70          75          80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
          85          90          95
Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
          130          135          140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145          150          155          160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195          200          205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215
<210> 21
<211> 98
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(98)
<223> Khuôn chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01
<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg
<210> 22
<211> 95

```

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(95)
<223> Khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01
<400> 22
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
          20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35          40          45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
          85          90          95

<210> 23
<211> 98
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(98)
<223> Khuôn chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV1-2*02
<400> 23
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
          20          25          30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg
<210> 24
<211> 100
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(100)
<223> Khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV2D-29*01
<400> 24
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20          25          30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
          35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
          85          90          95
Ile Gln Leu Pro
          100

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(118)
<223> hu25G7-VH-a
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
          20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```

```

      35      40      45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
  50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
  65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
Leu Val Thr Val Ser Ser
      115
<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(118)
<223> hu25G7-VH-b
<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
      20      25      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
Leu Val Thr Val Ser Ser
      115
<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(118)
<223> hu25G7-VH-c
<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
      20      25      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
Leu Val Thr Val Ser Ser
      115
<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(108)
<223> hu25G7-VL-a
<400> 28
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
      20      25      30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
      35      40      45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
      50      55      60

```

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 29
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(108)
 <223> hu25G7-VL-b
 <400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(108)
 <223> hu25G7-VL-c
 <400> 30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 31
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <222> (1)..(125)
 <223> hu7B10-VH-a
 <400> 31

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 32

```

<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(125)
<223> hu7B10-VH-b
<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20          25          30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
50          55          60
Lys Thr Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Lys Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
100         105         110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120         125
<210> 33
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(125)
<223> hu7B10-VH-c
<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20          25          30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
50          55          60
Lys Thr Arg Val Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Lys Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
100         105         110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120         125
<210> 34
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(111)
<223> hu7B10-VL-a
<400> 34
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
20          25          30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35          40          45
Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65          70          75          80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
85          90          95
Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105         110
<210> 35
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

```

```

<221> Miền
<222> (1)..(111)
<223> hu7B10-VL-b
<400> 35
Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
85 90 95
Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 36
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(111)
<223> hu7B10-VL-c
<400> 36
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
85 90 95
Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 37
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(108)
<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu25G7-A
<400> 37
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ala Tyr Pro Pro Met
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(10)
<223> hu25G7-A LCDR1
<400> 38
Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT

```

```

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(7)
<223> hu25G7-B LCDR2
<400> 39
Leu Ala Ser Ser Arg Pro Ser
1 5
<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(11)
<223> hu25G7-A LCDR3
<400> 40
Gln Gln Trp Arg Ala Tyr Pro Pro Met Leu Thr
1 5 10
<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(108)
<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu25G7-B
<400> 41
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Pro Gly Val Pro Pro Leu
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Leu Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(10)
<223> hu25G7-B LCDR1
<400> 42
Arg Ala Ser Pro Gly Val Pro Pro Leu Ala
1 5 10
<210> 43
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(118)
<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng được tối ưu hóa hu25G7-VH-c
<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
50 55 60
Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

```

<210> 44
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Chuỗi
<222> (1)..(445)
<223> Chuỗi nặng hu25G7-A và hu25G7-B
<400> 44
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
50 55 60
Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 45
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Chuỗi
<222> (1)..(215)
<223> Chuỗi nhẹ hu25G7-A
<400> 45
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

```

```

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
   35           40           45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
   50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
   65           70           75           80
Asp Phe Ala Val Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ala Tyr Pro Pro Met
           85           90           95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
           100          105          110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
           115          120          125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
           130          135          140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
           145          150          155          160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
           165          170          175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
           180          185          190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
           195          200          205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           210          215
<210> 46
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Chuỗi
<222> (1)..(215)
<223> Chuỗi nhẹ hu25G7-B
<400> 46
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Pro Gly Val Pro Pro Leu
           20           25           30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
           35           40           45
Leu Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
           50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
           65           70           75           80
Asp Phe Ala Val Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
           85           90           95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
           100          105          110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
           115          120          125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
           130          135          140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
           145          150          155          160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
           165          170          175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
           180          185          190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
           195          200          205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           210          215

```