



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

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



1-0044468

(51)^{2020.01} C07K 16/24; A61P 19/02; G01N 33/68; (13) B
C12N 15/13; A61K 39/395; A61P 29/00

(21) 1-2020-06802

(22) 24/05/2019

(86) PCT/CN2019/088344 24/05/2019

(87) WO2019/228266 05/12/2019

(30) 201810539405.0 30/05/2018 CN

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/05/2021 398A

(71) AKESO BIOPHARMA, INC. (CN)

6 Shennong Road, Torch Development Zone Zhongshan, Guangdong 528437, China

(72) LI, Baiyong (US); XIA, Yu (US); WANG, Zhongmin Maxwell (US); ZHANG, Peng (CN).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG INTƠLỜKIN-17A VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2020-06802

(57) Sáng chế liên quan đến lĩnh vực điều trị bệnh tự miễn và miễn dịch học phân tử, và cụ thể là đề cập đến kháng thể kháng IL-17A, và dược phẩm chứa chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng bao gồm: HCDR1-HCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 31-33, hoặc HCDR1-HCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 37-39, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng bao gồm: LCDR1-LCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 34-36, hoặc LCDR1-LCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 40-42. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với IL-17A, đối kháng đặc hiệu liên kết của IL-17A với phối tử của nó, và ức chế sự hoạt hóa của nguyên bào sợi bởi IL-17A.

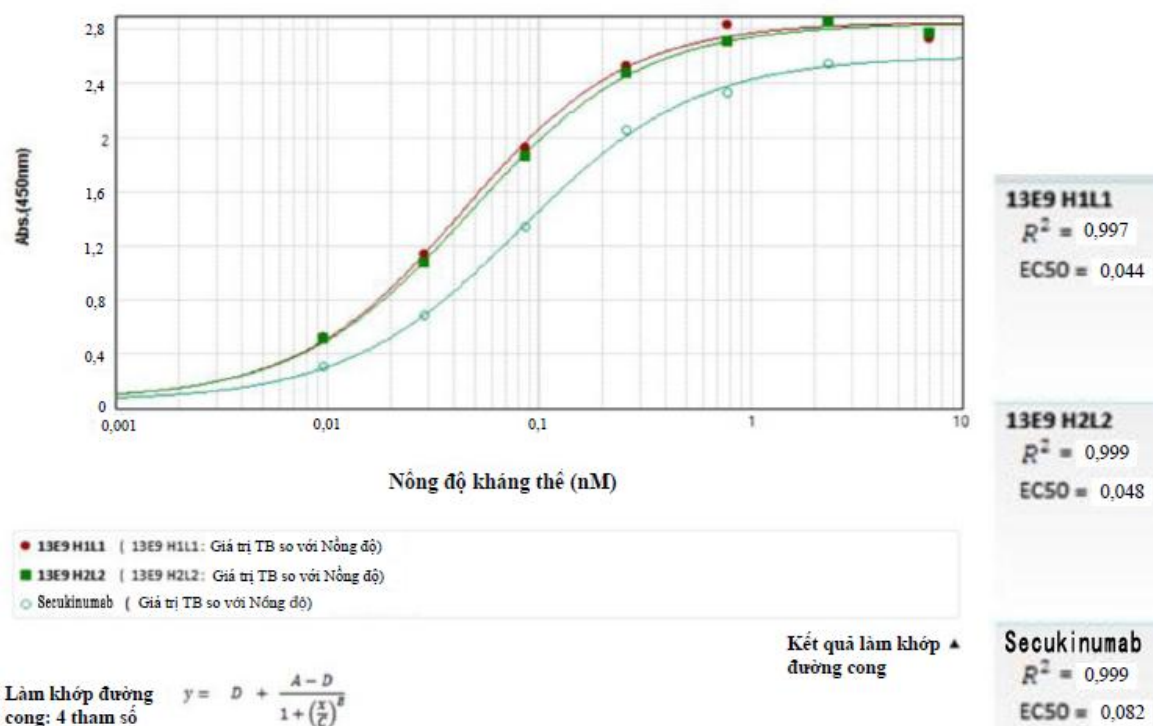


FIG. 12

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực miễn dịch học phân tử, và đề cập đến kháng thể kháng intolokin-17A, và dược phẩm chứa kháng thể này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng intolokin-17A.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Intolokin-17A (viết tắt là IL-17A hoặc IL 17A) là thành viên thuộc họ IL-17 xytokin gồm 6 thành viên, tức là IL-17A (IL-17A được phát hiện đầu tiên và còn được gọi là IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (còn có tên là IL-25) và IL-17F (Shi Peiqing et al., Chinese Journal of Cell Biology 33: 345-357 (2011)). IL-17F có chung khoảng 50% mức tương đồng với IL-17A và các gen mã hóa của chúng nằm trong cùng một đoạn nhiễm sắc thể 6p12 (Gaffen et al., Nat Rev Immunol 9:556-67 (2009)). IL-17A và IL-17F có thể tồn tại ở dạng dime đồng nhất như IL-17A/IL-17A và IL-17F/IL-17F, cũng như dime khác loại IL-17A/IL-17F. IL-17A và IL-17F thể hiện tác dụng sinh học bằng cách liên kết với các thụ thể (Wright et al., J Immunol 181: 2799-805 (2008)).

Họ thụ thể IL-17 (IL-17R) bao gồm 5 thành viên, tức là IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD và IL-17RE. Các thành viên của họ thụ thể IL-17 có thể tạo thành các phức hợp thụ thể khác nhau, trong đó IL-17RA, phân tử lớn nhất được phát hiện cho đến nay trong họ này, là một tiểu đơn vị phổ biến truyền tín hiệu cho ít nhất bốn phối tử và có các tác dụng sinh học chính. (Gaffen et al., Nat Rev Immunol 9: 556-67 (2009)). Phức hợp IL-17RA và IL-17RC điều tiết các đáp ứng của tế bào với IL-17A và IL-17F (Toy et al., J Immunol 177: 36-9 (2006)).

IL-17A quan trọng hơn IL-17F trong đáp ứng viêm tự miễn, lý do chính là IL17RA có ái lực với IL-17A lớn hơn hàng trăm lần với IL-17F (Ely et al., Nat Immunol 10 1245-51 (2009)), đáp ứng của tế bào với IL-17A mạnh hơn 10 lần so với đáp ứng của tế bào với IL-17F (Dubin et al., Immunity 30: 9-11 (2009)). Có thể sử dụng kháng thể kháng IL-17A hoặc kháng thể kháng thụ thể IL-17 để phong bế sự liên

kết của IL-17A với thụ thể của nó, do đó phong bế hoạt tính sinh học của IL-17A.

IL-17A đóng vai trò quan trọng trong một số bệnh tự miễn (ví dụ, bệnh vẩy nến, viêm khớp vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh luput ban đỏ hệ thống, v.v.). Kháng thể đơn dòng kháng IL-17A Secukinumab được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan Thuốc Châu Âu (EMA) phê duyệt để điều trị bệnh vẩy nến thể mảng từ mức trung bình đến nặng, viêm khớp vẩy nến và viêm cột sống dính khớp.

Bệnh vẩy nến, còn được gọi là bệnh mụn ngứa, là một bệnh về da mãn tính tự miễn. Đặc điểm mô học da của chúng là tăng sinh tế bào sừng biểu bì, hình thành mạch, cũng như sự thâm nhiễm của tế bào đuôi gai, đại thực bào, bạch cầu trung tính và tế bào T. (Nestle et al., N Engl J Med, 361: 496-509 (2009)). Bệnh vẩy nến có nhiều biểu hiện khác nhau, trong đó vẩy nến thể mảng là loại phổ biến nhất, chiếm hơn 90% trong tổng số bệnh nhân mắc bệnh vẩy nến. Viêm khớp vẩy nến (PsA) là loại bệnh vẩy nến đặc biệt, gây phát ban vẩy nến cũng như đau, sưng, cứng và rối loạn vận động ở khớp và các mô mềm xung quanh. Một số bệnh nhân có thể bị viêm xương cùng và (hoặc) viêm cột sống với diễn biến kéo dài, dễ tái phát và cứng khớp giai đoạn cuối dẫn đến tàn phế. Sự tồn tại của bệnh vẩy nến là một sự khác biệt quan trọng giữa viêm khớp vẩy nến và các viêm khớp khác và mức độ nghiêm trọng của tổn thương da không liên quan trực tiếp đến mức độ viêm khớp (Tan Zhen et al., Chinese Journal of Rheumatology 20:354-357 (2016)).

Mức biểu hiện IL-17A tăng lên đáng kể trong các mô da gây bệnh vẩy nến và sự gia tăng này có liên quan chặt chẽ đến hoạt động của bệnh vẩy nến (Johansen et al., Brit J Dermatol, 160:319-24 (2009); Lowes et al. J Invest Dermatol 128:1207-11 (2008)). Trong số các bệnh nhân bị bệnh vẩy nến, kháng thể đơn dòng kháng IL-17A Secukinumab đã cho thấy có hiệu quả tuyệt vời, có thể làm giảm đáng kể hoạt tính bệnh của bệnh nhân mắc bệnh vẩy nến và giảm diện tích các mảng vẩy nến. (Langley et al., N Engl J Med, 371:326-38 (2014)); Secukinumab cũng có thể làm giảm đáng kể các triệu chứng viêm khớp và cải thiện đáng kể các chức năng khớp của bệnh nhân bị viêm khớp vẩy nến (Gottlieb et al., J Drugs Dermatol, 14821-33 (2015)). Secukinumab

được FDA chấp thuận dùng để điều trị bệnh vẩy nến thể mảng từ mức trung bình đến nặng và viêm khớp vẩy nến.

Viêm khớp dạng thấp (RA) chủ yếu được đặc trưng bởi sự tăng sinh nguyên bào sợi hoạt dịch khớp gây viêm, tổn thương khớp và sụn, thâm nhiễm tế bào T trợ giúp CD4⁺ và tế bào huyết tương sản xuất tự kháng thể. IL-17A có thể gây ra cả viêm lẫn tổn thương xương trong viêm khớp dạng thấp. IL-17A được biểu hiện nhiều trong tế bào đơn nhân hoạt dịch dạng thấp của bệnh nhân mắc viêm khớp dạng thấp so với người khỏe mạnh hoặc bệnh nhân bị viêm xương khớp (Sarkar et al., Clin Exp Immunol. 177: 652-61 (2014)), các nghiên cứu tế bào học cho thấy IL-17A có thể kích thích tiêu xương và phá hủy collagen (Kitami et al., Biochimie. 92: 398-404 (2010)). IL-17A có thể cảm ứng sụn, tế bào hoạt dịch, đại thực bào và nguyên bào xương để tiết ra các xytokin tiền viêm như TNF α , IL-1 β và IL-6, và có tác dụng sinh học. Các xytokin tiền viêm này gây ra sự khởi phát đột ngột của viêm khớp dạng thấp và có thể duy trì số lượng tế bào TH17 thông qua IL-6 gây ra bởi IL-17A, do đó hình thành phản hồi tích cực và tác động hiệp đồng để khuếch đại các tác động viêm của chúng và thiết lập trạng thái viêm mãn tính (Ogura et al., Immunity 29: 628-36 (2008)). Việc gây đối kháng IL-17A có thể làm giảm các triệu chứng viêm khớp dạng thấp một cách hiệu quả. Ở mô hình chuột nhất bị viêm khớp do collagen, việc trung hòa IL-17A hoặc thụ thể của nó có thể giải quyết các triệu chứng của viêm khớp dạng thấp (Chao et al., Autoimmunity. 2011 May; 44 (3):243-52); Sự thiếu hụt IL-17 có thể bảo vệ chuột nhất chủ khỏi viêm khớp do collagen (Nakae et al., J Immunol, 171: 6173-7 (2003)) trong khi IL-17A biểu hiện quá mức có thể làm trầm trọng thêm các tình trạng bệnh này (Lubberts et al., Inflamm Res 51: 102-4 (2002)).

Viêm cột sống dính khớp (AS) là bệnh tự miễn mãn tính. Các đặc điểm bệnh lý ban đầu của AS là viêm cấp tính hoặc mãn tính tại các điểm gắn xương của khớp xương cùng, gân và dây chằng, có thể phát triển thành viêm khớp và viêm khớp đối mặt ở giai đoạn sau; và có hiện tượng giảm mật độ xương ở tất cả bệnh nhân AS. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng cả số lượng tế bào Th17 tiết IL-17A trong máu ngoại vi lẫn nồng độ IL-17A của bệnh nhân mắc chứng AS đều tăng đáng kể so với những người khỏe

mạnh. (Gracey et al., *Arthritis Rheumatol.* 68: 679-89. (2016)). IL-17A có thể hoạt hóa nhiều loại tế bào như đại thực bào, tế bào đuôi gai, tế bào nội mô, nguyên bào sợi, tế bào sụn và nguyên bào xương, có thể tạo ra một lượng lớn các yếu tố phá hủy viêm (Ogura et al., *Immunity* 29: 628-36 (2008)). Trong các mô xương, IL-17A khiến nguyên bào xương biểu hiện chất hoạt hóa thụ thể của phôi tử B yếu tố κ (RANKL), hoạt hóa tế bào hủy xương, do đó gây tiêu xương, làm trầm trọng thêm tình trạng mất xương và gây hủy xương trực tiếp hoặc gián tiếp (Gaffen, *Curr Rheumatol Rep* 11:365-370 (2009)). Trong số các bệnh nhân mắc AS, kháng thể đơn dòng kháng IL-17A Secukinumab đã cho thấy hiệu quả tuyệt vời, có thể làm giảm đáng kể các triệu chứng và dấu hiệu của viêm cột sống dính khớp. (Baeten et al., *N Engl J Med*, 373:2534-48 (2015)). Dựa trên các kết quả này, Secukinumab được FDA chấp thuận trong điều trị viêm cột sống dính khớp.

Bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE) là bệnh tự miễn ảnh hưởng đến nhiều hệ thống. Cụ thể, các kháng thể chống lại các tự kháng nguyên xuất hiện trong cơ thể bệnh nhân, chúng tấn công các mô hoặc cơ quan khác nhau một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, và các vùng thường bị ảnh hưởng nhất bao gồm da, khớp và thận. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng IL-17A đóng vai trò trong SLE. Tỷ lệ tế bào sản xuất IL-17A trong máu ngoại vi của bệnh nhân SLE tăng lên và mức IL-17A trong huyết thanh của bệnh nhân cao bất thường (Chen et al., *J Clin Immunol*, 30:221-5 (2010)). Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của bệnh nhân SLE kèm theo tổn thương thận có thể tạo ra nhiều IgG toàn phần, IgG kháng dsADN và IL-6 hơn khi được nuôi cấy với IL-17, cho thấy IL-17 có thể tham gia vào quá trình hoạt hóa tế bào B. (Dong Et al., *Chin Med J (Engl)*, 116:543-8 (2003)). Gần đây, cũng đã phát hiện ra rằng IL-17A có thể hợp tác với BAFF (yếu tố hoạt hóa tế bào B) để bảo vệ tế bào B khỏi quá trình chết theo chương trình, do đó làm tăng số lượng tế bào sản xuất tự kháng thể. (Onishi et al., *Immunology* 129: 311-21 (2010)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sau khi nghiên cứu sâu rộng và nỗ lực sáng tạo, các tác giả sáng chế đã sử dụng hệ thống biểu hiện tế bào động vật có vú để biểu hiện IL-17A tái tổ hợp (24-155) dưới

dạng kháng nguyên để chủng ngừa cho chuột nhắt, và thu được một lượng lớn các mẫu tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào lá lách chuột nhắt và tế bào u tủy. Các tác giả sáng chế đã thu được hai dòng tế bào lai riêng biệt sau đây bằng cách sàng lọc một lượng lớn các mẫu:

dòng tế bào lai LT006 (IL-17A-13E9), được lưu giữ tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) vào ngày 12 tháng 9 năm 2017 với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017102;

và dòng tế bào lai LT007 (IL-17A-2G2), được lưu giữ tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) vào ngày 12 tháng 9 năm 2017 với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017165.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra:

dòng tế bào lai LT006 có thể tiết và tạo ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu (có tên là 13E9) liên kết đặc hiệu với IL-17A, và kháng thể đơn dòng có thể phong bế liên kết của IL-17A với IL-17RA rất hiệu quả;

dòng tế bào lai LT007 có thể tiết và tạo ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu (có tên là 2G2) liên kết đặc hiệu với IL-17A, và kháng thể đơn dòng có thể phong bế liên kết của IL-17A với IL-17RA rất hiệu quả;

ngoài ra, các tác giả sáng chế đã tạo ra một cách sáng tạo kháng thể được làm tương thích với người kháng IL-17A (lần lượt có tên là 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2; và 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3), tất cả các kháng thể này có thể liên kết với IL-17A của người một cách hiệu quả, phong bế liên kết của IL-17A với thụ thể IL-17A, và ức chế sự hoạt hóa các con đường truyền tín hiệu xuôi dòng của các thụ thể IL-17A;

kháng thể theo sáng chế có tiềm năng dùng để sản xuất các loại thuốc ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh tự miễn như bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp và bệnh luput ban đỏ hệ thống.

Do đó, sáng chế đề xuất các đối tượng sau:

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết

kháng nguyên của nó, trong đó,

vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể đơn dòng bao gồm: HCDR1-HCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 31-33, hoặc HCDR1-HCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 37-39; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể đơn dòng bao gồm: LCDR1-LCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 34-36, hoặc LCDR1-LCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 40-42.

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng xác định sự liên kết của kháng nguyên; vùng biến đổi của mỗi chuỗi chứa ba vùng siêu biến, cụ thể là vùng xác định tính hỗ trợ (CDR) (CDR của chuỗi nặng (H) bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, và CDR của chuỗi nhẹ (L) bao gồm LCDR1, LCDR2, LCDR3; được xác định bởi Kabat et al., xem Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Volumes 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md).

Trình tự axit amin của vùng CDR của kháng thể đơn dòng trong mục (1) đến (2) nêu trên được phân tích bằng các phương tiện kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cơ sở dữ liệu VBASE2:

kháng thể 13E9, 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, và 13E9 H3L2 theo sáng chế có các CDR giống nhau:

trình tự axit amin của ba vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng là như sau:

HCDR1: SYSFTSDYA (SEQ ID NO: 31),

HCDR2: ITYSGVT (SEQ ID NO: 32),

HCDR3: ARADYDSYYTMDY (SEQ ID NO: 33); và

trình tự axit amin của ba vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như sau:

LCDR1: QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 34),

LCDR2: KVS (SEQ ID NO: 35),

LCDR3: SQSTHFWT (SEQ ID NO: 36).

Kháng thể 2G2, 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, và 2G2 H3L3 theo sáng chế có các CDR giống nhau:

trình tự axit amin của ba vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng là như sau:

HCDR1: SEVFPIAD (SEQ ID NO: 37),

HCDR2: ILPSFGRT (SEQ ID NO: 38),

HCDR3: ARGNYGFAY (SEQ ID NO: 39); và

trình tự axit amin của ba vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như sau:

LCDR1: QSLLNSDGKTY (SEQ ID NO: 40),

LCDR2: LVS (SEQ ID NO: 41),

LCDR3: WQGSHPQT (SEQ ID NO: 42).

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó,

vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể đơn dòng bao gồm HCDR1-HCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 31-33, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể đơn dòng bao gồm LCDR1-LCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 34-36.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó,

vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể đơn dòng bao gồm HCDR1-HCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 37-39, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể đơn dòng bao gồm LCDR1-LCDR3 với các trình tự axit amin được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 40-42.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó,

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, và SEQ ID NO: 28;

và

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, và SEQ ID NO: 30.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, và SEQ ID NO: 14, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 12;

hoặc

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, và SEQ ID NO: 28, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, và SEQ ID NO: 30.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ vùng bất kỳ trong số các vùng từ (1) đến (8) sau:

(1) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

(2) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

6, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8;

(3) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

10, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12;

(4) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

14, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12;

(5) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

16, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18;

(6) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

20, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22;

(7) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

24, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26;

và

(8) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

28, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, mảnh của vùng xác định tính hỗ trợ, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm và kháng thể kép.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó, kháng thể đơn dòng liên kết với protein IL-17A với EC₅₀ thấp hơn khoảng 100 nM, như thấp hơn khoảng 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, hoặc thấp hơn; tốt hơn là, EC₅₀ được đo bằng phương pháp ELISA cạnh tranh.

Theo một số phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể đơn dòng liên kết với protein IL-17A với K_D thấp hơn khoảng 10⁻⁵ M, như thấp hơn khoảng 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰

M, hoặc thấp hơn; tốt hơn là, K_D được đo bằng thiết bị tương tác phân tử Fortebio.

Theo một số phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể đơn dòng liên kết với protein IL-17A với EC_{50} thấp hơn khoảng 100 nM, như thấp hơn khoảng 10 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, hoặc thấp hơn; cụ thể là, EC_{50} được đo bằng phương pháp ELISA gián tiếp.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng bao gồm vùng không CDR, và vùng không CDR là từ các loài khác không phải là chuột, như từ kháng thể của người.

Theo một số phương án theo sáng chế, vùng ổn định của globulin miễn dịch được làm tương thích với người, ví dụ, vùng ổn định chuỗi nặng sử dụng vùng C chuỗi Ig gamma-1, ACCESSION: P01857; và vùng ổn định chuỗi nhẹ sử dụng vùng C chuỗi Ig kappa, ACCESSION: P01834.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó:

kháng thể đơn dòng được tạo ra bằng dòng tế bào lai LT006, được lưu giữ tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017102; hoặc

kháng thể đơn dòng được tạo ra bằng dòng tế bào lai LT007, được lưu giữ tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017165.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị khối u hoặc bệnh tự miễn, hoặc để chẩn đoán bệnh tự miễn; tốt hơn là, bệnh tự miễn được chọn từ bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp và bệnh luput ban đỏ hệ thống; tốt hơn nếu bệnh vẩy nến là bệnh vẩy nến thể mảng từ mức trung bình đến nặng.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh

liên kết kháng nguyên của nó được sử dụng để:

phong bế liên kết của IL-17A với IL-17RA,
điều hòa (ví dụ, điều hòa giảm) hoạt tính hoặc mức IL-17A, hoặc
ức chế sự biểu hiện IL-6 trong tế bào.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic phân lập chứa trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của một trong số các kháng thể đơn dòng bất kỳ được mô tả trong sáng chế.

Theo một hoặc nhiều phương án theo sáng chế, phân tử axit nucleic phân lập chứa trình tự nucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (1) đến (8):

- (1) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3;
- (2) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7;
- (3) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11;
- (4) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11;
- (5) SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17;
- (6) SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21;
- (7) SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; và
- (8) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic phân lập theo sáng chế. Tốt hơn nếu vector tái tổ hợp là vector biểu hiện tái tổ hợp, như vector biểu hiện tái tổ hợp của sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc vector biểu hiện tái tổ hợp của sinh vật có nhân điển hình.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa vector tái tổ hợp theo sáng chế.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra bất kỳ một trong số các kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng được mô tả trong sáng chế, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện thích hợp và phân lập kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ môi

trường nuôi cấy tế bào.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất dòng tế bào lai được chọn từ:

dòng tế bào lai LT006, được lưu giữ tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017102; và

dòng tế bào lai LT007, được lưu giữ tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017165.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất thể liên hợp bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và phần được liên hợp, trong đó kháng thể đơn dòng là một trong số các kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng được mô tả trong sáng chế, phần được liên hợp là nhãn có thể phát hiện được; tốt hơn nếu nhãn có thể phát hiện được là đồng vị phóng xạ, chất phát quang như chất huỳnh quang, chất tạo màu, hoặc enzym.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất kit bao gồm một trong số các kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng được mô tả trong sáng chế hoặc bao gồm thể liên hợp theo sáng chế;

tốt hơn là, kit còn bao gồm kháng thể thứ hai nhận diện đặc hiệu kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; tùy ý, kháng thể thứ hai này còn bao gồm nhãn có thể phát hiện được; tốt hơn nếu nhãn có thể phát hiện được là đồng vị phóng xạ, chất phát quang như chất huỳnh quang, chất tạo màu, hoặc enzym.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất việc sử dụng một trong số các kháng thể đơn dòng bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế trong việc điều chế kit để phát hiện định lượng hoặc định tính IL-17A. Phát hiện định tính đề cập đến việc phát hiện sự có mặt của IL-17A trong mẫu cần được kiểm tra, và phát hiện định lượng đề cập đến việc phát hiện nồng độ hoặc hàm lượng IL-17A trong mẫu cần được kiểm tra.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến được phẩm chứa một trong số các

kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế; tùy ý, dược phẩm còn chứa chất mang hoặc tá dược được dụng.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất việc sử dụng một trong số các kháng thể đơn dòng bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế để bào chế thuốc ngăn ngừa và/hoặc điều trị khối u hoặc bệnh tự miễn, hoặc sử dụng để bào chế thuốc chẩn đoán bệnh tự miễn; tốt hơn là, bệnh tự miễn được chọn từ bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp và bệnh luput ban đỏ hệ thống; tốt hơn nếu bệnh vẩy nến là bệnh vẩy nến thể mảng từ mức trung bình đến nặng.

Cụ thể, từ các thử nghiệm trên động vật (Ví dụ 11), các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng 13E9H3L2 có thể ức chế hiệu quả sự gia tăng độ dày biểu bì của mô hình chuột nhắt C57BL/6 bị bệnh vẩy nến, được chứng minh là thuốc kháng thể 13E9H3L2 có thể ức chế đáng kể sự gia tăng độ dày biểu bì của chuột nhắt gây ra do IL-17A và tiêm dưới da, có hiệu quả tương đương với thuốc kháng thể đơn dòng được bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, bệnh tự miễn (ví dụ, bệnh vẩy nến như bệnh vẩy nến thể mảng từ mức trung bình đến nặng, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp hoặc bệnh luput ban đỏ hệ thống) gây ra do mức biểu hiện IL-17A tăng. Mức biểu hiện tăng được mô tả trong bản mô tả là mức biểu hiện cao hơn mức biểu hiện của người khỏe mạnh và đạt đến mức gây bệnh.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến việc sử dụng một trong số các kháng thể đơn dòng bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế trong việc bào chế các thuốc sau:

thuốc phong bế liên kết của IL-17A với IL-17RA,

thuốc điều hòa (ví dụ, điều hòa giảm) hoạt tính hoặc mức IL-17A, hoặc

thuốc ức chế sự biểu hiện IL-6 trong tế bào.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất phương pháp *in vivo* hoặc *in vitro* bao

gồm bước cho tế bào hoặc đối tượng cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của một trong số các kháng thể đơn dòng bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế, và phương pháp này được chọn từ các phương pháp sau:

phương pháp phong bế liên kết của IL-17A với IL-17RA,

phương pháp điều hòa (ví dụ, điều hòa giảm) hoạt tính hoặc mức IL-17A, hoặc

phương pháp ức chế sự biểu hiện IL-6 trong nguyên bào sợi.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, phương pháp *in vitro* là phương pháp không trị liệu và/hoặc không chẩn đoán.

Intolokin 6 (viết tắt là IL-6 hoặc IL 6) có thể được tạo ra bởi nguyên bào sợi, bạch cầu đơn nhân/đại thực bào, tế bào lympho T, tế bào lympho B, tế bào biểu mô, tế bào sừng, và các tế bào khối u khác. Intolokin 6 là yếu tố quan trọng để điều hòa đáp ứng miễn dịch, và IL-6 và IL-1 có thể thúc đẩy hiệp đồng sự tăng sinh tế bào T, kích thích sự biệt hóa tế bào B, và tham gia vào các đáp ứng viêm của cơ thể (Schoenborn et al. *Advances in Immunology* 96: 41-101 (2007)). Thử nghiệm *in vitro* (Ví dụ 10) theo sáng chế cho thấy kháng thể kháng IL-17A có thể làm giảm đáng kể sự tiết IL-6 và ức chế đáp ứng miễn dịch qua trung gian IL-6.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa khối u hoặc bệnh tự miễn, và phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của một trong số các kháng thể đơn dòng bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế; tốt hơn là, bệnh tự miễn được chọn từ bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp và bệnh luput ban đỏ hệ thống; tốt hơn nếu bệnh vẩy nến là bệnh vẩy nến thể mảng từ mức trung bình đến nặng.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến phương pháp chẩn đoán bệnh tự miễn, và phương pháp này bao gồm bước đưa vào mẫu cần thử nghiệm (như mẫu mô, mẫu tế bào, hoặc mẫu máu) hoặc cho đối tượng cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của một trong số các kháng thể đơn dòng bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế; tốt hơn là, bệnh tự miễn được

chọn từ bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp và bệnh luput ban đỏ hệ thống; tốt hơn nếu bệnh vẩy nến là bệnh vẩy nến thể mảng từ mức trung bình đến nặng.

Theo một số phương án của sáng chế, xem xét rằng bệnh tự miễn (ví dụ, bệnh vẩy nến như bệnh vẩy nến thể mảng từ mức trung bình đến nặng, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp hoặc bệnh luput ban đỏ hệ thống) gây ra do mức biểu hiện IL-17A tăng, do đó việc chẩn đoán có thể được thực hiện bằng cách phát hiện mức biểu hiện IL-17A sử dụng bất kỳ một trong số các kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong sáng chế hoặc thể liên hợp theo sáng chế. Nếu mức biểu hiện IL-17A cao hơn mức của người khỏe mạnh và đạt đến mức gây bệnh, chẩn đoán là kết quả dương tính; ngược lại, chẩn đoán là kết quả âm tính.

Theo sáng chế, trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, các hoạt động trong phòng thí nghiệm về nuôi cấy tế bào, di truyền phân tử, hóa học axit nucleic và miễn dịch học được sử dụng ở đây là các hoạt động thường xuyên được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực tương ứng. Trong khi đó, để hiểu rõ hơn về sáng chế, các định nghĩa và giải thích về các thuật ngữ liên quan được cung cấp dưới đây.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, khi trình tự axit amin của protein IL-17A (intolokin-17A) được đề cập, nó bao gồm chiều dài đầy đủ của protein IL-17A; cũng là protein dung hợp IL-17A, như mảnh được dung hợp với mảnh protein IgG Fc của người hoặc chuột nhắt (mFc hoặc hFc). Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng trong trình tự axit amin của protein IL-17A, các đột biến hoặc các biến thể (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thay thế, khuyết đoạn và/hoặc bổ sung) có thể được tạo ra tự nhiên hoặc đưa vào nhân tạo mà không ảnh hưởng đến các chức năng sinh học của chúng. Vì thế, trong sáng chế, thuật ngữ "protein IL-17A" nên bao gồm tất cả các trình tự như vậy, bao gồm cả các biến thể tự nhiên hoặc nhân tạo của chúng. Ngoài ra, khi đoạn trình tự của protein IL-17A được

mô tả, protein IL-17A cũng bao gồm các mảnh trình tự tương ứng trong các biến thể tự nhiên hoặc nhân tạo của chúng.

Trình tự có chiều dài đầy đủ (155aa) của IL-17A như sau, trong đó trình tự peptit tín hiệu (23aa) được gạch dưới.

MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNL
NIHNRNTNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCIN
ADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHV
A (SEQ ID NO: 43)

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi có quy định khác, IL-17R là IL-17RA; trình tự protein cụ thể của nó là trình tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và có thể tham khảo trình tự được bộc lộ trong tài liệu hiện có hoặc GenBank. Ví dụ, IL-17RA (CD217, NCBI Gene ID: NP_055154.3).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ EC₅₀ đề cập đến nồng độ thu được 50% hiệu quả tối đa, tức là nồng độ có thể tạo ra 50% hiệu quả tối đa.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch thường bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit (mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (L) và một chuỗi "nặng" (H)). Theo nghĩa chung, chuỗi nặng có thể được hiểu là chuỗi polypeptit có trọng lượng phân tử lớn hơn trong kháng thể, và chuỗi nhẹ dùng để chỉ chuỗi polypeptit có trọng lượng phân tử nhỏ hơn trong kháng thể. Chuỗi nhẹ được phân loại là chuỗi nhẹ κ và λ . Chuỗi nặng thường được phân loại là μ , δ , γ , α , hoặc ϵ , và isotyp của kháng thể được xác định lần lượt là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng biến đổi và vùng ổn định được liên kết bởi vùng "J" gồm khoảng 12 axit amin trở lên, và chuỗi nặng cũng bao gồm vùng "D" gồm khoảng 3 axit amin trở lên. Mỗi chuỗi nặng gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng ổn định chuỗi nặng (C_H). Vùng ổn định chuỗi nặng gồm 3 miền (C_{H1}, C_{H2} và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) và vùng ổn định chuỗi nhẹ (C_L). Vùng ổn định chuỗi nhẹ gồm một miền C_L. Vùng ổn định của kháng thể có thể điều tiết sự liên kết của globulin miễn dịch với mô vật chủ hoặc các yếu tố, bao gồm sự liên kết của các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu ứng) với thành

phần thứ nhất (C1q) của hệ bổ thể cổ điển. Các vùng V_H và V_L có thể được chia nhỏ hơn nữa thành các vùng biến đổi mức độ cao (được gọi là vùng xác định tính bổ trợ (CDR)), và các vùng bảo toàn được gọi là vùng khung (FR) được phân bố giữa chúng. Mỗi V_H và V_L gồm 3 CDR và 4 FR được sắp xếp từ các đầu tận cùng amino đến các đầu tận cùng carboxyl theo trật tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Vùng biến đổi (V_H và V_L) của mỗi cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ tạo thành vị trí liên kết kháng thể tương ứng. Việc gán các axit amin cho mỗi vùng hoặc miền tuân theo định nghĩa của Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991)), hoặc Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883. Cụ thể, chuỗi nặng cũng có thể bao gồm nhiều hơn 3 CDR, như 6, 9, hoặc 12. Ví dụ, trong kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, chuỗi nặng có thể là ScFv với đầu tận cùng C của chuỗi nặng của kháng thể IgG liên kết với một kháng thể khác, và trong trường hợp này, chuỗi nặng bao gồm 9 CDR. Thuật ngữ "kháng thể" không bị giới hạn bởi phương pháp cụ thể bất kỳ để tạo ra kháng thể. Ví dụ, kháng thể bao gồm, cụ thể, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng. Kháng thể có thể là các isotyp khác nhau, như kháng thể IgG (ví dụ, kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên" chỉ polypeptit bao gồm mảnh kháng thể có chiều dài đầy đủ, duy trì khả năng liên kết đặc hiệu với cùng một kháng nguyên mà kháng thể có chiều dài đầy đủ liên kết với và/hoặc cạnh tranh với kháng thể có chiều dài đầy đủ để liên kết đặc hiệu với kháng nguyên, mà còn được gọi là "phần liên kết kháng nguyên". Nói chung, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)), được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nhằm tất cả các mục đích. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách phân cắt các kháng thể nguyên vẹn bằng enzym hoặc hóa học. Trong một số trường hợp, mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, mảnh của vùng xác định tính bổ trợ (CDR), mảnh kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv), kháng thể khảm, kháng thể kép và polypeptit như vậy, bao gồm ít nhất một phần

của kháng thể đủ để tạo ra khả năng liên kết kháng nguyên đặc hiệu với polypeptit.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “mảnh Fd” chỉ mảnh kháng thể gồm có miền V_H và C_{H1} ; thuật ngữ “mảnh Fv” chỉ mảnh kháng thể gồm có miền V_L và V_H của một nhánh đơn của kháng thể; thuật ngữ “mảnh dAb” chỉ mảnh kháng thể gồm có miền V_H (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)); thuật ngữ “mảnh Fab” chỉ mảnh kháng thể gồm có miền V_L , V_H , C_L , và C_{H1} ; và thuật ngữ “mảnh $F(ab')_2$ ” chỉ mảnh kháng thể bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu nối disulfua trên vùng bản lề.

Trong một số trường hợp, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể là kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv) trong đó miền V_L và V_H được bắt cặp để tạo thành phân tử hóa trị một thông qua thành phần liên kết cho phép chúng tạo ra một chuỗi polypeptit duy nhất (xem, ví dụ, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) và Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). Các phân tử scFv như vậy có thể có cấu trúc chung: NH_2-V_L -thành phần liên kết- V_H-COOH hoặc NH_2-V_H -thành phần liên kết- V_L-COOH . Thành phần liên kết của giải pháp đã biết thích hợp gồm trình tự axit amin đoạn lặp GGGGS hoặc biến thể của chúng. Ví dụ, thành phần liên kết có trình tự axit amin (GGGGS)₄ có thể được sử dụng, nhưng các biến thể của chúng cũng có thể được sử dụng (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448). Các thành phần liên kết khác có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả bởi Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 và Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

Trong một số trường hợp, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể là kháng thể kép, tức là kháng thể hóa trị hai, trong đó miền V_H và V_L được biểu hiện trên chuỗi polypeptit đơn. Tuy nhiên, thành phần liên kết được sử dụng quá ngắn để cho phép bắt cặp hai miền trên cùng một chuỗi, do đó các miền này buộc phải bắt cặp với miền hỗ trợ trên chuỗi kia và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên (xem, ví dụ, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), và Poljak RJ et al., *Structure* 2:1121-1123 (1994)).

Mảnh liên kết kháng nguyên (ví dụ, các mảnh kháng thể đề cập trên đây) của kháng thể có thể thu được từ kháng thể nhất định bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc phân cắt bằng enzym hoặc hóa học), và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể được sàng lọc tính đặc hiệu theo cách tương tự như đối với kháng thể nguyên vẹn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi có quy định khác rõ ràng trong bản mô tả, khi nói đến thuật ngữ “kháng thể”, nó bao gồm không chỉ kháng thể nguyên vẹn mà bao gồm cả mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mAb” và “kháng thể đơn dòng” chỉ kháng thể hoặc mảnh của kháng thể có nguồn gốc từ nhóm kháng thể tương đồng cao, tức là từ nhóm gồm các phân tử kháng thể giống hệt nhau, ngoại trừ các đột biến tự nhiên có thể xảy ra một cách tự phát. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao đối với một epitop duy nhất trên kháng nguyên. Kháng thể đa dòng, so với kháng thể đơn dòng, thường bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều hơn các kháng thể khác nhau thường nhận diện các epitop khác nhau trên kháng nguyên. Kháng thể đơn dòng thường có thể thu được bằng công nghệ tế bào lai được báo cáo đầu tiên bởi Kohler et al. (Nature, 256:495, 1975), nhưng cũng có thể thu được bằng công nghệ ADN tái tổ hợp (ví dụ, xem U.S.P 4,816,567).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể khảm” chỉ kháng thể có một phần của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng có nguồn gốc từ một kháng thể (có thể có nguồn gốc từ một loài cụ thể hoặc thuộc một lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể), và phần khác của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng có nguồn gốc từ một kháng thể khác (có thể có nguồn gốc từ cùng một loài hoặc từ loài khác hoặc thuộc cùng một lớp hoặc phân lớp kháng thể hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể khác nhau). Nhưng trong bất kỳ trường hợp nào, nó vẫn giữ nguyên hoạt tính liên kết với kháng nguyên (USP 4,816,567 của Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể được làm tương

thích với người” chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể thu được khi toàn bộ hoặc một phần vùng CDR của một globulin miễn dịch của người (kháng thể thụ thể) được thay thế bằng vùng CDR của kháng thể không phải của người (kháng thể thể cho), trong đó kháng thể thể cho có thể không phải là kháng thể của người (ví dụ, chuột nhắt, chuột cống hoặc thỏ) có tính đặc hiệu, ái lực hoặc tính phản ứng mong muốn. Ngoài ra, một số gốc axit amin trong vùng khung (FR) của kháng thể thụ thể cũng có thể được thay thế bằng gốc axit amin của kháng thể không phải của người tương ứng hoặc bằng gốc axit amin của kháng thể khác để cải thiện hoặc tối ưu hóa hơn nữa hiệu suất của kháng thể. Để biết thêm chi tiết về kháng thể được làm tương thích với người, xem, ví dụ, Jones et al., *Nature*, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323 329 (1988); Presta, *Curr. Op Struct. Biol.*, 2:593 596 (1992); và Clark, *Immunol. Today* 21: 397 402 (2000).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “epitop” chỉ vị trí trên kháng nguyên mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể liên kết đặc hiệu với nó. “Epitop” trong lĩnh vực kỹ thuật cũng được gọi là “yếu tố quyết định kháng nguyên”. Epitop hoặc yếu tố quyết định kháng nguyên thường gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của phân tử như axit amin hoặc hydrat cacbon hoặc chuỗi bên của phân tử đường, và thường có đặc điểm cấu trúc ba chiều cụ thể và đặc điểm điện tích cụ thể. Ví dụ, epitop thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp trong một cấu trúc không gian duy nhất, có thể là “mạch thẳng” hoặc “có hình dạng”. Xem, ví dụ, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). Trong epitop mạch thẳng, tất cả các điểm tương tác giữa protein và phân tử tương tác (ví dụ, kháng thể) tồn tại thẳng dọc theo trình tự axit amin chính của protein. Trong epitop có hình dạng, các điểm tương tác tồn tại vắt ngang các gốc axit amin protein mà tách biệt với nhau.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được phân lập” chỉ dạng thu được bằng các phương thức nhân tạo từ trạng thái tự nhiên. Nếu một chất hoặc thành phần “được phân lập” nào đó xuất hiện trong tự nhiên, thì có thể là do sự thay đổi môi trường tự nhiên của nó hoặc do nó được phân lập từ môi trường tự nhiên, hoặc do cả

hai. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit không được phân lập nhất định tồn tại tự nhiên trong động vật sống nhất định, và cùng một polynucleotit và polypeptit với độ tinh khiết cao được phân lập từ trạng thái tự nhiên như vậy được gọi là polynucleotit hoặc polypeptit được phân lập. Thuật ngữ “được phân lập” không loại trừ sự tồn tại của các chất nhân tạo hoặc tổng hợp hoặc các tạp chất khác mà không ảnh hưởng đến hoạt tính của chất.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hệ thống biểu hiện E. coli” chỉ hệ thống biểu hiện gồm có (chúng) E. coli và vector, trong đó (chúng) E. coli có nguồn gốc từ một chủng có bán trên thị trường như, nhưng không chỉ giới hạn ở, GI698, ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3), và BLR (DE3).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vector” chỉ chất dẫn axit nucleic mà polynucleotit có thể được cài xen vào đó. Khi vector cho phép sự biểu hiện của protein được mã hóa bởi polynucleotit đã được cài xen, vector này được gọi là vector biểu hiện. Vector có thể được đưa vào tế bào chủ bằng cách biến nạp, tải nạp, hoặc chuyển nhiễm để các yếu tố chất di truyền được mang bởi vector có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Các vector là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: plasmit; phagemit; cosmit; nhiễm sắc thể nhân tạo, như nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC) hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo có nguồn gốc từ P1 (PAC); thể thực khuẩn như thể thực khuẩn lambda hoặc thể thực khuẩn M13, và virus động vật, v.v. Virus động vật có thể được sử dụng làm vector bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, retrovirus (bao gồm lentivirus), adenovirus, virus liên quan đến adeno, virus herpes (như virus gây bệnh mụn giộp toàn thân), virus gây bệnh đậu mùa, baculovirus, virus gây bệnh u nhú, và virus gây bệnh ung thư ở động vật (như SV40). Vector có thể chứa nhiều phần tử điều khiển sự biểu hiện, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự gen khởi đầu, trình tự bắt đầu phiên mã, trình tự gen tăng cường, các phần tử chọn lọc, và các gen thông báo. Ngoài ra, vector còn có thể chứa vị trí bắt đầu sao chép.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào chủ” chỉ tế bào có thể

được sử dụng để đưa vào vectơ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào chưa có nhân điển hình như *E. coli* hoặc *Bacillus subtilis*, tế bào nấm như tế bào nấm men hoặc nấm *Aspergillus*, tế bào côn trùng như tế bào ruồi giấm S2 hoặc Sf9, hoặc tế bào động vật như nguyên bào sợi, tế bào CHO, tế bào COS, tế bào NSO, tế bào HeLa, tế bào BHK, tế bào HEK 293, hoặc tế bào của người.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ " K_D " chỉ hằng số cân bằng phân ly đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên đặc hiệu, được sử dụng để mô tả ái lực liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên. Hằng số phân ly cân bằng càng nhỏ, liên kết kháng thể-kháng nguyên càng chặt, và ái lực giữa kháng thể và kháng nguyên càng cao. Thông thường, kháng thể liên kết với các kháng nguyên với hằng số cân bằng phân ly (K_D) thấp hơn khoảng 10^{-5} M, như thấp hơn khoảng 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, hoặc thấp hơn, và hằng số cân bằng phân ly có thể được đo bằng cách, ví dụ, sử dụng thiết bị tương tác phân tử ForteBio.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" và "mAb" có cùng nghĩa và có thể được sử dụng thay thế cho nhau; thuật ngữ "kháng thể đa dòng" và "PcAb" có cùng nghĩa và có thể được sử dụng thay thế cho nhau; thuật ngữ "polypeptit" và "protein" có cùng nghĩa và có thể được sử dụng thay thế cho nhau. Và trong sáng chế, axit amin thường được biểu diễn bằng các từ viết tắt một chữ cái và ba chữ cái đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, alanin có thể được biểu diễn bằng chữ A hoặc Ala.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào lai" và "dòng tế bào lai" có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và khi đề cập đến thuật ngữ "tế bào lai" và "dòng tế bào lai", chúng cũng bao gồm các dưới dòng vô tính và tế bào con cháu của tế bào lai. Ví dụ, khi đề cập đến dòng tế bào lai LT006 hoặc LT007, cũng đề cập đến cả các dưới dòng vô tính và tế bào con cháu của dòng tế bào lai LT006 hoặc LT007.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất mang và/hoặc tá dược được dụng" chỉ chất mang và/hoặc tá dược tương thích về mặt dược lý và/hoặc sinh lý với đối tượng và thành phần hoạt tính, mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania:

Mack Publishing Company, 1995), và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chất điều chỉnh độ pH, chất hoạt động bề mặt, chất hỗ trợ và chất tăng cường độ bền ion. Ví dụ, chất điều chỉnh độ pH bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch đệm phosphat; chất hoạt động bề mặt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất hoạt động bề mặt cation, anion, hoặc không ion, như Tween-80; và các chất tăng cường độ bền ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri clorua.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất hỗ trợ” chỉ chất tăng cường miễn dịch không đặc hiệu, có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể với các kháng nguyên hoặc thay đổi loại đáp ứng miễn dịch khi đưa vào cơ thể cùng với các kháng nguyên hoặc đưa vào cơ thể trước. Có các chất hỗ trợ khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất hỗ trợ nhôm (ví dụ, nhôm hydroxit), chất hỗ trợ Freund (ví dụ, chất hỗ trợ Freund hoàn chỉnh và chất hỗ trợ Freund không hoàn chỉnh), corynebacterium parvum, lipopolysaccharit, xytokin, v.v. Chất hỗ trợ Freund là chất hỗ trợ được sử dụng phổ biến nhất trong các thử nghiệm trên động vật. Chất hỗ trợ nhôm hydroxit được sử dụng nhiều hơn trong các thử nghiệm lâm sàng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng đủ để thu được hoặc thu được ít nhất một phần hiệu quả mong muốn. Ví dụ, lượng hữu hiệu để ngăn ngừa bệnh (ví dụ, bệnh liên quan đến IL-17A liên kết với thụ thể IL-17A hoặc hoạt tính IL-17A quá mức, như bệnh tự miễn) là lượng đủ để ngăn ngừa, làm ngừng hoặc trì hoãn sự khởi phát của bệnh (ví dụ, bệnh liên quan đến IL-17A liên kết với thụ thể IL-17A hoặc hoạt tính IL-17A quá mức, như bệnh tự miễn); lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị là lượng đủ để chữa khỏi hoặc ít nhất ngăn ngừa một phần bệnh và các biến chứng của nó ở các bệnh nhân đã mắc bệnh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có khả năng xác định lượng hữu hiệu này. Ví dụ, lượng hữu hiệu để sử dụng trong điều trị sẽ phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh được điều trị, tình trạng tổng thể của hệ miễn dịch của bệnh nhân, tình trạng chung của bệnh nhân như độ tuổi, cân nặng và giới tính, cách sử dụng thuốc và các phương pháp điều trị khác được thực hiện đồng thời, v.v.

Hiệu quả có lợi theo sáng chế

Sáng chế đạt được ít nhất một trong số các hiệu quả kỹ thuật sau:

(1) kháng thể đơn dòng theo sáng chế như 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2, và 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3 đều có thể liên kết đặc hiệu với IL-17A rất tốt, và có thể phong bế hiệu quả liên kết của IL-17A với phối tử IL-17A và đặc biệt là giảm sự tiết IL-6 trong nguyên bào sợi qua trung gian IL-17A;

(2) kháng thể đơn dòng theo sáng chế, đặc biệt là 13E9 H2L2, có hiệu quả tương tự như thuốc bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích trong việc ức chế sự tiết IL-6;

(3) kháng thể đơn dòng theo sáng chế có hiệu lực để được dùng trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh chống tự miễn như bệnh vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp hoặc luput ban đỏ hệ thống.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Kết quả phát hiện kháng thể đơn dòng loài gặm nhấm 13E9 bằng SDS-PAGE. Các mẫu của bốn làn từ trái sang phải và lượng tải tương ứng của chúng là: kháng thể trong đệm tải điện di protein không khử, 1 μ g; kháng thể trong đệm tải điện di protein khử, 1 μ g; trình tự đánh dấu, 5 μ L; BSA, 1 μ g.

Fig. 2: Kết quả phát hiện kháng thể đơn dòng loài gặm nhấm 2G2 bằng SDS-PAGE. Các mẫu của bốn làn từ trái sang phải và lượng tải tương ứng của chúng là: kháng thể trong đệm tải điện di protein không khử, 1 μ g; kháng thể trong đệm tải điện di protein khử, 1 μ g; trình tự đánh dấu, 5 μ L; BSA, 1 μ g.

Fig. 3: Kết quả phát hiện kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người 13E9 H3L2 bằng SDS-PAGE. Các mẫu của ba làn từ trái sang phải và lượng tải tương ứng của chúng là: BSA, 1 μ g; trình tự đánh dấu, 5 μ L; kháng thể trong đệm tải điện di protein khử, 1 μ g; kháng thể trong đệm tải điện di protein không khử, 1 μ g.

Fig. 4: Kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học của kháng thể 13E9 H1L1. Trên hình vẽ, trục tung là giá trị tín hiệu với đơn vị là nm; trục hoành là thời gian với đơn vị là giây.

Fig. 5: Kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học của kháng thể 13E9

H2L2. Trên hình vẽ, trục tung là giá trị tín hiệu với đơn vị là nm; trục hoành là thời gian với đơn vị là giây.

Fig. 6: Kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học của kháng thể 13E9 H3L2. Trên hình vẽ, trục tung là giá trị tín hiệu với đơn vị là nm; trục hoành là thời gian với đơn vị là giây.

Fig. 7: Kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học của kháng thể Secukinumab. Trên hình vẽ, trục tung là giá trị tín hiệu với đơn vị là nm; trục hoành là thời gian với đơn vị là giây.

Fig. 8: Kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học của kháng thể 2G2 H1L1. Trên hình vẽ, trục tung là giá trị tín hiệu với đơn vị là nm; trục hoành là thời gian với đơn vị là giây.

Fig. 9: Kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học của kháng thể 2G2 H2L2. Trên hình vẽ, trục tung là giá trị tín hiệu với đơn vị là nm; trục hoành là thời gian với đơn vị là giây.

Fig. 10: Kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học của kháng thể 2G2 H3L3. Trên hình vẽ, trục tung là giá trị tín hiệu với đơn vị là nm; trục hoành là thời gian với đơn vị là giây.

Fig. 11: Kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học của kháng thể Secukinumab. Trên hình vẽ, trục tung là giá trị tín hiệu với đơn vị là nm; trục hoành là thời gian với đơn vị là giây.

Fig. 12: phát hiện hoạt tính liên kết của kháng thể 13E9 H1L1 và 13E9 H2L2 với kháng nguyên IL17A-His bằng phương pháp ELISA gián tiếp. Thuốc bán trên thị trường Secukinumab được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

Fig. 13: phát hiện hoạt tính liên kết của kháng thể 13E9 H3L2 với kháng nguyên IL17A-His bằng phương pháp ELISA gián tiếp. Thuốc bán trên thị trường Secukinumab được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

Fig. 14: phát hiện hoạt tính của kháng thể 13E9 H1L1 và 13E9 H2L2 cạnh tranh với thụ thể IL17RA-His để liên kết bằng phương pháp ELISA cạnh tranh. Thuốc bán

trên thị trường Secukinumab được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

Fig. 15: phát hiện hoạt tính của kháng thể 13E9 H3L2 cạnh tranh với thụ thể IL17RA-His để liên kết bằng phương pháp ELISA cạnh tranh. Thuốc bán trên thị trường Secukinumab được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

Fig. 16: phát hiện hoạt tính liên kết của kháng thể 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 với kháng nguyên IL17A-His bằng phương pháp ELISA gián tiếp. Thuốc bán trên thị trường Secukinumab được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

Fig. 17: phát hiện hoạt tính của kháng thể 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 cạnh tranh với thụ thể IL17A-His (biotin) để liên kết với kháng nguyên IL17A-His bằng phương pháp ELISA cạnh tranh. Thuốc bán trên thị trường Secukinumab được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

Fig. 18: hiệu quả của kháng thể 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 cũng như 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 đối với sự tiết cytokin IL-6 bởi tế bào lympho hỗn hợp.

Fig. 19: hiệu quả của thuốc kháng thể 13E9 H3L2 đối với độ dày biểu bì của mô hình chuột nhắt C57BL/6 bị bệnh vẩy nến.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án theo sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây có dựa vào các ví dụ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các ví dụ sau chỉ được sử dụng để minh họa sáng chế, và không nên xem là giới hạn phạm vi của sáng chế. Ví dụ được thực hiện theo công nghệ hoặc điều kiện được mô tả trong tài liệu trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, xem, *Guide to Molecular Cloning Experiments*, tác giả J. Sambrook et al., và được dịch bởi Huang Peitang et al., third edition, Science Press) hoặc theo hướng dẫn sử dụng sản phẩm nếu công nghệ hoặc điều kiện cụ thể không được nêu rõ trong đó. Chất phản ứng hoặc thiết bị được sử dụng đều là các sản phẩm thông thường có bán trên thị trường nếu nhà sản xuất các sản phẩm này không được nêu rõ.

Trong các ví dụ sau, chuột nhắt BALB/C được sử dụng được mua từ Trung tâm

Động vật thí nghiệm Y học Quảng Đông; chuột nhắt C57BL/6 được sử dụng là của Công ty Nanjing Galaxy Biopharma Co., Ltd.; các tế bào MRC5 được sử dụng là từ Trung tâm Shanghai Fudan IBS Cell Center; kháng thể đơn dòng Secukinumab (Cosentyx®) được sử dụng được mua từ Novartis Corporation.

Ví dụ 1: Điều chế kháng thể kháng IL-17A 13E9 và 2G2

1. Điều chế các dòng tế bào lai LT006 và LT007

Kháng nguyên IL17A (24-155)-his được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng IL-17A là protein dung hợp của peptit trưởng thành IL-17A của người (GenBank ID: Q16552) và thể His. Tế bào lá lách từ chuột nhắt BALB/C đã được gây miễn dịch (mua từ Trung tâm Động vật thí nghiệm Y học Quảng Đông) và tế bào u tủy của chuột nhắt được dung hợp thành tế bào lai, và các phương pháp đã thiết lập (ví dụ, “Monoclonal Antibody Production”, trong Basic Methods in Antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard và D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000) được tham khảo cho các thao tác cụ thể.

Protein dung hợp IL17A-His được phân cắt bằng enzym với TEV proteaza và được tinh chế bằng cột để thu được protein IL-17A (24-155). Việc sàng lọc ELISA gián tiếp được thực hiện trong các vi đĩa được phủ protein IL-17A (24-155) dưới dạng kháng nguyên để thu được tế bào lai tiết kháng thể mới liên kết đặc hiệu với IL-17A (24-155).

Tế bào lai thu được bằng phương pháp sàng lọc ELISA gián tiếp được sàng lọc bằng phương pháp ELISA cạnh tranh để thu được các dòng tế bào lai có khả năng tiết kháng thể đơn dòng cạnh tranh với thụ thể IL-17RA (CD217, NCBI Gene ID: NP_055154.3) để liên kết với IL-17A, và hai dòng tế bào lai ổn định đã thu được bằng cách pha loãng giới hạn.

Dòng tế bào lai LT006 (IL17A-13E9) được nộp lưu tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) vào thứ Bảy, 12/9/2015 với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017102, tại Trường Đại học Vũ Hán, Vũ Hán, Trung Quốc, 430072. Kháng thể đơn dòng được tiết bởi dòng tế bào lai LT006 được đặt tên là 13E9.

Dòng tế bào lai LT007 (IL17A-2G2) được nộp lưu tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) vào ngày 12 tháng 9 năm 2017 với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017165, tại Trường Đại học Vũ Hán, Vũ Hán, Trung Quốc, 430072. Kháng thể đơn dòng được tiết bởi dòng tế bào lai LT007 được đặt tên là 2G2.

2. Điều chế kháng thể kháng IL-17A 13E9

Dòng tế bào LT006 thu được ở trên được nuôi cấy (1×10^5 tế bào trong mỗi giếng) trong môi trường không chứa huyết thanh thể lai (chứa Penixilin-Streptomycin 1% và Glutamax 4%, được nuôi cấy trong tủ nuôi ở 37°C với 5% CO_2), và dịch nổi bề mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom khi tỷ lệ sống sót là khoảng 20% sau 7 ngày nuôi cấy, sau đó được quay ly tâm tốc độ cao, lọc chân không qua màng vi xốp, và tinh chế qua cột HiTrap protein A HP để thu được kháng thể 13E9. Các mẫu 13E9 đã tinh chế được phát hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE, và kết quả được thể hiện trên Fig. 1.

3. Điều chế kháng thể kháng IL-17A 2G2

Dòng tế bào LT007 thu được ở trên được nuôi cấy (1×10^5 tế bào trong mỗi giếng) trong môi trường không chứa huyết thanh thể lai (chứa Penixilin-Streptomycin 1% và Glutamax 4%, được nuôi cấy trong tủ nuôi ở 37°C với 5% CO_2), và dịch nổi bề mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom khi tỷ lệ sống sót là khoảng 20% sau 7 ngày nuôi cấy, sau đó được quay ly tâm tốc độ cao, lọc chân không qua màng vi xốp, và tinh chế qua cột HiTrap protein A HP để thu được kháng thể 2G2. Các mẫu 2G2 đã tinh chế được phát hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE, và kết quả được thể hiện trên Fig. 2.

Ví dụ 2: Phân tích trình tự của kháng thể 13E9

Tế bào LT006 được nuôi cấy theo phương pháp trong bước 2 của Ví dụ 1.

Sử dụng kit chiết ARN tổng tế bào/vi khuẩn (Tiangen, số bài báo DP430), ARN thông tin được chiết từ tế bào LT006 đã được nuôi cấy theo phương pháp trong hướng dẫn sử dụng kit.

ADN bổ trợ (cADN) được tổng hợp theo hướng dẫn sử dụng kit của Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System cho RT-PCR, và được khuếch đại bởi PCR.

Sản phẩm đã được khuếch đại bằng PCR được tách dòng TA trực tiếp, và hướng dẫn sử dụng kit của kit tách dòng pEASY-T1 (Transgen CT101) được tham khảo cho các thao tác cụ thể.

Các sản phẩm đã được tách dòng TA được giải trình tự trực tiếp, và kết quả giải trình tự là như sau:

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng: (360 bp)

GAAGTAAAGCTGCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTC
AGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTAGCTACTCATTACACAGTGATT
ATGCCTGGAGCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAATCAAACCTGGAGTGGATG
GGCTACATAACCTACAGTGGTGTCACTAGCTACAACCCCTCTCTCAAAAG
TCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTACAGTT
GAATTCTGTGACTACTGAGGACACGGCCACATATTACTGTGCAAGGGCAG
ACTATGATAGCTACTATACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC
ACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 1)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (120 aa)

EVKLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTSYSETSDYAWSWIRQFPGIKLEW
MGYITYSGVTSYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARADY
DSYYTMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 2)

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ: (333 bp)

GACATCCAGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGG
AGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAA
TGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAA
GGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTG
GAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTGG

ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 3)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (111 aa)

DIQLTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP
RLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFWTF
GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 4)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

Ví dụ 3: Thiết kế, điều chế và phát hiện các kháng thể được làm tương thích với người kháng IL-17A 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2

1. Thiết kế các trình tự của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người kháng IL-17A 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2

Dựa trên cấu trúc tinh thể ba chiều của protein IL-17A (EMBO J. (2001) 20 p: 5332-41) và trình tự của kháng thể 13E9 thu được trong Ví dụ 2, mô hình kháng thể được mô phỏng bằng máy tính và các đột biến được thiết kế theo mô hình để thu được trình tự vùng biến đổi của kháng thể 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 (trình tự vùng ổn định của kháng thể là từ cơ sở dữ liệu NCBI, trong đó vùng ổn định của chuỗi nặng là vùng C chuỗi Ig gamma-1, ACCESSION: P01857, và vùng ổn định của chuỗi nhẹ là vùng C chuỗi Ig kappa, ACCESSION: P01834).

Trình tự vùng biến đổi đã được thiết kế là như sau:

(1) trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người 13E9 H1L1

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng: (360 bp)

GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGC
CAGACCCTGAGCCTGACTTGCACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGA
CTACGCTTGGTCTTGGATCAGACAGTTCCCAGGAATTGGCCTCGAGTGGA
TGGGCTACATCACCTACAGCGGCGTGACCAGCTACAACCCAGCCTGAAG
AGCAGGATCACCATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGCA
GCTGAACAGCGTGACAGCAGCCGATACCGCAGTGTACTATTGCGCCAGGG
CCGACTACGACAGCTACTACACCATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCAGC

GTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 5)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (120 aa)

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSSYSFTSDYA^{WSWIRQFP}GIGLEW
MGYITYSGVTSYNPSLKSRLTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTAVYYC^{ARADY}
DSYYTMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 6)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ: (333 bp)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGCCAGTGACACTGG
GACAGCAGGCTAGCATCTCTTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGC
AACGGCAACACCTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCC
TAGACTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTTCAGCGGCGTGCCAGATA
GATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAG
AGTGGAGGCCGAGGATCTGGGAGTGTACTTCTGCAGCCAGAGCACCCACT
TTTGGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 7)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (111 aa)

DVVMTQTPLSLPVTLGQQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY^{LQKPGQS}
PRLLIYK^{VSNRFS}GV^{PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFWTF}
GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

(2) trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người 13E9 H2L2

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng: (360 bp)

GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGC
CAGACCCTGAGCCTGACTTGCACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGA
CTACGCTTGGTCTTGGATCAGACAGCCACCAGGAAAGGGACTCGAGTGG
TCGGCTACATCACCTACAGCGGCGTGACCAGCTACAACCCAGCCTGAAG
AGCAGGATCACCATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGCA
GCTGTCTAGCGTGACAGCAGCCGATACCGCAGTGTACTATTGCGCCAGGG

CCGACTACGACAGCTACTACACCATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCAGC
GTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 9)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (120 aa)

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSSYSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEW
IGYITYSGVTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLSSVTAADTAVYYCARADYD
SYTMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ: (333 bp)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGCCAGTGACACTGG
GACAGCCAGCTAGCATCTCTTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGC
AACGGCAACACCTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCC
TAGACTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTTCAGCGGCGTGCCAGATA
GATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAG
AGTGGAGGCCGAGGATCTGGGAGTGTACTACTGCAGCCAGAGCACCCACT
TTTGGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 11)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (111 aa)

DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQS
PRLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCSQSTHFWT
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

(3) trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng được làm tương
thích với người 13E9 H3L2

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng: (360 bp)

GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGC
CAGACCCTGAGCCTGACTTGCACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGA
CTACGCTTGGTCTTGGATCAGACAGCCACCAGGAAAGGGACTCGAGTGGA
TCGGCTACATCACCTACAGCGGCGTGACCAGCTACAACCCTAGCCTGAAG
AGCCGCGTGACCATTAGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAA

GCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGG
CCGATTACGACAGCTACTACACCATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCAGC
GTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 13)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (120 aa)

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSSYSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEW
IGYITYSGVTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADY
DSYYTMDYWGGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 14)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là giống như trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 13E9 H2L2, như nêu trong SEQ ID NO: 11.

Trình tự axit amin được mã hóa của nó cũng giống như trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 13E9 H2L2, như nêu trong SEQ ID NO: 12.

2. Điều chế kháng thể được làm tương thích với người 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2

Tất cả các vùng ổn định chuỗi nặng đều sử dụng vùng C chuỗi Ig gamma-1, ACCESSION: P01857; vùng ổn định chuỗi nhẹ sử dụng vùng C chuỗi Ig kappa, ACCESSION: P01834.

ADN bổ trợ của chuỗi nặng và ADN bổ trợ của chuỗi nhẹ của 13E9 H1L1, ADN bổ trợ của chuỗi nặng và ADN bổ trợ của chuỗi nhẹ của 13E9 H2L2, và ADN bổ trợ của chuỗi nặng và ADN bổ trợ của chuỗi nhẹ của 13E9 H3L2 lần lượt được tách dòng vào vector pUC57simple (được cung cấp bởi Genscript), để thu được lần lượt pUC57simple-13E9H1, pUC57simple-13E9L1, pUC57simple-13E9H2, pUC57simple-13E9L2 và pUC57simple-13E9H3, và mảnh chứa các chuỗi nặng tương ứng và mảnh chứa các chuỗi nhẹ tương ứng lần lượt được tách dưới dòng vào vector pcADN3.1, để thu được plasmit tái tổ hợp pcADN3.1-13E9H1, pcADN3.1-13E9L1, pcADN3.1-13E9H2, pcADN3.1-13E9L2, pcADN3.1-13E9H3 và pcADN3.1-13E9L2. Sau đó, plasmit tái tổ hợp của chuỗi nhẹ và plasmit tái tổ hợp của chuỗi nặng tương ứng (pcADN3.1-13E9H1 và pcADN3.1-13E9L1; pcADN3.1-13E9H2 và pcADN3.1-

13E9L2; pcADN3.1-13E9H3 và pcADN3.1-13E9L2) được đồng chuyển nhiễm vào tế bào 293F, môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom và tinh chế để thu được lần lượt kháng thể được làm tương thích với người 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, và 13E9 H3L2. Mẫu 13E9 H3L2 đã được tinh chế được phát hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE, và kết quả được thể hiện trên Fig. 3.

Ví dụ 4: Phân tích trình tự của kháng thể 2G2

Tế bào LT007 được nuôi cấy theo phương pháp trong bước 3 của Ví dụ 1.

Sử dụng kit chiết ARN tổng tế bào/vi khuẩn (Tiangen, số bài báo DP430), ARN thông tin (mARN) được chiết từ tế bào LT007 đã được nuôi cấy theo phương pháp trong hướng dẫn sử dụng kit.

ADN bổ trợ được tổng hợp theo hướng dẫn sử dụng kit của Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System cho RT-PCR, và được khuếch đại bằng PCR.

Sản phẩm đã được khuếch đại bằng PCR được tách dòng TA trực tiếp, và hướng dẫn sử dụng kit của kit tách dòng pEASY-T1 (Transgen CT101) được tham khảo cho các thao tác cụ thể.

Sản phẩm đã được tách dòng TA được giải trình tự trực tiếp, và kết quả giải trình tự là như sau:

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng: (351 bp)

GAGGTTTCAGCTGGAGCAGTCTGGTTCTGAACTGAGGAGTCCTGGAT
CTTCAGTAAAGCTTTCATGCAAGGATTTTGATTCAGAAGTCTTCCCTATTG
CTGATATGAGTTGGGTTAGGCAGAAGCCTGGGCATGGATTTGAATGGATT
GGAGACATACTCCCAAGTTTTGGTAGAACAATCTATGGAGAGAAGTTTGA
GGACAAAGCCAAAGTGGATGCAGACACAGTGTCCAACACAGCCTACTTG
GAACTCAACAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCTATCTACTACTGTGCAAG
GGGTAACACTACGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCT
CTGCA (SEQ ID NO: 15)

trình tự axit amin đã được mã hóa của nó: (117 aa)

EVQLEQSGSELRSPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQKPGHGF EW
IGDILPSFGR^{TIY}GEKFEDKAKVDADTVSNTAYLELNSLTSEDSAIYYCARGN
YGFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 16)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ: (336 bp)

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCACTTTGTCGGTTATCATTGG
ACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGCCAAGTCAGAGCCTCTTAAATAGTG
ATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCA
AAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAG
GTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAG
TGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTTACATTTTC
CTCAGACGTTTCGGTGGAGGCACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 17)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (112 aa)

DVLMTQTPLTSLVIIGQPASISCKPSQSL^{NSD}GKTYLNWLLQRPQGSP
KRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG^{VYYC}WQGS^{HFPQT}
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

Ví dụ 5: Thiết kế, điều chế và phát hiện kháng thể được làm tương thích với người
kháng IL-17A 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3

(1) trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng được làm tương
thích với người 2G2 H1L1

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng: (348 bp)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAAGCGAACTGAGAAAGCCAGGCTCC
AGCGTGAAGCTGTCTTGCAAGGACTTCGACAGCGAGGTGTTCCCCATCGC
CGATATGTCTTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGATTCGAGTGGATCG
GTGACATTCTGCCCAGCTTCGGAAGAACCAACTACGCCCAGAAGTTCGAG
GGCAAGGCCAAGGTGGACGCAGACAAGAGCACCAACACCGCCTACCTGG
AGCTGAACAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCATCTACTATTGCGCCAGG

GGCAACTACGGATTCGCCTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTGTC
CGCC (SEQ ID NO: 19)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (116 aa)

VQLVQSGSELRKPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQAPGQGFEWI
GDILPSFGRNTNYAQKFEGKAKVDADKSTNTAYLELNSLRSEDTAIYYCCARGN
YGfAYWGQTLTVSA (SEQ ID NO: 20)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ: (336 bp)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGG
GACAGCCAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAG
CGACGGCAAGACCTACCTGAATTGGCTGCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTC
CTAGAAGGCTGATCTACCTGGTGTCCAAGCTGGACAGCGGCGTGCCAGAT
AGATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCA
GAGTGGAGGCCGAGGATCTGGGAGTGTACTACTGTTGGCAGGGCAGCCA
CTTCCCTCAGACATTCGGCGGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID
NO: 21)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (112 aa)

DVVMTQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQSLLNSDGKTYLNWLLQRPGQSP
RRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHFPQT
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

(2) trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng được làm tương
thích với người 2G2 H2L2

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng: (348 bp)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAAGTGAAGAAGCCAGGCTCC
AGCGTGAAGCTGTCTTGCAAGGACTTCGACAGCGAGGTGTTCCCCATCGC
CGATATGTCTTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGATTCGAGTGGATCG
GTGACATTCTGCCCAGCTTCGGGAGAACCAATTACGCCCAGAAGTTCCAG

GGCAGAGTGACCGTGACCGCAGACAAGAGCACCAACACCGCCTACCTGG
AGCTGAACAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGG
GGCAACTACGGCTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGTC
CGCC (SEQ ID NO: 23)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (116 aa)

VQLVQSGAEVKKPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQAPGQGF
IGDILPSFGRTNYAQKFQGRVTVTADKSTNTAYLELNSLRSEDTAVYYCCARG
NYGFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 24)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ: (336 bp)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGG
GACAGCCAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAG
CGACGGCAAGACCTACCTGAATTGGCTGCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTC
CTAGAAGGCTGATCTACCTGGTGTCCAACCTGGACAGCGGCGTGCCAGAT
AGATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCA
GAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGTTGGCAGGGCAGCCA
CTTCCCTCAGACATTCGGCGGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID
NO: 25)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (112 aa)

DVVMTQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQSLNSDGKTYLNWLLQRPQGSP
RRLIYLVSNLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGSHFPQT
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 26)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

(3) trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng được làm tương
thích với người 2G2 H3L3

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng: (348 bp)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAAGTGAAGAAGCCAGGCAGC
AGCGTGAAGGTGTCTTGCAAGGACTTCAGCAGCGAGGTGTTCCCCATCGC

CGATATGTCTTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAGTGGATCG
 GTGACATTCTGCCCAGCTTCGGGAGAACCAATTACGCCCAGAAGTTCCAG
 GGCAGAGTGACCGTGACCGCAGACAAGAGCACCAACACCGCCTACCTGG
 AGCTGTCTAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGG
 GGCAACTACGGCTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGTC
 CGCC (SEQ ID NO: 27)

trình tự axit amin được mã hóa của nó: (116 aa)

VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKDFSSEVFPIADMSWVRQAPGQGLEW
 IGDILPSFGRTNYAQKFQGRVTVTADKSTNTAYLELSSLRSEDTAVYYCCARG
NYGFAYWGQTLVTSA (SEQ ID NO: 28)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ: (336 bp)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGG
 GACAGCCAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAG
 CGACGGCAAGACCTACCTGAATTGGTTCCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTC
 CTAGAAGGCTGATCTACCTGGTGTCCAACCTGGACAGCGGCGTGCCAGAT
 AGATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCA
 GAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGTTGGCAGGGCAGCCA
 CTTCCCTCAGACATTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID
 NO: 29)

trình tự axit amin đã được mã hóa của nó: (112 aa)

DVVMQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQSLNSDGKTYLNWFLQRPQSP
 RRLIYLVSNLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGSHFPQT
 FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 30)

Các vùng được gạch chân là vùng CDR.

2. Điều chế và phát hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE kháng thể được
 làm tương thích với người 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3

Vùng ổn định chuỗi nặng sử dụng vùng C chuỗi Ig gamma-1, ACCESSION:

P01857; vùng ổn định chuỗi nhẹ sử dụng vùng C chuỗi Ig kappa, ACCESSION: P01834.

ADN bổ trợ chuỗi nặng và ADN bổ trợ chuỗi nhẹ của 2G2 H1L1, ADN bổ trợ chuỗi nặng và ADN bổ trợ chuỗi nhẹ của 2G2 H2L2, và ADN bổ trợ chuỗi nặng và ADN bổ trợ chuỗi nhẹ của 2G2 H3L3 lần lượt được tách dòng vào vector pUC57simple (được cung cấp bởi Genscript), để thu được lần lượt pUC57simple-2G2H1, pUC57simple-2G2L1; pUC57simple-2G2H2, pUC57simple-2G2L2; và pUC57simple-2G2H3, pUC57simple-2G2L3. Mảnh nucleotit chứa các chuỗi nặng tương ứng và mảnh nucleotit chứa các chuỗi nhẹ tương ứng sau đó lần lượt được tách dưới dòng vào vector pcADN3.1, để thu được plasmit tái tổ hợp pcADN3.1-2G2H1, pcADN3.1-2G2L1, pcADN3.1-2G2H2, pcADN3.1-2G2L2, pcADN3.1-2G2H3 và pcADN3.1-2G2L3. Sau đó, plasmit tái tổ hợp của chuỗi nhẹ và plasmit tái tổ hợp của chuỗi nặng tương ứng (pcADN3.1-2G2H1 và pcADN3.1-2G2L1; pcADN3.1-2G2H2 và pcADN3.1-2G2L2; pcADN3.1-2G2H3 và pcADN3.1-2G2L3) được đồng chuyển nhiễm vào tế bào 293F, môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom và tinh chế để thu được lần lượt kháng thể được làm tương thích với người 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3. Các mẫu đã được tinh chế được phát hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.

Ví dụ 6: Đo các thông số động học đối với liên kết của 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 với protein kháng nguyên IL-17A (24-155)

Các thông số động học đối với liên kết của kháng thể được làm tương thích với người 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 với kháng nguyên IL-17A (24-155) được đo bằng cách sử dụng thiết bị tương tác phân tử Fortebio.

Cảm biến AR2G được kích hoạt bởi EDC/NHS, và kháng thể được cố định vào cảm biến AR2G đã được kích hoạt bằng cách ghép cặp amin, và cảm biến được phong bế bằng etanolamin 1 M (pH=8,5). Sau khi cảm biến được cân bằng trong PBST trong 300 giây, kháng thể được cố định trên cảm biến đã liên kết với protein kháng nguyên IL-17A (24-155) (giống như kháng nguyên được sử dụng trong Ví dụ 1), trong đó nồng độ kháng nguyên là 6,25-400 nM (pha loãng gradien hai lần) và thời gian liên kết là

420 giây, và kháng nguyên và kháng thể được phân tách trong PBST trong 600 giây.

Các thông số động học của các kháng thể 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2 và Secukinumab được thể hiện trong Bảng 1, và kết quả phát hiện về các thông số đặc tính động học được thể hiện lần lượt trên Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 và Fig. 7.

Bảng 1: Các thông số động học của 13E9 kháng thể được làm tương thích với người

Kháng thể	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	Sai số K_{on}	K_{dis} (1/s)	Sai số K_{dis}	R_{max} (nm)
13E9 H1L1	9,72E-10	1,34E+05	2,60E+03	1,31E-04	9,06E-06	0,0858-0,3326
13E9 H2L2	1,03E-09	9,86E+04	1,51E+03	1,01E-04	7,57E-06	0,0546-0,3049
13E9 H3L2	5,08E-10	2,90E+05	8,22E+03	1,47E-04	1,02E-05	0,1457-0,3546
Secukinumab	6,74E-10	9,28E+04	3,03E+03	6,26E-05	1,57E-05	0,0379-0,2064

K_D là hằng số ái lực; K_{on} là tốc độ liên kết của kháng nguyên và kháng thể; K_{dis} là tốc độ phân ly của kháng nguyên và kháng thể; $K_D = K_{dis}/K_{on}$.

Kết quả cho thấy rằng tất cả 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, và 13E9 H3L2 đều có ái lực tốt với kháng nguyên IL-17A (24-155), và ái lực là tương đương với ái lực của kháng thể đối chứng Secukinumab.

Ví dụ 7: Đo các thông số động học đối với liên kết của 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, và 2G2 H3L3 với kháng nguyên IL-17A (24-155)

Các thông số động học đối với liên kết của kháng thể được làm tương thích với người 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 với kháng nguyên IL-17A (24-155) được đo bằng cách sử dụng thiết bị tương tác phân tử Fortebio.

Cảm biến AR2G được kích hoạt bởi EDC/NHS, và kháng thể được cố định vào cảm biến AR2G đã được hoạt hóa bằng cách ghép cặp amin, và cảm biến được phong bế bằng etanolamin 1 M (pH=8,5). Sau khi cảm biến được cân bằng trong PBST trong 300 giây, kháng thể được cố định trên cảm biến liên kết với kháng nguyên IL-17A (24-155), trong đó nồng độ kháng nguyên là 6,25-400 nM (pha loãng gradien hai lần) và thời gian liên kết là 420 giây, và kháng nguyên và kháng thể được phân ly trong PBST trong 600 giây.

Các thông số động học của các kháng thể 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3,

và Secukinumab được thể hiện trong Bảng 2, và kết quả phát hiện về thông số đặc trưng động học được thể hiện lần lượt trên Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10, và Fig. 11.

Bảng 2: Các thông số động học của 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3 và Secukinumab

Kháng thể	K_D (M)	$K_{on}(1/Ms)$	Sai số K_{on}	K_{dis} (1/s)	Sai số K_{dis}	$R_{max}(nm)$
2G2 H1L1	1,53E-09	1,46E+05	3,15E+03	2,24E-04	9,67E-06	0,0035-0,2192
2G2 H2L2	8,43E-10	1,42E+05	2,18E+03	1,20E-04	6,73E-06	0,0444-0,2732
2G2 H3L3	1,54E-09	1,98E+05	5,30E+03	3,06E-04	1,08E-05	0,011-0,2109
Secukinumab	1,08E-09	1,33E+05	2,38E+03	1,43E-04	8,09E-06	0,0118-0,2584

K_D là hằng số ái lực; K_{on} là tốc độ liên kết của kháng nguyên và kháng thể; K_{dis} là tốc độ phân ly của kháng nguyên và kháng thể; $K_D = K_{dis}/K_{on}$.

Kết quả cho thấy rằng so với kháng thể đối chứng Secukinumab, 2G2 H2L2 có ái lực cao hơn với kháng nguyên IL-17A (24-155); ái lực của 2G2 H1L1 và 2G2 H3L3 tương đương với ái lực của kháng thể đối chứng Secukinumab.

Ví dụ 8: Phát hiện hoạt tính liên kết của kháng thể 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 với kháng nguyên bằng phương pháp ELISA

1. Hoạt tính liên kết của kháng thể 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 với kháng nguyên IL17A-His được phát hiện bằng ELISA gián tiếp và so với thuốc bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích.

IL17A-His có thể được điều chế bằng cách dựa vào các trình tự đã được công bố và các phương tiện kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật, hoặc dựa vào các bước sau:

Điều chế IL17A-His: trình tự protein có chiều dài đầy đủ của IL-17A của người được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu protein NCBI, và được dung hợp với nhãn tinh chế His*6. Genscript ở Nan Kinh (Nanjing) được giao để tổng hợp axit nucleic mã hóa protein dung hợp, và bằng cách dựa vào các công nghệ chuẩn được giới thiệu trong *Guide to Molecular Cloning Experiments (Second Edition)* và sử dụng công nghệ tách dòng phân tử tiêu chuẩn như PCR, phân cắt enzym, thu hồi gel, biến nạp nối, PCR khuôn lạc hoặc nhận diện sự phân cắt enzym, gen đích được tách dưới dòng vào vectơ

biểu hiện của tế bào động vật có vú, và gen đích với vector biểu hiện tái tổ hợp được giải trình tự tiếp và phân tích. Sau khi trình tự được xác minh là chính xác, một lượng trung bình và lớn của các plasmit biểu hiện không có nội độc tố được tạo ra, và chuyển nhiễm tạm thời tế bào HEK293 để biểu hiện protein. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch lỏng môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom và ái lực được tinh chế bằng cách sử dụng cột Ni Sepharose (GE), và chất lượng của các mẫu protein thu được được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật phân tích tiêu chuẩn SDS-PAGE và SEC-HPLC đạt tiêu chuẩn.

ELISA: IL17A-His được bổ sung vào vi đĩa và được ủ ở 4°C qua đêm; sau khi phong bế bằng BSA 1% trong PBS ở 37°C trong 2 giờ, kháng thể được bổ sung lần lượt, và được ủ ở 37°C trong 30 phút; và IgG (H + L)-HRP kháng người của dê (Jackson, 109-035-088) được bổ sung và được ủ ở 37°C trong 30 phút; và sau đó phản ứng màu được thực hiện với TMB (Neogen, 308177) trong 5 phút, và độ hấp thụ ở 450 nm được phát hiện trong thiết bị đọc vi đĩa. Dữ liệu thử nghiệm thu được được phân tích và xử lý bằng phần mềm SoftMax Pro 6.2.1, và đường cong phù hợp 4 tham số được vẽ đồ thị để phân tích với nồng độ kháng thể là hoành độ và giá trị độ hấp thụ là tung độ.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 12, Fig. 13, và Bảng 3 và Bảng 4 dưới đây.

Bảng 3: Kết quả phát hiện hoạt tính liên kết của 13E9 H1L1 và 13E9 H2L2 với kháng nguyên IL17A-His

Nồng độ/gradient kháng thể	Kháng nguyên phủ: IL17A-His, 1 µg/mL					
	13E9 H1L1		13E9 H2L2		Secukinumab	
1 µg/mL	2,726	2,731	2,804	2,737	2,184	2,227
1:3	2,875	2,852	2,832	2,873	2,595	2,505
1:9	2,858	2,815	2,717	2,712	2,297	2,364
1:27	2,564	2,494	2,479	2,481	2,049	2,064
1:81	1,934	1,925	1,891	1,834	1,372	1,314
1:243	1,159	1,116	1,097	1,062	0,672	0,697
1:729	0,522	0,537	0,514	0,511	0,313	0,309
0	0,047	0,048	0,048	0,048	0,046	0,046

EC ₅₀ (nM)	0,044	0,048	0,082
-----------------------	-------	-------	-------

Bảng 4: Kết quả phát hiện hoạt tính liên kết của 13E9 H3L2 với kháng nguyên IL17A-His

Nồng độ/gradient kháng thể	Kháng nguyên phủ: IL17A-His: 1 µg/mL			
	13E9 H3L2		Secukinumab	
0,5 µg/mL	3,074	3,068	2,929	2,929
1:3	3,175	3,026	2,924	2,885
1:9	2,944	2,895	2,660	2,666
1:27	2,472	2,393	1,947	1,862
1:81	1,610	1,617	1,140	1,092
1:243	0,786	0,783	0,521	0,522
1:729	0,343	0,348	0,252	0,253
0	0,091	0,084	0,087	0,087
EC ₅₀ (nM)	0,043		0,078	

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng tất cả các kháng thể 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 đều liên kết hiệu quả với kháng nguyên IL17A-His, và hiệu quả liên kết của chúng là phụ thuộc vào liều lượng. Trong cùng các điều kiện thử nghiệm, EC₅₀ liên kết của 13E9 H1L1 là 0,044 nM, EC₅₀ liên kết của 13E9 H2L2 là 0,048 nM, và EC₅₀ của thuốc bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích là 0,082 nM (Fig. 12, Bảng 3); trong cùng các điều kiện thử nghiệm, EC₅₀ liên kết của 13E9 H3L2 là 0,043 nM, và EC₅₀ của thuốc bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích là 0,078 nM (Fig. 13, Bảng 4).

Các kết quả thử nghiệm nêu trên cho thấy rằng trong cùng các điều kiện thử nghiệm, tất cả các giá trị EC₅₀ của 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 đều thấp hơn so với các giá trị này của thuốc đối chứng dương Secukinumab đối với cùng đích, chỉ ra rằng hoạt tính liên kết của 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 với IL17A-His là tốt hơn so với hoạt tính liên kết của thuốc đối chứng bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích.

2. Hoạt tính của các kháng thể 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 phong bế sự liên kết của IL17RA-His (biotin) với kháng nguyên IL17A-His được phát hiện

bằng phương pháp ELISA cạnh tranh.

IL17RA-His (biotin) có thể được điều chế bằng cách dựa vào các trình tự đã được công bố và các phương tiện kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật, hoặc dựa vào các bước sau:

Điều chế IL17RA-His (biotin): trình tự miền ngoại bào của IL-17RA của người được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu protein NCBI, và được dung hợp với nhãn tinh chế His*6. Genscript ở Nam Kinh (Nanjing) được giao để tổng hợp axit nucleic mã hóa protein dung hợp, và bằng cách dựa vào các công nghệ chuẩn được giới thiệu trong the *Guide to Molecular Cloning Experiments (Second Edition)* và sử dụng công nghệ tách dòng phân tử tiêu chuẩn như PCR, phân cắt enzym, thu hồi gel, biến nạp nổi, PCR khuôn lạc hoặc nhận diện sự phân cắt enzym, gen đích được tách dưới dòng vào vector biểu hiện của tế bào động vật có vú, và gen đích với vector biểu hiện tái tổ hợp được giải trình tự tiếp và phân tích. Sau khi trình tự được xác minh là chính xác, một lượng trung bình và lớn của các plasmit biểu hiện không có nội độc tố được tạo ra, và chuyển nhiễm tạm thời tế bào HEK293 để biểu hiện protein. Sau 7 ngày nuôi cấy, môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom và ái lực được tinh chế bằng cách sử dụng cột Ni Sepharose (GE), và chất lượng của các mẫu protein thu được được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tích tiêu chuẩn SDS-PAGE và SEC-HPLC đạt tiêu chuẩn. Sau khi hoàn thành việc xác định chất lượng, các mẫu protein IL-17RA của người-His đã được biotin hóa được dán nhãn và thu được bằng kit bán trên thị trường EZ-Link®Sulfo-NHS-LC-Biotinylation của Thermo scientific, và phương pháp điều chế cụ thể được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng kit.

ELISA: IL17A-His được bổ sung vào vi đĩa và được ủ ở 4°C qua đêm; sau khi phong bế bằng BSA 1% trong PBST ở 37°C trong 2 giờ, kháng thể được bổ sung lần lượt, và kháng nguyên và kháng thể được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút; sau đó thụ thể IL17RA-His (biotin) được bổ sung được trộn kỹ với kháng thể ở tỷ lệ thể tích là 1:1 và được ủ ở 37°C trong 30 phút; và SA-HRP (KPL, 14-30-00) được bổ sung và được ủ ở 37°C trong 30 phút; và sau đó phản ứng màu được thực hiện với TMB (Neogen, 308177) trong 5 phút, và độ hấp thụ ở 450 nm được phát hiện trong

thiết bị đọc vi đĩa. Dữ liệu thử nghiệm thu được được phân tích và xử lý bằng phần mềm SoftMax Pro 6.2.1, và đường cong phù hợp 4 tham số được vẽ đồ thị để phân tích với nồng độ kháng thể là hoành độ và giá trị độ hấp thụ là tung độ. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 14, Fig. 15, và Bảng 5 và Bảng 6 dưới đây.

Bảng 5: Kết quả phát hiện hoạt tính của 13E9 H1L1 và 13E9 H2L2 cạnh tranh với thụ thể IL17RA-His (biotin) để liên kết với kháng nguyên IL17A-His

Nồng độ/gradient kháng thể	Phủ kháng nguyên: IL17A-His (20150213) 0,5 µg/mL					
	13E9 H1L1		13E9 H2L2		Secukinumab	
10 µg/mL	0,273	0,249	0,274	0,290	0,402	0,392
1:3	0,299	0,220	0,313	0,339	0,469	0,502
1:9	0,418	0,379	0,431	0,379	0,642	0,708
1:27	0,673	0,610	0,646	0,636	0,842	0,855
1:81	0,986	1,008	1,011	1,069	1,169	1,201
1:243	1,342	1,362	1,428	1,331	1,418	1,468
1:729	1,363	1,375	1,447	1,519	1,467	1,657
0	1,495	1,406	1,429	1,561	1,610	1,495
Thụ thể	IL17RA-His(bio) 0,1 µg/mL					
EC ₅₀ (nM)	1,437		1,281		1,807	

Bảng 6: Kết quả phát hiện hoạt tính của 13E9 H3L2 cạnh tranh với thụ thể IL17RA-His (biotin) để liên kết với kháng nguyên IL17A-His

Nồng độ/gradient kháng thể	Phủ kháng nguyên: IL17A-His 0,5 µg/mL			
	13E9 H3L2		Secukinumab	
10µg/mL	0,193	0,182	0,263	0,282
1:3	0,231	0,206	0,318	0,327
1:9	0,265	0,267	0,419	0,462
1:27	0,424	0,415	0,630	0,663
1:81	0,725	0,627	0,813	0,859
1:243	1,069	1,018	1,120	1,182
1:729	1,218	1,095	1,133	1,250

0	1,184	1,334	1,182	1,232
Thụ thể	IL17RA-His(bio) 0,1 µg/mL			
EC ₅₀ (nM)	0,805		1,580	

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng tất cả các kháng thể 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 đều có thể phong bế hiệu quả sự liên kết của thụ thể IL17RA-His (biotin) với kháng nguyên IL17A-His, và hiệu quả phong bế là phụ thuộc vào liều lượng. Trong cùng các điều kiện thử nghiệm, EC₅₀ của 13E9 H1L1 cạnh tranh với IL17AR-His (biotin) để liên kết với IL17A-His là 1,437 nM, EC₅₀ của 13E9 H2L2 cạnh tranh với IL17AR-His (biotin) để liên kết với IL17A-His là 1,281 nM, và EC₅₀ của thuốc đối chứng dương Secukinumab đối với cùng đích cạnh tranh với IL17AR-His (biotin) để liên kết với IL17A-His là 1,807 nM (Bảng 5, Fig. 14); EC₅₀ của 13E9 H3L2 cạnh tranh với IL17AR-His (biotin) để liên kết với IL17A-His là 0,805 nM, và EC₅₀ của thuốc bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích cạnh tranh với IL17AR-His (biotin) để liên kết với IL17A-His là 1,580 nM (Bảng 6, Fig. 15).

Các kết quả thử nghiệm nêu trên cho thấy rằng trong cùng các điều kiện thử nghiệm, giá trị EC₅₀ của 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 cạnh tranh với IL17AR-His (biotin) để liên kết với IL17A-His đều nhỏ hơn so với giá trị này của thuốc đối chứng bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích, chỉ ra rằng hoạt tính của 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 và 13E9 H3L2 cạnh tranh với IL17AR-His (biotin) để liên kết với IL17A-His là tốt hơn so với hoạt tính của thuốc bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích.

Ví dụ 9: Phát hiện hoạt tính liên kết của kháng thể 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 với kháng nguyên bằng phương pháp ELISA

1. Hoạt tính liên kết của kháng thể 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 với kháng nguyên IL17A-His được phát hiện bằng ELISA gián tiếp.

Các bước thử nghiệm: IL17A-His được bổ sung vào vi đĩa và được ủ ở 4°C qua đêm; sau khi phong bế bằng BSA 1% trong PBS ở 37°C trong 2 giờ, kháng thể được bổ sung lần lượt, và được ủ ở 37°C trong 30 phút; và IgG (H + L)-HRP kháng người của dê (Jackson, 109-035-088) được bổ sung và được ủ ở 37°C trong 30 phút; và sau

đó phản ứng màu được thực hiện với TMB (Neogen, 308177) trong 5 phút, và độ hấp thụ ở 450 nm được phát hiện trong thiết bị đọc vi đĩa. Dữ liệu thử nghiệm thu được được phân tích và xử lý bằng phần mềm SoftMax Pro 6.2.1, và đường cong phù hợp 4 tham số được vẽ đồ thị để phân tích với nồng độ kháng thể là hoành độ và giá trị độ hấp thụ là tung độ.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 16 và Bảng 7 dưới đây. Trong đó, EC_{50} liên kết của 2G2 H1L1 là 0,177 nM, EC_{50} liên kết của 2G2 H2L2 là 0,372 nM, và EC_{50} liên kết của 2G2 H3L3 là 0,421 nM.

Bảng 7: Kết quả phát hiện liên kết của 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 với kháng nguyên IL17A-His

Nồng độ/gradient kháng thể	Phủ kháng nguyên: IL17A-His, 1 µg/mL							
	2G2 H1L1		2G2 H2L2		2G2 H3L3		Secukinumab	
1 µg/mL	3,220	3,135	3,030	2,960	2,485	2,384	3,448	3,448
1:3	3,284	3,149	2,899	2,886	2,311	2,314	3,477	3,478
1:9	2,820	2,747	2,199	2,126	1,693	1,703	3,320	3,331
1:27	2,020	1,969	1,348	1,328	0,982	1,002	2,768	2,764
1:81	1,113	1,075	0,638	0,624	0,439	0,440	1,761	1,689
1:243	0,469	0,426	0,261	0,350	0,188	0,186	0,807	0,806
1:729	0,224	0,188	0,131	0,148	0,113	0,102	0,337	0,326
0	0,061	0,057	0,058	0,068	0,063	0,060	0,062	0,060
EC_{50} (nM)	0,177		0,372		0,421		0,090	

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng tất cả các kháng thể 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 đều có thể liên kết hiệu quả với kháng nguyên IL17A-His, và hiệu quả liên kết của chúng là phụ thuộc vào liều lượng.

2. Hoạt tính của các kháng thể 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 cạnh tranh với thụ thể IL17A-His (biotin) để liên kết với kháng nguyên IL17A-His được phát hiện bằng phương pháp ELISA cạnh tranh.

Các bước thử nghiệm: IL17A-His được bổ sung vào vi đĩa và được ủ ở 4°C qua đêm; sau khi phong bế bằng BSA 1% trong PBST ở 37°C trong 2 giờ, kháng thể được

bổ sung lần lượt, và kháng nguyên và kháng thể được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút; sau đó thụ thể IL17RA-His (biotin) được bổ sung được trộn kỹ với kháng thể ở tỷ lệ thể tích là 1:1 và được ủ ở 37°C trong 30 phút; và SA-HRP (KPL, 14-30-00) được bổ sung và được ủ ở 37°C trong 30 phút; và sau đó phản ứng màu được thực hiện với TMB (Neogen, 308177) trong 5 phút, và độ hấp thụ ở 450 nm được phát hiện trong thiết bị đọc vi đĩa. Dữ liệu thử nghiệm thu được được phân tích và xử lý bằng phần mềm SoftMax Pro 6.2.1, và đường cong phù hợp 4 thông số được vẽ đồ thị để phân tích với nồng độ kháng thể là hoành độ và giá trị độ hấp thụ là tung độ.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 17 và Bảng 8 dưới đây. Trong đó, EC₅₀ phong bế của 2G2 H1L1 là 2,264 nM, EC₅₀ phong bế của 2G2 H2L2 là 5,408 nM, và EC₅₀ phong bế của 2G2 H3L3 là 5,911 nM (Fig. 17, Bảng 8).

Bảng 8: Kết quả phát hiện hoạt tính của 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 và 2G2 H3L3 cạnh tranh với thụ thể IL17RA-His (biotin) để liên kết với kháng nguyên IL17A-His

Nồng độ/gradient kháng thể	Phủ kháng nguyên: IL17A-His 0,5 µg/mL							
	2G2 H1L1		2G2 H2L2		2G2 H3L3		Secukinumab	
10 µg/mL	0,285	0,272	0,337	0,366	0,680	0,718	0,247	0,267
1:3	0,417	0,485	0,500	0,623	0,971	0,876	0,333	0,361
1:9	0,506	0,502	0,785	0,751	0,971	0,954	0,478	0,507
1:27	0,891	0,763	1,087	1,038	1,242	1,178	0,758	0,784
1:81	1,162	1,167	1,286	1,309	1,246	1,312	1,088	1,135
1:243	1,231	1,281	1,423	1,402	1,398	1,466	1,272	1,184
1:729	1,453	1,472	1,464	1,596	1,607	1,466	1,392	1,324
0	1,455	1,425	1,494	1,424	1,470	1,340	1,170	1,230
Thụ thể	IL17RA-His (biotin) :0,1 µg/mL							
EC ₅₀ (nM)	2,264		5,408		5,911		2,749	

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng tất cả các kháng thể 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, và 2G2 H3L3 đều có thể phong bế hiệu quả sự liên kết của thụ thể IL17RA-His (biotin) với kháng nguyên IL17A-His, và hiệu quả phong bế là phụ thuộc vào liều lượng.

Ví dụ 10: Phản ứng nguyên bào sợi phôi của người hỗn hợp: sự tiết xytokin IL-6

Các tế bào MRC 5 (mua từ Trung tâm Tế bào, Viện Khoa học Trung Quốc) được dàn lên đĩa 96 giếng với 5000 tế bào/giếng và được nuôi cấy qua đêm. Hỗn hợp của IL-17 và kháng thể (hIgG làm mẫu đối chứng) được ủ ở 37°C trong 20 phút được bổ sung vào tế bào MRC 5 và được nuôi cấy trong 48 giờ. Sau 48 giờ nuôi cấy, dịch nổi bề mặt tế bào được thu gom, và lượng IL-6 đã tiết được phát hiện bằng kit ELISA (mua từ Dakewe Corporation).

Tế bào MRC 5 được trộn và nuôi cấy lần lượt với 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2, 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 hoặc 2G2 H3L3 (1 nM, 10 nM, 100 nM) và Secukinumab (1 nM, 10 nM, 100 nM), và kết quả phát hiện của IL-6 đã tiết được thể hiện trên Fig. 18.

Có thể quan sát được từ Fig. 18 rằng tất cả các 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2, và 2G2 H2L2 đều làm giảm hiệu quả sự tiết IL-6 của tế bào MRC 5 được cảm ứng bởi IL-17, trong đó:

hiệu quả của kháng thể 13E9 H1L1 đối với việc ức chế sự tiết IL-6 ở nồng độ 100 nM là tốt hơn so với hiệu quả của kháng thể đối chứng Secukinumab ở cùng liều lượng, và hiệu quả ức chế đối với sự tiết IL-6 ở nồng độ 10 nM là tương đương với hiệu quả của kháng thể đối chứng Secukinumab ở nồng độ 100 nM;

hiệu quả của kháng thể 13E9 H2L2 đối với việc ức chế sự tiết IL-6 ở nồng độ 1 nM, 10 nM và 100 nM đều tương đương với hiệu quả của kháng thể đối chứng Secukinumab ở cùng liều lượng;

hiệu quả ức chế của kháng thể 13E9 H3L2 đối với sự tiết IL-6 ở nồng độ 10 nM và 100 nM đều tốt hơn so với hiệu quả của kháng thể đối chứng Secukinumab ở cùng liều lượng, và hiệu quả ở nồng độ 1 nM là tương đương với hiệu quả của kháng thể đối chứng Secukinumab;

hiệu quả của kháng thể 2G2 H2L2 đối với việc ức chế sự tiết IL-6 ở nồng độ 1 nM và 100 nM đều tương đương với hiệu quả của kháng thể đối chứng Secukinumab;

hiệu quả của 2G2 H3L3 đối với việc ức chế sự tiết IL-6 ở nồng độ 1 nM là tốt

hơn so với hiệu quả của kháng thể đối chứng Secukinumab ở cùng liều lượng.

Các kết quả nêu trên cho thấy rằng trong phản ứng nguyên bào sợi phôi người hỗn hợp *in vitro*, hoạt tính sinh học của kháng thể theo sáng chế trong việc phong bế sự tiết IL-6 qua trung gian IL-17A là tốt hơn hoặc ít nhất là tương đương với hoạt tính của thuốc bán trên thị trường Secukinumab đối với cùng đích.

Ví dụ 11: Hiệu quả của thuốc kháng thể 13E9 H3L2 đối với độ dày biểu bì của mô hình bệnh vẩy nến của chuột nhắt C57BL/6

Chuột nhắt C57BL/6 được chia thành 5 nhóm với 8 con chuột nhắt trong mỗi nhóm.

(1) Tạo mô hình:

nhóm bình thường, chuột nhắt C57BL/6 được tiêm trong da nước muối thông thường trên lưng nhắt trong 6 ngày liên tục từ ngày 1 đến ngày 6, 25 μ L/con chuột nhắt;

các nhóm chuột nhắt còn lại được tiêm trong da IL-17A tái tổ hợp của người từ ngày 1 đến ngày 4, 2 μ g/25 μ L/con chuột nhắt, và được tiêm trong da IL-17A tái tổ hợp của người từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 6, 5 μ g/25 μ L/con chuột nhắt.

(2) Phân nhóm và sử dụng cụ thể:

Nhóm bình thường: nước muối thông thường, được dùng với liều 0 mg/kg, 3 lần một tuần, tổng cộng 3 lần;

Nhóm mô hình: đối chứng isotyp âm, được dùng với liều 50 mg/kg, 3 lần một tuần, tổng cộng 3 lần;

Nhóm Secukinumab: Secukinumab, được dùng với liều 50 mg/kg, 3 lần một tuần, tổng cộng 3 lần;

Nhóm 13E9 H3L2 liều cao: được dùng với liều 50 mg/kg, 3 lần một tuần, tổng cộng 3 lần;

Nhóm 13E9 H3L2 liều thấp: được dùng với liều 10 mg/kg, 3 lần một tuần, tổng cộng 3 lần.

Mỗi nhóm được dùng dưới da 3 lần, cụ thể là lần lượt 1 ngày trước khi tạo mô

hình, tạo mô hình ngày 3 và tạo mô hình ngày 6.

Vào ngày thứ 7, da của các vị trí tiêm trên lưng chuột nhất được cố định để làm vùng bệnh lý và đo độ dày biểu bì.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 19.

Kết quả cho thấy rằng về mặt thống kê, độ dày biểu bì của nhóm Secukinumab (50 mg/kg), nhóm 13E9 H3L2 liều cao (50 mg/kg) và nhóm 13E9 H3L2 liều thấp (10 mg/kg) nhỏ hơn đáng kể so với độ dày biểu bì của nhóm mô hình ($P < 0,01$).

Kết quả cho thấy rằng kháng thể 13E9 H3L2 (50 mg/kg) cho thấy hiệu quả ức chế có ý nghĩa thống kê đối với độ dày biểu bì trong mô hình bệnh vẩy nến của chuột nhất C57BL/6 và có hiệu quả tương tự như Secukinumab (50 mg/kg); hiệu quả ức chế của 13E9 H3L2 (10 mg/kg) đối với độ dày biểu bì cũng có ý nghĩa thống kê.

Mặc dù các phương án cụ thể theo sáng chế đã được mô tả chi tiết, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các cải biến và thay thế khác nhau có thể được thực hiện với các phương án được mô tả chi tiết này theo tất cả nội dung đã được bộc lộ, và các thay đổi này nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Toàn bộ phạm vi của sáng chế được đưa ra bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo và các phân tương đương bất kỳ của chúng.

Lưu ý về bảo quản vật liệu sinh học:

Dòng tế bào lai LT006 (IL17A-13E9), được lưu giữ tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) vào ngày 12 tháng 9 năm 2017 với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017102, tại Trường Đại học Vũ Hán, Vũ Hán, Trung Quốc, 430072.

Dòng tế bào lai LT007 (IL17A-2G2), được lưu giữ tại Bảo tàng giống Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC) vào ngày 12 tháng 9 năm 2017 với số nộp lưu là CCTCC NO: C2017165, tại Trường Đại học Vũ Hán, Vũ Hán, Trung Quốc, 430072.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó kháng lại IL-17A, chứa:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) chứa vùng xác định tính bổ trợ (CDR) gồm CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó trình tự axit amin của CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 31, trình tự axit amin của CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 32, và trình tự axit amin của CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 33; và

b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) chứa các CDR gồm CDR1, CDR2, và CDR3, trong đó trình tự axit amin của CDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 34, trình tự axit amin của CDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 35, và trình tự axit amin của CDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 36.

2. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó:

trình tự axit amin của V_H được nêu trong SEQ ID NO: 2, và

trình tự axit amin của V_L được nêu trong SEQ ID NO: 4.

3. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó:

trình tự axit amin của V_H được nêu trong SEQ ID NO: 6, và

trình tự axit amin của V_L được nêu trong SEQ ID NO: 8.

4. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó:

trình tự axit amin của V_H được nêu trong SEQ ID NO: 10, và

trình tự axit amin của V_L được nêu trong SEQ ID NO: 12.

5. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó:

trình tự axit amin của V_H được nêu trong SEQ ID NO: 14, và

trình tự axit amin của V_L được nêu trong SEQ ID NO: 12.

6. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm, và kháng thể kép.

7. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-17A với EC₅₀ thấp hơn 100 nM.

8. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng không phải CDR có nguồn gốc từ các loài không phải là chuột nhắt.

9. Phân tử axit nucleic được phân lập, bao gồm axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

10. Thẻ liên hợp chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và phần liên hợp chứa nhãn phát hiện được.

11. Kit chất phản ứng chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

12. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và ít nhất một chất mang hoặc tá dược được dùng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AKESO BIOPHARMA, INC

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG INTOLOKIN-17A VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> IEC180082PCT

<150> 201810539405.0

<151> 2018-05-30

<160> 43

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 360

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng 13E9 của kháng thể

<400> 1

gaagtaaagc tgcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60

acctgcactg tcactagcta ctcattcacc agtgattatg cctggagctg gatccggcag 120

tttccaggaa tcaaactgga gtggatgggc tacataacct acagtgggtgt cactagctac 180

aaccctctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240

ctacagttga attctgtgac tactgaggac acggccacat attactgtgc aagggcagac 300

tatgatagct actatactat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 13E9 của kháng thể

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Asp Tyr Asp Ser Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 13E9 của kháng thể

<400> 3
 gacatccagc tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaagg ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagattttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattttctgct ctcaaagtac acatttttgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 4
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 13E9 của kháng thể

<400> 4

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

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

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

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

<210> 5

<211> 360

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng 13E9H1L1 của kháng thể

<400> 5

gatgtgcagc tgcaggaaag cggaccagga ctggtgaagc ctagccagac cctgagcctg 60
acttgcaccg tgtccagcta cagcttcacc agcgactacg cttggtcttg gatcagacag 120
ttcccaggaa ttggcctcga gtggatgggc tacatcacct acagcggcgt gaccagctac 180
aaccacagcc tgaagagcag gatcaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcttc 240
ctgcagctga acagcgtgac agcagccgat accgcagtgt actattgcgc cagggccgac 300
tacgacagct actacacat ggactattgg ggccaggga ccagcgtgac agtgtctagc 360

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 13E9H1L1 của kháng thể

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Asp Tyr Asp Ser Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 13E9H1L1 của kháng thể

<400> 7

gatgtcgtga tgaccagac ccctctgtct ctgccagtga cactgggaca gcaggctagc 60
 atctcttgca gaagcagcca gagcctgggtg cacagcaacg gcaacaccta cctgcattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctcctaga ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 180
 agcggcgtgc cagatagatt cagcggaagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agcagagtgg aggccgagga tctgggagtg tacttctgca gccagagcac ccacttttgg 300
 accttcggcg gaggcaccaa gctggagatc aag 333

<210> 8
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 13E9H1L1 của kháng thể

<400> 8

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

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

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

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

<210> 9
 <211> 360

<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng 13E9H2L2 của kháng thể

<400> 9
gatgtgcagc tgcaggaaag cggaccagga ctggtgaagc ctagccagac cctgagcctg 60
acttgcaccg tgtccagcta cagcttcacc agcgactacg cttggtcttg gatcagacag 120
ccaccaggaa agggactcga gtggatcggc tacatcacct acagcggcgt gaccagctac 180
aaccacagcc tgaagagcag gatcaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcttc 240
ctgcagctgt ctacgctgac agcagccgat accgcagtgt actattgcgc cagggccgac 300
tacgacagct actacacat ggactattgg ggccagggaa ccagcgtgac agtgtctagc 360

<210> 10
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 13E9H2L2 của kháng thể

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Asp Tyr Asp Ser Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 13E9H2L2 của kháng thể

<400> 11
 gatgtcgtga tgaccagac ccctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagctagc 60
 atctcttgca gaagcagcca gagcctggtg cacagcaacg gcaacaccta cctgcattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctcctaga ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 180
 agcggcgtgc cagatagatt cagcgggaagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agcagagtgg aggccgagga tctgggagtg tactactgca gccagagcac ccacttttgg 300
 accttcggcg gaggcaccaa gctggagatc aag 333

<210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 13E9H2L2 của kháng thể

<400> 12

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

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

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys 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 Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

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

<210> 13
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng 13E9H3L2 của kháng thể

<400> 13
 gatgtgcagc tgcaggaaag cggaccagga ctggtgaagc ctagccagac cctgagcctg 60
 acttgcaccg tgtccagcta cagcttcacc agcgactacg cttggtcttg gatcagacag 120
 ccaccaggaa agggactcga gtggatcggc tacatcacct acagcggcgt gaccagctac 180
 aaccctagcc tgaagagccg cgtgaccatt agcgtggaca ccagcaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctga gcagcgtgac agccgccgat acagcagtgt actattgocg ccgggccgat 300
 tacgacagct actacaccat ggactattgg ggccagggaa ccagcgtgac agtgtctagc 360

<210> 14
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 13E9H3L2 của kháng thể

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Asp Tyr Asp Ser Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 351
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng 2G2 của kháng thể

<400> 15

gagggttcagc tggagcagtc tggttctgaa ctgaggagtc ctggatcttc agtaaagctt 60

tcatgcaagg attttgattc agaagtcttc cctattgctg atatgagttg ggtaggcag 120

aagcctgggc atggatttga atggattgga gacatactcc caagttttgg tagaacaatc 180

tatggagaga agtttgagga caaagccaaa gtggatgcag acacagtgtc caacacagcc 240

tacttggaaac tcaacagtct gacatctgag gactctgcta tctactactg tgcaaggggt 300

aactacgggt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

<210> 16
<211> 117

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 2G2 của kháng thể

<400> 16

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Ile
 20 25 30

Ala Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
 35 40 45

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

Phe Glu Asp Lys Ala Lys Val Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
 65 70 75 80

Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 17
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2G2 của kháng thể

<400> 17
 gatgttttga tgacccaaac tccactcact ttgtcgggta tcattggaca accagcctcc 60
 atctcttgca agccaagtca gagcctctta aatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 ttgttgcaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaattct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaagggtc acattttcct 300
 cagacgttcg gtggaggcac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2G2 của kháng thể

<400> 18

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Pro Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 19
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng 2G2H1L1 của kháng thể

<400> 19
 gtgcagctgg tgcagagcgg aagcgaactg agaaagccag gctccagcgt gaagctgtct 60
 tgcaaggact tcgacagcga ggtgttcccc atcgccgata tgtcttgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gattcgagtg gatcggtgac attctgcca gcttcggaag aaccaactac 180
 gcccagaagt tcgagggcaa ggccaagggtg gacgcagaca agagcaccaa caccgcctac 240
 ctggagctga acagcctgag aagcgaggac accgccatct actattgcgc caggggcaac 300
 tacggattcg cctattgggg ccaggaaca ctggtgacag tgtccgcc 348

<210> 20
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 2G2H1L1 của kháng thể

<400> 20

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

Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Ile Ala
 20 25 30

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

Gly Asp Ile Leu Pro Ser Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Glu Gly Lys Ala Lys Val Asp Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 21
<211> 336
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2G2H1L1 của kháng thể

<400> 21
gatgtcgtga tgaccagac ccctctgtct ctgagcgtga cactgggaca gccagctagc 60
atcagctgca gaagcagcca gagcctgctg aacagcgacg gcaagaccta cctgaattgg 120
ctgctgcaga gaccaggcca gtctcctaga aggctgatct acctggtgtc caagctggac 180
agcggcgtgc cagatagatt cagcgggaagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
agcagagtgg aggccgagga tctgggagtg tactactgtt ggcagggcag ccacttcctc 300
cagacattcg gcggcggcac aaagctggag atcaag 336

<210> 22
<211> 112
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2G2H1L1 của kháng thể

<400> 22

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 348
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng 2G2H2L2 của kháng thể

<400> 23
gtgcagctgg tgcagagcgg agcagaagtg aagaagccag gctccagcgt gaagctgtct 60
tgcaaggact tcgacagcga ggtgttcccc atcgccgata tgtcttgggt ccgacaggct 120
ccaggccagg gattcgagtg gatcgggtgac attctgcccc gcttcgggag aaccaattac 180
gcccagaagt tccagggcag agtgaccgtg accgcagaca agagcaccaa caccgcctac 240
ctggagctga acagcctgag gagcgaggat accgccgtgt actattgcgc caggggcaac 300
tacggcttcg cctattgggg acaggaaca ctggtgacag tgtccgcc 348

<210> 24
<211> 116
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 2G2H2L2 của kháng thể

<400> 24

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

Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Ile Ala
20 25 30

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

Gly Asp Ile Leu Pro Ser Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ala
 115

<210> 25
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2G2H2L2 của kháng thể

<400> 25
 gatgtcgtga tgaccagac ccctctgtct ctgagcgtga cactgggaca gccagctagc 60
 atcagctgca gaagcagcca gagcctgctg aacagcgacg gcaagacctt cctgaattgg 120
 ctgctgcaga gaccaggcca gtctcctaga aggctgatct acctggtgtc caacctggac 180
 agcggcgtgc cagatagatt cagcggaagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agcagagtgg aagccgagga cgtgggagtg tactactgtt ggcagggcag ccacttcctt 300
 cagacattcg gcggcggcac aaagctggag atcaag 336

<210> 26
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2G2H2L2 của kháng thể

<400> 26

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 27

<211> 348

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng 2G2H3L3 của kháng thể

<400> 27

gtgcagctgg tgcagagcgg agcagaagtg aagaagccag gcagcagcgt gaaggtgtct 60

tgcaaggact tcagcagcga ggtgttcccc atcgccgata tgtcttgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gactggagtg gatcggtgac attctgccca gcttcgggag aaccaattac 180

gcccagaagt tccagggcag agtgaccgtg accgcagaca agagcaccaa caccgcctac 240

ctggagctgt ctagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actattgcgc caggggcaac 300

tacggcttcg cctattgggg acaggggaaca ctggtgacag tgtccgcc 348

<210> 28
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 2G2H3L3 của kháng thể

<400> 28

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

Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Phe Ser Ser Glu Val Phe Pro Ile Ala
 20 25 30

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

Gly Asp Ile Leu Pro Ser Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ala
 115

<210> 29
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2G2H3L3 của kháng thể

<400> 29
 gatgtcgtga tgaccagac ccctctgtct ctgagcgtga cactgggaca gccagctagc 60
 atcagctgca gaagcagcca gagcctgctg aacagcgacg gcaagaccta cctgaattgg 120
 ttctctgcaga gaccaggcca gtctctoctaga aggctgatct acctgggtgtc caacctggac 180
 agcggcgtgc cagatagatt cagcggaagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agcagagtgg aagccgagga cgtgggagtg tactactgtt ggcagggcag ccacttcctt 300
 cagacattcg gcggcggcac aaagctggag atcaag 336

<210> 30
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2G2H3L3 của kháng thể

<400> 30

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 của các kháng thể 13E9, 13E9H1L1, 13E9H2L2 hoặc 13E9H3L2

<400> 31

Ser Tyr Ser Phe Thr Ser Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 của các kháng thể 13E9, 13E9H1L1, 13E9H2L2 hoặc 13E9H3L2

<400> 32

Ile Thr Tyr Ser Gly Val Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 của các kháng thể 13E9, 13E9H1L1, 13E9H2L2 hoặc 13E9H3L2

<400> 33

Ala Arg Ala Asp Tyr Asp Ser Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 của các kháng thể 13E9, 13E9H1L1, 13E9H2L2 hoặc 13E9H3L2

<400> 34

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

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 của các kháng thể 13E9, 13E9H1L1, 13E9H2L2 hoặc 13E9H3L2

<400> 35

Lys Val Ser
1

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 của các kháng thể 13E9, 13E9H1L1, 13E9H2L2 hoặc 13E9H3L2

<400> 36

Ser Gln Ser Thr His Phe Trp Thr
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 của 2G2, 2G2H1L1, 2G2H2L2 hoặc 2G2H3L3

<400> 37

Ser Glu Val Phe Pro Ile Ala Asp
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 của 2G2, 2G2H1L1, 2G2H2L2 hoặc 2G2H3L3

<400> 38

Ile Leu Pro Ser Phe Gly Arg Thr

1

5

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 của 2G2, 2G2H1L1, 2G2H2L2 hoặc 2G2H3L3

<400> 39

Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 của 2G2, 2G2H1L1, 2G2H2L2 hoặc 2G2H3L3

<400> 40

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
 1 5 10

<210> 41
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LCDR2 của 2G2, 2G2H1L1, 2G2H2L2 hoặc 2G2H3L3

<400> 41

Leu Val Ser
 1

<210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 của 2G2, 2G2H1L1, 2G2H2L2 hoặc 2G2H3L3

<400> 42

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Gln Thr
1 5

<210> 43
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly
20 25 30

Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
35 40 45

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
50 55 60

Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
65 70 75 80

Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
85 90 95

Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
100 105 110

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
115 120 125

Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
130 135 140

Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
145 150 155

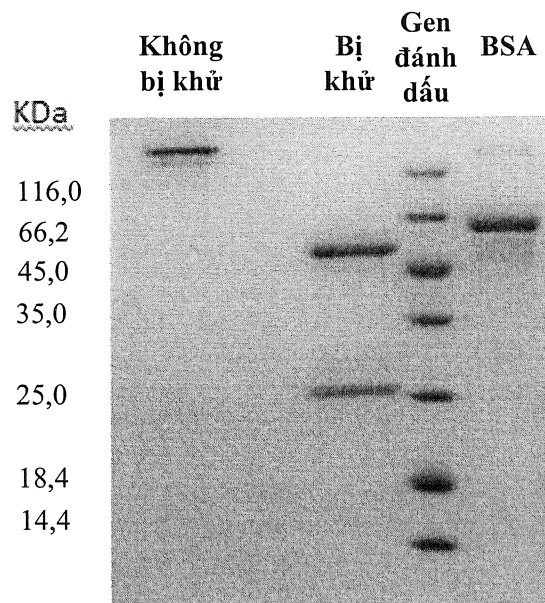


Fig. 1

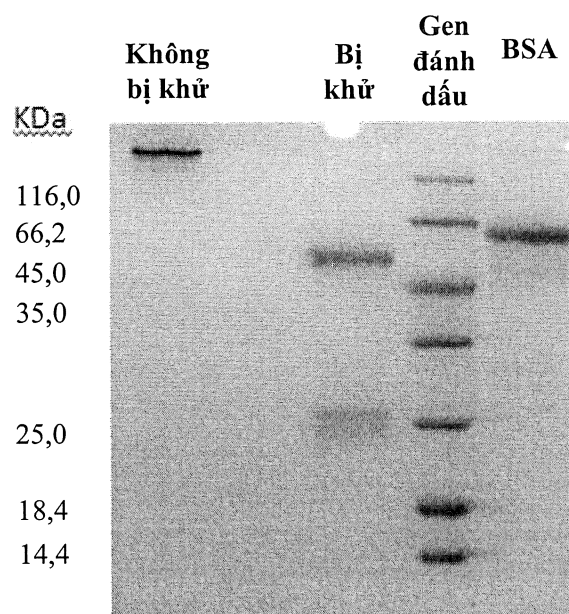
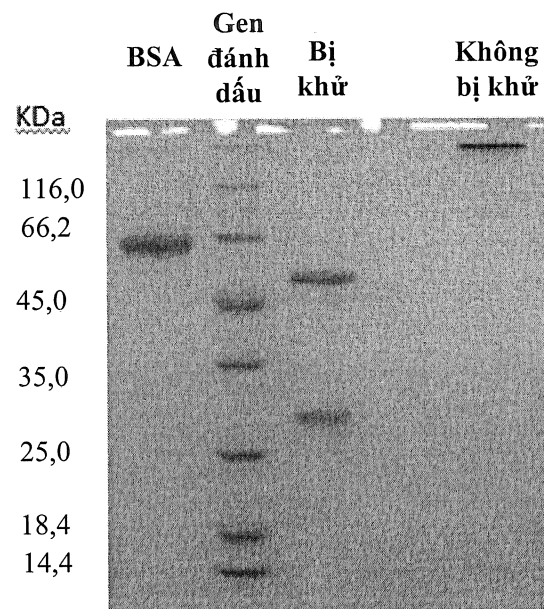


Fig. 2

**Fig. 3**

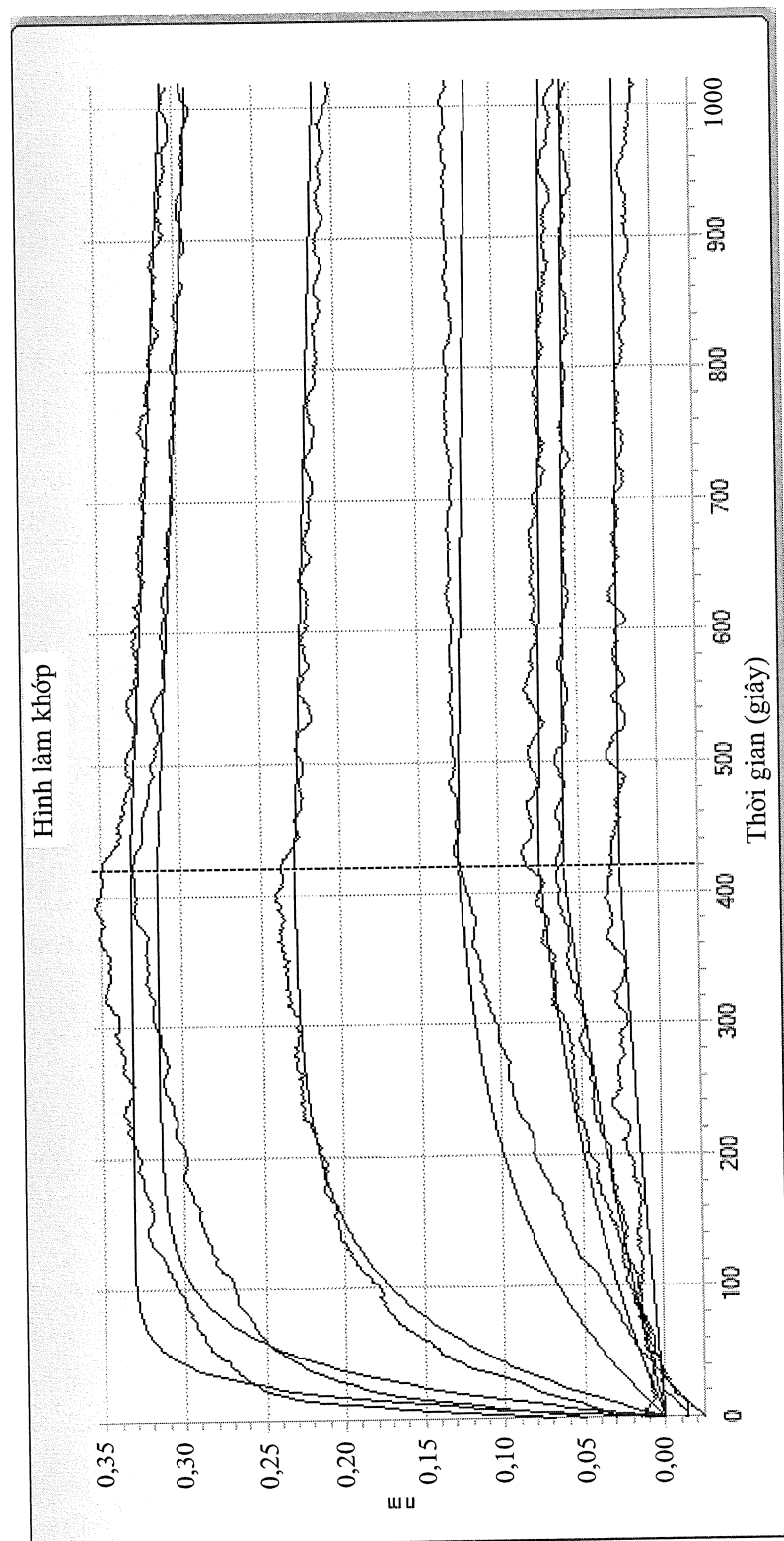


Fig. 4

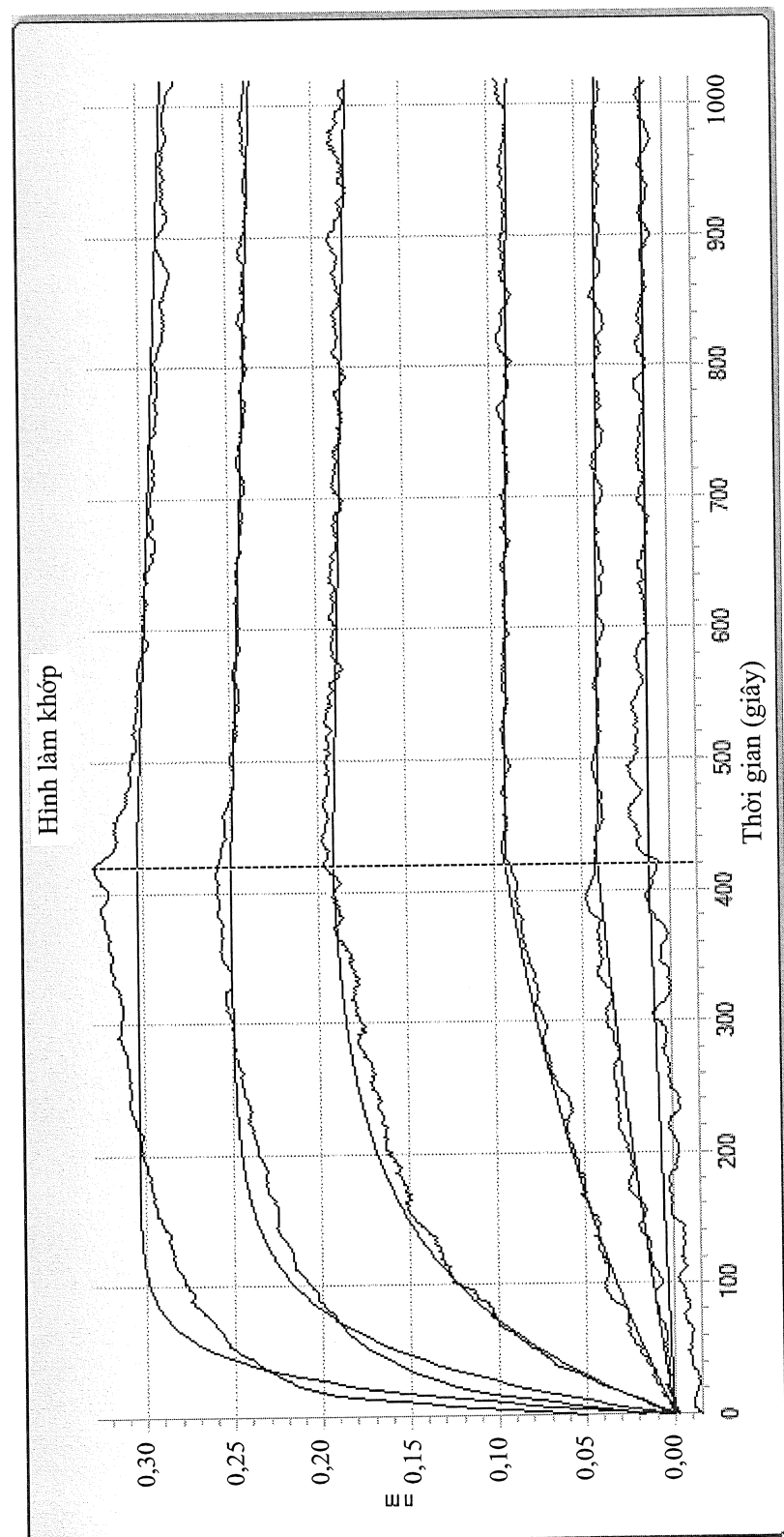


Fig. 5

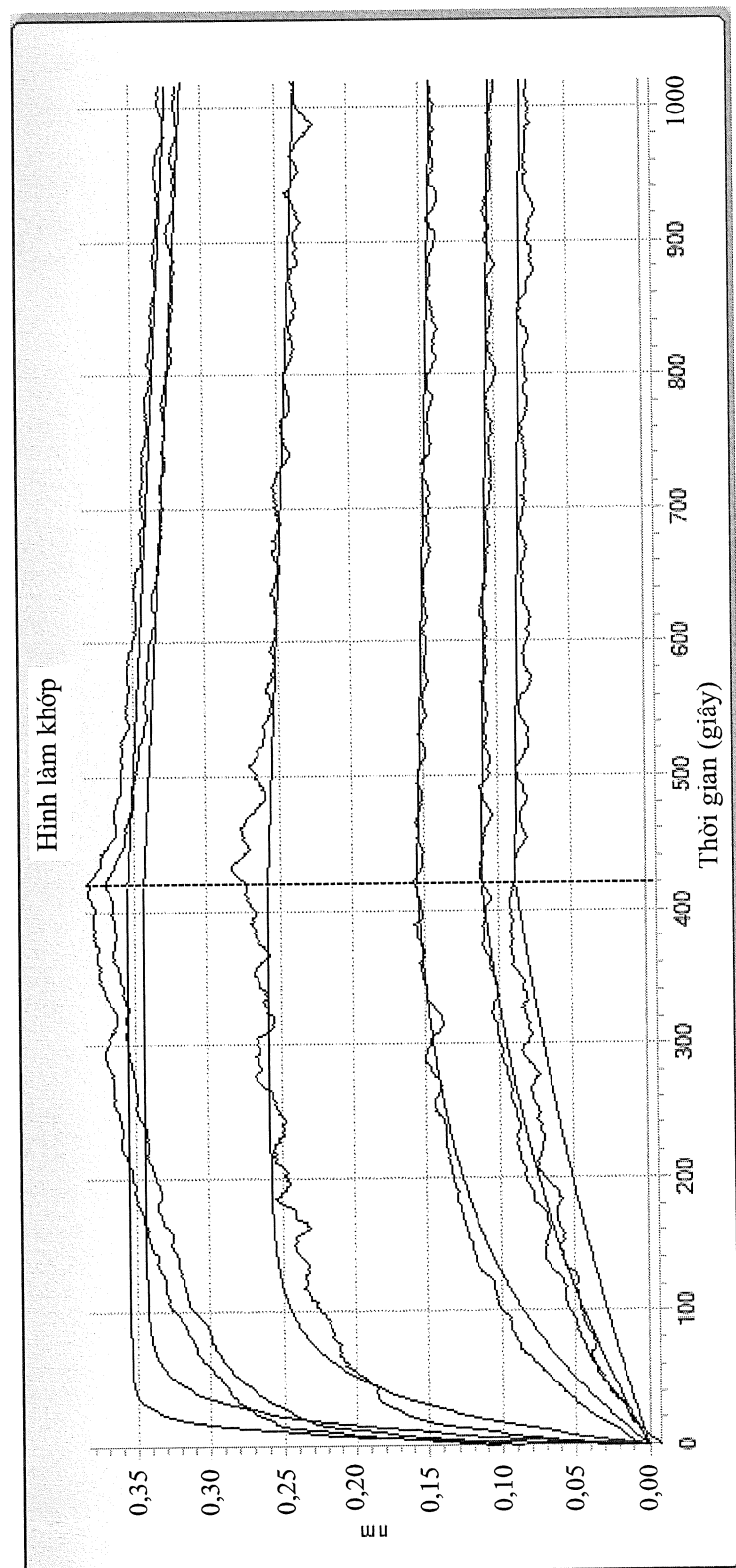


Fig. 6

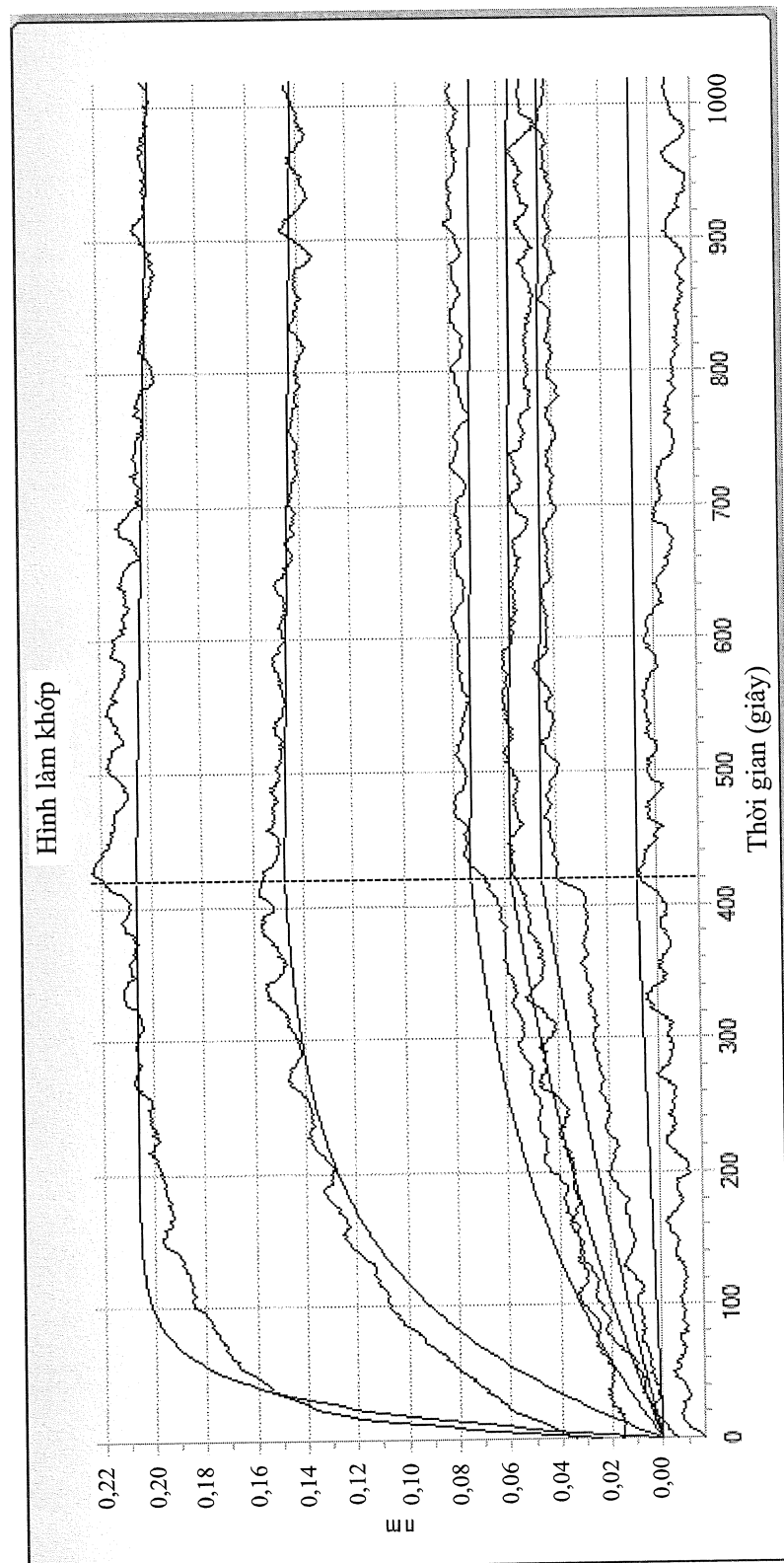


Fig. 7

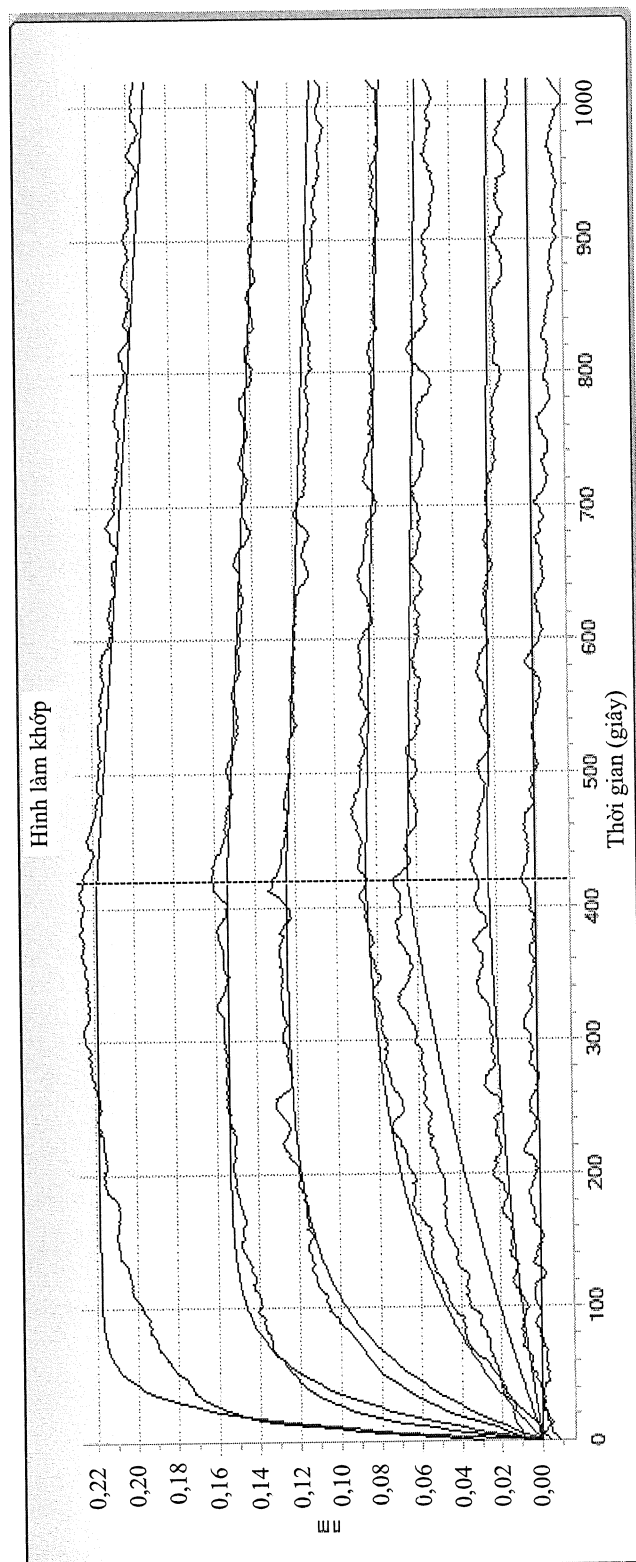


Fig. 8

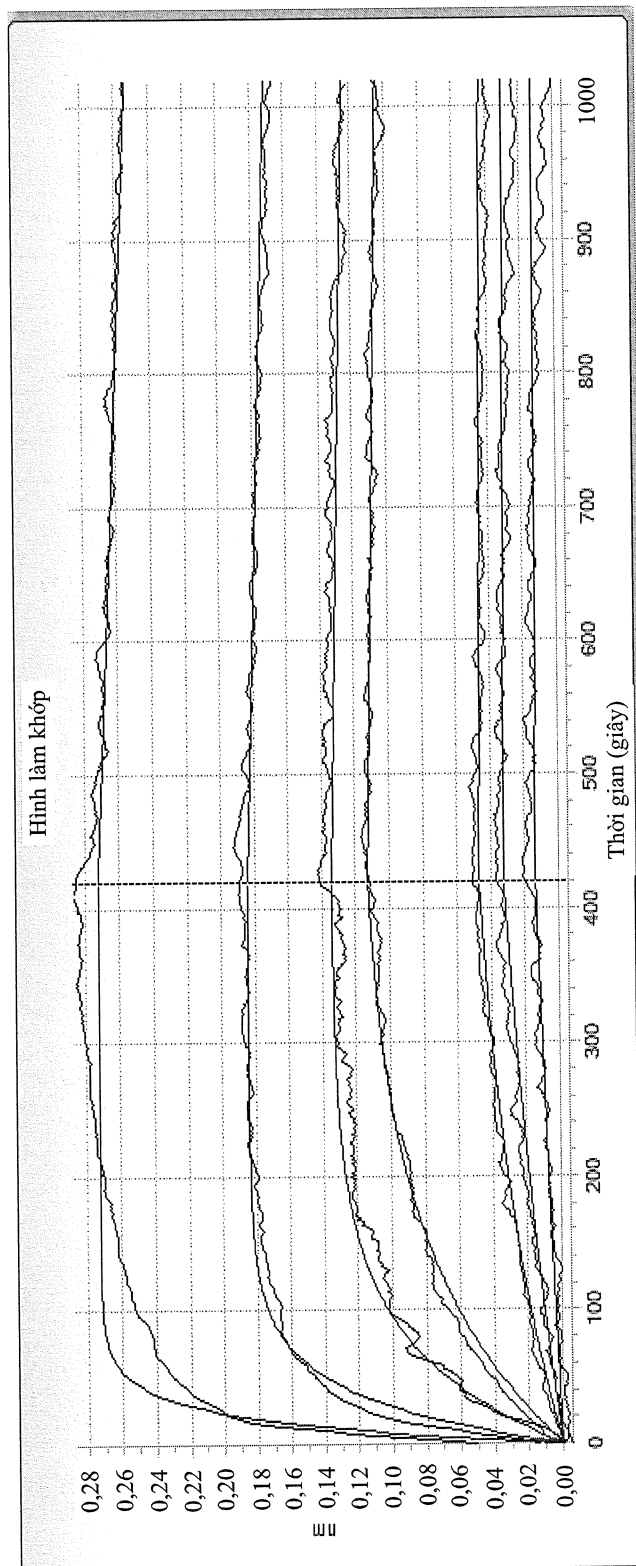


Fig. 9

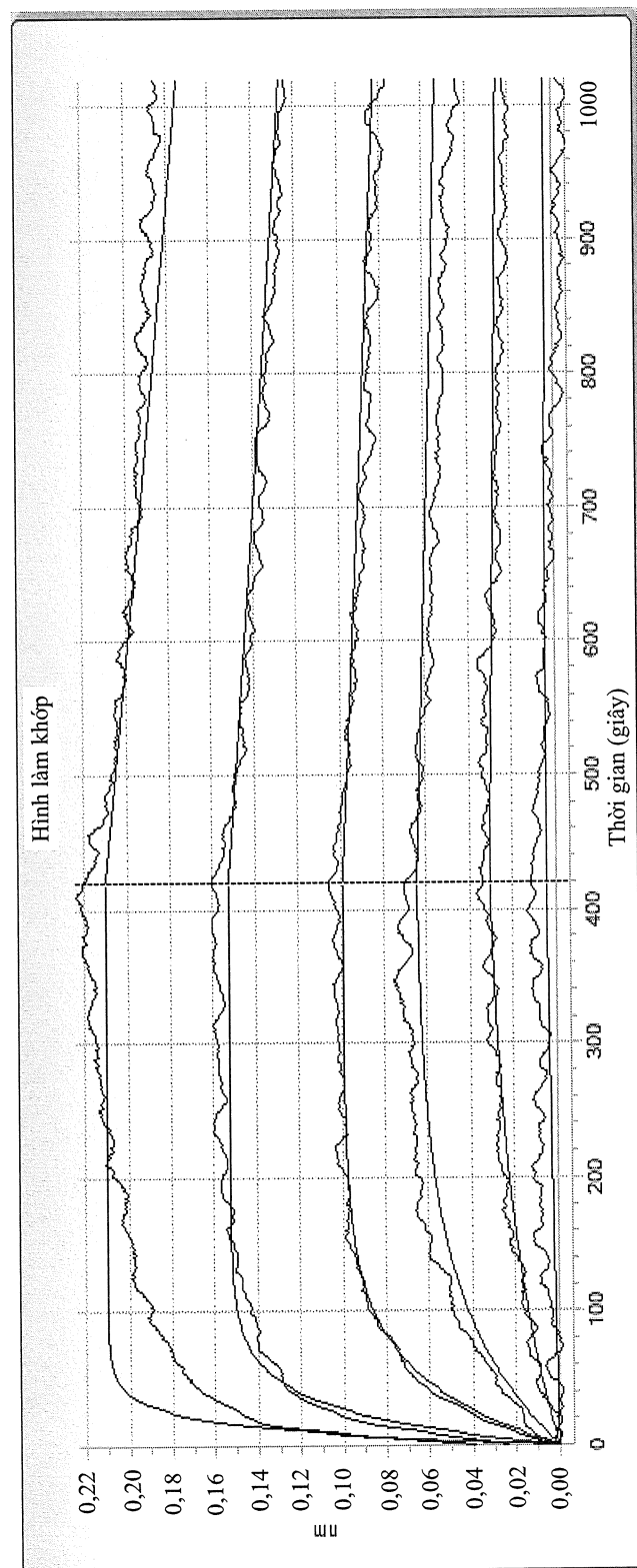


Fig. 10

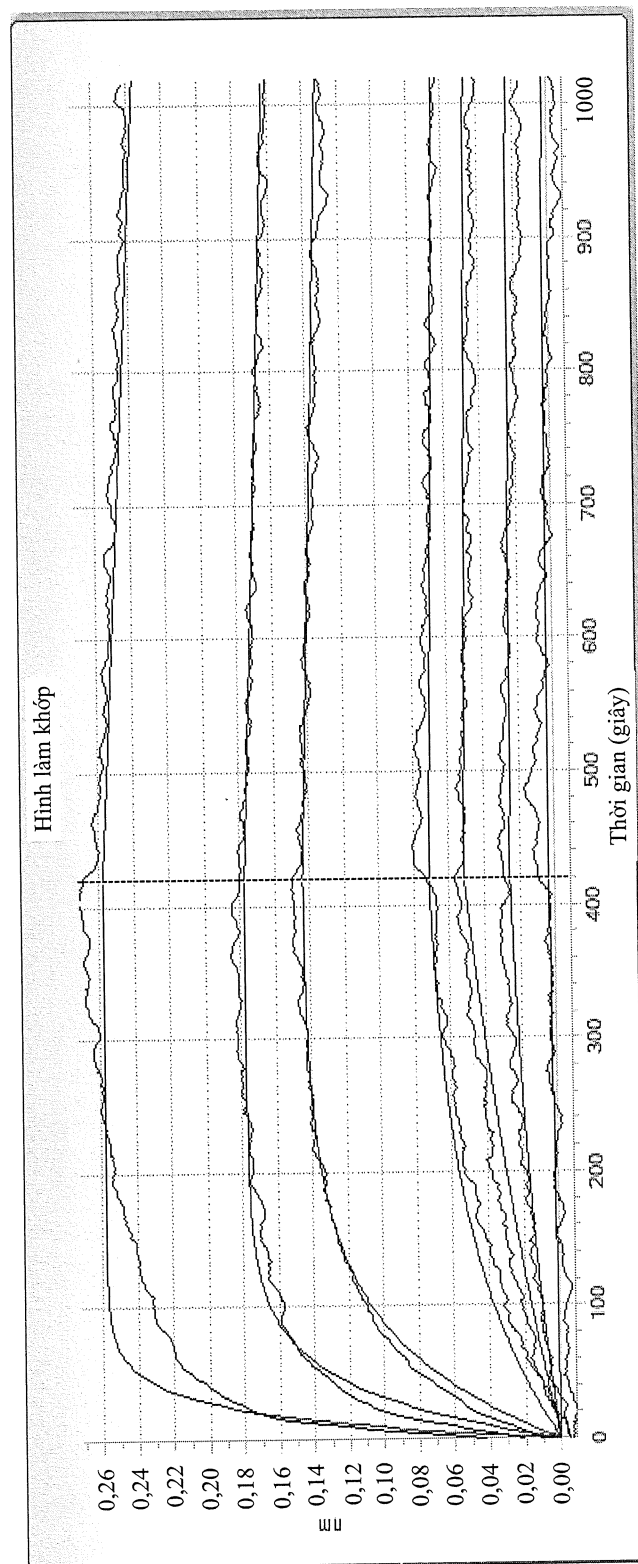


Fig. 11

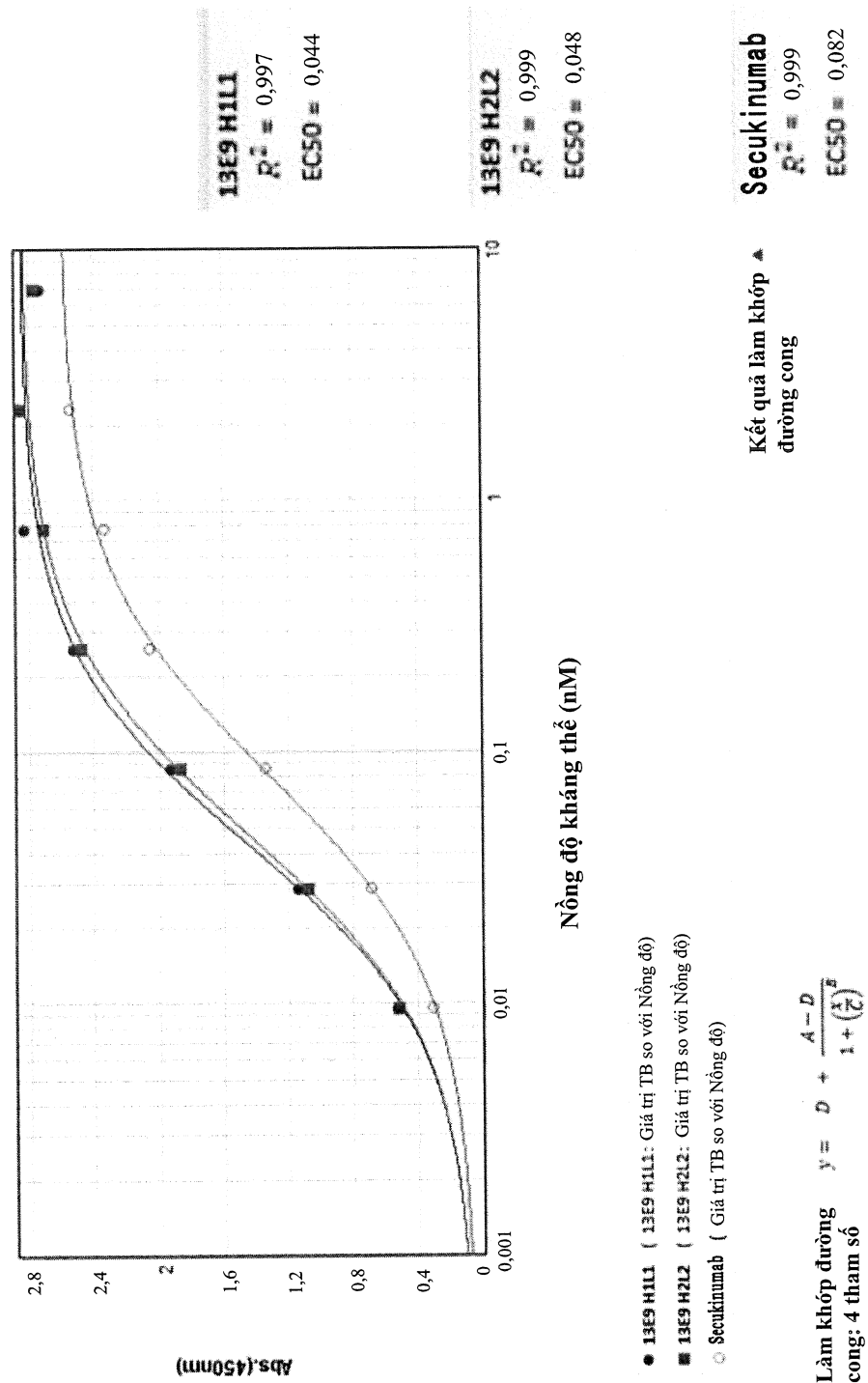


Fig. 12

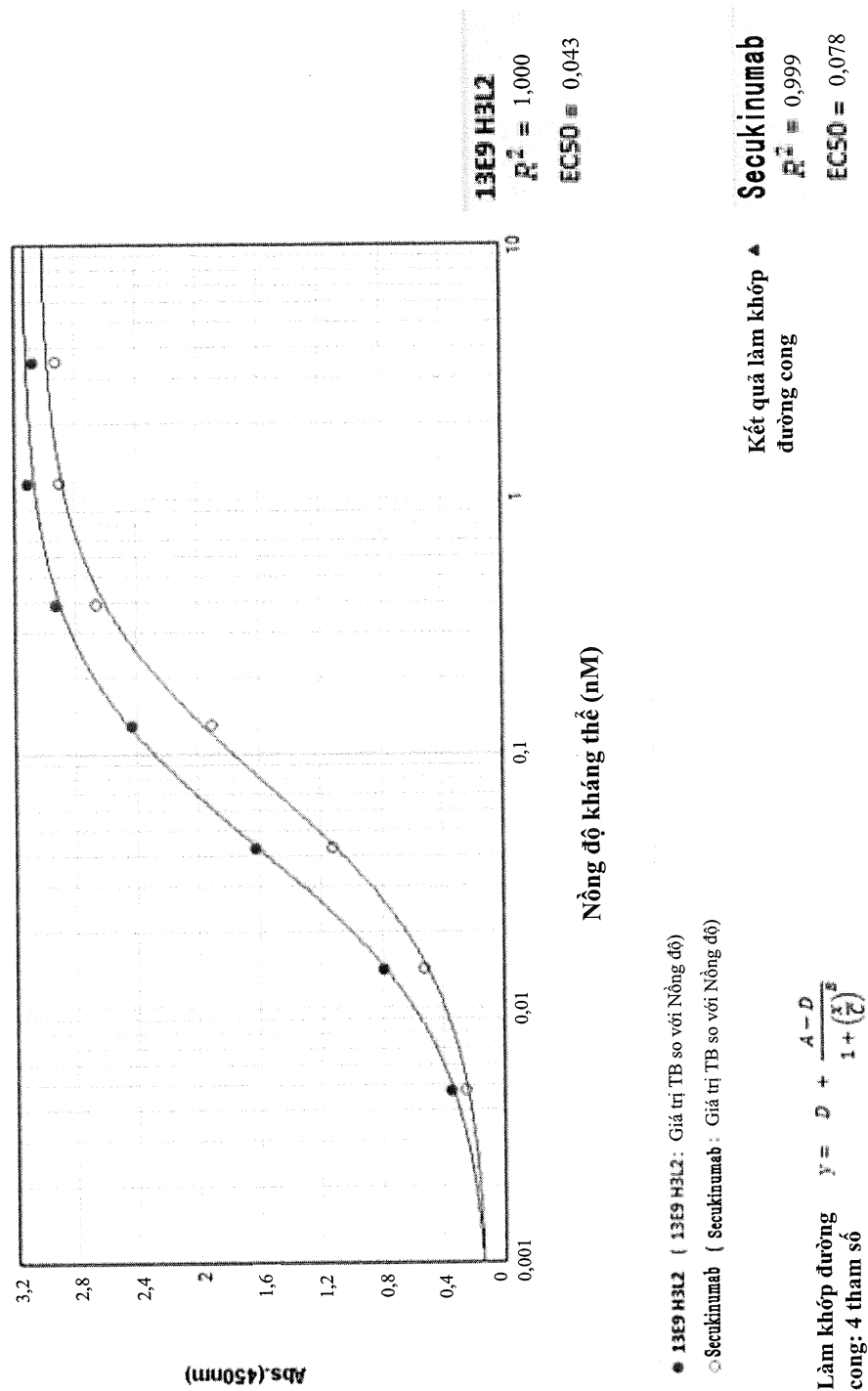


Fig. 13

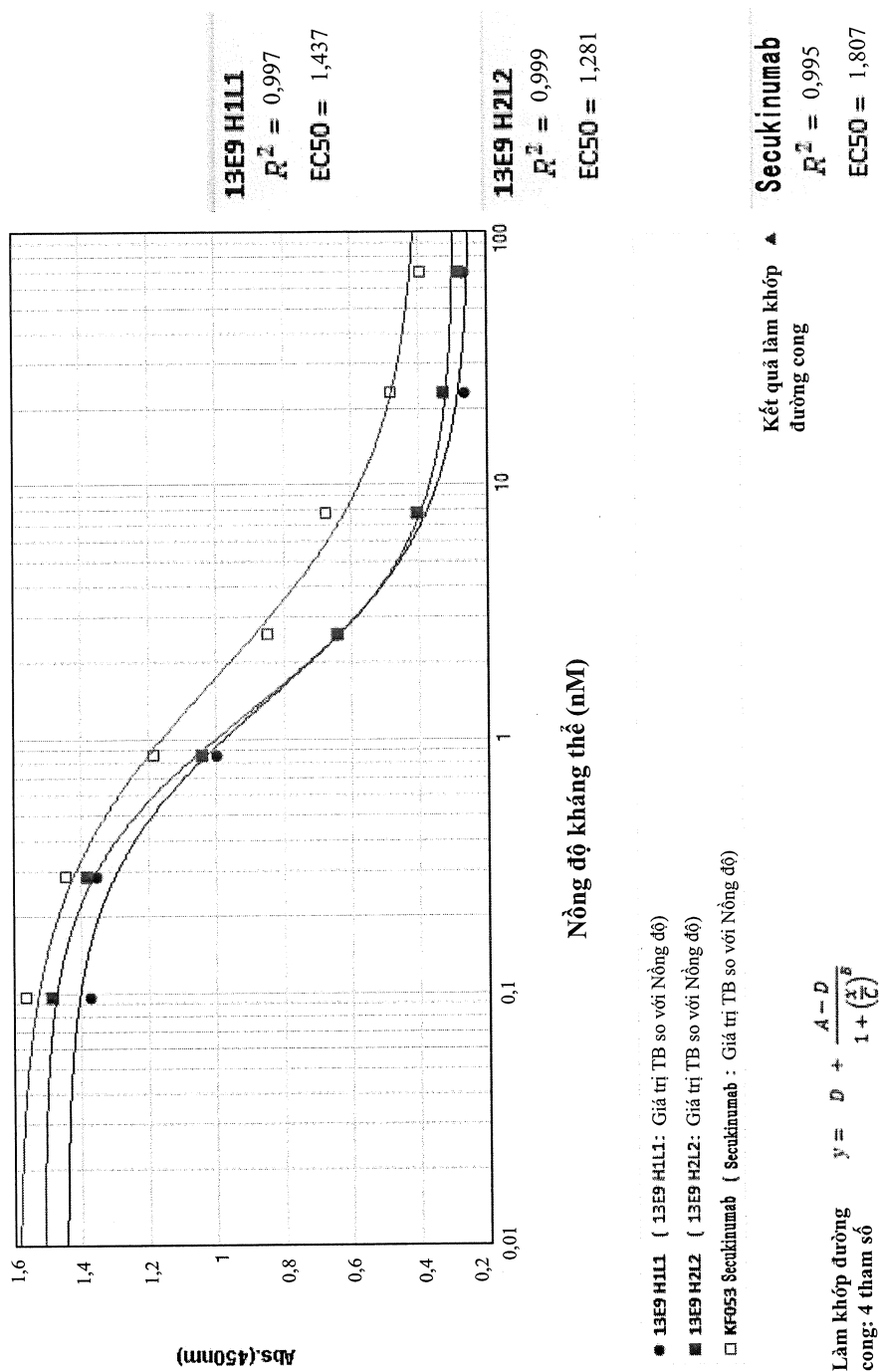


Fig. 14

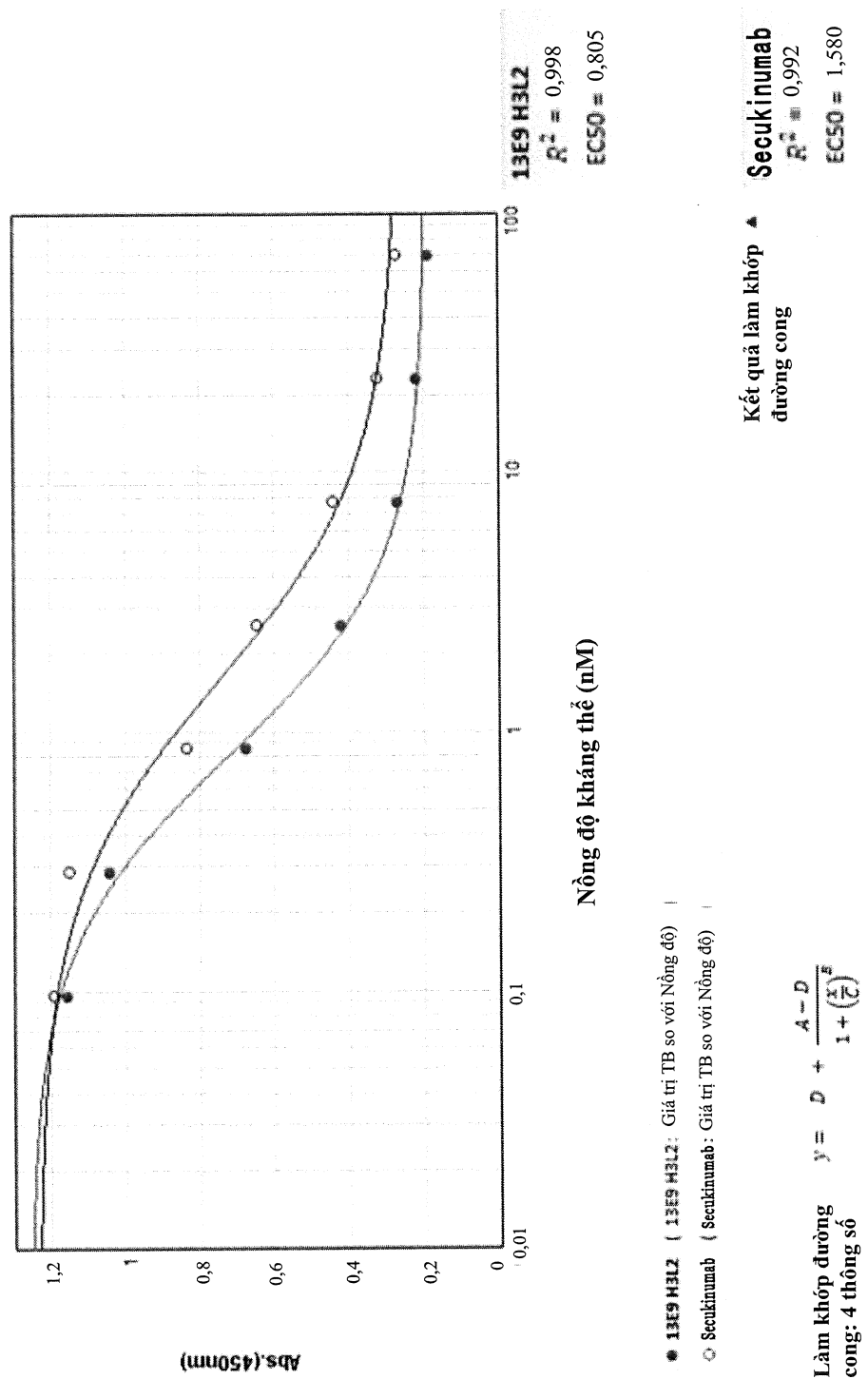
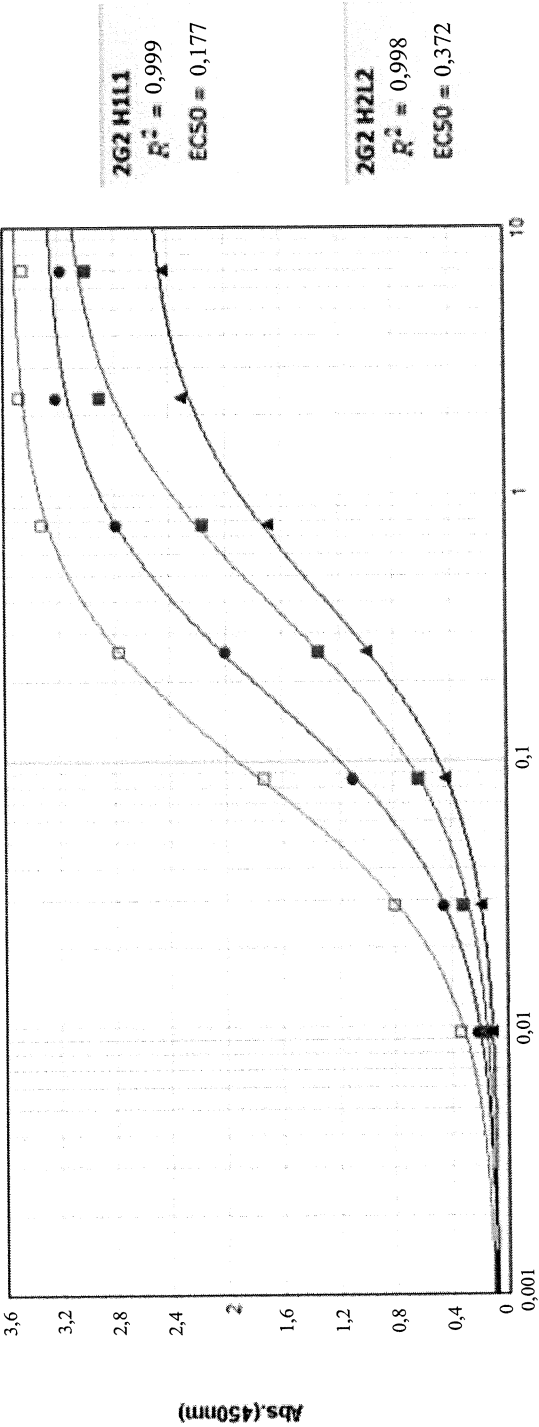


Fig. 15



Nồng độ kháng thể KF053 (nM)

- 2G2 H1L1 (2G2 H1L1 : Giá trị TB so với Nồng độ)
- 2G2 H2L2 (2G2 H2L2 : Giá trị TB so với Nồng độ)
- ▲ 2G2 H3L3 (2G2 H3L3 : Giá trị TB so với Nồng độ)
- Secukinumab (Secukinumab : Giá trị TB so với Nồng độ)

Kết quả làm khớp đường cong ▲

Làm khớp đường cong: 4 tham số

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^n}$$

Fig. 16

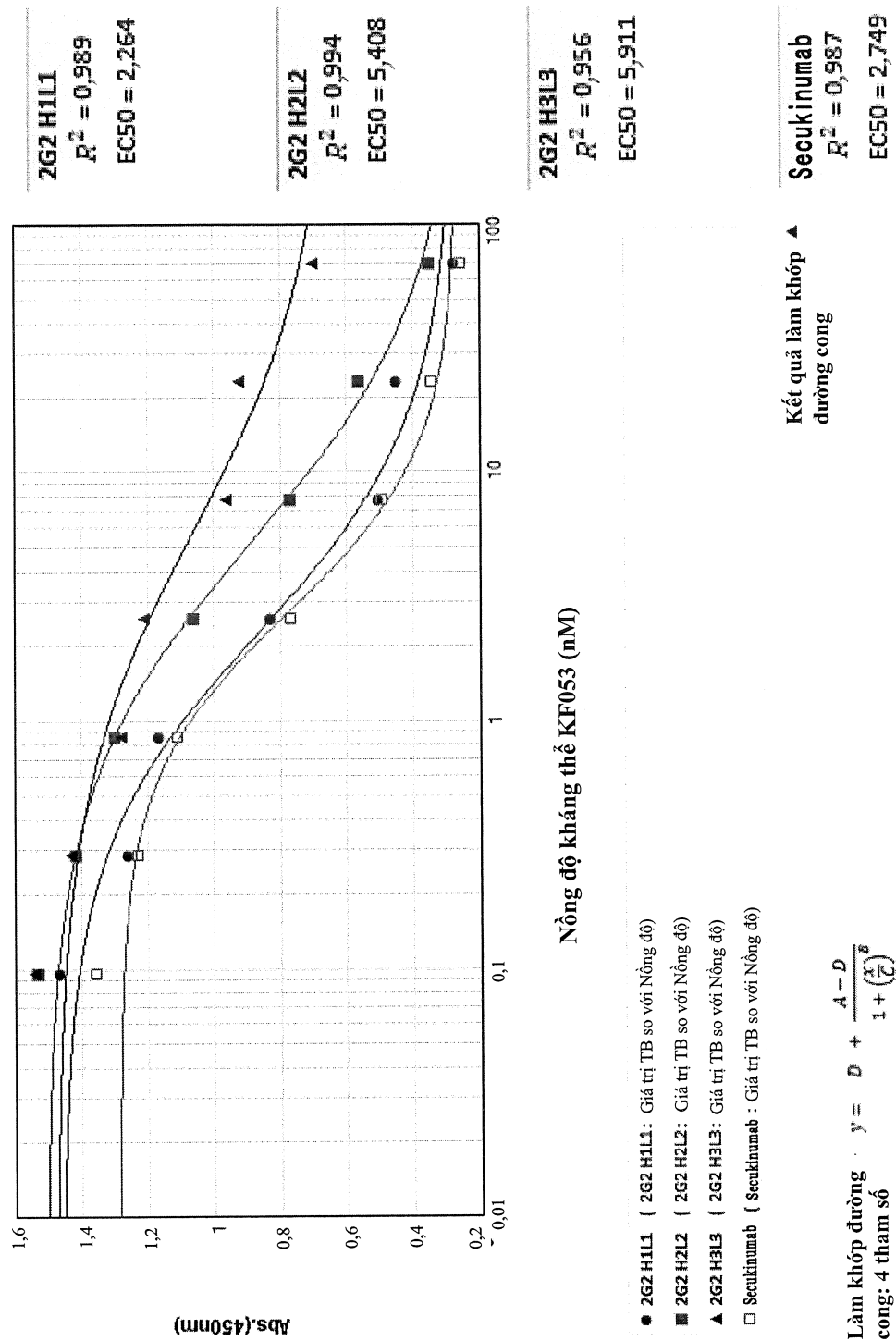


Fig. 17

Tiết IL-6 ở tế bào MRC-5

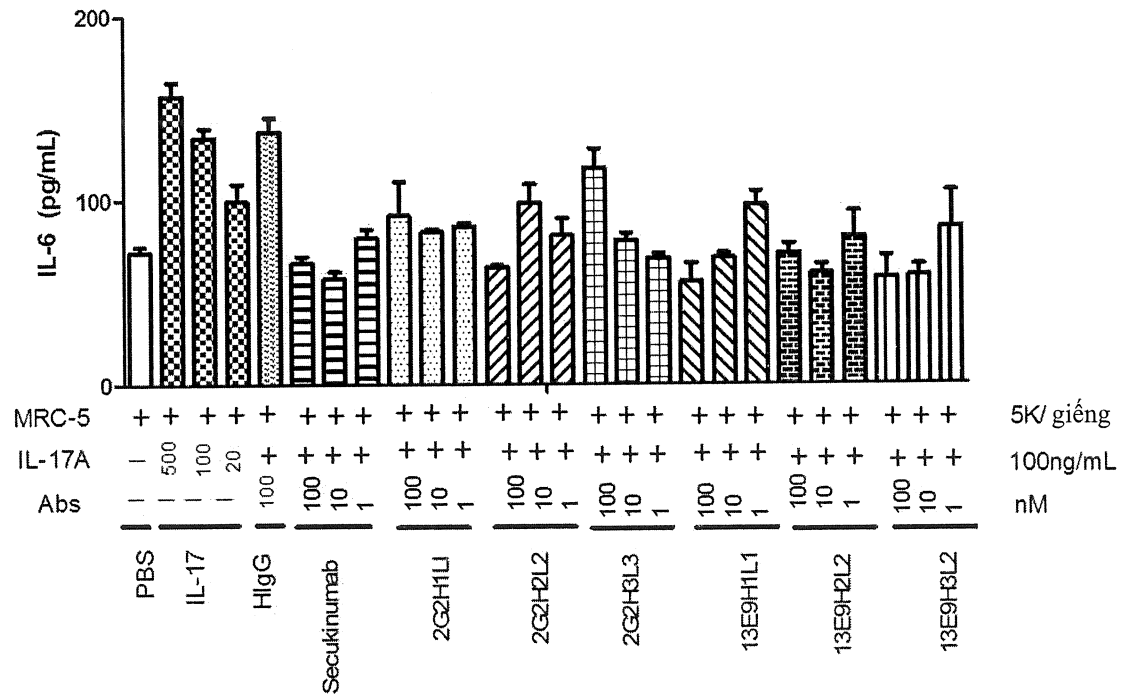


Fig. 18

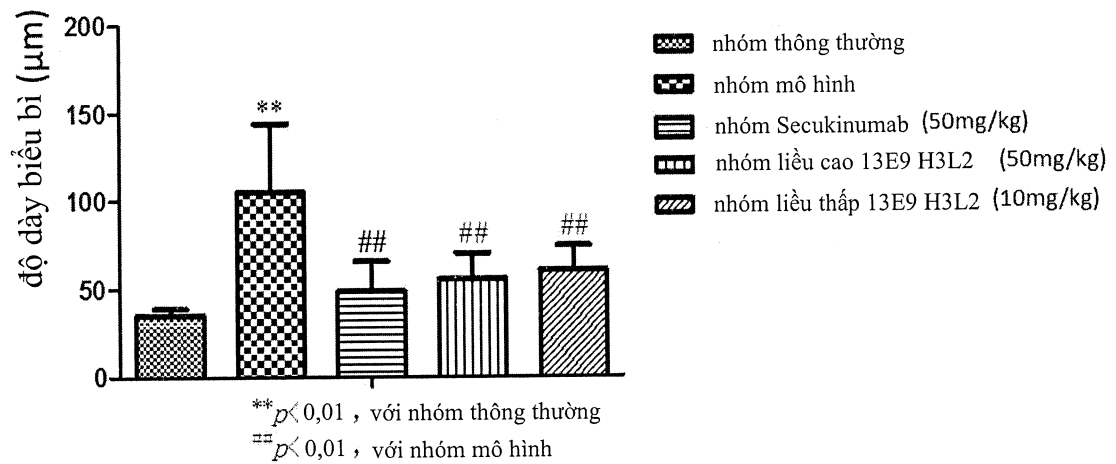


Fig. 19