



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

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

(11)



1-0029950

(51)⁷ C07K 16/24

(13) B

(21) 1-2017-00813

(22) 22/09/2015

(86) PCT/US2015/051407 22/09/2015

(87) WO/2016/049000 31/03/2016

(30) 62/054,167 23/09/2014 US

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/07/2017 352A

(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591-6707, United States of America

(72) Jamie M. ORENGO (US); Jeanne ALLINNE (FR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG IL-25 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể mà liên kết với interleukin 25 (IL-25) người và phương pháp sử dụng kháng thể này. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế liên kết với IL-25 người với ái lực cao. Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể liên kết với IL-25 người và cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 qua trung gian tế bào. Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể người nguyên vẹn, không có trong tự nhiên. Kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị các bệnh khác nhau liên quan đến hoạt động và biểu hiện IL-25, bao gồm hen suyễn, dị ứng, tắc nghẽn phổi mãn tính (COPD), bệnh viêm ruột (IBD), bao gồm viêm loét đại tràng và bệnh Crohn, bệnh viêm da cơ địa (AD), bệnh viêm mạch u hạt dưới da (EGPA, hay còn được gọi là hội chứng Churg-Strauss).

Khả năng gắn kết của mAb-2 với IL-25 đã tạo phức trước với mAb-1																		
mAb-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0,00	0,01	0,03	0,04	0,04	0,04	0,01	0,03	0,03	0,00	0,85	0,91	0,60	0,59	0,66	0,64	0,80	0,97
2	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,02	0,00	0,87	0,86	0,59	0,58	0,62	0,59	0,74	0,91
3	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,02	0,00	0,72	0,83	0,56	0,57	0,61	0,56	0,73	0,87
4	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,02	0,00	1,12	1,13	0,89	0,83	0,84	0,82	1,11	1,20
5	0,00	0,13	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	1,08	0,99	0,74	0,73	0,82	0,77	0,97	1,22
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	1,00	0,98	0,72	0,71	0,80	0,73	0,93	1,21
7	0,00	0,04	0,03	0,01	0,03	0,02	0,00	0,05	0,03	0,00	1,02	0,99	0,76	0,73	0,83	0,81	0,98	1,25
8	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,87	0,72	0,71	0,81	0,79	0,83	1,13
9	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86	0,89	0,77	0,68	0,79	0,71	0,82	1,19
10	0,00	0,03	0,02	0,03	0,04	0,02	0,00	0,05	0,03	0,00	0,10	0,77	0,48	0,50	0,56	0,51	0,66	0,85
11	0,53	0,63	0,64	0,57	0,58	0,64	0,47	0,77	0,62	0,11	0,00	0,89	0,54	0,45	0,52	0,61	0,74	0,52
12	0,51	0,63	0,64	0,56	0,67	0,61	0,48	0,67	0,58	0,70	0,78	0,00	0,42	0,48	0,47	0,50	0,58	0,88
13	0,56	0,72	0,76	0,65	0,75	0,75	0,55	0,77	0,66	0,82	1,03	0,88	0,00	0,02	0,11	0,03	0,20	0,30
14	0,63	0,73	0,74	0,71	0,77	0,64	0,60	0,82	0,73	0,82	0,90	0,87	0,03	0,00	0,03	0,06	0,13	0,20
15	0,59	0,70	0,68	0,67	0,73	0,60	0,57	0,77	0,68	0,77	0,79	0,68	0,00	0,00	0,00	0,03	0,05	0,17
16	0,57	0,68	0,66	0,63	0,70	0,56	0,55	0,75	0,65	0,74	0,90	0,73	0,00	0,00	0,03	0,09	0,05	0,16
17	0,62	0,74	0,74	0,79	0,78	0,72	0,66	0,86	0,72	0,79	0,99	0,87	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,13
18	0,55	0,67	0,66	0,63	0,69	0,63	0,50	0,76	0,64	0,68	0,60	0,76	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể, và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với interleukin-25 (IL-25), được phẩm chứa kháng thể đã nêu cũng như phương pháp sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin-25 (IL-25) là xytokin có cấu trúc liên quan đến interleukin 17 (IL-17) và đôi khi còn được gọi là IL-17E. Nó là một glycoprotein có hai cấu phần protein giống nhau, được tiết ra, tương tác và truyền tín hiệu thông qua thụ thể IL-17RB/IL17RA có cấu trúc dimer khác loại (Iwakura, *et.al.*, (2010), *Immunity*, 34:149). IL-25 được sản xuất bởi các tế bào Th2, các tế bào biểu mô, các tế bào nội mô, đại thực bào phế nang, dưỡng bào, các bạch cầu ái toan, và các bạch cầu ái kiềm (Rouvier, E. *et.al.*, (1993), *J. Immunol.* 150:5445-5456; Pan, G. *et.al.*, (2001), *J. Immunol.* 167:6559-6567; Kim, M. *et.al.*, (2002), *Blood* 100:2330-2340). Việc truyền tín hiệu thông qua IL-25 có liên quan tới sự tăng lực của các tế bào bạch cầu ái toan, bắt đầu các đáp ứng của tế bào Th2 và Th9 và sự cản trở đáp ứng của các tế bào Th1 và Th17. IL-25 cũng tạo ra các xytokin khác, bao gồm IL-4, IL-5 và IL-13, trong nhiều mô (Fort, MM *et.al.*, (2001), *Immunity* 15:985-995).

IL-25 dẫn đến viêm mãn tính liên quan tới đường tiêu hóa và đã nhận biết được gen IL-25 trong vùng nhiễm sắc liên quan đến các bệnh tự miễn của ruột, chẳng hạn như bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease-IBD) (Büning, C. *et.al.*, (2003), *Eur. J. Immunogenet. Oct*; 30(5): 329-333). IL-25 cũng cho thấy nồng độ tăng lên trong các mẫu bệnh phẩm thu được từ bệnh nhân bị hen suyễn (Sherkat, R. *et.al.*, (2014), *Asia Pac. Allergy Oct*; 4(4):212-221). Theo đó, việc ức chế sự truyền tín hiệu IL-25 rất hữu ích trong việc điều trị các bệnh khác nhau liên quan đến biểu hiện hoặc hoạt động của IL-25.

Kháng thể kháng IL-25 đã được đề cập đến, ví dụ, trong các bằng sáng chế US 8,785,605; 8,658,169 và 8,206,717; và trong công bố đơn PCT WO2011/123507; WO2010/038155 và WO2008/129263. Tuy nhiên, vẫn cần phải có các chất đối kháng

IL-25 mới trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập, chẳng hạn như kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế, để điều trị các rối loạn hoặc bệnh liên quan đến việc truyền tín hiệu và/hoặc biểu hiện của IL-25, hoặc các trình trạng bệnh khác liên quan đến việc truyền tín hiệu và/hoặc biểu hiện của IL-25.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể đã phân lập và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với interleukin 25 (IL-25) người.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với interleukin 25 (IL-25) người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có những đặc điểm sau đây:

- (a) là kháng thể đơn dòng người nguyên vẹn;
- (b) liên kết với IL-25 người với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 120 pM, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại 25°C;
- (c) liên kết với IL-25 người với chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 105 phút, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại 25°C;
- (d) cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào được thiết kế để truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,0 nM;
- (e) cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào máu ngoại vi đơn nhân (PBMC-peripheral blood mononuclear cells) với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 16 nM;
- (f) giảm tuần hoàn và/hoặc nồng độ IgE ở phổi động vật có vú biểu hiện quá mức IL-25;
- (g) giảm dị sản tế bào trong các tế bào hình đài ở động vật có vú biểu hiện quá mức IL-25;
- (h) gồm ba vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng (HCDR) nằm trong vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) chứa trình tự axit amin được liệt kê trong bảng 1; hoặc
- (i) gồm ba vùng xác định bổ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) nằm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) chứa trình tự axit amin như được liệt kê trong bảng 1.

Kháng thể đã phân lập và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế

rất hữu ích, chẳng hạn, trong việc điều trị các bệnh và rối loạn liên quan đến biểu hiện và hoạt động của interleukin 25 (IL-25).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người với giá trị KD nhỏ hơn khoảng 100 pM, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người với giá trị KD nhỏ hơn khoảng 60 pM, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người với giá trị KD nhỏ hơn khoảng 40 pM, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người với giá trị KD nhỏ hơn khoảng 20 pM, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người với chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 150 phút, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người với chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 200 phút, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người với chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 250 phút, được như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại

nhiệt độ 25°C.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người với chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 400 phút, được như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người và cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 720 pM.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người và cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 500 pM.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người và cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 100 pM.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người và cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào máu ngoại vi đơn nhân có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,0 nM.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người và cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào máu ngoại vi đơn nhân có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 700 pM.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 người và cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào máu ngoại vi đơn nhân có giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 30 pM đến 150 pM.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể nguyên vẹn (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ chứa phần liên kết kháng nguyên (ví dụ, Fab, F(ab')₂ hoặc mảnh scFv), và có thể được biến đổi để thay đổi chức năng (ví dụ, để loại bỏ các chức năng phản ứng lại kích thích không cần thiết) (Reddy và et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Các ví dụ về kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế được trình bày trong bảng 1 và 2 ở đây. Bảng 1 trình bày các mã trình tự nhận biết axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), vùng xác định hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3), vùng xác định hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của kháng thể kháng IL-25 được lấy làm ví dụ. Bảng 2 trình bày các mã trình tự nhận biết axit nucleic của HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của kháng thể kháng IL-25 được lấy làm ví dụ.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) chứa các trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1, hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) chứa các trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1, hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm cặp trình tự axit amin HCRV và LCRV (HCVR/LCVR) chứa trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1 bắt cặp với trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nằm trong kháng thể kháng IL-25 lấy làm ví dụ bất kỳ được liệt kê trong bảng 1.

Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc

hiệu với interleukin-25 (IL-25) người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa: (a) vùng xác định bổ trợ (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) chứa trình tự axit amin như được liệt kê trong bảng 1; và (b) vùng xác định bổ trợ (CDR) thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) chứa trình tự axit amin như được liệt kê trong bảng 1.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, chứa: (a) các CDR của HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 và 258; và (b) các CDR của LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 và 266.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 chứa: (a) các CDR của HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 98, 114, 130 và 178; và (b) các CDR của LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 106, 122, 138 và 186.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 chứa trình tự axit amin HCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 và 258.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 chứa trình tự axit amin LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 và 266.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 chứa trình tự axit amin HCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 và 258; và trình tự axit amin LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 và 266.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 chứa: các CDR của cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 và 258/266.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 chứa: các CDR của cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 98/106; 114/122; 130/138; và 178/186.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 chứa: các CDR của cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 và 258/266.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 chứa: các CDR của cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 98/106; 114/122; 130/138; và 178/186.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCVR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCVR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) chứa trình tự axit amin

được chọn từ trình tự axit amin HCVR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCVR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCVR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCVR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm cặp trình tự axit amin HCDR3 và LCDR3 (HCDR3/LCDR3) chứa trình tự axit amin HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1 bất cặp với trình tự axit amin LCDR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có cấu tạo gồm cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 nằm trong kháng thể kháng IL-25 lấy làm ví dụ bất kỳ được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm: 104/112; 120/128; 136/144; và 184/192.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm tập hợp sáu CDR (tức là, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) nằm trong kháng thể kháng IL-25 lấy làm ví dụ bất kỳ được

liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, tập hợp trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm: (a) các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110, 112; (b) các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126, 128; (c) các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 132, 134, 136, 140, 142, 144; và (d) SEQ ID NO: 180, 182, 184, 188, 190, 192.

Theo một phương án liên quan, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm tập hợp sáu CDR (tức là HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) nằm trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như đã xác định bởi kháng thể kháng IL-25 lấy làm ví dụ bất kỳ được liệt kê trong bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm tập hợp các trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 nằm trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm: 98/106; 114/122; 130/138; và 178/186. Các phương pháp và kỹ thuật để nhận biết các CDR trong các trình tự axit amin HCVR và LCVR là những kiến thức đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập và có thể được sử dụng để nhận biết các CDR trong các trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR cụ thể được đề cập trong sáng chế này. Các kỹ thuật thường được sử dụng để xác định hai đầu của CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, và định nghĩa AbM. Nhìn chung, định nghĩa Kabat dựa trên mức độ biến đổi của trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của các vùng lặp cấu trúc, và định nghĩa AbM là sự kết hợp giữa định nghĩa Kabat và Chothia. Xem, ví dụ, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Các cơ sở dữ liệu đã công bố cũng được sử dụng để nhận biết các trình tự CDR trong kháng thể.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm:

- (a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246 và 262;
- (b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình

tự nêu trong SEQ ID No: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248 và 264;

(c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248 và 264;

(d) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252 và 268;

(e) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254 và 270; và

(f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256 và 272.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm:

(a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 100, 116, 132, và 180;

(b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 102, 118, 134, và 182;

(c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 104, 120, 136, và 184;

(d) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 108, 124, 140, và 188;

(e) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 110, 126, 142, và 190; và

(f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 112, 128, 144, và 192.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có cấu tạo gồm một tập hợp sáu CDR được chọn từ nhóm bao gồm (a) các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110, 112; (b) các trình tự nêu

trong SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126, 128; (c) các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 132, 134, 136, 140, 142, 144; và (d) SEQ ID NO: 180, 182, 184, 188, 190, 192.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với interleukin-25 (IL-25) người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để liên kết với IL-25 người bao gồm cặp trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ (HCVR/LCVR) như trình bày trong bảng 1. Kháng thể tham chiếu chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 và 258/266.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với interleukin-25 (IL-25) người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên IL-25 người với kháng thể tham chiếu, bao gồm cặp trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ (HCVR/LCVR) như đã trình bày trong bảng 1. Kháng thể tham chiếu chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 và 258/266.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho kháng thể kháng IL-25 và mảnh của nó. Ví dụ, sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho các trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có cấu tạo gồm trình tự polynucleic được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleic được chọn từ trình tự axit nucleic LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình

tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleic được chọn từ trình tự axit nucleic HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCDR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleic được chọn từ trình tự axit nucleic HCDR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleic được chọn từ trình tự axit nucleic HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCDR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleic được chọn từ trình tự axit nucleic LCDR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCDR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleic được chọn từ trình tự axit nucleic LCDR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCDR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleic được chọn từ trình tự axit nucleic LCDR3 bất kỳ được

liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho HCVR, trong đó HCVR chứa tập hợp gồm ba CDR (tức là, HCDR1, HCDR2, HCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3 như được xác định bởi kháng thể kháng IL-25 bất kỳ trong số các ví dụ về kháng thể được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho LCVR, trong đó LCVR chứa tập hợp gồm ba CDR (tức là, LCDR1, LCDR2, LCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin LCDR1, LCDR2, LCDR3 như được xác định bởi kháng thể kháng IL-25 bất kỳ trong số các ví dụ về kháng thể được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho cả HCVR và LCVR, trong đó HCVR chứa trình tự axit amin của trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1, trong đó LCVR chứa trình tự axit amin của trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1. Theo một phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa chuỗi polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu, và trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó mà có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự đã nêu. Theo một khía cạnh nhất định của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hóa cho LCVR và HCVR, trong đó cả HCVR và LCVR đều có nguồn gốc từ cùng một kháng thể kháng IL-25 được liệt kê trong bảng 1.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất các vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện chuỗi polypeptit, có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng IL-25. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic bất kỳ đã nêu ở trên, tức là, các phân tử axit nucleic mã hóa cho các trình tự HCVR, LCVR, và/hoặc CDR như đã trình bày trong bảng 1. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các tế bào chủ là các tế bào mà các vector đã nêu được đưa vào, cũng như phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh của nó bằng cách

nuôi cấy các tế bào chủ trong các điều kiện cho phép sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể, và thu lấy kháng thể và mảnh kháng thể đã tổng hợp được.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng IL-25 có mô hình glycosyl hóa bị biến đổi. Theo một vài phương án, việc biến đổi để loại bỏ các vị trí glycosyl hóa không mong muốn sẽ rất hữu ích, hoặc kháng thể thiếu gốc fucose trong chuỗi oligosaccarit, ví dụ, làm tăng hiệu quả gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC) (xem Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Theo ứng dụng khác, việc biến đổi quá trình galactosyl hóa có thể được thực hiện để làm thay đổi hiệu quả gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity (CDC)).

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất được phẩm chứa ít nhất một kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với IL-25 và chất mang được dụng.

Theo khía cạnh liên quan, sáng chế mô tả chế phẩm, là sự kết hợp giữa kháng thể kháng IL-25 và tác nhân trị liệu thứ hai. Theo một phương án, tác nhân trị liệu thứ hai là một tác nhân được kết hợp một cách thuận lợi với kháng thể kháng IL-25. Tác nhân trị liệu thứ hai sẽ rất hữu ích trong việc làm giảm nhẹ các bệnh hoặc rối loạn dễ bị viêm, hoặc ít nhất là làm giảm triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn dễ bị viêm.

Theo một phương án nhất định, tác nhân trị liệu thứ hai có thể chọn từ nhóm bao gồm chất chống viêm không chứa steroid (NSAID), steroid, corticosteroid (dạng hít hoặc tại chỗ), chất ức chế miễn dịch (ví dụ, cyclophosphamid), chất chống tiết cholin, (ví dụ, tiotropium), chất kích thích hệ muscarin (ví dụ, glycopyrronium), chất ức chế enzym phosphodiesteraza, (ví dụ, theophyllin, roflumilast, cilomilast), chất chẹn beta, cyclosporin, tacrolimus, pimecrolimus, azathioprin, methotrexat, natri cromolyn, chất ức chế enzym proteinaza, chất dẫn phế quản, chất chủ vận beta-2, chất kháng histamin, epinephrin, chất chống sung huyết, chất ức chế leukotrien, chất ức chế dưỡng bào, chất đối kháng lymphopoietin cơ chất tuyến ức (TSLP), chất đối kháng TNF, chất đối kháng IgE, chất đối kháng IL-1, chất đối kháng IL-4 hoặc IL-4R, chất đối kháng IL-13 hoặc IL-13R, chất đối kháng IL-4/IL-13 cùng lúc, chất đối kháng IL-5, chất đối kháng IL-6 hoặc IL-6R, chất đối kháng của IL-8, chất đối kháng IL-9, chất đối kháng IL-12/23, chất đối kháng IL-22, chất đối kháng IL-17, chất đối kháng IL-31, chất đối kháng IL-33, và

chất đối kháng protein Lymphopoietin cơ chất tuyến ức (TSLP, chất ức chế PDE4 đường miệng và kháng thể khác với IL-25.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến biểu hiện hoặc hoạt động của IL-25, hoặc ít nhất một triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc rối loạn, sử dụng kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Các phương pháp trị liệu theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc cung cấp lượng hiệu quả điều trị của dược phẩm có chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị. Rối loạn được điều trị là bất cứ bệnh hoặc tình trạng bệnh được cải thiện, thuyên giảm, ức chế hoặc ngăn chặn bằng cách hướng đích IL-25 và/hoặc ức chế việc truyền tín hiệu tế bào qua trung gian IL-25.

Theo các phương án nhất định, các bệnh hoặc rối loạn cần được điều trị với kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có thể được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hen suyễn, dị ứng, viêm mũi dị ứng, viêm đường hô hấp dị ứng, các bệnh tự miễn, bệnh tắc nghẽn phổi mãn tính (COPD), bệnh viêm phổi tăng eosin, viêm thực quản tăng eosin, hội chứng tăng eosin, bệnh ghép chống chủ do truyền máu (graft-versus-host disease), bệnh viêm da cơ địa (atopic dermatitis (AD)), chứng mày đay bao gồm nổi mày đay tự phát mãn tính, bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease (IBD)), viêm khớp, viêm tá tràng, bệnh tim mạch, cơn đau, xơ cứng, lupus, viêm mạch và bệnh viêm mạch u hạt dưới da (EGPA, hay còn được gọi là hội chứng Churg-Strauss).

Theo một phương án, bệnh hen suyễn được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được chọn từ nhóm bao gồm hen suyễn dị ứng, hen suyễn không dị ứng, hen suyễn nặng, hen phế quản, hen suyễn gây ra bởi virus, hoặc hen phế quản gây ra bởi virus, hen suyễn kháng steroid, hen suyễn nhạy cảm với steroid, hen suyễn tăng eosin hoặc hen suyễn không tăng eosin, hoặc các rối loạn liên quan khác có đặc điểm là viêm đường hô hấp hoặc do phản ứng quá mức của đường hô hấp (airway hyperresponsiveness (AHR)).

Theo một phương án, bệnh tắc nghẽn phổi mãn tính (COPD) được điều trị bằng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có liên quan một phần tới, hoặc có

nguyên nhân gây bệnh là do khói thuốc lá, ô nhiễm không khí, hóa trị liệu, dị ứng hoặc tăng phản ứng đường hô hấp.

Theo một phương án khác, bệnh viêm da cơ địa được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có liên quan một phần tới, hoặc có nguyên nhân gây ra bệnh là do mất chức năng bảo vệ của biểu bì, dị ứng hoặc phơi nhiễm với phóng xạ.

Dị ứng được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có nguyên nhân gây ra bệnh là do thực phẩm, phấn hoa, nấm mốc, mạt bụi, động vật hoặc lông động vật.

Theo một phương án, bệnh viêm ruột (IBD) được điều trị bằng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, viêm đại tràng collagen, viêm đại tràng tăng lympho bào, viêm đại tràng thiếu máu, viêm đại tràng dị ứng, hội chứng Behcet, viêm đại tràng lây nhiễm, viêm đại tràng không xác định được đặc trưng bởi sự viêm nhiễm của lớp niêm mạc trong ruột già hoặc đại tràng.

Theo một phương án, chứng viêm khớp được điều trị bởi kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm khớp xương mãn tính (OA), viêm khớp dạng thấp và viêm khớp vảy nến.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng hơn từ những mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig 1: Sự cạnh tranh chéo giữa các kháng thể kháng IL-25 để liên kết với IL-25 người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả chi tiết, cần phải hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương pháp cụ thể và các điều kiện thí nghiệm đã mô tả, do các phương pháp

và điều kiện đã nêu có thể bị thay đổi. Cũng cần phải hiểu rằng, các thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, chứ không có ý định làm giới hạn sáng chế, do phạm vi của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có nghĩa giống với nghĩa hiểu thông thường bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng”, khi được sử dụng để tham chiếu đến một giá trị dạng số được trích dẫn cụ thể, có nghĩa là các giá trị thực có thể sai khác so với giá trị trích dẫn không quá 1%. Ví dụ, khi được sử dụng ở đây, khi diễn đạt “khoảng 100” tức là sẽ bao gồm giá trị 99 và 100 và tất cả các giá trị ở giữa chúng (ví dụ, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4, v.v.).

Các phương pháp hoặc vật liệu giống hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng thực tiễn hoặc thử nghiệm trong sáng chế, nhưng các phương pháp và vật liệu mô tả ở đây sẽ được ưu tiên hơn. Tất cả các bằng sáng chế, các đơn sáng chế, và các công bố phi sáng chế được đề cập đến trong bản mô tả đều được kết hợp vào đây bằng cách tham chiếu đến toàn bộ.

Định nghĩa

Khi viết “interleukin-25”, “IL-25” và các ký hiệu tương tự, như là “IL-17E”, sẽ được hiểu là đề cập đến xytokin người (trừ khi được chỉ ra cụ thể từ những loài khác) có chứa trình tự axit amin như nêu trong các gốc axit amin từ 33 đến 177 của số đăng ký NP_073626.1. IL-25 người có đuôi myc-myc-hexahistidin được trình bày trong SEQ ID NO: 273 (với các gốc axit amin 1-145 là IL-25 người không chứa trình tự tín hiệu và các gốc axit amin 146-173 là đuôi myc-myc-hexahistidin). Các protein IL-25 khác được mô tả ở đây, bao gồm IL-25 khỉ (các axit amin 33-176 của số đăng ký XP_001107906.2) có đuôi myc-myc-hexahistidin, là protein được nêu trong SEQ ID NO: 274 (với gốc axit amin 1-144 là IL-25 *M. fascicularis* và các gốc axit amin 145-172 đuôi myc-myc-hexahistidin); IL-25 chuột (axit amin 17-169 của số đăng ký NP_542767.1) có chứa đuôi myc-myc-hexahistidin, được nêu trong SEQ ID NO: 275 (với gốc axit amin 1-153 là IL-25 chuột và các gốc axit amin 154-181 đuôi myc-myc-hexahistidin); IL-25 thỏ (axit amin 17-169 của số đăng ký NP_001178936.1) có chứa đuôi myc-myc-

hexahistidin, được nêu trong SEQ ID NO: 276 (với gốc axit amin 1-153 là IL-25 thỏ và các gốc axit amin 154-181 đuôi myc-myc-hexahistidin).

Tất cả các protein, polypeptit và các đoạn protein được nhắc tới ở đây đều dự định đề cập lần lượt đến protein, polypeptit và các đoạn protein của người, trừ khi được chỉ ra rõ ràng là từ các loài không phải người. Do đó, khi viết “IL-25” thì hiểu là đang đề cập đến IL-25 người trừ khi chỉ ra rõ ràng là từ các loài không phải người, ví dụ, “IL-25 khỉ”, “IL-25 chuột”, “IL-25 thỏ”.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể kháng IL-25” bao gồm cả kháng thể đơn trị có tính đặc hiệu đơn, cũng như kháng thể đặc hiệu kép có nhánh thứ nhất liên kết với IL-25 và nhánh thứ hai liên kết với kháng nguyên thứ hai (kháng nguyên đích), trong đó nhánh kháng IL-25 chứa trình tự HCVR/LCVR hoặc CDR bất kỳ đã trình bày trong bảng 1. Khi viết “kháng thể kháng IL-25” sẽ được hiểu là đề cập đến các liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) chứa kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên hợp với thuốc hoặc độc tố (tức là, tác nhân gây độc tế bào). Khi viết “kháng thể kháng IL-25” cũng sẽ được hiểu là đề cập đến các liên hợp kháng thể-nuclit phóng xạ (ARC) có chứa kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên hợp với nuclit phóng xạ.

Thuật ngữ “kháng thể kháng IL-25”, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên hoặc phức hợp phân tử bất kỳ chứa ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) liên kết hoặc tương tác đặc hiệu với IL-25 hoặc một phần của IL-25. Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm các phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) liên kết với nhau qua cầu nối disulfit cũng như các đa phân của chúng (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là HCVR hoặc V_H) và vùng hằng định chuỗi nặng. Mỗi vùng hằng định chuỗi nặng có chứa ba đoạn, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc V_L) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ gồm một đoạn (C_{L1}). Các vùng V_H và V_L còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, vùng xác định bổ trợ (CDR), nằm xen kẽ với các vùng bảo thủ hơn, được gọi các vùng sườn (FR). Mỗi V_H và V_L đều gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu cacboxy theo thứ tự như sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác nhau, các vùng sườn FR của kháng thể kháng IL-25

(hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) có thể tương đồng với trình tự dòng mầm ở người, hoặc được biến đổi một cách tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự liên ứng axit amin có thể được nhận biết dựa trên các phân tích từ phần này tới phần khác của hai hoặc nhiều CDR.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng ở đây, cũng bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên của phân tử kháng thể nguyên vẹn. Thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể, và các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng ở đây, bao gồm chuỗi polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ thu được bằng enzym, được tổng hợp hoặc được thiết kế di truyền, liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể có nguồn gốc từ, ví dụ, từ các phân tử kháng thể nguyên vẹn bằng cách sử dụng các kỹ thuật phù hợp như thủy phân protein hoặc kỹ thuật di truyền tái tổ hợp bao gồm xử lý và biểu hiện ADN mã hóa cho các vùng biến đổi và các vùng hằng định tùy chọn của kháng thể. ADN như vậy là ADN đã biết và/hoặc có sẵn từ, ví dụ, trên thị trường, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ thư viện kháng thể-thực khuẩn thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được giải trình tự và xử lý bằng các kỹ thuật hóa học hoặc sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng hằng định và/hoặc biến đổi thành một cấu hình phù hợp, hoặc đưa vào trong các codon, tạo gốc xystein, thay thế, thêm hoặc bớt axit amin, v.v..

Các ví dụ không giới hạn về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) các mảnh Fab, (ii) các mảnh F(ab')₂; (iii) các mảnh Fd; (iv) các mảnh Fv; (v) các phân tử Fv chuỗi đơn (scFv); (vi) các mảnh dAb; và (vii) các đơn vị nhận biết nhỏ nhất chứa các gốc axit amin giống hệt vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng xác định bổ trợ (CDR) đã phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit ràng buộc FR3-CDR3-FR4. Các phân tử di truyền khác, chẳng hạn như các kháng thể đặc hiệu miễn, các kháng thể đơn miễn, kháng thể mất miễn, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể đôi, kháng thể ba, kháng thể bốn, kháng thể có kích thước nhỏ, kháng thể có kích thước nano (nanobody) (ví dụ, kháng thể nano hóa trị một, kháng thể nano hóa trị hai, v.v.), dược phẩm miễn dịch phân tử nhỏ (small modular immunopharmaceuticals - SMIPs), và các vùng biến đổi của IgNAR từ cá mập, cũng nằm trong phạm vi của thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên”, như được sử dụng ở đây.

Mảnh liên kết kháng nguyên của một kháng thể thường chứa ít nhất một vùng biến đổi. Vùng biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và nhìn chung, thường chứa ít nhất một vùng CDR nằm liền kề hoặc nằm trong khung với một hoặc nhiều trình tự sườn. Mảnh liên kết kháng nguyên có vùng biến đổi chuỗi nặng V_H liên kết với vùng biến đổi chuỗi nhẹ V_L , các vùng V_H và V_L nằm tại các vị trí tương đối so với một vùng khác theo bất kỳ sự sắp xếp thích hợp. Ví dụ, vùng biến đổi có thể ở dạng nhị phân và có chứa các dime V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa vùng V_H hoặc V_L ở dạng monome.

Theo các phương án nhất định, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một vùng biến đổi liên kết cộng hóa trị với ít nhất một vùng hằng định. Các cấu hình mẫu minh họa của các vùng biến đổi và hằng định tìm thấy trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) V_H - CH_1 ; (ii) V_H - CH_2 ; (iii) V_H - CH_3 ; (iv) V_H - CH_1 - CH_2 ; (v) V_H - CH_1 - CH_2 - CH_3 ; (vi) V_H - CH_2 - CH_3 ; (vii) V_H - CL ; (viii) V_L - CH_1 ; (ix) V_L - CH_2 ; (x) V_L - CH_3 ; (xi) V_L - CH_1 - CH_2 ; (xii) V_L - CH_1 - CH_2 - CH_3 ; (xiii) V_L - CH_2 - CH_3 ; và (xiv) V_L - CL . Theo cấu hình bất kỳ của vùng biến đổi và vùng hằng định, bao gồm cấu hình mẫu bất kỳ được liệt kê ở trên, các vùng biến đổi và hằng định hoặc liên kết trực tiếp với một vùng khác hoặc được liên kết bằng toàn bộ hoặc một phần của vùng bản lề hoặc vùng liên kết. Vùng bản lề có thể chứa ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin tạo thành liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa các vùng biến đổi và/hoặc các vùng hằng định liền kề trong phân tử polypeptit đơn. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế còn chứa phân tử dime cùng loại hoặc dime khác hoặc (hoặc multimer khác) của cấu hình vùng hằng định và biến đổi bất kỳ được liệt kê ở trên liên kết không cộng hóa trị với một vùng V_H hoặc V_L khác và/hoặc với một hoặc nhiều vùng V_H hoặc V_L ở dạng monome (ví dụ, bằng liên kết disulfite).

Tương tự như các phân tử kháng thể nguyên vẹn, mảnh liên kết kháng nguyên có thể là đặc hiệu đơn hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thường sẽ chứa ít nhất hai vùng biến đổi khác nhau, trong đó mỗi vùng có khả năng liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên riêng rẽ hoặc với các quyết định kháng nguyên khác nhau trên cùng một kháng nguyên. Định dạng kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, gồm cả các định dạng của kháng thể đặc hiệu kép mẫu được đề cập

đến ở đây, có thể bị biến đổi để sử dụng trong trường hợp của mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực mà sáng chế đề cập.

Các kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng của nó bằng cách cản trở hoặc ngăn chặn sự tương tác giữa IL-25 với một hoặc nhiều thành phần thụ thể của nó. Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế còn ức chế việc truyền tín hiệu qua trung gian IL-25 thông qua cơ chế không liên quan đến việc cản trở tương tác của IL-25 với thụ thể của nó. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng thông qua khả năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) hoặc gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). “Gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể” (CDC) đề cập đến khả năng ly giải các tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng kháng thể theo sáng chế khi có mặt của bổ thể. “Gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể” (ADCC) đề cập đến phản ứng trung gian tế bào trong đó, các tế bào gây độc không đặc hiệu biểu hiện thụ thể Fc (FcRs) (ví dụ, các tế bào giết tự nhiên (NK), tế bào bạch cầu trung tính, và các đại thực bào) xác định kháng thể gắn trên bề mặt tế bào đích và từ đó ly giải tế bào đích. Có thể đo CDC và ADCC bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã biết và có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập. (Xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ US 5,500,362 và 5,821,337, và Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656). Vùng hằng định của kháng thể có vai trò quan trọng trong việc cố định bổ thể và gây độc qua trung gian tế bào của kháng thể. Do đó, tiêu chí lựa chọn isotyp của kháng thể dựa trên cơ sở liệu nó có cần thiết đối với kháng thể để gây độc tế bào qua trung gian.

Thuật ngữ “kháng thể người”, như được sử dụng ở đây, được dự tính để bao gồm kháng thể người không có trong tự nhiên. Thuật ngữ bao gồm kháng thể được sản xuất tái tổ hợp trong động vật có vú không phải con người, hoặc trong các tế bào của động vật có vú không phải con người. Thuật ngữ không được dùng để chỉ kháng thể được phân lập từ hoặc có nguồn gốc từ con người.

Theo một vài phương án, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể người tái tổ hợp và/hoặc kháng thể người nhân tạo. Thuật ngữ “kháng thể người tái tổ hợp”, như được sử dụng ở đây, bao gồm tất cả các kháng thể người được xử lý, biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng phương pháp tái tổ hợp, chẳng hạn như các kháng thể được

biểu hiệu bằng cách chuyển nạp vector biểu hiện tái tổ hợp vào trong tế bào chủ (sẽ được mô tả chi tiết ở bên dưới), các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người tổ hợp, tái tổ hợp (sẽ được mô tả chi tiết bên dưới), kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) được chuyển các gen globulin miễn dịch người (xem ví dụ, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) hoặc các kháng thể được xử lý, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương pháp khác bao gồm phương pháp nối các trình tự gen globulin miễn dịch người với trình tự ADN khác. Theo các phương án nhất định, kháng thể người tái tổ hợp đã nêu trải qua đột biến gen *in vitro* (hoặc, khi chuyển gen động vật vào trình tự Ig người được sử dụng, gây đột biến tế bào sinh dưỡng *in vivo*) và do đó trình tự axit amin của các vùng V_H và V_L trong các kháng thể tái tổ hợp là các trình tự liên quan đến trình tự V_H và V_L của tế bào dòng mầm người, có thể không tồn tại tự nhiên trong danh mục tế bào dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Kháng thể người có thể tồn tại ở hai dạng, hai dạng này liên quan đến sự không đồng nhất của vùng bản lề. Ở dạng thứ nhất, phân tử globulin miễn dịch có cấu tạo gồm một cấu trúc bốn chuỗi ổn định có khối lượng xấp xỉ 150-160 kDa trong đó, các đime liên kết với nhau qua cầu nối disulfit chuỗi nặng liên chuỗi. Ở dạng thứ hai, các đime không liên kết với nhau qua các cầu nối disulfit liên chuỗi và một phân tử có khối lượng khoảng 75-80 kDa được tạo ra có chứa liên kết cộng hóa trị của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (một nửa kháng thể). Các dạng này rất khó phân lập, kể cả khi đã tinh sạch ái lực.

Tần suất xuất hiện của dạng thứ hai trong các isotype IgG nguyên vẹn khác nhau là do, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự khác nhau trong cấu trúc liên quan đến isotyp vùng bản lề của kháng thể. Việc thay thế chỉ một axit amin trong vùng bản lề của vùng bản lề IgG4 người làm giảm đáng kể sự xuất hiện của dạng thứ hai (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) tới mức thường quan sát được bằng cách sử dụng bản lề IgG 1 người. Sáng chế gồm các kháng thể có một hoặc nhiều đột biến ở vùng bản lề, vùng C_H2 hoặc C_H3, những vùng mong đợi, ví dụ, trong việc sản xuất, tăng sản lượng của dạng kháng thể mong muốn.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” hoặc “liên kết đặc hiệu với”, hoặc các thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tạo thành phức hợp tương đối bền với kháng nguyên dưới các điều kiện sinh lý. Liên kết đặc hiệu được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất khoảng 1×10^{-6} M hoặc thấp hơn (ví dụ,

hằng số K_D nhỏ hơn có nghĩa là liên kết chặt hơn). Phương pháp để xác định liệu hai phân tử có liên kết đặc hiệu hay không là những kiến thức đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm, ví dụ, phương pháp thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và các phương pháp tương tự. Như được mô tả ở đây, kháng thể được nhận biết bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™, liên kết đặc hiệu với IL-25. Hơn nữa, kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể liên kết với protein IL-25 và một hoặc nhiều kháng nguyên bổ sung hoặc kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể liên kết với hai vùng khác nhau trên IL-25 đều được xem là kháng thể “liên kết đặc hiệu”, như được sử dụng ở đây.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể phân lập. “Kháng thể phân lập” được sử dụng ở đây, dùng để chỉ kháng thể được nhận biết và được phân lập và/hoặc thu từ ít nhất một thành phần thuộc môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể được phân lập hoặc được tách ra từ ít nhất một phần của cơ quan, hoặc từ mô hoặc tế bào trong đó kháng thể tồn tại một cách tự nhiên hoặc được sản xuất một cách tự nhiên, được gọi là “kháng thể phân lập” dùng cho mục đích của sáng chế. Kháng thể phân lập cũng bao gồm kháng thể tại chỗ (*in situ*) trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể phân lập là các kháng thể trải qua ít nhất một bước tinh sạch hoặc phân lập. Theo các phương án nhất định, kháng thể phân lập gần như không chứa các vật liệu tế bào và/hoặc các chất hóa học khác.

Kháng thể kháng IL-25 được đề cập ở đây có thể chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế, thêm và/hoặc mất axit amin trong vùng sườn và/hoặc vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Có thể dễ dàng xác định các đột biến đã nêu bằng cách so sánh trình tự được nêu ở đây với trình tự có sẵn từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể đã công bố. Sau khi thu được kháng thể, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến có thể dễ dàng kiểm tra một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, tính liên kết đặc hiệu được cải thiện, ái lực liên kết tăng lên, đặc tính sinh học đối vận hay đồng vận được cải thiện hoặc tăng cường (tùy từng trường hợp cụ thể), tính sinh miễn dịch giảm đi, v.v.. Các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên thu được bằng cách này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng IL-25 có chứa các biến thể của trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR bất kỳ được bộc lộ ở đây có một hoặc nhiều

đột biến thay thế bảo thủ. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng IL-25 có trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR có, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. đột biến thay thế axit amin bảo thủ liên quan đến trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR bất kỳ được trình bày trong bảng 1.

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” dùng để chỉ yếu tố quyết định kháng nguyên mà tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên cụ thể trên vùng biến đổi của phân tử kháng thể được biết đến là vị trí bám của kháng thể. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể gắn vào các vùng khác nhau trên cùng một kháng nguyên và có thể có những tác động sinh học khác nhau. Các quyết định kháng nguyên có thể tồn tại ở dạng cấu hình không gian ba chiều hoặc dạng thẳng. Dạng không gian ba chiều được tạo ra bởi các axit amin nằm cạnh nhau trong không gian từ những đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit thẳng. Quyết định kháng nguyên dạng thẳng là quyết định kháng nguyên được tạo ra bởi các gốc axit amin gần nhau trong chuỗi polypeptit. Trong trường hợp nhất định, một quyết định kháng nguyên có thể gồm gốc saccarit, nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Thuật ngữ "gần như tương đồng" hoặc "tương đồng đáng kể" khi đề cập đến axit nucleic hoặc mảnh của nó, có nghĩa là, khi xếp thẳng hàng một cách tối ưu nhất đột biến thêm hoặc mất nucleotit thích hợp với axit nucleic khác (hoặc với sợi bổ sung của nó), thu được độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, và tốt hơn nếu ít nhất khoảng 96%, 97%, 98% hoặc 99% của các cặp bazơ nucleotit, đo bằng thuật toán về trình tự nhận biết bất kỳ đã biết, chẳng hạn như FASTA, BLAST hoặc Gap, như được mô tả bên dưới. Một phân tử axit nucleic gần như tương đồng với một phân tử axit nucleic tham chiếu, trong một vài trường hợp nhất định, mã hóa cho chuỗi polypeptit có trình tự axit amin giống hoặc gần giống với chuỗi polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Khi sử dụng với chuỗi polypeptit, thuật ngữ “gần như tương đồng” hoặc “tương đồng đáng kể” có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được xếp thẳng hàng một cách tối ưu nhất, chẳng hạn bằng các chương trình như GAP hoặc BESTFIT sử dụng các trọng lượng khoảng trống mặc định, tìm ra được độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, thậm chí là 98% hoặc 99%. Tốt hơn nếu, vị trí các gốc không tương đồng khác nhau bởi

đột biến thay thế axit amin bảo thủ. “Thay thế axit amin bảo thủ” là sự thay thế trong đó, gốc axit amin này được thay thế bằng gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) có tính chất hóa học tương tự (ví dụ, tính mang điện tích hoặc tính kỵ nước). Nhìn chung, việc thay thế axit amin bảo thủ gần như sẽ không làm thay đổi chức năng của protein. Trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau do sự thay thế bảo thủ, phần trăm trình tự nhận biết hoặc độ tương đồng được điều chỉnh tăng lên để phù hợp với tính chất bảo thủ của đột biến thay thế. Phương pháp điều chỉnh là những kiến thức đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, được kết hợp vào đây bằng cách tham chiếu. Các ví dụ về nhóm axit amin chứa chuỗi bên có các tính chất hóa học tương tự bao gồm (1) chuỗi bên aliphatic : glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin ; (2) chuỗi bên aliphatic-hydroxyl: serin và threonin; (3) chuỗi bên có chứa amit: asparagin và glutamin; (4) chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) chuỗi bên bazo: lysin, arginin, và histidin; (6) chuỗi bên axit: aspartat và glutamat, và (7) chuỗi bên có chứa lưu huỳnh là xystein và methionin. Tốt hơn nếu nhóm thế axit amin bảo thủ là valin-leucin-isoleucin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Ngoài ra, thay thế bao thủ là bất kỳ sự thay đổi có giá trị dương trong ma trận PAM250 log-likelihood được đề cập trong Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Đột biến thay thế “khá bảo thủ” là bất kỳ sự thay đổi nào có giá trị không âm trong ma trận PAM250 log-likelihood.

Sự tương đồng trình tự đối với chuỗi polypeptit, cũng được đề cập đến như trình tự tương đồng, thường được đo bằng phần mềm phân tích. Phần mềm phân tích protein ghép các trình tự tương đồng sử dụng phương pháp đo độ tương đồng gắn với các đột biến thay thế, mất hoặc các biến đổi khác, bao gồm, đột biến thay thế axit amin bảo thủ. Ví dụ, phần mềm GCG gồm các chương trình như Gap và Bestfit sử dụng các tham số mặc định để xác định độ tương đồng trình tự hoặc độ đồng nhất trình tự giữa các polypeptit có quan hệ gần gũi, chẳng hạn như polypeptit tương đồng từ các loài khác nhau của cơ thể sinh vật hoặc giữa protein kiểu đại và một biến thể của nó. Xem, ví dụ GCG phiên bản 6.1. Trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh sử dụng phần mềm FASTA, phần mềm này sử dụng các tham số mặc định hoặc tham số đề xuất, một chương trình trong GCG phiên bản 6.1 (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp các sắp xếp hoặc

phần trăm trình tự tương đồng của các vùng xếp chồng khớp nhất giữa trình tự truy vấn và trình tự tìm kiếm (Pearson (2000) *supra*). Thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự trong sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa lượng lớn các trình tự từ các cơ quan khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc BLASTN, sử dụng các tham số mặc định. Xem, ví dụ, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, mỗi tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng IL-25 có đặc tính liên kết phụ thuộc vào độ pH. Ví dụ, kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có thể có khả năng liên kết với IL-25 tại pH axit giảm đi so với khả năng liên kết tại pH trung tính. Ngoài ra, kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có khả năng liên kết với IL-25 tại pH axit tăng lên so với tại pH trung tính. Khi viết “pH axit” tức là bao gồm các giá trị pH nhỏ hơn 6,2, ví dụ, khoảng 6,0; 5,95; 5,9; 5,85; 5,8; 5,75; 5,7; 5,65; 5,6; 5,55; 5,5; 5,45; 5,4; 5,35; 5,3; 5,25; 5,2; 5,15; 5,1; 5,05; 5,0; hoặc thấp hơn. Như được sử dụng ở đây, khi viết là “pH trung tính” có nghĩa là pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,4. Khi viết “pH trung tính” bao gồm các giá trị pH khoảng 7,0; 7,05; 7,1; 7,15; 7,2; 7,25; 7,3; 7,35; và 7,4.

Theo các phương án nhất định, “khả năng liên kết với IL-25 tại pH axit giảm đi so với pH trung tính” được thể hiện ở tỉ lệ giữa giá trị K_D của kháng thể liên kết với IL-25 tại pH axit và giá trị K_D của kháng thể liên kết với IL-25 tại pH trung tính (hoặc ngược lại). Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được xem là “liên kết với IL-25 tại pH axit giảm đi so với tại pH trung tính” nếu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có tỷ lệ K_D axit/trung tính khoảng 3,0 hoặc lớn hơn. Theo các phương án mẫu nhất định, tỷ lệ K_D axit/trung tính của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể là khoảng 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5; 13,0; 13,5; 14,0; 14,5; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 100,0 hoặc lớn hơn.

Các kháng thể có đặc tính liên kết phụ thuộc vào độ pH sẽ thu được, ví dụ, bằng cách sàng lọc quần thể kháng thể biểu hiện giảm (hoặc tăng) khả năng liên kết với một kháng nguyên cụ thể tại pH axit so với tại pH trung tính. Ngoài ra, các đột biến tại vùng liên kết kháng nguyên ở mức độ axit amin giúp thu được các kháng thể có đặc tính liên

kết phụ thuộc vào độ pH. Ví dụ, bằng cách thay thế một hoặc nhiều axit amin của vùng liên kết với kháng nguyên (ví dụ, trong vùng CDR) bằng gốc histidin, có thể thu được kháng thể với khả năng liên kết với kháng nguyên tại pH axit giảm đi so với khả năng liên kết tại pH trung tính.

Kháng thể kháng IL-25 chứa biến thể Fc.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng IL-25 được đề xuất có vùng Fc chứa một hoặc nhiều đột biến mà làm tăng hoặc làm giảm khả năng liên kết của kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, tại pH axit so với pH trung tính. Ví dụ, sáng chế gồm kháng thể kháng IL-25 bị đột biến tại các vùng CH₂ hoặc CH₃ của vùng Fc, trong đó (các) đột biến làm tăng ái lực của vùng Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong nhân đơn bào nơi giá trị pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Các đột biến đã nêu làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể khi sử dụng cho động vật. Ví dụ về việc biến đổi Fc đã nêu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ biến đổi tại vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T), và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc đột biến tại vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, H/F hoặc Y); hoặc đột biến tại vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc đột biến tại vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, các đột biến bao gồm đột biến 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S), đột biến 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F), đột biến 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y), đột biến 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E), đột biến ; 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); đột biến và 307 và/hoặc đột biến 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P).

Ví dụ, sáng chế gồm kháng thể kháng IL-25 có vùng Fc chứa một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm các đột biến được chọn từ nhóm bao gồm: 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L); 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E); 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); và 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F). Tất cả tổ hợp có thể xảy ra của các đột biến tại vùng Fc đã nêu, và các đột biến khác tại vùng biến đổi trong kháng thể được đề cập đến ở đây, đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Đặc tính sinh học của kháng thể

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng IL-25 liên kết với IL-25 người với giá trị

KD nhỏ hơn khoảng 120 pM, đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C. Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng IL-25 liên kết với IL-25 người với giá trị KD nhỏ hơn khoảng 100 pM, nhỏ hơn khoảng 90 pM, nhỏ hơn khoảng 80 pM, nhỏ hơn khoảng 70 pM, nhỏ hơn khoảng 60 pM, nhỏ hơn khoảng 50 pM, nhỏ hơn khoảng 40 pM, nhỏ hơn khoảng 30 pM, nhỏ hơn khoảng 20 pM, nhỏ hơn khoảng 18 pM, nhỏ hơn khoảng 16 pM, nhỏ hơn khoảng 14 pM, nhỏ hơn khoảng 12 pM.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng IL-25 liên kết với IL-25 người có chu kỳ bán bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 105 phút, đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C. Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể kháng IL-25 liên kết với IL-25 người có chu kỳ bán bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 105 phút, lớn hơn khoảng 150 phút, lớn hơn khoảng 175 phút, lớn hơn khoảng 200 phút, lớn hơn khoảng 250 phút, lớn hơn khoảng 300 phút, lớn hơn khoảng 350 phút, lớn hơn khoảng 400 phút, lớn hơn khoảng 450 phút, lớn hơn khoảng 500 phút, lớn hơn khoảng 550 phút, lớn hơn khoảng 600 phút, lớn hơn khoảng 700 phút, lớn hơn khoảng 800 phút, lớn hơn khoảng 900 phút, lớn hơn khoảng 1000 phút, lớn hơn khoảng 1100 phút, hoặc lớn hơn khoảng 1200 phút.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng IL-25 liên kết hoặc không liên kết với IL-25 khi, hoặc IL-25 chuột nhà hoặc chuột nhắt. Như được sử dụng ở đây, kháng thể “không liên kết với” kháng nguyên cụ thể (ví dụ, IL-25 khi, chuột nhà, chuột nhắt) nếu kháng thể, khi kiểm tra bằng thử nghiệm liên kết kháng nguyên chẳng hạn như cộng hưởng plasmon bề mặt có giá trị K_D lớn hơn khoảng 1000 nM, hoặc không có bất kỳ liên kết kháng nguyên nào, trong thử nghiệm đã nêu. Thử nghiệm khác có thể sử dụng để xác định liệu kháng thể liên kết hay không liên kết với kháng nguyên cụ thể, theo khía cạnh này của sáng chế, là ELISA.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng IL-25 cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,0 nM. Ví dụ, như được thể hiện trong ví dụ 6 ở đây, các tế bào HEK293 được thiết kế di truyền để biểu hiện ổn định IL-17RA người (các axit amin từ 1 đến 866 có số đăng ký NP_055154.3) và IL-17RB (các axit amin từ 1 đến 502 có số đăng ký NP_061195.2). Dòng tế bào cũng có thể chứa phân tử báo cáo cho

phép phát hiện việc truyền tín hiệu qua trung gian IL-25 thông qua thụ thể IL-17RA/IL-17RB (ví dụ, phân tử báo cáo luciferaza hoặc thụ thể có thể phát hiện khác được tạo ra bởi việc IL-25 liên kết với thụ thể của nó). Sử dụng thử nghiệm đã được mô tả trong ví dụ 6, hoặc thử nghiệm tương tự, giá trị IC_{50} được tính toán là nồng độ kháng thể cần dùng để làm giảm việc truyền tín hiệu qua trung gian IL-25 xuống bằng 50% lượng tín hiệu truyền qua lớn nhất quan sát được khi không có kháng thể. Do đó, theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng IL-25 cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 720 pM, nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 400 pM, nhỏ hơn khoảng 300 pM, nhỏ hơn khoảng 200 pM, nhỏ hơn khoảng 100 pM, nhỏ hơn khoảng 90 pM, nhỏ hơn khoảng 80 pM, nhỏ hơn khoảng 70 pM, nhỏ hơn khoảng 60 pM, nhỏ hơn khoảng 50 pM, nhỏ hơn khoảng 40 pM, nhỏ hơn khoảng 30 pM, nhỏ hơn khoảng 20 pM, nhỏ hơn khoảng 10 pM, nhỏ hơn khoảng 5 pM, đo được khi sử dụng thử nghiệm đã mô tả trong ví dụ 6 hoặc các thử nghiệm tương tự.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng IL-25 cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào máu ngoại vi đơn nhân người (PBMC) có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 16 pM. Ví dụ, như được trình bày trong ví dụ 7 ở đây, các tế bào PBMC đã được ủ với IL-25 và các lượng kháng thể kháng IL-25 khác nhau, và nồng độ IL-25 được sản xuất bởi các tế bào được phát hiện để xác định mức độ truyền tín hiệu qua trung gian IL-25. Sử dụng thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 7, hoặc các thử nghiệm tương tự, giá trị IC_{50} được tính toán theo nồng độ kháng thể cần dùng để làm giảm việc truyền tín hiệu qua trung gian IL-25 xuống bằng 50% lượng tín hiệu truyền qua lớn nhất quan sát được khi không có kháng thể. Do đó, theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng IL-25 cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào ngoại vi đơn nhân người (PBMC) có giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 5 nM, nhỏ hơn khoảng 4 nM, nhỏ hơn khoảng 3 nM, nhỏ hơn khoảng 1 nM, nhỏ hơn khoảng 900 pM, nhỏ hơn khoảng 800 pM, nhỏ hơn khoảng 700 pM, nhỏ hơn khoảng 600 pM, nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 400 pM, nhỏ hơn khoảng 300 pM, nhỏ hơn khoảng 200 pM, nhỏ hơn khoảng 100 pM, nhỏ hơn khoảng 90 pM, nhỏ hơn khoảng 80 pM, nhỏ hơn khoảng 70 pM, nhỏ hơn khoảng 60 pM, nhỏ hơn khoảng 50 pM, nhỏ hơn khoảng 40 pM, nhỏ hơn khoảng 30 pM, nhỏ hơn khoảng 20 pM, đo được khi sử dụng thử nghiệm mô tả trong ví dụ 7 hoặc các thử nghiệm tương tự. Theo một phương án, các kháng thể IL-25 trong

sáng chế cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong tế bào máu ngoại vi đơn nhân người (PBMC) có giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 30 pM đến 150 pM.

Đặc tính liên kết của kháng thể theo sáng chế (ví dụ, đặc tính liên kết bất kỳ được đề cập đến ở đây), khi đề cập đến thuật ngữ “cộng hưởng plasmon bề mặt” có nghĩa là đặc tính liên kết gắn liền với sự tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên được đo bằng cách sử dụng thiết bị cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, thiết bị Biacore®, GE Healthcare) sử dụng các điều kiện thử nghiệm Biacore tiêu chuẩn như được minh họa trong ví dụ 2, hoặc các thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, các tham số liên kết được đo tại nhiệt độ 25°C, trong khi theo các phương án khác, các tham số liên kết được đo tại nhiệt độ 37°C.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng IL-25 làm giảm nồng độ IgE trong hệ tuần hoàn và/hoặc nồng độ IgE được tìm thấy ở phổi của động vật có vú biểu hiện quá mức IL-25, như được trình bày trong mô hình đã mô tả ở ví dụ 8. Cũng được mô tả trong ví dụ 8 là các kháng thể kháng IL-25 làm giảm dị sản tế bào hình đài ở động vật có vú biểu hiện quá mức IL-25.

Sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, là mảnh liên kết đặc hiệu với IL-25, bao gồm HCVR và/hoặc LCVR chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều đặc tính sinh học đã nêu, hoặc tổ hợp bất kỳ các đặc tính sinh học của chúng. Danh sách các đặc tính sinh học đã nêu của kháng thể theo sáng chế không phải là toàn bộ các đặc tính sinh học. Các đặc tính sinh học khác của kháng thể theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bằng cách xem lại sáng chế và các ví dụ được đề cập đến ở đây.

Lập bản đồ quyết định kháng nguyên và các kỹ thuật liên quan

Quyết định kháng nguyên mà kháng thể theo sáng chế liên kết với nó có thể bao gồm một trình tự chuỗi liên tiếp của 3 hoặc nhiều (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) axit amin của protein IL-25. Ngoài ra, quyết định kháng nguyên cũng có thể chứa nhiều axit amin (hoặc các trình tự axit amin)

không liên kết của IL-25. Theo một số phương án, các quyết định kháng nguyên nằm trên hoặc nằm gần bề mặt của IL-25 tương tác với thụ thể IL-25. Theo các phương án khác, quyết định kháng nguyên nằm trên hoặc nằm gần bề mặt của IL-25, mà không tương tác với thụ thể IL-25, ví dụ, tại vị trí trên bề mặt của IL-25, mà tại đó khi kháng thể liên kết với quyết định kháng nguyên, không làm cản trở sự tương tác giữa IL-25 và thụ thể của nó.

Có thể sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với những người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để xác định việc kháng thể “tương tác với một hoặc nhiều axit amin” trong chuỗi polypeptit hoặc protein. Các kỹ thuật tiêu biểu bao gồm thử nghiệm phong bế-chéo thông thường ví dụ như thử nghiệm được mô tả trong *Antibodies*, Harlow và Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), kỹ thuật phân tích đột biến quét alanin, phân tích thẩm tách peptit (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), phân tích khả năng phân cắt peptit. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng các phương pháp khác như cắt quyết định kháng nguyên, tách chiết quyết định kháng nguyên và biến đổi hóa học các kháng nguyên. (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Phương pháp khác nữa có thể sử dụng để xác định axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác với nó là phương pháp trao đổi hydro/đoteri được phát hiện bằng khối phổ. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri đòi hỏi cần phải gắn nhãn đoteri vào protein quan tâm, sau đó gắn kháng thể với protein đã được đánh dấu đoteri. Sau đó, phức hợp kháng thể/protein được chuyển vào nước để thực hiện quá trình trao đổi hydro/đoteri ở tất cả các gốc trừ các gốc được kháng thể bảo vệ (mà vẫn được đánh dấu đoteri). Sau khi kháng thể phân ly, protein đích được cắt bằng enzym proteaza và phân tích bằng khối phổ, nhờ đó phát hiện ra các gốc đánh dấu bằng đoteri tương ứng với các axit amin cụ thể mà tương tác với kháng thể. *Xem, ví dụ, Ehring (1999) Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng IL-25 mà liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể bất kỳ trong số các ví dụ cụ thể về kháng thể được mô tả ở đây (ví dụ, các kháng thể chứa trình tự axit amin bất kỳ được liệt kê trong bảng 1). Tương tự, sáng chế cũng đề bao gồm các kháng thể kháng IL-25 cạnh tranh nhau để liên kết với IL-25 như bất kỳ kháng thể cụ thể trong số các ví dụ về kháng thể mô tả ở đây (ví dụ, các kháng thể chứa trình tự axit amin bất kỳ như được liệt kê trong bảng 1).

Những người có hiểu biết trung bình có thể dễ dàng xác định việc kháng thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên hay cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng IL-25 tham chiếu bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và được sử dụng ở đây làm ví dụ. Ví dụ, để xác định liệu kháng thể cần kiểm tra và kháng thể kháng IL-25 tham chiếu trong sáng chế liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên, cho kháng thể kháng IL-25 tham chiếu liên kết với quyết định kháng nguyên. Sau đó, đánh giá khả năng liên kết với phân tử IL-25 của kháng thể cần kiểm tra. Nếu kháng thể cần kiểm tra có thể liên kết với IL-25 sau khi kháng thể kháng IL-25 tham chiếu đã liên kết bão hòa, có thể kết luận rằng kháng thể cần kiểm tra liên kết với quyết định kháng nguyên khác với kháng thể kháng IL-25. Mặt khác, nếu kháng thể cần kiểm tra không thể liên kết với phân tử IL-25 sau khi kháng thể kháng IL-25 tham chiếu liên kết bão hòa, thì kháng thể cần kiểm tra có thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên khi quyết định kháng nguyên đã liên kết với kháng thể kháng IL-25 tham chiếu theo sáng chế. Sau đó, có thể thực hiện các thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, thử nghiệm đột biến peptit và phân tích liên kết) để xác nhận liệu việc không quan sát được sự liên kết của các kháng thể cần kiểm tra trên thực tế là do chúng gắn vào cùng một quyết định kháng nguyên với kháng thể tham chiếu hay là do hiện tượng cản trở liên kết về mặt không gian (hoặc hiện tượng khác) là nguyên nhân khiến cho không quan sát được liên kết. Có thể tiến hành các thử nghiệm loại này bằng cách sử dụng ELISA, RIA Biacore, phân tích tế bào theo dòng chảy hoặc bất kỳ thử nghiệm định lượng kháng thể-liên kết hoặc thử nghiệm định tính khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo các phương án nhất định, hai kháng thể cùng liên kết (hoặc chồng lên nhau) với một quyết định kháng nguyên nếu, ví dụ, vượt quá 1-, 5-, 10-, 20- hoặc 100-lần của một kháng thể sẽ cản trở sự liên kết của các kháng thể khác ít nhất là 50%, tốt hơn nếu là 75%, 90% hoặc thậm chí là 99%, các kết quả đo được bằng thử nghiệm cạnh tranh liên kết (Xem, ví dụ, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Ngoài ra, hai kháng thể được coi là liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên làm giảm hoặc làm mất đi sự liên kết của một kháng thể cũng sẽ làm giảm hoặc làm mất đi sự liên kết của kháng thể kia. Hai kháng thể được coi là có “các quyết định kháng nguyên chồng lên nhau” khi chỉ có một nhóm nhỏ các đột biến axit amin làm giảm hoặc mất đi sự liên kết của một kháng thể cũng sẽ làm giảm hoặc mất đi sự liên kết của kháng thể khác.

Để xác định xem một kháng thể có cạnh tranh với kháng thể kháng IL-25 tham chiếu để liên kết (hoặc cạnh tranh chéo để liên kết), phương pháp liên kết đã mô tả ở trên được tiến hành theo hai hướng: theo hướng thứ nhất, cho kháng thể tham chiếu liên kết với protein IL-25 dưới các điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá khả năng liên kết của kháng thể cần kiểm tra với phân tử IL-25. Theo hướng thứ hai, kháng thể cần kiểm tra được liên kết với phân tử IL-25 dưới các điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử IL-25. Nếu theo cả hai hướng, chỉ có kháng thể thứ nhất (bão hòa) có khả năng liên kết với phân tử IL-25 thì có thể kết luận rằng, kháng thể cần kiểm tra và kháng thể tham chiếu cạnh tranh nhau để liên kết với IL-25 (Xem, ví dụ, thử nghiệm đã mô tả trong ví dụ 4, trong đó protein IL-25 được bắt giữ trên đầu cảm biến và IL-25 được phủ đầu cảm biến được xử lý lần lượt với kháng thể kháng IL-25 tham chiếu [mAb-1] và kháng thể cần kiểm tra [mAb-2] và theo cả hai thứ tự liên kết). Theo như đánh giá của những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, một kháng thể cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để liên kết có thể không nhất thiết phải liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể cản trở sự liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách gắn vào quyết định kháng nguyên liền kề hoặc gối lên nhau.

Sản xuất kháng thể người

Các kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có thể là kháng thể người nguyên vẹn nhưng không có trong tự nhiên. Phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng người, bao gồm các kháng thể đơn dòng người nguyên vẹn là những kiến thức đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Mọi phương pháp đã biết đều có thể sử dụng trong sáng chế để tạo ra kháng thể người liên kết đặc hiệu với IL-25 người.

Sử dụng kỹ thuật VELOCIMMUNE® (Xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) hoặc bất kỳ phương pháp tương tự đã biết để tạo kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm có ái lực cao với dị ứng nguyên, được phân lập ban đầu chứa vùng biến đổi người và vùng hằng định chuột. Kỹ thuật VELOCIMMUNE® bao gồm việc tạo ra chuột chuyển gen có hệ gen chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được liên kết với vùng hằng định chuột nội sinh loci sao cho chuột này tạo ra kháng thể có chứa vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột đáp ứng với sự kích thích kháng nguyên. ADN mã hóa cho

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được phân lập và liên kết hoạt động với ADN mã hóa cho vùng hằng định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người. ADN sau đó được biểu hiện trong tế bào có khả năng biểu hiện phân tử kháng thể nguyên vẹn.

Nhìn chung, chuột VELOCIMMUNE® được thử nghiệm với kháng nguyên cần quan tâm, và các tế bào bạch huyết (chẳng hạn như tế bào B) được thu từ chuột nhất biểu hiện kháng thể. Dung hợp các tế bào bạch huyết với dòng tế bào u tủy để tạo ra dòng tế bào lai bất tử, và các dòng tế bào lai này được sàng lọc và lựa chọn để xác định dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên cần quan tâm. ADN mã hóa cho vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được phân lập và liên kết với vùng hằng định isotyp mong muốn của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Protein kháng thể đã nêu được sản xuất trong tế bào, chẳng hạn, tế bào CHO. Ngoài ra, ADN mã hóa cho kháng thể khảm đặc hiệu kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được phân lập trực tiếp từ các tế bào bạch huyết đặc hiệu kháng nguyên.

Như được mô tả trong phần thử nghiệm bên dưới, kháng thể khảm có ái lực cao, mà được phân lập chứa vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột, được xác định đặc tính và chọn lựa các đặc tính mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, quyết định kháng nguyên, v.v.. Vùng hằng định chuột sau đó được thay thế bằng vùng hằng định người mong muốn để tạo ra phân tử kháng thể người nguyên vẹn theo sáng chế, ví dụ, Ig1 hoặc Ig4 kiểu đại hoặc được biến đổi. Mặc dù vùng hằng định lựa chọn có thể khác nhau tùy theo mục đích sử dụng cụ thể, các đặc tính đặc hiệu đích và liên kết kháng nguyên ái lực cao là do vùng biến đổi tạo ra.

Nhìn chung, các kháng thể trong sáng chế có ái lực rất cao, thường có K_D nằm trong khoảng từ 10^{-12} đến 10^{-9} M, đo bằng cách liên kết với kháng nguyên hoặc cố định trên pha rắn hoặc pha lỏng.

Tương đương sinh học

Kháng thể kháng IL-25 và mảnh kháng thể theo sáng chế chứa các protein có trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin của các kháng thể đã mô tả nhưng vẫn có khả năng liên kết với IL-25. Các kháng thể hoặc mảnh kháng thể biến đổi như vậy gồm một hoặc nhiều đột biến thêm, mất hoặc thay thế axit amin so với trình tự gốc, nhưng lại có hoạt tính sinh học gần như tương đương với các kháng thể được mô tả.

Tương tự, trình tự ADN mã hóa cho kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế gồm các trình tự chứa một hoặc nhiều đột biến mất hoặc thay thế nucleotit so với trình tự đã nêu, tuy nhiên trình tự ADN mã hóa cho kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh kháng thể gần như tương đương sinh học với kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế. Các ví dụ về các trình tự ADN và axit amin biến đổi đã được thảo luận ở trên.

Hai protein liên kết kháng nguyên, hoặc kháng thể, được xem là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng là các tương đương về mặt được dụng hoặc thay thế lẫn nhau về mặt được dụng có tốc độ và mức độ hấp thụ khác nhau không đáng kể khi được sử dụng tại cùng một liều lượng mol dưới các điều kiện thử nghiệm giống nhau, khi cung cấp một liều hoặc nhiều liều. Một vài kháng thể được xem là tương đương hoặc thay thế lẫn nhau về mặt được dụng nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng không tương đương về tốc độ hấp thụ và cũng có thể xem là tương đương sinh học bởi vì sự khác biệt về tốc độ hấp thụ là có chủ ý và tạo ra trong quá trình đánh dấu, các kháng thể này không cần thiết phải duy trì được nồng độ thuốc hữu hiệu, ví dụ, sử dụng lâu dài, và được xem là không có ý nghĩa về mặt y học đối với sản phẩm thuốc cụ thể đã nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng không có sự khác biệt đáng kể về mặt lâm sàng đối với độ an toàn, độ tinh khiết và hiệu lực của chúng.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ xảy ra tác dụng phụ, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng về tính sinh miễn dịch hoặc giảm hiệu quả so với tiếp tục liệu trình điều trị mà không có sự bất kỳ sự chuyển đổi nào nói trên.

Trong một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu cả hai đều hoạt động theo một cơ chế chung hoặc theo cơ chế tác động đối với điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng, đến mức độ mà các cơ chế đã nêu được biết đến.

Có thể chứng minh tương đương sinh học bằng các phương pháp *in vitro* và *in vivo*. Các phương pháp đo tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác, trong đó nồng độ kháng thể hoặc các chất chuyển

hóa của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc các dịch sinh học khác theo hàm của thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà tương ứng với và được cho là phù hợp với dữ liệu độ sinh khả dụng *in vivo* ở người; (c) tiến hành thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác trong đó, hiệu quả được lý cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo theo hàm của thời gian; và (d) các thử nghiệm lâm sàng kiểm soát tốt giúp xác định độ an toàn, hiệu lực hoặc độ sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Biến thể tương đương sinh học của kháng thể kháng IL-25 trong sáng chế có thể được tạo cấu trúc bằng cách, ví dụ, tạo ra các thay thế của gốc hoặc trình tự khác nhau hoặc loại bỏ các gốc hoặc trình tự ở trên trong hoặc đầu cuối không cần thiết đối với hoạt tính sinh học. Ví dụ, gốc cysteine không cần thiết đối với hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc thay thế bằng các axit amin khác để ngăn chặn sự hình thành của các cầu disulfide nội phân tử không cần thiết hoặc không chính xác trong quá trình phức hợp đặc tính. Trong các phương án khác, kháng thể tương đương sinh học bao gồm các biến thể của kháng thể kháng IL-25 mà việc biến đổi axit amin làm thay đổi các đặc tính glycosyl hóa của các kháng thể, ví dụ, các đột biến khử hoặc loại bỏ quá trình glycosyl hóa.

Tính chọn lọc loài và phản ứng chéo loài

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng IL-25 liên kết với IL-25 người nhưng không liên kết với IL-25 của các loài khác. Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng IL-25 liên kết với IL-25 người và IL-25 của một hoặc nhiều loài không phải người. Ví dụ, các kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có thể liên kết với IL-25 người và có thể liên kết hoặc không liên kết với, trong các trường hợp có thể liên kết, một hoặc nhiều IL-25 của chuột nhà, chuột nhắt, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ đuôi dài, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu hoặc tinh tinh. Theo những phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng IL-25 được đề xuất liên kết đặc hiệu với IL-25 người và IL-25 của khỉ đuôi dài (ví dụ, *Macaca fascicularis*). Các kháng thể kháng IL-25 khác theo sáng chế liên kết với IL-25 người nhưng không liên kết, hoặc chỉ liên kết yếu với IL-25 khỉ đuôi dài.

Kháng thể đa đặc hiệu

Kháng thể theo sáng chế có thể đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu với các quyết định kháng nguyên khác của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các vùng liên kết với kháng nguyên đặc hiệu với nhiều hơn một polypeptit đích. Xem, ví dụ, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với hoặc đồng biểu hiện với một phân tử chức năng khác, ví dụ, với một peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng liên kết hóa học, dung hợp gen, liên hợp phi hóa trị hoặc bằng cách khác) với một hoặc nhiều phân tử khác, chẳng hạn kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu với độ đặc hiệu liên kết thứ cấp.

Sáng chế bao gồm kháng thể đặc hiệu kép trong đó, một nhánh của globulin miễn dịch liên kết với IL-25 người, và nhánh còn lại của globulin miễn dịch liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên thứ hai. Nhánh liên kết với IL-25 chứa các trình tự axit amin HCVR/LCVR hoặc CDR bất kỳ được trình bày trong bảng 1.

Ví dụ về dạng kháng thể đặc hiệu kép có thể được theo sáng chế bao gồm việc sử dụng vùng C_{H3} globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và vùng C_{H3} Ig thứ hai, trong đó, các vùng C_{H3} Ig thứ nhất và thứ hai khác các vùng khác tại ít nhất một axit amin, và trong đó sự khác biệt về ít nhất một axit amin làm giảm đi khả năng gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với Protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác biệt axit amin. Theo một phương án, vùng C_{H3} Ig thứ nhất gắn với Protein A và vùng C_{H3} Ig thứ hai bao gồm một đột biến làm giảm hoặc mất liên kết với Protein A như biến đổi H95R (bằng phương pháp đánh số exon IMGT; biến đổi H435R bằng đánh số EU). Vùng C_{H3} thứ hai còn chứa đột biến Y96F (bằng IMGT; Y436F bằng EU). Các đột biến khác có thể tìm thấy tại vùng C_{H3} thứ hai gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (bằng IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (bằng IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I bởi EU) trong trường hợp của kháng thể IgG4. Các biến thể của kháng thể đặc hiệu kép được mô tả ở trên được dự tính trong phạm vi sáng chế.

Ví dụ khác về dạng đặc hiệu kép có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm,

nhưng không bị giới hạn ở, ví dụ, dạng diabody đặc hiệu kép hoặc trên cơ sở scFv, dung hợp IgG-scFv, vùng điển đôi kép (DVD)-Ig, Quadroma, kỹ thuật bám-vào-lỗ, chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường có bám-vào-lỗ, v.v.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, vùng khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác động kép, và các dạng đặc hiệu kép Mab² (Xem, ví dụ, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, và các tài liệu Xem được trích dẫn ở đây, để xem xét lại các định dạng đã nêu). Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách sử dụng sự kết hợp axit nucleic/peptit, ví dụ, trong đó các axit nucleic phi tự nhiên với khả năng phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra các liên hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu vị trí mà sau đó chúng tự lắp ráp thành phức hệ đa phân có thành phần, hóa trị và hình dạng xác định. (Xem, ví dụ, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Dược phẩm điều trị và sử dụng

Sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa kháng thể kháng IL-25 hoặc các mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế với chất mang, tá dược, và chất thích hợp khác giúp cải thiện khả năng vận chuyển, phân phối, dung nạp thuốc và các đặc tính tương tự khác. Dược phẩm thích hợp có thể được tìm thấy trong tuyển tập công thức và được tất cả nhà hóa dược biết đến như: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dược phẩm này bao gồm, ví dụ, dạng bột, bột nhão, thuốc mỡ, thạch, sáp, dầu, lipit, chất dẫn thuốc chứa lipit (cationic hoặc anionic) (như LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), thể tiếp hợp ADN, bột nhão hấp thụ khan, nhũ tương dầu-trong-nước và nước-trong-dầu, hệ nhũ tương cacbovac (chế phẩm polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, hỗn hợp bán rắn chứa cacbovac. Cũng Xem Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều kháng thể được sử dụng đối với bệnh nhân có thể thay đổi tùy theo độ tuổi và thể trọng cơ thể bệnh nhân, bệnh đích, tình trạng bệnh, đường dùng, và tương tự. Tốt hơn nếu, liều dùng được tính toán theo thể trọng hoặc diện tích bề mặt cơ thể. Đối với bệnh nhân trưởng thành, việc tiêm kháng thể theo sáng chế vào tĩnh mạch có vẻ thuận lợi hơn, thông thường, một liều nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 20mg/kg thể trọng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,02 đến 7, khoảng từ 0,03 đến 5, hoặc nằm

trong khoảng từ 0,05 đến 3 mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh mà tần xuất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Liệu trình và liều lượng để sử dụng hiệu quả kháng thể kháng IL-25 có thể được xác định bằng thực nghiệm; ví dụ, tiến triển bệnh của bệnh nhân có thể được theo dõi bằng cách đánh giá định kỳ, và cần điều chỉnh liều lượng sao cho phù hợp. Hơn nữa, việc chia tỉ lệ liều lượng khác loài có thể được tiến hành bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Nhiều hệ thống vận chuyển được biết đến và có thể sử dụng để cung cấp dược phẩm theo sáng chế, ví dụ, được đóng gói trong liposom, vi hạt, vi anng, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virút đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (Xem, ví dụ, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Các phương pháp khác để đưa dược phẩm vào cơ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm trong da, tiêm bắp, trong màng bụng, tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, qua đường mũi, gây tê ngoài mang cứng, và qua đường miệng. Dược phẩm có thể được cung cấp theo bất kỳ con đường nào thuận tiện, ví dụ, bằng cách truyền hay tiêm thuốc, bằng cách hấp thụ qua biểu mô hoặc lớp lót niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và đường ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với các tác nhân hoạt hóa sinh học khác. Dược phẩm có thể được sử dụng cho toàn cơ thể hoặc cho từng cơ quan.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được tiêm dưới da hoặc tiêm tĩnh mạch bằng một ống tiêm và kim tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, liên quan đến việc tiêm dưới da, thiết bị đưa thuốc dạng bút được sử dụng để đưa dược phẩm theo sáng chế vào cơ thể bệnh nhân. Thiết bị đưa thuốc dạng bút đã nêu có thể được tái sử dụng hoặc chỉ dùng một lần. Thiết bị đưa thuốc dạng bút tái sử dụng thường dùng một ống chứa dược phẩm có thể thay thế. Khi dược phẩm trong ống đã được sử dụng hết và chỉ còn ống trống, những ống trống này có thể dễ dàng loại bỏ và thay thế bằng một ống chứa dược phẩm mới. Thiết bị đưa thuốc dạng bút sau đó có thể tái sử dụng cho các lần sau. Đối với thiết bị đưa thuốc dạng bút dùng một lần thì không có ống thay thế. Thay vào đó, thiết bị đưa thuốc dạng bút dùng một lần đóng sẵn dược phẩm trong một chỗ chứa bên trong thiết bị. Một khi chỗ chứa đó hết dược phẩm thì toàn bộ thiết bị sẽ được loại bỏ.

Nhiều thiết bị đưa thuốc dạng bút tái sử dụng và dụng cụ tiêm tự động được sử dụng để tiêm dược phẩm trong sáng chế dưới da. Các ví dụ bao gồm, nhưng không giới

hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly và Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), ở đây chỉ nêu tên một vài thiết bị. Các ví dụ về thiết bị đưa thuốc dạng bút dùng một lần được sử dụng để tiêm được phẩm trong sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và dụng cụ tiêm tự động KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), bút PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), và HUMICHUỘT NHẮT™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), ở đây chỉ nêu tên một vài thiết bị.

Trong các trường hợp nhất định, dược phẩm có thể được đưa vào trong hệ thống giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, ống bơm có thể được sử dụng (Xem Langer, ở trên; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Theo một phương án khác, các vật liệu polyme có thể được sử dụng; xem, Medical Applications of Controlled Release, Langer và Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Theo một phương án khác nữa, hệ thống giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở vị trí lân cận với đích của dược phẩm, do đó chỉ cần sử dụng một phần nhỏ của liều toàn thân (Xem, ví dụ, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, ở trên, quyển 2, pp. 115-138). Các hệ thống giải phóng có kiểm soát khác được mô tả trong bài đánh giá của Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Dược phẩm có thể tiêm bao gồm các dược phẩm dạng liều để tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, trong da và tiêm bắp hay truyền nhỏ giọt, v.v.. Các dược phẩm tiêm này có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, dược phẩm tiêm có thể được điều chế bằng, ví dụ, bằng cách hòa tan, tạo huyền phù hoặc nhũ hóa các kháng thể hoặc muối của chúng được mô tả ở trên trong môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu thường được sử dụng để tiêm. Các môi trường nước dùng để tiêm là, ví dụ, nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương có chứa glucozơ và các tác nhân hỗ trợ khác, v.v., mà có thể sử dụng kết hợp với chất hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức

(ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt phi ion [ví dụ, phức olisorbat 80, HCO-50 (polyoxyetylen (50 mol) sản phẩm cộng của dầu thầu dầu đã hydrô hóa)], v.v.. Môi trường dầu được sử dụng bao gồm, ví dụ, dầu mè, dầu đậu tương, v.v., mà có thể sử dụng kết hợp với chất hòa tan như enzoat, benzyl alcohol, v.v. Vì thế được phẩm tiêm được ưu tiên đựng vào trong ống thuốc tiêm thích hợp.

Thuận lợi nếu, dược phẩm sử dụng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả ở trên được bào chế thành dược phẩm dạng liều trong liều đơn vị phù hợp với lượng các thành phần hoạt hóa. Liều đơn vị của dược phẩm dạng liều đã nêu bao gồm, ví dụ, các viên nén, viên tròn, viên nang, dung dịch tiêm (ống thuốc tiêm), thuốc đạn, v.v.. Lượng kháng thể đã nêu thường nằm trong khoảng từ 5 đến khoảng 500 mg trên mỗi liều đơn vị của dược phẩm dạng liều; đặc biệt ở dạng dung dịch tiêm, lượng kháng thể đã nêu thường nằm trong khoảng từ 5 đến khoảng 100mg và khoảng từ 10 đến khoảng 250 mg đối với các dược phẩm dạng liều khác.

Liệu pháp sử dụng kháng thể

Sáng chế đề xuất các phương pháp bao gồm cung cấp cho đối tượng cần điều trị dược phẩm trị liệu chứa kháng thể kháng IL-25. Dược phẩm điều trị có thể chứa kháng thể kháng IL-25 bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề cập đến ở đây và chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng.

Các kháng thể theo sáng chế rất hữu ích, ví dụ trong việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện tình trạng bệnh hoặc các rối loạn liên quan tới hoặc qua trung gian bởi biểu hiện hoặc hoạt tính của IL-25, hoặc có thể điều trị bằng cách cản trở sự tương tác giữa IL-25 và thụ thể IL-25 hoặc bằng cách ức chế hoạt tính và/hoặc việc truyền tín hiệu của IL-25.

Sáng chế cũng bao gồm các phương pháp để điều trị hoặc phòng ngừa hen suyễn bằng cách cung cấp cho bệnh nhân cần điều trị kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề cập đến ở bất kỳ đâu trong sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hen suyễn” bao gồm, nhưng không giới hạn ở hen suyễn do dị ứng, hen suyễn không do dị ứng, hen suyễn nặng, hen phế quản, hen do vi-rut gây ra hoặc hen phế quản do vi-rut gây ra, hen kháng steroid, hen mẫn cảm với steroid, hen suyễn tăng eosin (eosinophilic) hoặc không tăng eosin và các bệnh liên quan khác

được đặc trưng bởi viêm đường hô hấp hoặc viêm hoặc do phản ứng quá mức của đường hô hấp (airway hyperresponsiveness (AHR)).

Sáng chế cũng bao gồm các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa viêm phổi tắc nghẽn mãn tính (chronic obstructive pulmonary disease (COPD)) bằng cách cung cấp cho bệnh nhân cần điều trị kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề cập đến ở bất kỳ đâu trong sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “viêm phổi tắc nghẽn mãn tính” bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh hoặc các rối loạn đặc trưng bởi sự giảm lưu lượng thở ra và sự xả hết của phổi không thay đổi đáng kể sau một vài tháng. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể sử dụng để điều trị, ví dụ viêm phổi tắc nghẽn mãn tính liên quan đến hoặc gây ra bởi khói thuốc lá (ví dụ, hút thuốc lá trong thời gian dài, ô nhiễm không khí, v.v.), hóa chất nghề nghiệp (ví dụ, catmi), dị ứng hoặc AHR.

Sáng chế cũng bao gồm các phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh viêm ruột (IBD) bằng cách cung cấp cho bệnh nhân cần điều trị kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ ở bất kỳ đâu trong sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bệnh viêm ruột” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, viêm đại tràng collagen, viêm đại tràng tăng lympho bào, viêm đại tràng thiếu máu, diversion colitis, hội chứng Behcet, viêm đại tràng lây nhiễm, viêm đại tràng không xác định được đặc trưng bởi sự viêm nhiễm của lớp niêm mạc trong ruột già hoặc đại tràng.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh viêm da cơ địa (atopic dermatitis (AD)) bằng cách cung cấp cho bệnh nhân cần điều trị kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ ở bất kỳ đâu trong sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “viêm da cơ địa” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh viêm da có đặc điểm là ngứa dữ dội (ví dụ, ngứa nặng) và thương tổn eczema khô và đóng vảy. Thuật ngữ “viêm da cơ địa” bao gồm viêm da cơ địa gây ra bởi hoặc liên quan đến sự mất đi chức năng bảo vệ, dị ứng, (ví dụ dị ứng với thức ăn, phấn hoa, nấm mốc, mạt bụi, động vật, v.v.), phơi nhiễm phóng xạ, và/hoặc hen suyễn. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể sử dụng để điều trị, ví dụ, bệnh viêm da cơ địa nhẹ, trung bình, trung bình đến nặng và nặng.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh và các rối loạn chẳng hạn bệnh viêm mạch u hạt dưới da (EGPA) (còn được gọi là hội chứng Churg-Strauss), dị ứng, viêm mũi dị ứng, viêm đường hô hấp dị ứng, dị ứng thực phẩm, chứng mày đay (bao gồm nổi mày đay tự phát mãn tính), bệnh viêm phổi tăng eosin, viêm thực quản tăng bạch cầu eosin, hội chứng tăng eosin kịch phát, xơ hóa phổi tự phát, bệnh thấp khớp, viêm mạch, viêm màng mạch nhỏ, ung thư, bệnh ghép chống chủ do truyền máu (graft-versus-host disease), bằng cách cung cấp cho bệnh nhân cần điều trị kháng thể kháng IL-25 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được được bộc lộ ở bất kỳ đâu trong sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa các chứng viêm khác, các bệnh tim mạch, bệnh của hệ thần kinh trung ương, cơn đau, viêm khớp (viêm khớp dạng thấp, viêm xương khớp, viêm khớp vẩy nến, v.v.), viêm động mạch tế bào khổng lồ, viêm mạch, viêm mạch nói chung, ban xuất huyết Henoch-Schonlei, đa xơ cứng, lupus ban đỏ, và hội chứng Sjogren.

Trong các phương pháp điều trị bệnh được mô tả ở đây, kháng thể kháng IL-25 có thể được cung cấp theo liệu pháp đơn (tức là, chỉ cung cấp một tác nhân trị liệu) hoặc được cung cấp liệu pháp kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung (các ví dụ đã được mô tả trong sáng chế).

Liệu pháp kết hợp và dược phẩm

Sáng chế bao gồm dược phẩm và dược phẩm trị liệu chứa kháng thể kháng IL-25 bất kỳ được mô tả ở đây kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung, và các phương pháp điều trị bao gồm cung cấp liệu pháp kết hợp đã nêu cho bệnh nhân cần điều trị.

Kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có thể được bào chế cùng với và/hoặc được cung cấp kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm, ví dụ, chất đối kháng IL-4 hoặc IL-4R, ví dụ, kháng thể kháng IL-4 hoặc kháng thể kháng IL-4R, chất đối kháng IL-13, chẳng hạn như, ví dụ, kháng thể kháng IL-13 hoặc kháng thể kháng IL-13R, chất đối kháng IL-6 hoặc IL-6R, ví dụ, kháng thể kháng IL-6 hoặc kháng thể kháng IL-6R (xem ví dụ trong bằng sáng chế US7,582,298), chất đối kháng kháng IL-1, ví dụ rilonacept, chất đối kháng TNF, ví dụ,

etanercept (ENBREL™), chất đối kháng IgE, và một chất đối kháng IL-5, IL-8, IL-9, IL-17, IL-17Ra, IL-22, TSLP và IL-33.

Trong trường hợp điều trị hen suyễn và các tình trạng bệnh liên quan, thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung có thể chọn từ nhóm bao gồm: chất đối kháng beta2- có tác dụng lâu dài (LABA, *ví dụ*, salmeterol hoặc formoterol), corticosteroid dạng hít (ICS, *ví dụ*, fluticasone hoặc budesonid), tổ hợp bao gồm LABA + ICS (*ví dụ*, fluticasone + salmeterol [*ví dụ*, ADVAIR® (GlaxoSmithKline)]; hoặc budesonid + formoterol [*ví dụ*, SYMBICORT® (AstraZeneca)]), corticosteroid tại chỗ (*ví dụ*, đường miệng hoặc trong tĩnh mạch), methylxanthin, nedocromil sodium, cromolyn sodium, chất đối kháng (*ví dụ*, kháng thể) kháng một hoặc nhiều các xytokin và/hoặc thụ thể sau đây của chúng: IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17, IL-33, TSLP và tổ hợp của chúng.

Trong trường hợp điều trị bệnh viêm da cơ địa hoặc các tình trạng bệnh liên quan, các thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung sẽ được chọn từ nhóm bao gồm: corticosteroid tại chỗ (TCS, *ví dụ*, hydrocortison, betamethason valerat, betamethason dipropionat, diflucortolon valerat, hydrocortison-17-butytrat, mometason furoat, methylprednisolon aceponat, clobetasol propionat, halcinonit, clobetasol butytrat, và triamcinolon axetonit), tacrolimus, pimecrolimus, cyclosporin, azathioprin, metotrexat, cromolyn natri, chất ức chế proteinaza, chất đối kháng (*ví dụ*, kháng thể) kháng một hoặc nhiều xytokin và/hoặc thụ thể sau đây của chúng: IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-33, TSLP và tổ hợp của chúng. Theo các phương án nhất định trong khía cạnh này của sáng chế, kháng thể kháng IL-25 được cung cấp cho đối tượng cần điều trị kết hợp với một liệu pháp điều trị không cần dùng thuốc, chẳng hạn như liệu pháp ánh sáng tử ngoại.

Trong trường hợp điều trị bệnh viêm phổi tắc nghẽn mãn tính (COPD), các thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung sẽ được chọn từ nhóm bao gồm: chất chủ vận beta2, chất chống tiết cholin, kháng thể IL-5 (*ví dụ*, mepolizumab), hoặc kháng thể IL-13 (*ví dụ*, lebrukuzimab). Ví dụ, các chất có thể được sử dụng kết hợp với các sáng chế theo sáng chế để điều trị bệnh viêm phổi tắc nghẽn mãn tính có thể bao gồm một hoặc nhiều chất sau đây: indacaterol (chất chủ vận beta2), glycopyrronium (chất kích thích hệ muscarin), tiotropium (chất chống tiết cholin), aclidinium (chất ức chế hệ muscarin), umeclidinium bromit (chất chống tiết cholin), hoặc vilanterol (chất chủ vận beta2 có tác dụng lâu dài). Các chất khác có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể theo để điều

trị bệnh viêm phổi tắc nghẽn mãn tính bao gồm chất ức chế enzym phosphodiesteraza (ví dụ, theophyllin, roflumilast, cilomilast), opioid nội sinh, hoặc chất đối kháng beta-giải phóng adrenali (chất chẹn beta).

Trong trường hợp điều trị bệnh viêm mạch, cụ thể là, hội chứng Churg-Strauss (Churg-Strauss Syndrome - CSS), các thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung sẽ được chọn từ steroid, corticosteroid và chất ức chế miễn dịch (ví dụ, cyclophosphamid).

Trong trường hợp điều trị dị ứng, kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với bất kỳ liệu pháp tạm thời sử dụng để điều trị đáp ứng dị ứng, hoặc có thể được sử dụng liệu pháp miễn dịch trị liệu tiêu chuẩn (standard immunotherapy - SIT) để xử lý các điều kiện dị ứng, hoặc có thể được sử dụng để cải thiện ít nhất một triệu chứng bệnh liên quan đến đáp ứng dị ứng. Ví dụ, thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung có thể được chọn từ chất kháng histamin, steroid, corticosteroid, chất chống sung huyết, chất ức chế leukotrien, và chất ức chế dưỡng bào. Các tác nhân khác có thể được sử dụng để điều trị dị ứng có thể là một chất đối kháng kháng một hoặc nhiều xytokin và/hoặc thụ thể của nó sau đây: IL-1, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17, TSLP, IL-33, hoặc chất đối kháng TNF.

Kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có thể được cung cấp và/hoặc bào chế kết hợp với chất kháng virus, thuốc kháng sinh, chất giảm đau, khí oxy, chất chống oxy hóa, chất ức chế COX, chất bảo vệ tim, chelat kim loại, IFN-gamma, và/hoặc các NSAID.

Các thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung, ví dụ, bất kỳ tác nhân được đã liệt kê ở trên hoặc các dẫn xuất của nó, có thể được cung cấp trước, đồng thời, hoặc ngay sau khi cung cấp kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế; (đối với các mục đích của sáng chế được bộc lộ, phác đồ cung cấp thuốc như được được xem là cung cấp kháng thể kháng IL-25 “kết hợp với” thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung). Sáng chế bao gồm được phẩm trong đó kháng thể kháng IL-25 trong sáng chế đồng công thức với một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung được mô tả ở đây.

Phác đồ dùng thuốc

Theo như các phương án nhất định của sáng chế, các liều dùng kháng thể kháng

IL-25 (hoặc được phẩm có chứa kháng thể kháng IL-25 kết hợp với chất hoạt hóa tri liệu bổ sung bất kỳ được đề cập ở đây) có thể được cung cấp cho bệnh nhân trong thời gian nhất định. Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc cung cấp tuần tự cho bệnh nhân các liều kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, “cung cấp tuần tự” có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng IL-25 được cung cấp cho bệnh nhân tại các thời điểm khác nhau, ví dụ, được phẩm được cung cấp vào các ngày khác nhau cách nhau một khoảng thời gian định trước (ví dụ, giờ, ngày, tuần, tháng). Sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm cung cấp tuần tự cho bệnh nhân liều đơn kháng thể kháng IL-25 thứ nhất, sau đó cung cấp một hoặc nhiều liều kháng thể kháng IL-25 thứ hai, và sau đó cung cấp tùy ý một hoặc nhiều liều kháng thể kháng IL-25 thứ ba.

Các thuật ngữ “liều thứ nhất”, “liều thứ hai”, và “liều thứ ba”, đề cập đến trình tự thời gian cung cấp kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế. Do đó, “liều thứ nhất” là liều được cung cấp tại thời điểm bắt đầu phác đồ điều trị (còn được gọi là “liều cơ sở”); “liều thứ hai” là liều được cung cấp sau liều thứ nhất; và “liều thứ ba” là liều được cung cấp sau liều thứ hai. Liều thứ nhất, thứ hai và thứ ba có thể chứa cùng một lượng kháng thể kháng IL-25, nhưng thường khác nhau về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, lượng kháng thể kháng IL-25 trong liều thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba là khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh lên hoặc xuống sao cho phù hợp) trong suốt quá trình điều trị. Theo các phương án nhất định, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được cung cấp tại thời điểm bắt đầu phác đồ điều trị, được gọi là “liều nạp” sau đó là các liều tiếp theo được cung cấp trên cơ sở ít thường xuyên hơn (ví dụ, “liều duy trì”).

Theo các phương án tiêu biểu nhất định của sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc thứ ba được cung cấp từ 1 đến 26 (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc nhiều hơn) tuần ngay sau liều mới cung cấp. Thuật ngữ “liều mới cung cấp”, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là, trong trình tự cung cấp nhiều liều, liều kháng thể kháng IL-25 được cung cấp cho bệnh nhân trước khi cung cấp liều rất gần tiếp theo mà không cung cấp liều khác xen vào giữa.

Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc bước cung cấp cho

bệnh nhân số lượng bất kỳ của liều thứ hai và/hoặc thứ ba của kháng thể kháng IL-25. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chỉ có duy nhất một liều thứ hai được cung cấp cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ hai được cung cấp cho bệnh nhân. Ngoài ra, theo các phương án nhất định, chỉ có duy nhất một liều thứ ba được cung cấp cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ ba được cung cấp cho bệnh nhân. Phác đồ cung cấp thuốc có thể được cung cấp ở thời điểm bất kỳ không xác định của đối tượng cụ thể, hoặc cho đến khi điều trị này không còn cần thiết hoặc không thuận lợi nữa.

Theo phương án bao gồm nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được cung cấp ở cùng một tần suất như liều thứ hai khác. Ví dụ, mỗi liều thứ hai có thể được cung cấp cho bệnh nhân từ 1 tuần đến 2 tuần hoặc 1 tháng đến 2 tháng sau liều mới cung cấp. Tương tự, trong phương án bao gồm nhiều liều thứ ba, mỗi liều thứ ba có thể được cung cấp ở cùng một tần suất như các liều thứ ba khác. Ví dụ, mỗi liều thứ ba có thể được cung cấp cho bệnh nhân từ 2 tuần đến 12 tuần sau liều mới cung cấp. Theo các phương án nhất định của sáng chế, tần suất cung cấp liều thứ hai và/hoặc thứ ba cho bệnh nhân có thể thay đổi trong suốt quá trình điều trị. Tần suất cung cấp cũng có thể được bác sĩ điều chỉnh trong quá trình điều trị phụ thuộc vào nhu cầu của từng bệnh nhân sau khi khám lâm sàng.

Sáng chế bao gồm các phác đồ cung cấp thuốc, trong đó, 2 đến 6 liều nạp được cung cấp cho bệnh nhân theo tần suất thứ nhất (ví dụ, một tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, một tháng một lần, hai tháng một lần, v.v.), sau đó cung cấp hai hoặc nhiều liều duy trì cho bệnh nhân trên với tần suất ít thường xuyên hơn. Ví dụ, theo như khía cạnh này của sáng chế, nếu liều nạp được cung cấp với tần suất một tháng một lần thì liều duy trì có thể được cung cấp cho bệnh nhân sáu tuần một lần, hai tháng một lần, ba tháng một lần, v.v..

Sử dụng kháng thể trong chẩn đoán

Các kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có thể cũng được sử dụng để phát hiện và/hoặc định lượng IL-25, hoặc các tế bào biểu hiện IL-25 trong mẫu, ví dụ, sử dụng để chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng IL-25, hoặc mảnh của nó, có thể được sử dụng để

chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng bệnh được đặc trưng bởi các biểu hiện khác thường (ví dụ, việc biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, thiếu biểu hiện, v.v.) của IL-25. Các xét nghiệm chẩn đoán IL-25 có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu, thu mẫu từ bệnh nhân, tiếp xúc với kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế, trong đó, kháng thể kháng IL-25 được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử báo cáo. Ngoài ra, kháng thể kháng IL-25 không được đánh dấu có thể được sử dụng trong các ứng dụng chuẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai mà chính nó đã tự được đánh dấu theo cách phát hiện được. Chất đánh dấu hoặc phân tử báo cáo có thể phát hiện được có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; phản huỳnh quang hoặc huỳnh quang hóa như huỳnh quang isothiocyanat, hoặc rhodamin; hoặc một enzym như alkaline phosphatase, beta-galactosidase, horseradish peroxidase, hoặc luciferase. Ví dụ về thử nghiệm đặc hiệu có thể sử dụng để phát hiện hoặc định lượng IL-25 trong một mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA), xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Mẫu có thể dùng trong thử nghiệm chuẩn đoán IL-25 theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch lỏng bất kỳ thu được từ cơ thể bệnh nhân, mà chứa lượng có thể phát hiện được của protein IL-25 hoặc mảnh của nó, dưới điều kiện bình thường hoặc điều kiện bệnh lý. Nhìn chung, mức IL-25 trong một mẫu cụ thể thu được từ bệnh nhân khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến hoạt động hoặc lượng IL-25 bất thường) bước đầu sẽ được định lượng trước để thiết lập đường cơ sở, hoặc đường tiêu chuẩn, của lượng IL-25. Đường cơ sở của lượng IL-25 sau đó được so sánh với lượng IL-25 được định lượng trong các mẫu thu được từ các đối tượng nghi ngờ mắc bệnh hoặc triệu chứng có liên quan đến IL-25.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra nhằm mục đích cung cấp cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập những mô tả và bộc lộ đầy đủ nhất về cách thức tiến hành và sử dụng các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế, và không làm giới hạn phạm vi cái các tác giả xem như sáng chế của họ. Các tác giả đã rất cố gắng để đảm bảo độ chính xác của các số liệu được sử dụng (ví dụ, số lượng, nhiệt độ, v.v.) tuy nhiên vẫn còn một số sai sót thực nghiệm và sai số. Trừ khi

chỉ định khác, các phần là các phần trọng lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là độ C, và áp suất là áp suất khí quyển hoặc gần áp suất khí quyển.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể kháng IL-25

Các kháng thể kháng IL-25 thu được bằng cách gây miễn dịch chuột VELOCIMMUNE® (tức là chuột được thiết kế di truyền có chứa ADN mã hóa cho vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa và chuỗi nặng globulin miễn dịch người) với IL-25 người tái tổ hợp (R & D Systems, Catalog No. 1258). Đáp ứng miễn dịch kháng thể được theo dõi bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu IL-25. Khi đạt được đáp ứng miễn dịch mong muốn, các tế bào đơn nhân lách được thu hoạch và kết hợp với các tế bào tủy xương chuột để duy trì khả năng sống sót của chúng và để tạo ra các dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai được sàng lọc và chọn lọc để nhận biết dòng tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu IL-25. Sử dụng kỹ thuật này thu được một số kháng thể kháng IL-25 (tức là, kháng thể chứa vùng biến đổi người và vùng hằng định chuột). Ngoài ra, một vài kháng thể kháng IL-25 người nguyên vẹn được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính kháng nguyên không dung hợp với tế bào tủy xương, như được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ số US 2007/0280945A1.

Đặc tính sinh học cụ thể của kháng thể kháng IL-25 lấy làm ví dụ được tạo ra tương ứng với các phương pháp trong ví dụ này được mô tả chi tiết trong các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 2: Trình tự axit nucleic và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng

Bảng 1 trình bày trình tự nhận biết axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và vùng CDR của kháng thể kháng IL-25 được chọn trong sáng chế. Trình tự nhận biết axit nucleic tương ứng được trình bày trong bảng 2.

Bảng 1: Trình tự nhận biết axit amin

SEQ ID NO:										
Kí hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3		
H1M11009N	2	4	6	8	10	12	14	16		
H2M10690N	18	20	22	24	26	28	30	32		
H2M11008N	34	36	38	40	42	44	46	48		
H4H10861P	50	52	54	56	58	60	62	64		
H4H10862P	66	68	70	72	74	76	78	80		
H4H10863P	82	84	86	88	90	92	94	96		
H4H10864P	98	100	102	104	106	108	110	112		
H4H10871P	114	116	118	120	122	124	126	128		
H4H10876P	130	132	134	136	138	140	142	144		
H4H10883P	146	148	150	152	154	156	158	160		
H4H10897P	162	164	166	168	170	172	174	176		
H4H10900P	178	180	182	184	186	188	190	192		
H4H10901P	194	196	198	200	202	204	206	208		
H4H10903P	210	212	214	216	218	220	222	224		
H4H10905P	226	228	230	232	234	236	238	240		
H4H10906P	242	244	246	248	250	252	254	256		
H4H10907P	258	260	262	264	266	268	270	272		

Bảng 2: Trình tự nhận biết axit nucleic

SEQ ID NO:									
Kí hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	
H1M11009N	1	3	5	7	9	11	13	15	
H2M10690N	17	19	21	23	25	27	29	31	
H2M11008N	33	35	37	39	41	43	45	47	
H4H10861P	49	51	53	55	57	59	61	63	
H4H10862P	65	67	69	71	73	75	77	79	
H4H10863P	81	83	85	87	89	91	93	95	
H4H10864P	97	99	101	103	105	107	109	111	
H4H10871P	113	115	117	119	121	123	125	127	
H4H10876P	129	131	133	135	137	139	141	143	
H4H10883P	145	147	149	151	153	155	157	159	
H4H10897P	161	163	165	167	169	171	173	175	
H4H10900P	177	179	181	183	185	187	189	191	
H4H10901P	193	195	197	199	201	203	205	207	
H4H10903P	209	211	213	215	217	219	221	223	
H4H10905P	225	227	229	231	233	235	237	239	
H4H10906P	241	243	245	247	249	251	253	255	
H4H10907P	257	259	261	263	265	267	269	271	

Các kháng thể thường được đề cập đến ở đây theo cách đặt tên như sau: tiền tố Fc (ví dụ, "H1M", "H2M", "H4H", v.v.) tiếp đến là số hiệu nhận biết (ví dụ, "11009", "10690", "10861", v.v.), sau đó một là hậu tố "P" hoặc "N", như được trình bày trong bảng 1 và bảng 2. Do đó, theo như cách đặt tên này, kháng thể được đề cập đến ở đây, ví dụ như "H1M11009N", "H2M10690N", "H4H10861P", v.v.. Các tiền tố H1M, H2M và H4H trong ký hiệu kháng thể được sử dụng ở đây để chỉ isotyp vùng Fc cụ thể trong kháng thể. Ví dụ, một kháng thể "H1M" có Fc IgG1 của chuột, kháng thể "H2M" có Fc IgG2 chuột, và kháng thể "H4M" có Fc IgG4 của chuột (tất cả các vùng biến đổi toàn bộ là của người do được ký hiệu bằng chữ 'H' đầu tiên trong ký hiệu kháng thể). Theo đánh giá của những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, kháng thể có isotyp Fc cụ thể có thể được biến đổi thành kháng thể có isotyp Fc khác (ví dụ, một kháng thể chứa Fc IgG1 có thể chuyển đổi (biến đổi) thành kháng thể chứa IgG4 người, v.v.) nhưng trong mọi trường hợp, các vùng biến đổi (có chứa các vùng CDR)-được chỉ ra bằng các số hiệu nhận biết như đã trình bày trong bảng 1 và 2 sẽ vẫn được giữ nguyên như cũ, và các đặc tính liên kết được kỳ vọng là sẽ giống hệt hoặc tương đối giống không phụ thuộc vào bản chất của vùng Fc.

Kháng thể so sánh được sử dụng trong các ví dụ sau đây

Kháng thể kháng IL-25 so sánh trong các ví dụ sau đây được dùng cho mục đích so sánh. Cụ thể là, "kháng thể so sánh 1" là một kháng thể kháng IL-25 có các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của các vùng tương ứng của "RH2.5_R71V," như được trình bày trong bằng sáng chế Mỹ US8,658,169.

Ví dụ 3: Ái lực liên kết thu được từ cộng hưởng plasmon bề mặt và hằng số động lực học của các kháng thể đơn dòng kháng IL-25 người

Hằng số phân ly cân bằng (các giá trị K_D) để IL-25 liên kết với kháng thể kháng IL-25 đã tinh sạch được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực trên thiết bị Biacore 4000 (GE Healthcare). Bề mặt đầu dò Biacore được tạo ra bằng cách bất cặp amin với một kháng thể đa dòng thô kháng kháng thể chuột (GE Healthcare, # BR-1008-38) hoặc kháng thể đơn dòng chuột kháng Fc người (GE Healthcare, # BR-1008-39) để bắt giữ kháng thể kháng IL-25 biểu hiện các vùng hằng

định khác. Tất cả các nghiên cứu gắn Biacore được tiến hành bằng đệm chạy HBST (0,01M HEPES pH 7,4; 0,15M NaCl, 3mM EDTA, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích). Tất cả các chất phản ứng IL-25 được biểu hiện với đuôi myc-myc-hexahistidin ở đầu C (được đề cập đến ở đây là "IL-25-MMH"). Các nồng độ khác nhau của IL-25-MMH (SEQ ID NO:273) người, IL-25-MMH (SEQ ID NO:274) khỉ, IL-25-MMH (SEQ ID NO:275) chuột, và IL-25-MMH (SEQ ID NO:276) thỏ được đã xử lý sơ bộ trong đệm chạy HBST (có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 nM đến 3,7 nM, pha loãng 3 lần), được tiêm lên bề mặt bắt giữ kháng thể kháng IL-25 với vận tốc dòng chảy là 30 μ L/phút. Việc kết hợp tất cả các chất phản ứng IL-25-MMH với mỗi kháng thể đơn dòng bị bắt giữ được theo dõi trong 4 phút và sự phân ly của chúng trong đệm chạy HBST cũng được quan sát trong 10 phút. Tất cả các thử nghiệm động lực học liên kết được thực hiện ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C như được trình bày trong các bảng bên dưới. Hằng số tỷ lệ liên kết (k_a) và phân ly động học (k_d) được xác định bằng cách điều chỉnh sensorgram thời gian thực theo tỉ lệ 1:1 với mô hình liên kết sử dụng phần mềm điều chỉnh đường cong Scrubber 2.0c. Các hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán hủy ($t_{1/2}$) được tính toán từ hằng số tỷ lệ động học theo công thức như sau: K_D (M) = k_d / k_a và $t_{1/2}$ (phút) = $(\ln 2) / (60 * k_d)$. Các tham số động học liên kết của IL-25-MMH người, khỉ, chuột và thỏ liên kết với kháng thể kháng IL-25 tại nhiệt độ 25°C và 37°C được trình bày trong các bảng từ bảng 3 đến bảng 10. ("NB" là kí hiệu cho không quan sát thấy liên kết dưới các điều kiện thử nghiệm; IC là kí hiệu không xác định liên kết do liên kết bề mặt không đặc hiệu với bề mặt kháng mFc).

Bảng 3: Các tham số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-25 liên kết với IL-25 người tại nhiệt độ 25°C

Kháng thể	Lượng kháng thể bị bắt giữ (RU)	100nM IL-25-MMH người đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10900P	$79 \pm 0,44$	43	$1,74E+06$	$2,75E-05$	$1,58E-11$	421
H4H10864P	$136 \pm 0,55$	75	$2,68E+06$	$4,51E-05$	$1,68E-11$	256
H4H10901P	$109 \pm 0,61$	62	$2,28E+06$	$5,79E-05$	$2,54E-11$	199
H4H10861P	$83 \pm 0,33$	47	$2,01E+06$	$2,34E-05$	$1,16E-11$	493
H4H10862P	$104 \pm 0,61$	56	$1,88E+06$	$6,49E-05$	$3,44E-11$	178
H4H10883P	$99 \pm 0,37$	56	$7,06E+05$	$1,00E-05$	$1,42E-11$	1155
H4H10903P	$96 \pm 0,45$	54	$8,97E+05$	$1,73E-05$	$1,92E-11$	670
H4H10907P	$104 \pm 0,26$	40	$7,36E+05$	$6,50E-05$	$8,83E-11$	178
H4H10871P	$94 \pm 0,37$	38	$7,49E+05$	$6,38E-05$	$8,51E-11$	181
H4H10897P	$100 \pm 2,61$	39	$6,23E+05$	$7,87E-05$	$1,26E-10$	147
H4H10876P	$127 \pm 0,47$	45	$3,86E+05$	$4,78E-05$	$1,24E-10$	242
H4H10905P	$136 \pm 0,48$	49	$4,78E+05$	$1,09E-04$	$2,28E-10$	106
H4H10863P	$96 \pm 0,81$	34	$2,60E+05$	$7,25E-05$	$2,79E-10$	159
H2aM11008N	$111 \pm 0,75$	48	$4,82E+05$	$2,10E-04$	$4,35E-10$	55
H4H10906P	$106 \pm 0,30$	61	$1,64E+06$	$4,32E-05$	$2,64E-11$	268
H1M11009N	$96 \pm 2,13$	30	$2,42E+05$	$3,04E-03$	$1,25E-08$	4
H2aM10690N	$159 \pm 1,43$	32	$8,02E+04$	$2,90E-03$	$3,62E-08$	4
Kháng thể so sánh 1	$241 \pm 0,62$	79	$9,27E+05$	$1,12E-04$	$1,20E-10$	103

Bảng 4: Các tham số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-25 liên kết với IL-25 người tại nhiệt độ 37°C

Kháng thể	Lượng kháng thể bị bắt giữ (RU)	100nM IL-25-MMH người đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10900P	92 ± 2,04	51	2,83E+06	9,91E-05	3,50E-11	117
H4H10864P	166 ± 2,68	94	3,73E+06	1,96E-04	5,26E-11	59
H4H10901P	121 ± 2,5	65	3,19E+06	2,08E-04	6,51E-11	56
H4H10861P	110 ± 2,49	63	2,91E+06	7,80E-05	2,68E-11	148
H4H10862P	134 ± 2,03	72	2,39E+06	2,10E-04	8,79E-11	55
H4H10883P	131 ± 3,8	74	1,58E+06	4,80E-05	3,04E-11	241
H4H10903P	111 ± 1,81	65	1,53E+06	7,75E-05	5,08E-11	149
H4H10907P	119 ± 1,72	47	1,19E+06	4,45E-05	3,75E-11	259
H4H10871P	126 ± 2,41	49	1,15E+06	3,18E-05	2,76E-11	363
H4H10897P	132 ± 2,4	48	1,04E+06	2,26E-04	2,18E-10	51
H4H10876P	170 ± 3,02	60	6,28E+05	5,93E-05	9,44E-11	195
H4H10905P	161 ± 2,46	55	8,09E+05	1,20E-04	1,49E-10	96
H4H10863P	130 ± 2,14	46	6,06E+05	7,78E-05	1,28E-10	149
H2aM11008N	130 ± 1,16	60	7,34E+05	7,93E-04	1,08E-09	15
H4H10906P	124 ± 2,05	72	2,90E+06	1,54E-04	5,29E-11	75
H1M11009N	103 ± 0,84	30	3,93E+05	8,29E-03	2,11E-08	1,4
H2aM10690N	196 ± 1,28	39	1,37E+05	8,44E-03	6,14E-08	1,4
Kháng thể so sánh 1	301 ± 8,01	99	1,36E+06	1,82E-04	1,34E-10	64

Bảng 5: Các tham số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-25 liên kết với IL-25 khi tại nhiệt độ 25°C

Kháng thể	Lượng kháng thể bị bắt giữ (RU)	100nM IL-25-MMH khi đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10900P	$78 \pm 0,23$	45	$2,94E+06$	$1,18E-05$	$4,02E-12$	980
H4H10864P	$135 \pm 0,85$	78	$3,68E+06$	$4,70E-05$	$1,28E-11$	246
H4H10901P	$108 \pm 0,21$	64	$2,63E+06$	$3,06E-05$	$1,16E-11$	377
H4H10861P	$83 \pm 0,18$	48	$3,26E+06$	$1,48E-05$	$4,54E-12$	779
H4H10862P	$104 \pm 0,69$	58	$2,00E+06$	$5,10E-05$	$2,55E-11$	226
H4H10883P	$99 \pm 0,30$	58	$1,04E+06$	$1,00E-05$	$9,65E-12$	1155
H4H10903P	$96 \pm 0,27$	57	$1,15E+06$	$1,00E-05$	$8,71E-12$	1155
H4H10907P	$104 \pm 0,34$	43	$1,39E+06$	$6,74E-05$	$4,85E-11$	171
H4H10871P	$94 \pm 0,28$	42	$6,28E+05$	$6,06E-05$	$9,65E-11$	191
H4H10897P	$101 \pm 0,47$	42	$1,13E+06$	$8,43E-05$	$7,49E-11$	137
H4H10876P	$126 \pm 0,38$	51	$3,29E+05$	$7,18E-05$	$2,18E-10$	161
H4H10905P	$136 \pm 0,45$	54	$4,17E+05$	$7,77E-05$	$1,86E-10$	149
H4H10863P	$96 \pm 0,36$	39	$3,43E+05$	$6,83E-05$	$1,99E-10$	169
H2aM11008N	$109 \pm 1,04$	64	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H10906P	$106 \pm 0,42$	61	$2,09E+06$	$2,95E-05$	$1,41E-11$	391
H1M11009N	$93 \pm 0,38$	17	IC*	IC*	IC*	IC*
H2aM10690N	$156 \pm 0,64$	46	IC*	IC*	IC*	IC*
Kháng thể so sánh I	$267 \pm 0,76$	100	$8,60E+05$	$7,52E-05$	$8,80E-11$	154

* IC là kí hiệu không xác định liên kết do liên kết bề mặt không đặc hiệu với bề mặt kháng mFc

Bảng 6: các tham số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-25 liên kết với IL-25 khi tại nhiệt độ 37°C

Kháng thể	Lượng kháng thể bị bắt giữ (RU)	100nM IL-25-MMH khi đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10900P	$86 \pm 1,48$	50	$3,07E+06$	$7,49E-05$	$2,44E-11$	154
H4H10864P	$157 \pm 2,66$	94	$4,35E+06$	$1,90E-04$	$4,36E-11$	61
H4H10901P	$114 \pm 1,68$	64	$3,55E+06$	$1,65E-04$	$4,64E-11$	70
H4H10861P	$103 \pm 1,86$	61	$3,03E+06$	$7,14E-05$	$2,36E-11$	162
H4H10862P	$127 \pm 2,3$	70	$2,93E+06$	$1,72E-04$	$5,89E-11$	67
H4H10883P	$122 \pm 2,21$	72	$1,75E+06$	$4,18E-05$	$2,39E-11$	276
H4H10903P	$105 \pm 1,52$	66	$1,76E+06$	$6,59E-05$	$3,74E-11$	175
H4H10907P	$112 \pm 1,68$	50	$1,51E+06$	$1,01E-04$	$6,71E-11$	114
H4H10871P	$118 \pm 2,28$	54	$1,35E+06$	$7,40E-05$	$5,46E-11$	156
H4H10897P	$124 \pm 1,98$	49	$1,22E+06$	$2,31E-04$	$1,89E-10$	50
H4H10876P	$162 \pm 2,24$	64	$5,24E+05$	$5,45E-05$	$1,04E-10$	212
H4H10905P	$154 \pm 1,5$	59	$6,68E+05$	$9,01E-05$	$1,35E-10$	128
H4H10863P	$122 \pm 2,26$	51	$1,18E+06$	$8,07E-05$	$6,85E-11$	143
H2aM11008N	127 ± 1	80	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H10906P	$118 \pm 1,41$	73	$3,01E+06$	$1,30E-04$	$4,31E-11$	89
H1M11009N	$101 \pm 0,94$	23	IC*	IC*	IC*	IC*
H2aM10690N	$193 \pm 0,78$	49	IC*	IC*	IC*	IC*
Kháng thể so sánh 1	$335 \pm 7,64$	124	$1,32E+06$	$6,24E-05$	$4,73E-11$	185

* IC là kí hiệu liên kết không xác định liên kết do liên kết bề mặt không đặc hiệu với bề mặt kháng mFc

Bảng 7: các tham số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-25 liên kết với IL-25 chuột nhà tại nhiệt độ 25°C

Kháng thể	Lượng kháng thể bị bắt giữ (RU)	100nM IL-25-MMH chuột nhà đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10900P	$78 \pm 0,48$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	$135 \pm 0,14$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	$108 \pm 0,33$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	$82 \pm 0,08$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	$104 \pm 0,08$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	$99 \pm 0,17$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	$95 \pm 0,16$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	$104 \pm 0,15$	10	$1,96E+05$	$1,15E-02$	$5,87E-08$	1,0
H4H10871P	$94 \pm 0,04$	30	$1,21E+05$	$1,11E-04$	$9,18E-10$	104
H4H10897P	$101 \pm 0,06$	20	$1,48E+05$	$1,04E-03$	$7,05E-09$	11
H4H10876P	$125 \pm 0,10$	40	$1,74E+05$	$9,89E-05$	$5,70E-10$	117
H4H10905P	$135 \pm 0,23$	43	$1,24E+05$	$1,45E-04$	$1,17E-09$	80
H4H10863P	$95 \pm 0,10$	22	$5,57E+04$	$1,49E-04$	$2,67E-09$	78
H2aM11008N	$108 \pm 0,33$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	$106 \pm 0,50$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H1M11009N	$92 \pm 0,25$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	$156 \pm 0,23$	17	$3,88E+04$	$3,19E-03$	$8,23E-08$	4
Kháng thể so sánh 1	$271 \pm 0,69$	88	$5,71E+05$	$1,17E-04$	$2,05E-10$	99

*NB = không quan sát thấy liên kết dưới các điều kiện thử nghiệm

Bảng 8: Các tham số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-25 liên kết với IL-25 chuột nhà tại nhiệt độ 37°C

Kháng thể	Lượng kháng thể bị bất giữ (RU)	100nM IL-25-MMH chuột nhà đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10900P	$84 \pm 0,49$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	$154 \pm 0,42$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	$111 \pm 0,4$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	$99 \pm 0,69$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	$123 \pm 0,13$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	$117 \pm 0,47$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	$102 \pm 0,47$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	$109 \pm 0,02$	8	$2,75E+05$	$3,76E-02$	$1,37E-07$	0,3
H4H10871P	$114 \pm 0,88$	41	$3,22E+05$	$8,29E-05$	$2,58E-10$	139
H4H10897P	$121 \pm 0,47$	17	$1,77E+05$	$6,41E-03$	$3,62E-08$	1,8
H4H10876P	$157 \pm 0,58$	51	$3,69E+05$	$8,97E-05$	$2,43E-10$	129
H4H10905P	$151 \pm 0,14$	47	$4,03E+05$	$1,78E-04$	$4,41E-10$	65
H4H10863P	$118 \pm 1,04$	37	$1,34E+05$	$1,53E-04$	$1,14E-09$	76
H2aM11008N	$126 \pm 0,89$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	$114 \pm 1,18$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H1M11009N	$100 \pm 0,2$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	$192 \pm 0,85$	27	$9,53E+04$	$7,78E-03$	$8,17E-08$	1,5
Kháng thể so sánh 1	$332 \pm 8,16$	111	$1,01E+06$	$8,16E-05$	$8,08E-11$	142

*NB = không quan sát thấy liên kết dưới các điều kiện thử nghiệm

Bảng 9: Các tham số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-25 liên kết với IL-25 chuột nhất tại nhiệt độ 25°C

Kháng thể	Lượng kháng thể bị bắt giữ (RU)	100nM IL-25-MMH chuột nhất đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10900P	$78 \pm 0,06$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	$135 \pm 0,50$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	$108 \pm 0,15$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	$82 \pm 0,34$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	$103 \pm 0,46$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	$99 \pm 0,30$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	$95 \pm 0,43$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	$103 \pm 0,4$	10	2,20E+05	1,47E-02	6,69E-08	0,8
H4H10871P	$94 \pm 0,18$	37	5,48E+05	7,23E-05	1,32E-10	160
H4H10897P	$100 \pm 0,24$	23	3,33E+05	8,07E-04	2,42E-09	14
H4H10876P	$125 \pm 0,32$	45	2,59E+05	8,81E-05	3,41E-10	131
H4H10905P	$135 \pm 0,24$	45	1,67E+05	1,35E-04	8,10E-10	85
H4H10863P	$95 \pm 0,40$	34	1,53E+05	1,64E-04	1,07E-09	70
H2aM11008N	$107 \pm 0,23$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	$106 \pm 0,38$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H1M11009N	$92 \pm 0,26$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	$155 \pm 0,26$	18	9,18E+04	9,50E-03	1,03E-07	1,2
Kháng thể so sánh 1	$266 \pm 0,53$	91	9,27E+05	9,55E-05	1,03E-10	121

*NB = không quan sát thấy liên kết dưới các điều kiện thử nghiệm

Bảng 10: các tham số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-25 liên kết với IL-25 chuột nhất tại nhiệt độ 37°C

Kháng thể	Lượng kháng thể bị bắt giữ (RU)	100nM IL-25-MMH chuột nhất đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10900P	$82 \pm 0,55$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	$153 \pm 0,52$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	$110 \pm 0,53$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	$97 \pm 0,71$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	$121 \pm 1,02$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	$116 \pm 0,77$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	$100 \pm 0,77$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	$107 \pm 0,78$	8	$2,38E+05$	$2,04E-02$	$8,54E-08$	0,6
H4H10871P	$112 \pm 0,54$	45	$9,37E+05$	$5,64E-05$	$6,02E-11$	205
H4H10897P	$118 \pm 0,75$	22	$2,45E+05$	$6,01E-03$	$2,46E-08$	1,9
H4H10876P	$156 \pm 1,22$	53	$4,50E+05$	$1,07E-04$	$2,38E-10$	108
H4H10905P	$148 \pm 1,25$	49	$4,81E+05$	$1,81E-04$	$3,77E-10$	64
H4H10863P	$116 \pm 0,75$	41	$4,74E+05$	$3,41E-04$	$7,20E-10$	34
H2aM11008N	$125 \pm 0,2$	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	$113 \pm 0,73$	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H1M11009N	$99 \pm 0,5$	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	$191 \pm 0,58$	20	$1,68E+05$	$1,93E-02$	$1,15E-07$	0,6
Kháng thể so sánh 1	$325 \pm 8,52$	109	$1,59E+06$	$1,02E-04$	$6,42E-11$	113

*NB = không quan sát thấy liên kết dưới các điều kiện thử nghiệm

Tại nhiệt độ 25°C, các kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với IL-25 người có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 11,6 pM đến 36,2 nM, trong khi kháng thể so sánh 1 liên kết với IL-25 người có giá trị K_D là 120 pM (bảng 3). Tại nhiệt độ 37°C, các kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với IL-25 người có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 26,8 pM đến 61,4 nM, trong khi kháng thể so sánh 1 liên kết với IL-25 người có giá trị K_D là 134 pM (bảng 4). Tại nhiệt độ 25°C, 14 trên 17 kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với IL-25 khi có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 4,02 pM đến 218 pM, trong khi kháng thể so sánh 1 liên kết với IL-25 khi có giá trị K_D là 88,0 pM (bảng 5). Tại nhiệt độ 37°C, 14 trên 17 kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với IL-25 khi có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 23,6 pM đến 189 pM, trong khi kháng thể so sánh 1 liên kết với IL-25 khi có giá trị K_D là 47,3 pM (bảng 6). Có ba kháng thể trong sáng chế không chứng minh được sự liên kết với IL-25 khi tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C. Tại nhiệt độ 25°C, 14 trên 17 kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với IL-25 chuột có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 570 pM đến 82,3 nM, trong khi kháng thể so sánh 1 liên kết với IL-25 chuột có giá trị K_D là 205 pM (bảng 7). Tại nhiệt độ 37°C, 14 trên 17 kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với IL-25 chuột có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 243 pM đến 137 nM, trong khi kháng thể so sánh 1 liên kết với IL-25 khi có giá trị K_D là 80,8 pM (bảng 8). Có mười kháng thể theo sáng chế không chứng minh được khả năng liên kết với IL-25 tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C. Tại nhiệt độ 25°C, 14 trên 17 kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với IL-25 chuột nhất có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 132 pM đến 103 nM, trong khi kháng thể so sánh 1 liên kết với IL-25 chuột nhất có giá trị K_D là 103 pM (bảng 9). Tại nhiệt độ 37°C, 14 trên 17 kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế liên kết với IL-25 chuột nhất có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 60,2 pM đến 115 nM, trong khi kháng thể so sánh 1 liên kết với IL-25 chuột nhất có giá trị K_D là 64,2 pM (bảng 10). Mười kháng thể theo sáng chế không chứng minh được khả năng liên kết với IL-25 chuột nhất ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Ví dụ 4: Kháng thể kháng IL-25 cạnh tranh chéo

Cạnh tranh liên kết giữa các kháng thể đơn dòng kháng IL-25 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm giao thoa bio-layer không nhãn, thời gian thực thiết bị cảm biến sinh học QK384 (Pall ForteBio Corp.).

Toàn bộ thí nghiệm được tiến hành tại nhiệt độ 25°C trong đệm động học HBST

(HEPES 0,01M pH7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, BSA 0,1mg/ml) cùng với đĩa lắc tại vận tốc 1000 rpm. Để khẳng định liệu 2 kháng thể có khả năng cạnh tranh với nhau để gắn vào các quyết định kháng nguyên tương ứng của chúng trên IL-25 người tái tổ hợp biểu hiện một đuôi myc-myc-hexahistidin tại đầu C (hIL-25-MMH; SEQ ID NO:273), đầu tiên khoảng 0,5 đến 0,7 nm hIL-25-MMH bị bắt giữ trên kháng thể kháng Penta-His được phủ cảm biến sinh học Octet (Fortebio Inc, # 18-5079) bằng cách ngâm các cảm biến sinh học 5 phút trong các giếng chứa 4µg/mL dung dịch hIL-25-MMH. Sau đó, các cảm biến sinh học bắt giữ kháng nguyên được bão hòa với một kháng thể đơn dòng kháng IL-25 thứ nhất (được đề cập đến ở đây là mAb-1) bằng cách ngâm trong các giếng chứa 50 µg/mL dung dịch mAb-1 trong 5 phút. Tiếp theo, các cảm biến sinh học lần lượt được ngâm trong các giếng có chứa 50 µg/mL dung dịch kháng thể đơn dòng kháng IL-25 thứ hai (được đề cập đến ở đây là mAb-2). Các cảm biến sinh học được rửa trong đệm động học HBST giữa mỗi bước trong thí nghiệm. Đáp ứng liên kết thời gian thực được quan sát trong suốt quá trình tiến hành thí nghiệm và đáp ứng liên kết khi kết thúc mỗi bước đều được ghi lại. Đáp ứng liên kết của mAb-2 liên kết với tiền phức của hIL-25-MMH và mAb-1 được đem ra so sánh và hành vi cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng IL-25 khác cũng được xác định. Trong một vài trường hợp, các kháng thể kháng IL-25 không có khả năng bão hòa hoàn toàn bề mặt hIL-25-MMH bị bắt giữ, dẫn đến quan sát được lượng tín hiệu liên kết nhất định trong suốt quá trình tự cạnh tranh. Do đó, ma trận cạnh tranh chéo được sinh ra bằng cách trừ đi tín hiệu tự cạnh tranh từ liên kết mAb-2 cụ thể và mọi tín hiệu cạnh tranh nhỏ hơn 0 nm được ghi lại là 0nm. Các kết quả thu được được tóm tắt trong Fig. 1. Chia khóa để các trình tự mAb nhận biết và các kháng thể tương ứng và các đáp ứng liên kết được quan sát của hIL-25-MMH liên kết với đầu dò kháng Penta-His và của mAb-1 liên kết với hIL-25-mmh bị bắt giữ được trình bày trong bảng 11.

Bảng 11: Các kháng thể nhận biết tương ứng với các kháng thể kiểm tra trong thử nghiệm cạnh tranh chéo đã trình bày trong Fig.1

mAb nhận biết trình bày trong Fig.1	Kháng thể tương ứng	hIL-25-MMH bị bắt giữ (nm)	50ug/mL mAb-1 liên kết (nm)
1	H4H10883P	0,58 ± 0,02	0,7 ± 0,04
2	H4H10900P	0,55 ± 0,03	0,68 ± 0,04
3	H4H10901P	0,53 ± 0,03	0,67 ± 0,04
4	H4H10903P	0,8 ± 0,03	1,03 ± 0,03
5	H4H10861P	0,67 ± 0,02	0,88 ± 0,03
6	H4H10862P	0,66 ± 0,02	0,83 ± 0,03
7	H2aM11008N	0,71 ± 0,02	0,81 ± 0,03
8	H4H10864P	0,67 ± 0,02	0,84 ± 0,04
9	H4H10906P	0,71 ± 0,03	0,88 ± 0,03
10	H4H10897P	0,57 ± 0,02	1,12 ± 0,06
11	H4H10907P	0,73 ± 0,03	1,74 ± 0,06
12	H1M11009N	0,69 ± 0,02	1,42 ± 0,05
13	H2aM10690N	0,79 ± 0,02	1,38 ± 0,04
14	H4H10863P	0,71 ± 0,03	1,13 ± 0,04
15	H4H10871P	0,65 ± 0,02	1,12 ± 0,04
16	H4H10876P	0,62 ± 0,02	1,07 ± 0,05
17	H4H10905P	0,77 ± 0,03	1,59 ± 0,05
18	Kháng thể so sánh 1	0,69 ± 0,02	1,49 ± 0,07

Trong Fig. 1, các ô màu xám nhạt với phông chữ màu đen tượng trưng cho sự tự cạnh tranh. Các kháng thể cạnh tranh theo cả hai hướng, độc lập theo thứ tự liên kết được tượng trưng bằng các ô màu đen có phông chữ trắng. Không có sự cạnh tranh giữa các kháng thể gợi ý trong các quyết định kháng nguyên liên kết riêng biệt được tượng trưng bằng các ô màu trắng với phông chữ đen. Các ô màu xám đậm với phông chữ trắng tượng trưng cho các đáp ứng liên kết của các kháng thể đối chứng isotyp và chỉ có đậm.

Ví dụ này chỉ ra rằng, chỉ có một vài kháng thể theo sáng chế cạnh tranh chéo với một hoặc nhiều kháng thể khác theo sáng chế để liên kết với IL-25; trong khi các kháng thể nhất định theo sáng chế (ví dụ, H1M11009N [12]) cạnh tranh một ít hoặc không cạnh tranh với kháng thể thử nghiệm khác.

Ví dụ 5: Kháng thể kháng IL-25 cản trở IL-25 liên kết với IL-17RB

Khả năng cản trở IL-25 người liên kết với một trong số các thụ thể tự nhiên của nó, IL-17RB người của kháng thể kháng IL-25, đã được đo trong thử nghiệm cạnh tranh ELISA sandwich.

Vùng ngoại bào của protein IL-17RB người, biểu hiện đuôi Fc người ở đầu C (hIL17RB-hFc; R&D Systems, #1207-BR), được phủ 2 $\mu\text{g/mL}$ trên đĩa microlit 96 giếng trong đệm PBS qua đệm tại nhiệt độ 4°C. Sau đó, các vị trí liên kết không đặc hiệu bị ức chế sử dụng dung dịch BSA 0,5% (trọng lượng/thể tích) trong PBS. Nồng độ không đổi của 2 nM IL-25 người biểu hiện đuôi myc-myc-hexahistidin tại đầu C (hIL-25-MMH; SEQ ID NO:273) được thêm vào các dung dịch pha loãng hàng loạt của kháng thể sao cho nồng độ cuối cùng của kháng thể nằm trong khoảng từ 0 đến 200 nM. Hỗn hợp kháng thể/hIL-25-MMH được ủ trong 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng (RT) trước khi chuyển vào đĩa microlit đã được phủ hIL-17RB-hFc. Sau khi ủ một giờ tại nhiệt độ trong phòng, các giếng được rửa, và đĩa đã liên kết với hIL-25-MMH được phát hiện bằng enzym peroxidaza củ cải ngựa liên hợp với kháng thể đa dòng kháng myc (Novus Biologicals, #NB600-341). Các mẫu được triển khai với dung dịch TMB để tạo ra phản ứng có màu và sau đó dập tắt phản ứng bằng axit sulfuric 1M trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm trên máy đọc đĩa Victor X5. Tiến hành phân tích dữ liệu sử dụng

mô hình liều lượng-đáp ứng hình xichma trong phần mềm Prism™ (GraphPad). Giá trị IC₅₀, được định nghĩa là nồng độ kháng thể cần thiết để cản trở 50% hIL-25-MMH liên kết với hIL-17RB-hFc, được sử dụng như một chỉ số về khả năng cản trở. Độ hấp thụ đo tại nồng độ không đổi của một mình hIL-25-MMH được xác định là cản trở 0% và độ hấp thụ được đo khi không có hIL-25-MMH được xác định là cản trở 100%. Phần trăm cản trở được tính toán theo tỷ lệ giữa việc giảm tín hiệu quan sát dưới sự xuất hiện của kháng thể liên quan đến sự khác nhau giữa tín hiệu khi chỉ có một mình hIL-25-MMH và nền (tín hiệu từ HRP-một mình kháng thể thứ hai liên hợp) được trừ đi từ cản trở 100% như đã xác định trước đó. Giá trị độ hấp thụ của các giếng chứa nồng độ cao nhất của mỗi kháng thể được sử dụng để xác định là phần trăm cản trở lớn nhất. Các giá trị IC₅₀ và phần trăm cản trở lớn nhất cho mỗi kháng thể thử nghiệm được trình bày trong bảng 12.

Bảng 12: Kháng thể cản trở sự liên kết của IL-25 với IL-17RB

Kháng thể	Cản trở 2 nM hIL-25-MMH liên kết với hIL-17RB-hFc, IC ₅₀ , (M)	% cản trở lớn nhất của 200 nM kháng thể cản trở 2 nM hIL-25-MMH liên kết với hIL-17RB-hFc
H4H10900P	2,0E-10(*)	90
H4H10864P	2,6E-10(*)	88
H4H10901P	2,3E-10(*)	91
H4H10861P	2,0E-10(*)	92
H4H10862P	2,4E-10(*)	89
H4H10883P	2,0E-10(*)	93
H4H10903P	2,4E-10(*)	91
H4H10907P	5,5E-10(*)	87
H4H10871P	7,1E-10(*)	92
H4H10897P	3,2E-10(*)	94
H4H10876P	6,5E-10(*)	89
H4H10905P	5,3E-10(*)	86
H4H10863P	9,2E-10(*)	87

H2aM11008N	4,3E-10(*)	98
H1M11009N	Không cản trở	20
H4H10906P	1,4E-10(*)	89
H2aM10690N	3,1E-08	70
Kháng thể so sánh 1	2,5E-10(*)	90
Đối chứng isotyp hIgG4	Không cản trở	-31
Đối chứng isotyp mIgG2a	Không cản trở	-45

(*) – cuối lý thuyết của thử nghiệm bên dưới của thử nghiệm được tính là 1,0 NM cho thử nghiệm này, trong đó hIL-25MMH dạng dime trong dung dịch được cố định tại nồng độ 2nM.

Các kháng thể không có tác động tới tín hiệu của hằng số hIL-25-MMH hoặc làm giảm tín hiệu liên kết 25% hoặc thấp hơn được xác định là không cản trở. Cuối thử nghiệm trên lý thuyết là 0,5 nM chỉ ra rằng giá trị IC₅₀ thấp hơn không tương trưng cho vị trí liên kết kháng thể - protein định lượng. Vì lý do này, các kháng thể có giá trị IC₅₀ nhỏ hơn 0,5 nM được ghi lại là <5,0E-10 M trong bảng 12.

Như được trình bày trong bảng 12, 16 trên 17 kháng thể kháng IL-25 kiểm tra cản trở không cho 2 nM hIL-25-MMH liên kết với hIL-17RB-hFc, có giá trị IC₅₀ từ nhỏ hơn 0,5 nM đến 31 nM và phần trăm cản trở lớn nhất nằm trong khoảng từ 70% đến 98%. Kháng thể so sánh 1 cản trở 90% sự liên kết của 2 nM hIL-25-MMH với hIL-17RB-hFc, có giá trị IC₅₀ nhỏ hơn 0,5 nM. Một kháng thể, H1M11009N, được xác định là không có khả năng cản trở dưới các điều kiện thử nghiệm.

Ví dụ 6: Kháng thể kháng IL-25 cản trở việc truyền tín hiệu qua trung gian IL-25 trong các dòng tế bào được thiết kế di truyền biểu hiện IL-17RA và IL-17RB

Thử nghiệm sinh học được nghiên cứu để phát hiện việc truyền tín hiệu qua trung gian tế bào IL-15 và để đo phạm vi trong đó các kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 *in vitro*.

Trong thử nghiệm này, dòng tế bào HEK 293 được tạo ra để biểu hiện ổn định IL-17RA người (các axit amin 1 đến 866 của số đăng ký NP_055154.3), IL-17RB (axit

amin 1 đến 502 của số đăng lý NP_061195.2), và Act1 (axit amin 1 đến 564 của số đăng ký NP_001157753.1), cùng với thụ thể luciferaza [NF κ B đáp ứng phần (5x)-luciferaza-IRES-GFP]. Dòng tế bào ổn định thu được, được đề cập đến ở đây là HEK293/NF κ B-luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1, được phân lập và giữ trong DMEM 10% có chứa 10% FBS, NEAA, pencillin/streptomycin, 500 μ g/mL G418, 100 μ g/mL hygromycin B, và 1 μ g/mL puromycin.

Các tế bào được gieo vào đĩa 96 giếng với mật độ 10.000 tế bào/ giếng trong OPTIMEM bổ sung với 0,1% FBS và sau đó ủ tại nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂ qua đêm. Ngày hôm sau, để xác định liều lượng đáp ứng của IL-25, hoặc là cho IL-25 người biểu hiện đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (hIL-25-MMH; SEQ ID NO:273), IL-25 khi cynomolgus biểu hiện đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (MfIL-25-MMH; SEQ ID NO:274) hoặc IL-25 chuột biểu hiện đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (mIL-25-MMH; SEQ ID NO:275) được pha loãng hàng loạt theo tỷ lệ 1:3 (từ 3 nM đến 0,00001 nM) và thêm vào tế bào. Mẫu đối chứng có chứa đệm pha loãng nhưng không chứa IL-25 cũng được thêm vào một mẫu tế bào. Để đo mức độ ức chế, các kháng thể được pha loãng hàng loạt và được thêm vào tế bào sau khi bổ sung các nồng độ không đổi IL-25 (5pM cho cả hIL-25-MMH, 12pM cho MfIL-25-MMH và 10pM cho mIL-25-MMH). Việc pha loãng hàng loạt kháng thể trước khi thêm vào tế bào theo tỷ lệ 1:3 bắt đầu từ 100 nM và mức độ giảm xuống 0,002 nM cộng thêm mẫu đối chứng chỉ chứa đệm mà không chứa kháng thể. Hoạt tính của enzym luciferaza được đo sau khi ủ 5,5 giờ tại nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂ sau đó bổ sung chất phản ứng ONE-GLO® (Promega, # E6051) bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Victor X (Perkin Elmer). Kết quả thu được được phân tích sử dụng phép hồi quy phi tuyến tính (4 tham số logistic) bằng phần mềm Prism 5 (GraphPad) để thu được các giá trị EC₅₀ và IC₅₀. Kết quả thu được được trình bày trong bảng 13.

Bảng 13: Ước chế việc truyền tín hiệu qua trung gian IL-25.

Các loại IL25	Người		Khỉ	Chuột
EC ₅₀ [M]	2,9E-12	1,6E-11	1,9E-11	8,4E-12
Hằng số IL25 được sử dụng trong thử nghiệm	5pM		12pM	10pM
Các kháng thể	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]
H2aM10690N	Ước chế tại nồng độ cao			
H4H10861P	6,3E-11		3,7E-11	
H4H10862P	8,4E-11		3,3E-11	
H4H10863P	6,9E-10		3,5E-10	4,3E-09
H4H10864P	3,6E-11		2,6E-11	
H4H10871P	3,2E-10		8,8E-11	6,7E-10
H4H10876P	4,6E-10		2,1E-10	8,8E-10
H4H10883P	1,4E-10		3,9E-11	
H4H10897P	4,6E-10		4,0E-10	1,5E-08
H4H10900P	3,1E-11		2,2E-11	
H4H10901P	5,6E-11		3,8E-11	
H4H10903P	1,4E-10		6,0E-11	
H4H10905P	5,1E-10		2,1E-10	6,8E-10
H4H10906P		2,7E-11	4,7E-11	
H4H10907P	2,2E-10		1,4E-10	NB
H2aM11008N	1,8E-09			
H1M11009N	ước chế tại nồng độ cao			
Kháng thể so sánh 1	7,2E-10	2,2E-10	3,8E-10	6,1E-10
Đối chứng Isotyp 1	NB			
Đối chứng Isotyp 2	NB	NB	NB	NB

NB=không ước chế.

Như được trình bày trong bảng 13, hIL-25-MMH hoạt hóa có các giá trị EC_{50} là 2,9 pM và 16 pM trong hai ngày thử nghiệm khác nhau, mfIL-25-MMH hoạt hóa có giá trị EC_{50} là 19 pM; và mLIL-25-MMH hoạt hóa có giá trị EC_{50} là 8,4 pM.

Liên quan đến việc ức chế, 15 trên 17 kháng thể theo sáng chế ức chế hoàn toàn kích thích của tế bào HEK293/NF κ B-luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 bằng 5 pM hIL-25-MMH có giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 27 pM đến 1,8 nM, trong khi kháng thể so sánh 1 ức chế hoàn toàn với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 720 pM và 220 pM trong hai ngày thử nghiệm khác nhau. Hai kháng thể thử nghiệm là H2aM10690N và H1M11009N, ức chế một phần 5 pM hIL-25-MMH tại nồng độ kháng thể cao. Toàn bộ 14 kháng thể được thử nghiệm theo sáng chế đều ức chế hoàn toàn kích thích của tế bào HEK293/NF κ B-luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 bằng 12 pM MfIL-25-MMH với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 22 pM đến 400 pM, trong khi kháng thể so sánh 1 ức chế hoàn toàn với giá trị IC_{50} là 380pM. 5 trên 6 kháng thể được thử nghiệm theo sáng chế ức chế hoàn toàn kích thích của tế bào HEK293/NF κ B-luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 bằng 10 pM mLIL-25-MMH với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 670 pM đến 15 nM, trong khi kháng thể so sánh 1 ức chế hoàn toàn với giá trị IC_{50} là 610 pM. Các kháng thể đối chứng isotyp cũng được kiểm tra và không thể hiện khả năng ức chế trong mọi thử nghiệm.

Ví dụ 7: Các kháng thể kháng IL-25 ức chế việc truyền tín hiệu trung gian tế bào IL-25 trong thử nghiệm dựa trên tế bào sơ cấp.

Khả năng ức chế của các kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế còn tiếp tục được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm trên cơ sở tế bào sơ cấp dùng các tế bào máu ngoại vi đơn nhân (peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (*Xem Rickel et al., The Journal of Immunology*, 2008, vol. 181 (6) pp. 4299-4310).

Các tế bào máu ngoại vi đơn nhân (PBMC) được tinh sạch từ máu hoàn toàn sạch của hai người hiến máu khác nhau bằng cách ly tâm gradien mật độ. Tóm lại, toàn bộ K2 EDTA máu được pha loãng hai lần trong RPMI 1640, phân lớp trên Ficoll-Paque (GE Healthcare, #17-1440-03) và ly tâm trong 20 phút. Hút lớp ở giữa các pha có chứa PBMC, chuyển vào một ống mới và rửa hai lần với PBS. Các PBMC đã phân lập được đưa vào bình tam giác 75 cm² tại nồng độ cuối cùng 2 x10⁶ tế bào/mL trong RPMI 1640

bổ sung với FBS 10%, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin và 100ng/mL của lymphoprotein cơ chất tuyến ức tái tổ hợp (TSLP; R&D Systems, #1398-TS/CF). Sau 24 giờ, thu các tế bào, rửa với RPMI 1640, và đưa vào đĩa 96 giếng có đáy tròn với nồng độ cuối là 3×10^5 tế bào/mL trong RPMI 1640 bổ sung 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, và 100µg/mL streptomycin. Sau đó, các tế bào được ủ với 50ng/mL TSLP, 10ng/mL IL-2 người (IL-2; R&D Systems, #202-IL/CF), 1nM IL-25 người biểu hiện đuôi myc-myc-hexahistidin tại đầu C (hIL-25-MMH; SEQ ID:273) và pha loãng liên tiếp các kháng thể từ 200 nM đến 48,8 pM tại thể tích cuối là 200µL trên mỗi giếng. Mỗi mẫu được kiểm tra ba lần. Khi có mặt kháng thể, chúng được thêm vào tế bào 30 phút sau khi ủ trước với IL-25.

Sau đó, các tế bào được ủ trong 72 giờ tại nhiệt độ 37°C trong tủ nuôi cấy được làm ẩm với 5% CO₂. Sau đó, đo nồng độ IL-5 trong dịch nổi nuôi cấy bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA có sẵn trên thị trường (R&D Systems, #DY205). Đối với thử nghiệm ELISA, đĩa 96 giếng có đáy phẳng được phủ kháng thể bắt, theo như hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi rửa và ức chế, 100µL dịch nổi nuôi cấy không pha loãng được thêm vào các đĩa và ủ trong 2 giờ. Sau đó, tiến hành rửa và phát hiện theo như hướng dẫn của nhà sản xuất. Các kết quả thu được được tóm tắt trong bảng 14 và 15.

Bảng 14: hIL-25-MMH làm giải phóng IL-5 từ tế bào máu ngoại vi đơn nhân PBMC người

[hIL-25-MMH]	IL-5 giải phóng từ người hiến 727058-059 (ng/mL)		IL-5 giải phóng từ người hiến 727060 (ng/mL)	
(M)	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
1E-09	0,071	0,021	0,599	0,088
0	0,014	0,007	0,083	0,022

Bảng 15: Việc ức chế hIL-25-MMH làm giải phóng IL-5 từ tế bào máu ngoại vi đơn nhân PMBC người bởi kháng thể kháng IL-25

Kháng thể	Giá trị IC ₅₀ của kháng thể ức chế giải phóng IL-5 từ người hiến #727058-059 (M)	Giá trị IC ₅₀ của kháng thể ức chế giải phóng IL-5 từ người hiến #727060 (M)
H4H10900P	3,921E-11	5,781e-010
H4H10864P	1,149E-09	6,771e-010
H4H10871P	1,178E-10	6,363e-010
H4H10876P	1,720E-10	1,296e-010
Kháng thể so sánh 1	5,685E-09	1,590e-008

Như được trình bày trong bảng 14, IL-25-MMH người tại nồng độ 1nM, dưới sự có mặt TSLP và IL-2, gây ra hiện tượng giải phóng 0,071ng/mL IL-5 từ PBMC tổng số người thu được từ người hiến #727058-059 và 0,599ng/mL IL-5 từ PBMC tổng số người thu được từ người hiến #727060.

Như được trình bày trong bảng 15, toàn bộ 4 kháng thể kháng IL-25 được kiểm tra ức chế sự giải phóng IL-5 từ PBMC gây ra bởi 1nM hIL-25-MMH, có các giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 39,2pM đến 1,149nM đối với người hiến #727058-059, có các giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 129,6pM đến 677,1pM đối với người hiến #727060. Kháng thể so sánh 1 ức chế việc giải phóng IL-5 có giá trị IC₅₀ là 5,685nM đối với người hiến #727058-059, và giá trị IC₅₀ là 15,9nM đối với người hiến #727060.

Ví dụ này xác nhận rằng các kháng thể kháng IL-25 theo sáng chế có khả năng ức chế việc truyền tín hiệu IL-25 trong các tế bào có mức độ lớn hơn so với kháng thể kháng IL-25 so sánh.

Ví dụ 8: Sự phân phối thủy động học IL-25 của ADN (HDD) tạo ra bạch cầu ái toan phổi, dị sản tế bào hình dài và tăng nồng độ IgE huyết thanh để nghiên cứu hiệu lực của các mAb *in vivo*

IL-25 người được biểu hiện quá mức ở chuột kiểu dại (wild type (WT)) bởi phân phối thủy động học của ADN (HDD). Đối với thử nghiệm HDD, chuột kiểu dại được tiêm hoặc 25 µg một plasmid biểu hiện toàn bộ phân tử IL-25 người (xem

NM_022789.3; hIL-25 và SEQ ID NO: 277 (ADN) và SEQ ID NO: 278 (Protein)) hoặc được tiêm 25 µg một plasmid tương tự không có trình tự mã hóa (vector rỗng). Lấy một ít chuột đã tiêm plasmid hIL-25 đem tiêm dưới da với hoặc kháng thể IL-25 hoặc một liều thích hợp của kháng thể đối chứng isotyp ba ngày trước khi tiêm HDD, vào ngày tiêm HDD và vào ngày thứ 2 và 4 sau tiêm HDD. Chuột bị chết sau 7 ngày tiêm HDD, thu lấy máu và phổi của chuột. Nồng độ IgE huyết thanh được định lượng bằng ELISA; đánh giá bạch cầu ái toan phổi được bằng cách phân lập các tế bào thâm nhiễm phổi sau khi xử lý với enzyme collagenaza và phân tích tế bào theo dòng chảy; và đánh giá dị sản tế bào hình đài bằng cách định lượng các phần phổi được nhuộm bằng axit periodic Schiff (PAS).

Liều lượng thử nghiệm và quy trình xử lý đối với các nhóm chuột được trình bày trong bảng 16A và 16B.

Bảng 16A: Nghiên cứu 1

Nhóm	Chuột	n	Cấu trúc	Kháng thể	Liều lượng mAb
1	Kiểu đại	3	Vectơ rỗng	Không có	
2	Kiểu đại	5	hIL-25	Đối chứng Isotyp	25 mg/kg
3	Kiểu đại	5	hIL-25	H4H10871P kháng IL-25	25 mg/kg
4	Kiểu đại	5	hIL-25	H4H10900P kháng IL-25	25 mg/kg

Bảng 16B: Nghiên cứu 2

Nhóm	Chuột	n	Cấu trúc	Kháng thể	Liều mAb
1	Kiểu đại	5	Vectơ rỗng	Không có	
2	Kiểu đại	4	hIL-25	Không có	
3	Kiểu đại	5	hIL-25	H4H10871P kháng IL-25	5 mg/kg
4	Kiểu đại	5	hIL-25	H4H10871P kháng IL-25	25 mg/kg

Đo nồng độ IgE trong hệ tuần hoàn

Các mẫu máu được thu từ mỗi chuột thông qua lỗ thủng ở cuối tim sử dụng kim tiêm 27G^{1/2} 1ml TB (BD, #309306) và máu thu được được đưa vào trong ống tách huyết thanh BD Microtainer® (BD, #365956). Sau khi ly tâm, thu lấy huyết thanh và sau đó chuyển sang các ống mới.

Để xác định nồng độ IgE tổng số trong các mẫu huyết thanh, bộ ELISA OPTeia sandwich (BD, #555248) được sử dụng theo như hướng dẫn của nhà sản xuất cùng với chất phản ứng BD OPTeia B (BD, #550534). Tóm lại, các mẫu huyết thanh được pha loãng trong chất pha loãng và được đưa vào trong đĩa 96 giếng đã được phủ kháng thể bắt kháng IgE. IgE chuột đã tinh sạch, được cung cấp bởi nhà sản xuất, được sử dụng như một chuẩn tham chiếu. Sau khi rửa, đĩa liên kết với IgE tổng số được phát hiện bằng cách sử dụng một kháng thể kháng IgE chuột được biotin hóa sau khi bổ sung liên hợp streptavidin-peroxidaza củ cải ngựa. Sau đó bổ sung thêm vào chất nhuộm sắc 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin để tạo ra phản ứng tạo màu và trung hòa với axit sulfuric 1M trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm bằng đầu đọc đĩa Molecular Devices SpectraMax M5. Tiến hành phân tích dữ liệu sử dụng phần mềm Prism™ (GraphPad). Giá trị trung bình của nồng độ IgE trong hệ tuần hoàn của mỗi nhóm thí nghiệm được trình bày dưới dạng ng/mL $\pm$ độ lệch chuẩn (độ lệch chuẩn (SD)), như được trình bày trong bảng 18 và 19.

Thu hoạch phổi để tiến hành phân tích sự thâm nhiễm vào tế bào phổi

Sau khi hút hết máu, lấy thùy đuôi của phổi bên phải ra khỏi cơ thể chuột, cắt thành các khối có kích thước khoảng 2 đến 3 mm, và đặt vào một ống nghiệm có chứa 20 μ g/mL dung dịch enzym ADNaza (Roche, #10104159001) và 0,7 U/mL enzym Liberaza TH (Roche, #05401151001) được pha loãng trong dung dịch muối cân bằng của Hank (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)) (Gibco, #14025), là dung dịch được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút và được lắc sau mỗi 5 phút. Kết thúc phản ứng bằng cách bổ sung thêm axit ethylenediaminetetraacetic (Gibco, #15575) tại nồng độ cuối 10mM. Sau đó, mỗi phổi bị phân tách ra bằng cách sử dụng chất phân ly nhẹ MACS® (Miltenyi Biotec, #130-095-937) và sau đó lọc qua màng 70 μ m và ly tâm. Các hạt phổi nhỏ thu được tạo huyền phù lại trong 1 mL đệm ly giải tế bào máu đỏ 1X (Sigma, #R7757) để loại bỏ tế bào máu đỏ. Sau khi ủ 3 phút tại nhiệt độ trong phòng,

bổ sung thêm 3 mL dung dịch DMEM 1X để khử hoạt tính của dung dịch đệm ly giải tế bào máu đỏ. Sau đó đem ly tâm huyền phù tế bào, và các hạt tế bào nhỏ thu được lại được tạo huyền phù trong 5 mL đệm MACS (autoMACS Running Buffer; Miltenyi Biotec, #130-091-221). Các mẫu đã tạo huyền phù được lọc qua màng lọc 70 μ m và 1×10^6 tế bào mỗi giếng được đặt vào đĩa 96 giếng có đáy hình chữ V. Các tế bào sau đó được ly tâm và các hạt tế bào nhỏ thu được được rửa trong PBS 1X. Sau khi ly tâm lần thứ hai, các hạt tế bào nhỏ lại được tạo huyền phù trong 100 μ L nhuộm tế bào chết trong suốt cố định LIVE/DEAD® (Fixable Aqua Dead Cell Stain) (Life Technologies, #L34957) được pha loãng theo tỷ lệ 1:1000 trong PBS 1X để xác định khả năng sống sót của tế bào và ủ trong 20 phút trong bóng tối tại nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa một lần với PBS 1X, các tế bào được ủ trong dung dịch đệm MACS có chứa 10 μ g/mL CD16/CD32 Fc kháng chuột nhà của chuột nhắt đã tinh sạch, (Clone: 2.4G2; BD Biosciences, #553142) trong 10 phút tại nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa một lần nữa và sau đó được ủ trong hỗn hợp kháng thể thích hợp (được trình bày trong bảng 17) được pha loãng trong đệm MACS trong 30 phút trong bóng tối tại nhiệt độ 4°C. Sau khi ủ kháng thể, các tế bào được rửa hai lần trong đệm MACS, tạo huyền phù lại trong BD cytofix (BD Biosciences, #554655) và sau đó ủ trong 15 phút trong bóng tối tại nhiệt độ 4°C. Các tế bào sau đó được rửa, tạo huyền phù lại trong đệm MACS, và sau đó chuyển vào các ống BD FACS (BD Biosciences, #352235) để phân tích bạch cầu ái toan bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy.

Các bạch cầu ái toan được xác định là sống, CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{lo}, SiglecF^{hi}. Các số liệu được trình bày theo tần suất xuất hiện của các bạch cầu ái toan trong quần thể tế bào miễn dịch (% của CD45⁺ tế bào $\pm$ độ lệch chuẩn) như được trình bày trong bảng 20 và 21.

Bảng 17: Các kháng thể được sử dụng phân tích phân tích tế bào theo dòng chảy

Kháng thể	Chất phát huỳnh quang	Nhà sản xuất	Số danh mục	Tỷ lệ pha loãng cuối
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-82	1/800
F4/80	Pacific Blue	eBiosciences	48-4801-82	1/200
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor780	eBiosciences	47-5931-82	1/200

Thu hoạch phổi để tiến hành phân tích dị sản tế bào hình dài

Sau khi hút hết máu, lấy phổi trái ra khỏi cơ thể chuột và đặt vào trong các ống có chứa 5mL dung dịch paraformaldehyt 4% (trọng lượng/thể tích) (Boston Bioproducts, #BM-155) trong nước muối đệm phosphate 1X và để ở nhiệt độ trong phòng trong ít nhất 24 giờ. Sau đó, các mẫu phổi được thấm khô và được chuyển sang các ống chứa etanol 70%. Các mẫu được gửi tới Histoserv, Inc (Germantown, MD) để nhúng paraffin, phân đoạn và nhuộm axit periodic Schiff (PAS).

Hình ảnh của các phần phổi đã nhuộm PAS được chụp bằng kính hiển vi Zeiss Axio Imager A2 (vật kính 40X). Các tế bào nhuộm dương tính với PAS được xác định là các tế bào hình dài và được đếm trong phần có chiều dài từ 1 đến 2 mm trong biểu mô của phế quản chính. Số lượng các tế bào hình dài được biểu hiện tương ứng với tổng số tế bào trong phần được phân tích của tế bào biểu mô. Số liệu được trình bày dưới dạng tần suất xuất hiện của tế bào hình dài $\pm$ độ lệch chuẩn như được trình bày trong bảng 22.

Bảng 18: Nồng độ IgE chuột tổng số trong hệ tuần hoàn từ nghiên cứu 1.

Nhóm	Chuột	Cấu trúc	Kháng thể	Liều lượng mAb	Giá trị trung bình của nồng độ IgE trong hệ tuần hoàn (ng/mL $\pm$ độ lệch chuẩn)
1	Kiểu đại	Vectơ rỗng	Không có		311 $\pm$ 200
2	Kiểu đại	hIL-25	Đối chứng Isotyp	25 mg/kg	3417 $\pm$ 1627
3	Kiểu đại	hIL-25	H4H10871P	25 mg/kg	333 $\pm$ 125
4	Kiểu đại	hIL-25	H4H10900P	25 mg/kg	1240 $\pm$ 2233

Bảng 19: Nồng độ của IgE chuột tổng số trong hệ tuần hoàn từ nghiên cứu 2

Nhóm	Chuột	Cấu trúc	Kháng thể	Liều lượng mAb	Giá trị trung bình của nồng độ IgE trong hệ tuần hoàn (ng/mL $\pm$ độ lệch chuẩn)
1	Kiểu đại	Vectơ rỗng	Không có		93 $\pm$ 71
2	Kiểu đại	hIL-25	Không có		1186 $\pm$ 1370 **
3	Kiểu đại	hIL-25	H4H10871P	5 mg/kg	190 $\pm$ 99
4	Kiểu đại	hIL-25	H4H10871P	25 mg/kg	118 $\pm$ 26

Chỉ ra được ý nghĩa thống kê so với nhóm vectơ rỗng được xác định bằng thử nghiệm Kruskal-Wallis với so sánh nhiều lần sau thử nghiệm của Dunn (** $p < 0,001$).

Bảng 20: Tần suất xuất hiện bạch cầu ái toan phổi từ nghiên cứu 1

Nhóm	Chuột	Cấu trúc	Kháng thể	Liều lượng mAb	Tần xuất xuất hiện bạch cầu ái toan trung bình (%CD45+ tế bào $\pm$ độ lệch chuẩn)
1	Kiểu đại	Vectơ rỗng	Không có		1,47 $\pm$ 0,16
2	Kiểu đại	hIL-25	Đối chứng Isotype	25 mg/kg	17,20 $\pm$ 2,39
3	Kiểu đại	hIL-25	H4H10871P	25 mg/kg	1,03 $\pm$ 0,16 **
4	Kiểu đại	hIL-25	H4H10900P	25 mg/kg	1,36 $\pm$ 0,19

Chỉ ra được ý nghĩa thống kê so với nhóm vectơ rỗng được xác định bằng thử nghiệm Kruskal-Wallis với so sánh nhiều lần sau thử nghiệm của Dunn (** $p < 0,001$).

Bảng 21: Tần suất xuất hiện bạch cầu ái toan phổi từ nghiên cứu 2

Nhóm	Chuột	Cấu trúc	Kháng thể	Liều lượng mAb	Tần xuất xuất hiện bạch cầu ái toan trung bình (%CD45+ tế bào $\pm$ độ lệch chuẩn)
1	Kiểu đại	Vectơ rỗng	Không có		6,35 $\pm$ 1,46
2	Kiểu đại	hIL-25	Không có		32,29 $\pm$ 18,35

3	Kiểu đại	hIL-25	H4H10871P	5 mg/kg	4,46 ±1,66 *
4	Kiểu đại	hIL-25	H4H10871P	25 mg/kg	5,23 ±2,13

Chỉ ra được ý nghĩa thống kê so với nhóm vector rỗng được xác định bằng thử nghiệm Kruskal-Wallis với so sánh nhiều lần sau thử nghiệm của Dunn (** p<0,001).

Bảng 22: Tần suất xuất hiện dị sản tế bào hình đài từ nghiên cứu 2

Nhóm	Chuột	n	Construct	Kháng thể	Tần suất xuất hiện dị sản tế bào hình đài trung bình (% tổng tế bào trong biểu mô ± độ lệch chuẩn)
1	Kiểu đại	Vector rỗng	Không có		1,15 ±1,67
2	Kiểu đại	hIL-25	Không có		59,63 ±39,74
3	Kiểu đại	hIL-25	H4H10871P	5 mg/kg	1,71 ±1,93
4	Kiểu đại	hIL-25	H4H10871P	25 mg/kg	6,90 ±11,55

Chuột kiểu đại biểu hiện quá mức IL-25 người bởi HDD chứng minh nồng độ IgE trong hệ tuần hoàn tăng lên (3417±1627 ng/mL đối với nghiên cứu 1 và 1186 ±1370 ng/mL đối với nghiên cứu 2) so với với chuột kiểu đại được chuyển vector rỗng bằng HDD (311 ±200 ng/mL đối với nghiên cứu 1 và 1186 ±1370 ng/mL đối với nghiên cứu 2). Nồng độ của IgE trong hệ tuần hoàn bị giảm đi trong mỗi nghiên cứu khi chuột biểu hiện quá mức IL-25 người bằng HDD được xử lý với kháng thể IL-25, như được trình bày trong bảng 18 và 19. Chuột kiểu đại biểu hiện quá mức IL-25 người bằng HDD chứng minh xu hướng hướng tới tăng tần số xuất hiện bạch cầu ái toan phổi (17,20 ±2,39% đối với nghiên cứu 1 và 32,29 ±18,35% đối với nghiên cứu 2) so với chuột kiểu đại được chuyển vector rỗng bằng HDD (1,47 ± 0,16% đối với nghiên cứu 1 và 6,35 ± 1,46% đối với nghiên cứu 2). Tần suất xuất hiện bạch cầu ái toan phổi bị giảm đi trong mỗi nghiên cứu khi chuột biểu hiện quá mức IL-25 người bằng HDD được xử lý với kháng thể IL-25 như được trình bày trong bảng 20 và 21. Chuột kiểu đại biểu hiện quá mức IL-25 người bằng HDD chứng minh xu hướng hướng tới tăng dị sản tế bào hình đài (59,63 ± 39,74 đối với nghiên cứu 2) so với chuột kiểu đại được chuyển vector rỗng bằng HDD (1,15 ± 1,67 đối với nghiên cứu 2). Tần số xuất hiện dị sản tế bào hình đài trong nghiên cứu 2 giảm đi khi chuột biểu hiện quá mức IL-25 người bằng HDD được

xử lý với kháng thể IL-25 như được trình bày trong bảng 22.

Ví dụ 9: Dị ứng mật bụi nhà mẫn tính (HDM) gây ra viêm phổi ở chuột kiểu dại (WT) và chuột IL-25 KO

Để xác định vai trò của IL-25 trong mô hình *in vivo* liên quan, một nghiên cứu về chứng dị ứng mật bụi nhà mẫn tính (HDM)-gây ra viêm phổi được tiến hành ở cả chuột kiểu dại (WT) và chuột đã đồng hợp tử để loại bỏ IL-25 chuột (chuột IL-25 KO).

Chuột IL-25 KO và chuột kiểu dại được tiêm theo đường mũi hoặc 50µg chiết xuất mật bụi nhà (HDM; Greer, #XPB70D3A2.5) được pha loãng trong 20µL dung dịch muối đệm phosphat (PBS) 1X hoặc 20µL PBS 1X 5 ngày 1 tuần, liên tục trong 12 tuần. Tất cả các chuột đều chết vào ngày đầu tiên của tuần thứ 13 của nghiên cứu và phổi của chúng được thu lại. Liều lượng thử nghiệm và quy trình xử lý đối với các nhóm chuột được trình bày trong bảng 23.

Bảng 23: Liều lượng thử nghiệm và quy trình xử lý đối với các nhóm chuột

Nhóm	Chuột	n	Tiêm theo đường mũi	Thời gian tiến hành tiêm theo đường mũi
1	Kiểu dại	3	PBS 1X (nước muối)	12 tuần
2	Kiểu dại	4	50µg HDM trong 20µL PBS 1X	12 tuần
3	IL-25 KO	4	PBS 1X (nước muối)	12 tuần
4	IL-25 KO	5	50µg HDM in 20µL PBS 1X	12 tuần

Thu hoạch phổi để tiến hành phân tích sự thâm nhiễm qua tế bào phổi

Sau khi hút hết máu, lấy thùy đuôi của phổi phải ra khỏi cơ thể chuột, cắt thành các khối có kích thước từ 2 đến 3 mm, và đặt chúng vào các ống nghiệm có chứa 20 µg/mL dung dịch enzym ADNaza (Roche, #10104159001) và 0,7 U/mL enzym Liberase TH (Roche, #05401151001) được pha loãng trong dung dịch muối cân bằng của Hank (HBSS) (Gibco, #14025), là dung dịch được ủ trong bể nước tại nhiệt độ 37°C trong thời gian 20 phút và được đảo ngược sau mỗi 5 phút. Kết thúc phản ứng bằng cách bổ sung thêm axit ethylenediaminetetraacetic (Gibco, #15575) tại nồng độ cuối 10mM. Mỗi phổi sau đó được phân tách bằng cách sử dụng chất phân ly nhẹ MACS® (Miltenyi Biotec, #130-095-937) và sau khi lọc qua màng 70 µm và ly tâm. Các hạt phổi nhỏ thu được tạo

huyền phù lại trong 1 mL dung dịch đệm ly giải tế bào máu đỏ 1X (Sigma, #R7757) để loại bỏ tế bào máu đỏ. Sau khi ủ 3 phút tại nhiệt độ trong phòng, bổ sung thêm 3 mL dung dịch DMEM 1X để khử hoạt tính của dung dịch đệm ly giải tế bào máu đỏ. Sau đó đem ly tâm huyền phù tế bào, và các hạt tế bào nhỏ thu được lại được tạo huyền phù trong 5 mL dung dịch đệm MACS (autoMACS Running Buffer; Miltenyi Biotec, #130-091-221). Các mẫu đã tạo huyền phù được lọc qua màng lọc 70 μ m và 1×10^6 tế bào mỗi giếng được đặt vào đĩa 96 giếng có đáy hình chữ V. Các tế bào được ly tâm và các hạt tế bào nhỏ được rửa trong PBS 1X. Sau khi ly tâm lần thứ hai, các hạt tế bào nhỏ lại được tạo huyền phù trong 100 μ L dung dịch nhuộm tế bào chết trong suốt cố định LIVE/DEAD® (Fixable Aqua Dead Cell Stain) (Life Technologies, #L34957) được pha loãng theo tỷ lệ 1:1000 trong PBS 1X để xác định khả năng sống sót của tế bào và ủ trong 20 phút tại nhiệt độ trong phòng trong khi được bảo vệ khỏi ánh sáng. Sau khi rửa một lần trong PBS 1X, các tế bào được ủ trong dung dịch đệm MACS có chứa 10 μ g/mL chất cản trở Fc CD16/CD32 kháng chuột nhà của chuột nhắt đã tinh sạch, (Clone: 2.4G2; BD Biosciences, #553142) trong 10 phút tại nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa một lần nữa và sau đó được ủ trong hỗn hợp kháng thể thích hợp (được trình bày trong bảng 17) được pha loãng trong đệm MACS trong 30 phút trong bóng tối tại nhiệt độ 4°C. Sau khi ủ kháng thể, các tế bào được rửa hai lần bằng đệm MACS, tạo huyền phù lại trong BD cytofix (BD Biosciences, #554655) và sau đó ủ trong 15 phút trong bóng tối tại nhiệt độ 4°C. Các tế bào sau đó được rửa, tạo huyền phù lại trong đệm MACS, và sau đó chuyển tới các ống BD FACS (BD Biosciences, #352235) để phân tích các bạch cầu trung tính và các tế bào lympho bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy.

Các bạch cầu trung tính được xác định là sống, CD45⁺, F4/80⁻, Ly6G⁺, Ly6C^{Int}. Số liệu của bạch cầu trung tính được trình bày dưới dạng tần số xuất hiện của các tế bào còn sống được phân tích (tần số tế bào sống sót, $\pm$ độ lệch chuẩn) như được trình bày trong bảng 25. Các tế bào T CD4 và CD8 được xác định lần lượt là sống, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD45⁺, CD19⁻, CD3⁺, CD8⁻, CD4⁺ và Live, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD45⁺, CD19⁻, CD3⁺, CD8⁺, CD4⁻. Số liệu của các tế bào T CD4 và CD8 được trình bày dưới dạng tần số xuất hiện của các tế bào CD4 tương ứng với tần số xuất hiện của các tế bào CD8 (tỷ lệ CD4/CD8, $\pm$ độ lệch chuẩn) như được trình bày trong bảng 25. Các tế bào CD4 hoạt hóa được xác định là các tế bào còn sống, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, và

CD69⁺. Các tế bào CD8 hoạt hóa được xác định là các tế bào còn sống, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, và CD69⁺. Số liệu của các tế bào hoạt hóa được trình bày dưới dạng tần số của các tế bào hoạt hóa (CD69⁺) trong quần thể bố mẹ (tần số xuất hiện của các tế bào CD4 hoặc CD8, $\pm$ độ lệch chuẩn) như được trình bày trong bảng 25.

Bảng 24: Các kháng thể được sử dụng cho phân tích phân tích tế bào theo dòng chảy

Kháng thể	Chất phát huỳnh quang	Nhà sản xuất	Số phân loại	Tỷ lệ pha loãng cuối
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-82	1/800
F4/80	Pacific Blue	eBiosciences	48-4801-82	1/200
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor780	eBiosciences	47-5931-82	1/200
CD3	PE-Cy7	BD Biosciences	552774	1/200
CD19	eFluor 450	eBiosciences	48-0193-82	1/200
CD4	APC-H7	BD Biosciences	560181	1/200
CD8	APC	eBiosciences	17-0081-82	1/200
CD69	PE	eBiosciences	12-0691-82	1/200

Thu hoạch phổi để tiến hành phân tích cytokin

Sau khi hút hết máu, lấy các thùy phổi giữa và cuối của phổi phải ra khỏi cơ thể chuột và đặt vào trong các ống có chứa dung dịch chất phản ứng chiết xuất protein mô (thuốc thử T-PER 1X; Pierce, #78510) được bổ sung dung dịch hỗn hợp thuốc chất ức chế Proteaza Halt 1X (Pierce, #78430). Tất cả các bước tiếp theo được thực hiện trên đá. Thể tích của thuốc thử T-PER (có chứa dung dịch hỗn hợp thuốc chất ức chế proteaza) được điều chỉnh trong mỗi mẫu theo tỷ lệ mô trên T-PER là 1:7.5 (trọng lượng/thể tích). Các mẫu phổi được đồng nhất hóa bằng tay trong các ống, sử dụng cối xay dùng một lần (Argos Technologies, cat P9950-901). Dịch thủy phân thu được được ly tâm thành các mảnh vụn. Dịch nổi có chứa chiết xuất protein hòa tan được chuyển vào các ống mới và bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi thực hiện các phân tích tiếp theo.

Đo hàm lượng protein tổng số trong chiết xuất protein phổi bằng cách sử dụng các thử nghiệm Bradford. Đối với thử nghiệm này, 10 μ L mẫu chiết đã pha loãng được đặt vào các đĩa 96 giếng chia làm hai và trộn với 200 μ L thuốc nhuộm 1X (Biorad, #500-0006). Pha loãng hàng loạt albumin huyết thanh bò (Sigma, #A7979), bắt đầu tại nồng độ 700 μ g/mL trong thuốc thử T-Per 1X được sử dụng làm tiêu chuẩn để xác định nồng độ protein chiết xuất. Sau khi ủ trong 5 phút tại nhiệt độ trong phòng, đo độ hấp thụ tại bước sóng 595 nm bằng máy đọc đĩa Molecular Devices SpectraMax M5. Tiến hành phân tích dữ liệu để xác định hàm lượng protein tổng số bằng phần mềm GraphPad Prism™.

Nồng độ xytokin trong chiết xuất protein phổi được đo bằng cách sử dụng bộ thử nghiệm miễn dịch nhiều thành phần Proinflammatory Panel 1 (chuột) (MesoScale Discovery, # K15048D), theo như hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, 50 μ L/giếng của bộ định chuẩn và mẫu (được pha loãng trong chất pha loãng 41) được thêm vào các đĩa đã phủ sơ bộ với các kháng thể bắt và vừa ủ trong nhiệt độ phòng vừa lắc tại vận tốc 700 rpm trong 2 tiếng. Sau đó, các đĩa được rửa 3 lần bằng PBS 1X có chứa Tween-20 0,05% (trọng lượng/thể tích), sau đó là bổ sung thêm 25 μ L dung dịch kháng thể phát hiện được pha loãng bằng chất pha loãng 45. Sau 2 giờ vừa ủ tại nhiệt độ phòng vừa lắc, các đĩa được rửa 3 lần, bổ sung thêm 150 μ L đệm đọc 2X vào mỗi giếng. Điện phát quang hóa học ngay lập tức được đo bằng thiết bị MSD Spector®. Tiến hành phân tích dữ liệu bằng phần mềm GraphPad Prism™.

Mỗi nồng độ xytokin trong chiết xuất protein tổng số phổi đo được chuẩn hóa thành hàm lượng protein tổng số trong chiết xuất đo được bằng thử nghiệm Bradford, và được trình bày dưới dạng pg của xytokin trên mỗi mg của protein phổi tổng số ((pg/mg protein phổi, $\pm$ độ lệch chuẩn SD) như được trình bày trong bảng 26.

Bảng 25: Tần số xuất hiện xâm nhiễm tế bào phổi được xác định bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy.

Nhóm thử nghiệm	Tần số xuất hiện bạch cầu trung tính trung bình	Tỷ lệ CD4/CD8 trung bình ($\pm$ độ lệch	Tần số xuất hiện tế bào T CD4+ hoạt hóa	Tần số xuất hiện tế bào của tế bào T CD8+ hoạt
-----------------	---	--	---	--

	(% tế bào sống sót, $\pm$ độ lệch chuẩn)	chuẩn)	trung bình (% tế bào T CD4, $\pm$ độ lệch chuẩn)	hóa trung bình (% tế bào T CD8, $\pm$ độ lệch chuẩn)
Nước muối kiểu dại	6,57 $\pm$ 1,27 **	1,00 $\pm$ 0,07 **	10,74 $\pm$ 0,75 ***	3,01 $\pm$ 1,24 **
HDM Kiểu đại	13,53 $\pm$ 2,63	3,89 $\pm$ 1,63	57,10 $\pm$ 4,03	26,18 $\pm$ 13,16
Nước muối IL-25 KO	5,98 $\pm$ 0,26 **	1,33 $\pm$ 0,21 **	10,16 $\pm$ 2,14 ***	5,51 $\pm$ 6,00 **
HDM IL-25 KO	6,89 $\pm$ 2,68 **	2,02 $\pm$ 0,48 *	38,65 $\pm$ 11,06 **	6,37 $\pm$ 3,10 **

Chỉ ra được ý nghĩa thống kê so với nhóm HDM kiểu đại được xác định bằng ANOVA hai yếu tố cùng với so sánh nhiều lần sau thử nghiệm của Tukey (** $p < 0.001$; *** $p < 0,0001$).

Bảng 26: Nồng độ xytokin trong chiết xuất protein phổi

Nhóm thử nghiệm	Giá trị trung bình [IL-1 β] trong chiết xuất protein phổi (pg/mg protein phổi) $\pm$ độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình [TNF α] trong chiết xuất protein phổi (pg/mg protein phổi) $\pm$ độ lệch chuẩn
Nước muối kiểu đại	0,24 $\pm$ 0,11 **	0,76 $\pm$ 0,22 ***
HDM kiểu đại	138,70 $\pm$ 70,17	11,42 $\pm$ 2,60
Nước muối IL-25 KO	0,49 $\pm$ 0,42 ***	0,78 $\pm$ 0,14 ***
HDM IL-25 KO	21,69 $\pm$ 17,90 **	5,01 $\pm$ 2,94 **

Chỉ ra được ý nghĩa thống kê so với nhóm HDM kiểu đại được xác định bằng ANOVA hai yếu tố cùng với so sánh nhiều lần sau thử nghiệm của Tukey (** $p < 0.001$; *** $p < 0,0001$).

Như được trình bày trong bảng 25, phơi nhiễm thời gian dài hoặc phơi nhiễm lặp đi lặp lại với HDM ở chuột kiểu đại làm tăng đáng kể bạch cầu trung tính phổi so với chuột kiểu đại chỉ phơi nhiễm với PBS. Thử nghiệm HDM mãn tính trong chuột kiểu đại cũng làm thay đổi sự cân bằng của các tế bào T CD4 và CD8, cũng như tăng tần suất xuất hiện của các tế bào T CD4 và CD8 hoạt hóa. Việc tăng bạch cầu trung tính phổi và các đặc tính khác của sự viêm nhiễm tế bào phổi gây ra bởi thử nghiệm HMD mãn tính, bị giảm đáng kể ở chuột IL-25KO so với chuột kiểu đại.

Phơi nhiễm thời gian dài với HDM làm tăng đáng kể nồng độ của xytokin tiền viêm nhiễm như IL-1 β và TNF α trong phổi của chuột kiểu đại so với chuột kiểu đại chỉ phơi nhiễm với một mình PBS. Ngược lại, phơi nhiễm mãn tính ở chuột IL-25KO với HDM không làm tăng đáng kể nồng độ của hai xytokin đã nêu trong phổi như được trình bày trong bảng 26.

Tóm lại, phơi nhiễm mãn tính với HDM gây ra các triệu chứng viêm nhiễm phổi ở chuột kiểu đại, viêm nhiễm này không xuất hiện ở phổi của chuột IL-25KO thực hiện cùng một thử nghiệm.

Sáng chế cũng không bị giới hạn bởi phạm vi của các phương án cụ thể được miêu tả ở đây. Trên thực tế, những biến thể khác nhau của sáng chế ngoài những thứ được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng hơn với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật từ những mô tả trước và các hình vẽ kèm theo. Những biến thể này được dự định nằm trong phạm vi của phần yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với interleukin-25 (IL-25) người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa

ba vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng (HCDR) nằm trong vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 114 và hoặc

ba vùng xác định bổ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) nằm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 122.

2. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-25 người với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 100pM như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

3. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-25 người với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 60 pM như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

4. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-25 người với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 40 pM như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

5. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-25 người với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 20 pM như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

6. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-25 người tại chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 150 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C.

7. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-25 người tại chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 200 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C.

8. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 7, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-25 người tại chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 250 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C.

9. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 8, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với IL-25 người có chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 400 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C.

10. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 720 pM.

11. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 10, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 500 pM.

12. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 100 pM.

13. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong tế bào máu ngoại vi đơn nhân người với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 2,0 nM.

14. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 13,

trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong tế bào máu ngoại vi đơn nhân người với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 700 pM.

15. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 14, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong tế bào máu ngoại vi đơn nhân người với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 30 pM đến 150 pM.

16. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, chứa trình tự axit amin HCVR nêu trong SEQ ID NO: 114.

17. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, chứa trình tự axit amin LCVR nêu trong SEQ ID NO: 122.

18. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 114/122.

19. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa tập hợp gồm sáu CDR nêu trong SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126, và 128.

20. Dược phẩm chứa kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, và chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng.

21. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó còn có một hoặc nhiều đặc trưng sau đây:

- (a) là kháng thể đơn dòng người nguyên vẹn;
- (b) liên kết với IL-25 người với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 120 pM như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại 25°C;
- (c) liên kết với IL-25 người với chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 105 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại 25°C;
- (d) cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào được thiết kế di truyền để biểu hiện thụ thể IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 2 nM;

(e) cản trở việc truyền tín hiệu IL-25 người trong các tế bào máu ngoại vi đơn nhân người với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 16 nM;

(f) giảm tuần hoàn và/hoặc nồng độ IgE ở phổi động vật có vú biểu hiện quá mức IL-25; hoặc

(g) giảm dị sản tế bào trong các tế bào hình đài ở động vật có vú biểu hiện quá mức IL-25.

Khả năng gắn kết của mAb-2 với IL-25 đã tạo phức trước với mAb-1																		
mAb-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0,00	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,01	0,05	0,05	0,00	0,85	0,91	0,60	0,59	0,66	0,64	0,80	0,97
2	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,02	0,00	0,67	0,86	0,59	0,58	0,62	0,59	0,74	0,91
3	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,02	0,00	0,72	0,83	0,58	0,57	0,61	0,56	0,73	0,87
4	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,02	0,00	1,12	1,13	0,89	0,83	0,94	0,92	1,11	1,30
5	0,00	0,19	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	1,08	0,99	0,74	0,73	0,82	0,77	0,97	1,22
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	1,00	0,98	0,72	0,71	0,80	0,73	0,93	1,21
7	0,00	0,04	0,03	0,01	0,03	0,02	0,00	0,05	0,03	0,00	1,02	0,99	0,76	0,73	0,83	0,81	0,99	1,25
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94	0,97	0,72	0,71	0,81	0,79	0,93	1,13
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85	0,99	0,77	0,68	0,79	0,71	0,92	1,19
10	0,00	0,03	0,02	0,03	0,04	0,02	0,00	0,08	0,05	0,00	0,19	0,77	0,48	0,50	0,56	0,51	0,66	0,85
11	0,53	0,63	0,64	0,57	0,68	0,64	0,47	0,77	0,62	0,11	0,00	0,69	0,54	0,45	0,52	0,61	0,74	0,52
12	0,51	0,63	0,64	0,56	0,67	0,61	0,48	0,67	0,58	0,70	0,78	0,00	0,42	0,48	0,47	0,50	0,68	0,88
13	0,58	0,72	0,76	0,65	0,75	0,75	0,55	0,77	0,66	0,82	1,03	0,88	0,00	0,02	0,11	0,09	0,20	0,30
14	0,63	0,73	0,74	0,71	0,77	0,64	0,60	0,82	0,72	0,82	0,90	0,87	0,03	0,00	0,08	0,06	0,13	0,28
15	0,59	0,70	0,68	0,67	0,73	0,60	0,57	0,77	0,68	0,77	0,79	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,17
16	0,57	0,68	0,66	0,63	0,70	0,56	0,55	0,75	0,66	0,74	0,90	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,16
17	0,62	0,74	0,74	0,70	0,78	0,72	0,56	0,86	0,72	0,79	0,99	0,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
18	0,55	0,67	0,66	0,63	0,69	0,63	0,50	0,76	0,64	0,68	0,50	0,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Fig.1

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Kháng thể kháng IL-25 việc sử dụng kháng thể này

<130> A0034WO01

<150> 62/054,167

<151> 2014-09-23

<160> 278

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggttagagc ctgggggggtc ccttagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggttgccat attgaaagga aaactgatgg tgggacaaca 180
gacttcgctg caccctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
gtggggccct acagtgtccc ttttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360
tca
```

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 3
 ggattcactt tcagtaacgc ctgg

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
 1 5

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 5
 attgaaagga aaactgatgg tgggacaaca

30

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> synthetic

<400> 6
 Ile Glu Arg Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 7

accacagtgg gccctacag tgtccctttt gactac

36

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 8

Thr	Thr	Val	Gly	Pro	Tyr	Ser	Val	Pro	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 9

gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	gagcattggc	agctatttaa	attgggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	gggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggtac	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcaacag	acttacagta	cccccatcac	cttcgggcca	300
gggacacgac	tggagattaa	a				321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

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

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 11

cagagcattg gcagctat

18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 12

Gln Ser Ile Gly Ser Tyr

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 13

gctgcatcc

9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 14

Ala Ala Ser

1

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 15

caacagactt acagtacccc catcacc

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 16

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr
1 5

<210> 17

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 17

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagttccc 300
ataactggaa ctacctggtt cgacccctgg ggccaggga ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 18

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

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 19

ggttacacct ttaccagcta tggc

24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 21

atcagcgctt acaatggtaa caca

24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> synthetic

<400> 22

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 23

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 23

gcgagagttc ccataactgg aactacctgg ttcgacccc

39

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 24

Ala	Arg	Val	Pro	Ile	Thr	Gly	Thr	Thr	Trp	Phe	Asp	Pro
1				5					10			

<210> 25

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 25

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	gagcattagc	agctatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcaacag	acttacagta	cccccatcac	cttcggccaa	300
gggacacgac	tgagagattaa	a				321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 26

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

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 27

cagagcatta gcagctat

18

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 28
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 29
 gctgcatcc

9

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 30
 Ala Ala Ser
 1

<210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 31
 caacagactt acagtacccc catcacc

27

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 32
 Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr

1

5

<210> 33
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> synthetic

<400> 33
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agtcactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccaggaagg gactggaatg gattgggttt atctattaca gtgggagcac caacttcaac 180
 cctccctca agagtcgagt caccatttca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgagag acatgactac 300
 aatgactacg agctcaacta cttcgatctc tggggccgtg gcaccctggc ctctgtctcc 360
 tca

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 34
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser His
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Phe Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Phe Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg His Asp Tyr Asn Asp Tyr Glu Leu Asn Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Ala Ser Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 35
 ggtggctcca tcagtagtca ctac

24

<210> 36

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 36
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser His Tyr
 1 5

<210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 37
 atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 38
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 39
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 39
 gcgagacatg actacaatga ctacgagctc aactacttcg atctc

45

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 40
 Ala Arg His Asp Tyr Asn Asp Tyr Glu Leu Asn Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 41
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acttacagta ccccatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 42
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 43
 cagagcatta gcagctat

18

<210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> synthetic

<400> 44

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 45

gctgcatcc

9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 46

Ala Ala Ser
1

<210> 47

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 47

caacagactt acagtacccc catcacc

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 48

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr
1 5

<210> 49

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 49

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaggt ctggtgaagc ctcgggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt aattactact ggagttggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattggatat atcttttaca gtgggaacac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatttca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgcgag agtcaggttc 300
agtgactacg aactaaactg gttcgacccc tggggccagg ggaccctggt caccgtctcc 360
tca

```

<210> 50

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 50

```

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

```

<210> 51

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 51

```

ggtgcctcca tcagtaatta ctac

```

24

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 52

Gly Ala Ser Ile Ser Asn Tyr Tyr
 1 5

<210> 53

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 53

atctttttaca gtgggaacac c

21

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 54

Ile Phe Tyr Ser Gly Asn Thr
 1 5

<210> 55

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> synthetic

<400> 55

gcgagagtca gggttcagtgta ctacgaacta aactgggttcg acccc

45

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 56

Ala Arg Val Arg Phe Ser Asp Tyr Glu Leu Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 57

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 57

```
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtat ttctggggcga gcgggccacc 60
atcaactgca ggtccagcca gagtggtttt ctcggtcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccagc agaaacctgg acagcctcct aaactactca ttactgggc gtcttcccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtcag ggacagattt cactctcact 240
atcaacagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata tttcattact 300
ccgctcactt tcggcgagg gagcaagggtg gagatcaaa 339
```

<210> 58

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 58

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

<210> 59

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 59

```
cagagtgttt ttctcggtc caacaataag aactac
```

36

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 60

```
Gln Ser Val Phe Leu Gly Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1          5          10
```

<210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 61
 tgggcgtct

9

<210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 62
 Trp Ala Ser
 1

<210> 63
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 63
 cagcaatatt tcattactcc gctcact

27

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 64
 Gln Gln Tyr Phe Ile Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 65

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttacttct ggagctggat ccggcaggcc 120
ccaggaaagg gactggagtg gattggattt atcgattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagttgaact ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtctatt actgtgcgag acaagagatc 300
attaacttcg agctgaactg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt cactgtctcc 360
tca

```

<210> 66
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 66
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20          25          30
Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Phe Ile Asp Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Arg Gln Glu Ile Ile Asn Phe Glu Leu Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly
100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 67
ggtggctcca tcagtagtta cttc

```

24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 68
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Phe
1          5

```

<210> 69
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 69
 atcgattaca gtgggagcac c

21

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 70
 Ile Asp Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> synthetic

<400> 71
 gcgagacaag agatcattaa cttcgagctg aactggttcg acccc

45

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 72
 Ala Arg Gln Glu Ile Ile Asn Phe Glu Leu Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 73
 gacatcgtga tgacccagtc tccagcctcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagttcca acaataagaa ctacttagct 120

```

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aacctgctca tttactgggc atctaccggg 180
gactccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggttctg gggcagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagtact 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

```

<210> 74
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 74

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

Lys

<210> 75
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> synthetic

<400> 75

```

cagagtgttt tatacagttc caacaataag aactac 36

```

<210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 76

Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser	Ser	Asn	Asn	Lys	Asn	Tyr
1				5					10		

<210> 77
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 77

tggtcatct

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 78

Trp Ser Ser

1

<210> 79

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 79

cagcaatatt ttagtactcc gtggacg

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 80

Gln Gln Tyr Phe Ser Thr Pro Trp Thr

1

5

<210> 81

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 81

caggttcagc tggtgcagtc cggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgtaagg cttctggtta cacctttagt agttatggta ttagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatgataa cacacagtat 180
gcacagaaat tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagtccca 300

ttacaatggg tgggggagtc ctttgaccac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360
tca 363

<210> 82
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 82
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Asp Asn Thr Gln Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Pro Leu Gln Trp Phe Gly Glu Ser Phe Asp His Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 83
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 83
ggttacacct ttagtagtta tggg

24

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> synthetic

<400> 84
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 85
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 85

atcagcgctt acaatgataa caca

24

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 86

Ile Ser Ala Tyr Asn Asp Asn Thr

1

5

<210> 87

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 87

gcgagagtcc cattacaatg gttcggggag tcctttgacc ac

42

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 88

Ala Arg Val Pro Leu Gln Trp Phe Gly Glu Ser Phe Asp His

1

5

10

<210> 89

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 89

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtggggga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	ggacattaac	aactatttaa	attggtttca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatcttttct	acatccagtt	tgcaaagtgg	gggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggtct	tggaacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctccaatct	240
gaagattttg	caacttatta	ctgtcaacag	actttcatta	ccccgctcac	tttcggcggc	300
gggaccaagg	tggagatcaa	a				321

<210> 90
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 91
 caggacatta acaactat

18

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 92
 Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 93
 tctacatcc

9

<210> 94
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 94
 Ser Thr Ser
 1

<210> 95
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 95
 caacagactt tcattacccc gctcact

27

<210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 96
 Gln Gln Thr Phe Ile Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 97
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 97
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acttgtactg tctctggtgg ctccatcagt aattacttct ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattgggttt aactataaca gtgggagcac caactataac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatttca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggggtataac 300
 tggaactacg aaatagcttg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt cactgtctcc 360
 tca

<210> 98
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 98

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

<210> 99

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 99

ggtaggctcca tcagtaatta cttc

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 100

Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Asn	Tyr	Phe
1				5			

<210> 101

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 101

aactataaca gtgggagcac c

21

<210> 102

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 102
 Asn Tyr Asn Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 103
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 103
 gcgagaggggt ataactggaa ctacgaaata gcttggttcg acccc 45

<210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 104
 Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Glu Ile Ala Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 105
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 105
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcataagc agttatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag agttacctta ccccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 106
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 106

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

<210> 107

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 107

cagagcataa gcagttat

18

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 108

Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
1				5	

<210> 109

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 109

gctgcatcc

9

<210> 110

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 110
Ala Ala Ser
1

<210> 111
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 111
caacagagtt accttacccc gctcact

27

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 112
Gln Gln Ser Tyr Leu Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 113
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 113
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgatgaagc ctgggggcctc agtgaagggtc 60
tcctgcaagt cttctgactt cgcctttacc acctatggca tcagctgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gaacagaggt tccagggcag aatcaccatg accacagaca catccacgac cacagtttat 240
atggagttga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatccc 300
gactattgta gtagtaacac ctgttctgat gcttttgatt tgtggggcca agggacaatg 360
gtcacccgtct cttca 375

<210> 114
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 114
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

```

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

```

<210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 115
 gacttcgcct ttaccaccta tggc

24

<210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 116
 Asp Phe Ala Phe Thr Thr Tyr Gly
 1 5

<210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 117
 atcagcgctt acaatggtac caca

24

<210> 118
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 118
 Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 119
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 119
 gcgagagatc ccgactattg tagtagtaac acctgttctg atgcttttga tttg 54

<210> 120
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 120
 Ala Arg Asp Pro Asp Tyr Cys Ser Ser Asn Thr Cys Ser Asp Ala Phe
 1 5 10 15
 Asp Leu

<210> 121
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 121
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtacgaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc gggcattacc aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagtgc ctaaggctct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
 cggttcagtg gcagtggctc tgggacagaa ttcactctcg ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaggatgttg caacttattt ctgtcaacag tatggcagtg ccccttggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 122
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 122
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Asn Tyr

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

<210> 123
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 123
 cagggcatta ccaattat

18

<210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 124
 Gln Gly Ile Thr Asn Tyr
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 125
 gctgcatcc

9

<210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 126
 Ala Ala Ser
 1

<210> 127
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 127
 caacagtatg gcagtgcccc ttggacg

27

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 128
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ala Pro Trp Thr
 1 5

<210> 129
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 129
 cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaaac ctgggggcctc agtgaagggtc 60
 tcctgcaagg cttctgagta caccttttagc aactatggca tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gtcttgagtg gttgggggtg atcggcgctt atagtgggtt cacaaaatat 180
 gcacagaagg tccaggacag aatcaccatg accacagacg catccacgac cacagcctac 240
 atggagctga gaaacctgag atctgacgac acggccgtgt attattgtgc gagagtggga 300
 actggaactg actcttactt tgactttctg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 130
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 130
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Glu Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Trp Ile Gly Ala Tyr Ser Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Val

50						55						60					
Gln	Asp	Arg	Ile	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr		
65						70				75					80		
Met	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Asp	Ser	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115					120										

<210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 131
 gagtacacct ttagcaacta tggc

24

<210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 132
 Glu Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 133
 atcggcgctt atagtggttt caca

24

<210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 134
 Ile Gly Ala Tyr Ser Gly Phe Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 135
 gcgagagtgg gaactggaac tgactcttac tttgacttc

39

<210> 136
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 136
 Ala Arg Val Gly Thr Gly Thr Asp Ser Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

<210> 137
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 137
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gaacattaac agtcatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatttatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccata 180
 agattcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg gaatttacat ctgtcaacag acttacataa cccctctcac tttcggcggt 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 138
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 138
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Ser His
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu	Asp	Phe	Gly	Ile	Tyr	Ile	Cys	Gln	Gln	Thr	Tyr	Ile	Thr	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 139
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 139
 cagaacatta acagtcac

18

<210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 140
 Gln Asn Ile Asn Ser His
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 141
 actgcatcc

9

<210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 142
 Thr Ala Ser
 1

<210> 143
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 143
caacagactt acataacccc tctcact

27

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 144
Gln Gln Thr Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 145
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 145
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga cttgtgaagt cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gcctggaatg gattggattt atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccttttca gtagacactt ccaaaaacca cttctccctg 240
aagctgaact ctgtgaccgc cacagacacg gccgtgtatt actgtgcgcg acattacttt 300
gattcgggga cttatgaact ggggcctttt gactactggg gccagggaac cctgggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 146
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 146
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Ser Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Phe Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Thr Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg His Tyr Phe Asp Ser Gly Thr Tyr Glu Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 147
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 147
gggtggctcca tcagtagtta ctac

24

<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 148
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 149
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 149
atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 150
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 150
Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 151
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 151
gcgcgcacatt acttttgattc ggggacttat gaactggggc cttttgacta c 51

<210> 152
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 152
Ala Arg His Tyr Phe Asp Ser Gly Thr Tyr Glu Leu Gly Pro Phe Asp
1 5 10 15
Tyr

<210> 153
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 153
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gaatatTTta ttaacttcca gtaataagaa ctacttaact 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctattcgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca ctttatttct gtcagcaata ttatattact 300
ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 154
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 154
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Ile Leu Leu Thr
20 25 30
Ser Ser Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Leu Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ile Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
100 105 110
Lys

<210> 155
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 155
 cagaatatattt tatttaacttc cagtaataag aactac

36

<210> 156
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 156
 Gln Asn Ile Leu Leu Thr Ser Ser Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 157
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 157
 tgggcatct

9

<210> 158
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 158
 Trp Ala Ser
 1

<210> 159
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 159
cagcaatatt atattactcc attcact

27

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 160
Gln Gln Tyr Tyr Ile Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 161
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 161
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt gattactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattggccat atctattaca gtgggagcac caaccacaac 180
ccctccctca agagtcgagt cgccatatca gtcgacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aggctgtact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agacgggtat 300
agtagctcgt ccggcttcta ctacttcggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 162
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 162
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Ala Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Tyr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Gly Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Phe Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 163
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 163
 ggtggctcca tcagtgatta ctac

24

<210> 164
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 164
 Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 165
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 165
 atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 166
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 166
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 167
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 167
 gcgagagacg ggtatagtag ctcgtccggc ttctactact tcggtatgga cgtc

54

<210> 168
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 168
 Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Phe Tyr Tyr Phe Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Val

<210> 169
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 169
 gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggccagtc ggacattaac agttatttag cctgggtatca gcaaaaacca 120
 gggaagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccactt tgcaagggtgg ggtcccttct 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacac cttagtagtt tccctcccac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 170
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 170
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Ala Ala Ser Thr Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Ser Ser Phe Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 171
 <211> 18

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 171
 caggacatta acagttat

18

<210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 172
 Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 1 5

<210> 173
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 173
 gctgcatcc

9

<210> 174
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 174
 Ala Ala Ser
 1

<210> 175
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 175
 caacacctta gtagtttccc tcccacc

27

<210> 176
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 176
 Gln His Leu Ser Ser Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 177
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 177
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaggc cttcggagac cctatccctc 60
 atctgcactg tctctggtgg ctccatcaat agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggaatg gattggatat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca ggagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgcgcgag aggggtaatc 300
 tggaactacg aactccgaga atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca

<210> 178
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 178
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Gly Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Val Ile Trp Asn Tyr Glu Leu Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 179
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 179

ggtggctcca tcaatagtta ctac

24

<210> 180

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 180

Gly Gly Ser Ile Asn Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 181

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> synthetic

<400> 181

atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 182

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 182

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 183

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 183

gcgagagggg taatctggaa ctacgaactc cgagaatttg actac

45

<210> 184

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 184

Ala	Arg	Gly	Val	Ile	Trp	Asn	Tyr	Glu	Leu	Arg	Glu	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15

<210> 185

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 185

gacatcgtga	tgacccagtc	tccagactcc	ctggctgtgt	ctctggggcga	gagggccacc	60
atcaactgca	agtccagcca	gagtgtttta	gacagttcca	acaataagaa	ctacttagtt	120
tggtaccagc	agaaaccagg	acagcctcct	gagctgctca	tttactgggc	atctaccggg	180
gaatccgggg	tccctgaccg	attcagtggc	agcgggtctg	ggacagattt	caactctcacc	240
atcagcagcc	tcgaggctga	agatgtggca	gtttattact	gtcagcaata	ttattttact	300
ccgctcacct	tcggcggagg	gaccaaggtg	gagatcaaa			339

<210> 186

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 186

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

Lys

<210> 187

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 187
cagagtgttt tagacagttc caacaataag aactac

36

<210> 188
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 188
Gln Ser Val Leu Asp Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 189
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 189
tgggcatct

9

<210> 190
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 190
Trp Ala Ser
1

<210> 191
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 191
cagcaatatt attttactcc gctcacc

27

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 192

Gln Gln Tyr Tyr Phe Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 193

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 193

```

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaggc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcagtg tctcgagtgg ctccatcaga agtagtaatt actactgggg ctggatccgc 120
cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggaatatct attatagtg gaacaccttc 180
tataaccogt ccctcaaggg tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tcctgaagc tgagctctgt gaccgccaca gacacggctg tgtattactg tgcgagacaa 300
ggatatagtg actacgagtt gaactgggtc gaccctggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca

```

<210> 194

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 194

```

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

```

<210> 195

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 195

agtggctcca tcagaagtag taattactac

30

<210> 196
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 196
 Ser Gly Ser Ile Arg Ser Ser Asn Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 197
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 197
 atctattata gtgggaacac c

21

<210> 198
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 198
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
 1 5

<210> 199
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 199
 gcgagacaag gatatagtgta ctacgagttg aactggttcg acccc

45

<210> 200
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 200

Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Leu Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 201
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 201
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggtgctgt ctctgggcca gagggccacc 60
 ttcaactgca agtccagcca gagtggttta gacagttcca acaataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagttgctca tttactgggc atctaccggg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt ctctctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca ctttattact gtcaacaatt ttataatagt 300
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 202
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 202
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Val Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Phe Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asp Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Phe Tyr Asn Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 203
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 203
 cagagtgttt tagacagttc caacaataag aactac

36

<210> 204

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

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 204
 Gln Ser Val Leu Asp Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 205
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 205
 tgggcatct

9

<210> 206
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 206
 Trp Ala Ser
 1

<210> 207
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 207
 caacaatttt ataatagtcc gtggacg

27

<210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 208
 Gln Gln Phe Tyr Asn Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 209
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 209
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaggg ctggtgaagc cctcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcaat agttattctt ggacctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggaatg gattggaaat atctataata gtgagaatac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gttgacacgt ccaagagtca ggtttccctg 240
 aaactgaact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag aacatataac 300
 tggaactacg aaataggggc catgggcgctc tggggccagg ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca

<210> 210
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 210
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Asn Ser Glu Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Tyr Asn Trp Asn Tyr Glu Ile Gly Ala Met Gly Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 211
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 211
 ggtggctcca tcaatagtta ttct

24

<210> 212
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 212

Gly Gly Ser Ile Asn Ser Tyr Ser
1 5

<210> 213

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 213

atctataata gtgagaatac c

21

<210> 214

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> synthetic

<400> 214

Ile Tyr Asn Ser Glu Asn Thr
1 5

<210> 215

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 215

gcgagaacat ataactggaa ctacgaaata ggggccatgg gcgtc

45

<210> 216

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 216

Ala Arg Thr Tyr Asn Trp Asn Tyr Glu Ile Gly Ala Met Gly Val
1 5 10 15

<210> 217

<211> 339
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 217
 gacatcgtga tgacccagtt tccagaactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtcagcca gaatgtttta atcacctcca acaataagaa ttatttagct 120
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc ttccaccggg 180
 gaattcgggg tccctgcccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatacaa 339

<210> 218
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 218
 Asp Ile Val Met Thr Gln Phe Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Ile Thr
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Phe Gly Val
 50 55 60
 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 219
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 219
 cagaatgttt taatcacctc caacaataag aattat

36

<210> 220
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 220

Gln Asn Val Leu Ile Thr Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 221

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 221

tgggcttcc

9

<210> 222

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 222

Trp Ala Ser
1

<210> 223

<211> 27

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 223

cagcaatatt atagtactcc attcact

27

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 224

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 225

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 225

```

caggttcagc  tgggtgcagtc  tggagctgag  gtgaagaagc  ctgggacctc  agtgaaggtc  60
tcctgcaagg  cttctgggta  cacctttacc  aactatggta  tcagttgggt  gcgacaggcc  120
cctggacaag  gtcttgagtg  gttgggatgg  atcagcgctt  ataatgataa  cacagactat  180
gcacagaaac  tccaggccag  agtcaccatg  accacagaca  cattcacgag  cacagcctac  240
atggacctga  ggagcctgag  atctgacgac  acggccgtgt  attactgtgc  gagagttcct  300
ataactggaa  ctacctcaag  ttttgacttc  tggggccagg  gaaccctggg  caccgtctcc  360
tca

```

<210> 226

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 226

```

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

```

<210> 227

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 227

```

ggttacacct  ttaccaacta  tgggt

```

24

<210> 228

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 228

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 229

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 229

atcagcgctt ataatgataa caca

24

<210> 230

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 230

Ile Ser Ala Tyr Asn Asp Asn Thr
 1 5

<210> 231

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 231

gcgagagttc ctataactgg aactacctca agttttgact tc

42

<210> 232

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 232

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

<210> 233

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 233

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atctcttgcc gggcaagtca gaccatttac agctatttaa attggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggctc tgggacacat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaggattttg caacttactt ctgccaacag acttacagta cccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

<210> 234

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> synthetic

<400> 234

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

<210> 235

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 235

cagaccattt acagctat

18

<210> 236

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 236

```
Gln Thr Ile Tyr Ser Tyr
1          5
```

<210> 237
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 237
 gatgcatcc

9

<210> 238
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 238
 Asp Ala Ser
 1

<210> 239
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 239
 caacagactt acagtacccc tctcact

27

<210> 240
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 240
 Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 241
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 241
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaaac cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

```

ccagggaagg gactggagtg gattggcttt atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatctca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagtt ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgcgag acatgacagt 300
gactacgaac tctacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

```

<210> 242
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 242
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
          20          25          30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Phe Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
          50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95
Arg His Asp Ser Asp Tyr Glu Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 243
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 243
ggtggctcca tcagtagtta ctac

```

24

<210> 244
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 244
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
 1          5

```

<210> 245
 <211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 245

atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 246

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 246

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr

1

5

<210> 247

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 247

gcgagacatg acagtgacta cgaactctac ggtatggacg tc

42

<210> 248

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 248

Ala Arg His Asp Ser Asp Tyr Glu Leu Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 249

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 249

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcacctgca agtccagcca gagtatTTTA tacaactccg acaataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaatcagg acagcctcct aagctgctca tttcctgggc atctaccggg 180
 gaatccgggg tccctgaccg tttcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaata tttttttact 300
ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 250
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 250
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Asn
20 25 30
Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Phe Phe Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
100 105 110
Lys

<210> 251
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 251
cagagtattt tatacaactc cgacaataag aactac 36

<210> 252
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 252
Gln Ser Ile Leu Tyr Asn Ser Asp Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 253
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 253

tgggcatct

9

<210> 254

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 254

Trp Ala Ser

1

<210> 255

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 255

caacaatatt tttttactcc attcact

27

<210> 256

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 256

Gln Gln Tyr Phe Phe Thr Pro Phe Thr

1

5

<210> 257

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 257

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	aactacgaca	tacactgggt	cgcceaagtt	120
ccaggaaaag	gtctggagtg	gatctcaact	attggttctg	ctggtgatac	attctatcca	180
ggctccgtga	agggccggtt	caccatctcc	agagaaaatg	ccaagaactc	cctgtatctt	240
caaatgaaca	gcctgagagc	cggggactcg	gctgtatatt	actgtgcaag	aggggataac	300
tggaactacg	tttcatgggt	cttcgatctc	tggggccgtg	gcaccctggt	cactgtctcc	360
tca						363

<210> 258
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 258
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Asp Ile His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ser Thr Ile Gly Ser Ala Gly Asp Thr Phe Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Asp Asn Trp Asn Tyr Val Ser Trp Phe Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 259
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 259
 ggattcacct tcagtaacta cgac

24

<210> 260
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 260
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Asp
 1 5

<210> 261
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 261
attggttctg ctggtgatac a

21

<210> 262
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 262
Ile Gly Ser Ala Gly Asp Thr
1 5

<210> 263
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 263
gcaagagggg ataactggaa ctacgtttca tgggttcttcg atctc

45

<210> 264
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 264
Ala Arg Gly Asp Asn Trp Asn Tyr Val Ser Trp Phe Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 265
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 265
gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctacat ctgtcggaga cagagtcacc 60
atcacgtgct gggccagtc ggacatcagc agtttttttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcgtccggtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag tctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcagcag gttaatagtt acccgatcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 266
<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 266

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

<210> 267

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 267

caggacatca gcagtttt

18

<210> 268

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 268

Gln	Asp	Ile	Ser	Ser	Phe
1				5	

<210> 269

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 269

gctgcgtcc

9

<210> 270

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 270
 Ala Ala Ser
 1

<210> 271
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 271
 cagcaggtta atagttaccc gatcacc

27

<210> 272
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 272
 Gln Gln Val Asn Ser Tyr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 273
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hIL-25-MMH
 aa 1-145: hIL-25 (aa 33-177 of NP_073626.1)
 aa 146-173: đuôi myc-myc-hexahistidin

<400> 273
 Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu Pro
 20 25 30
 Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly
 35 40 45
 Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg
 50 55 60
 Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys
 65 70 75 80
 Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg Gly
 85 90 95

```

Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro
      100      105      110
Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Arg
      115      120      125
Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met
      130      135      140
Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys
145      150      155      160
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
      165      170

```

<210> 274

<211> 172

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MfIL-25-MMH

aa 1-144: M.fascicularis IL-25 (aa 33-176 of
XP_001107906.2)

aa 145-172: đuôi myc-myc-hexahistidin

<400> 274

```

Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Tyr Pro Ser Glu
1      5      10      15
Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Lys Pro Ala
      20      25      30
Ser Leu Asp Phe His Ser Val Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly Pro
      35      40      45
Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg Asp
      50      55      60
Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys Pro
65      70      75      80
His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg Gly Asn
      85      90      95
Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys
      100      105      110
His Gly Lys Lys Gly Asn His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Arg Leu
      115      120      125
Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met Gly
      130      135      140
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu
145      150      155      160
Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
      165      170

```

<210> 275

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-25-MMH chuột nhà

aa 1-153: IL-25 chuột nhà (aa 17-169 of NP_542767.1)

aa 154-181: đuôi myc-myc-hexahistidin

<400> 275

```

Val Ser Leu Arg Ile Gln Glu Gly Cys Ser His Leu Pro Ser Cys Cys
 1          5          10          15
Pro Ser Lys Glu Gln Glu Pro Pro Glu Glu Trp Leu Lys Trp Ser Ser
          20          25          30
Ala Ser Val Ser Pro Pro Glu Pro Leu Ser His Thr His His Ala Glu
          35          40          45
Ser Cys Arg Ala Ser Lys Asp Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser
          50          55          60
Pro Trp Ser Tyr Glu Leu Asp Arg Asp Leu Asn Arg Val Pro Gln Asp
65          70          75          80
Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr
          85          90          95
Gly Ser His Met Asp Pro Leu Gly Asn Ser Val Pro Leu Tyr His Asn
          100          105          110
Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Glu Gly Thr His
          115          120          125
Arg Arg Tyr Cys Leu Glu Arg Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys
          130          135          140
Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
145          150          155          160
Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His
          165          170          175
His His His His His
          180

```

<210> 276

<211> 181

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-25-MMH chuột nhắt

aa 1-153: IL-25 chuột nhắt (aa 17-169 of NP 001178936.1)

aa 154-181: đuôi myc-myc-hexahistidin

<400> 276

```

Val Ser Leu Arg Ile Gln Glu Asp Cys Ser His Leu Pro Arg Cys Cys
 1          5          10          15
Pro Ser Lys Gln Gln Glu Phe Pro Glu Glu Trp Leu Lys Trp Asn Pro
          20          25          30
Ala Pro Val Ser Pro Pro Glu Pro Leu Arg His Thr His His Pro Glu
          35          40          45
Ser Cys Arg Ala Ser Lys Asp Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser
          50          55          60
Pro Trp Ser Tyr Glu Leu Asp Arg Asp Leu Asn Arg Val Pro Gln Asp
65          70          75          80
Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr
          85          90          95
Gly Ser His Met Asp Pro Met Gly Asn Ser Val Pro Leu Tyr His Asn
          100          105          110
Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Gln Gly Ala His
          115          120          125
Gly Arg Tyr Cys Leu Glu Arg Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys
          130          135          140
Val Cys Val Arg Pro Arg Met Met Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
145          150          155          160
Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His
          165          170          175

```

His His His His His
180

<210> 277
<211> 1335
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IL-25 người (NM_022789.3)

<400> 277
ggcttgctga aaataaaatc aggactccta acctgctcca gtcagcctgc ttccacgagg 60
cctgtcagtc agtgcaccac ttgtgactga gtgtgcagtg cccagcatgt accagggtcag 120
tgcagagggc tgcctgaggg ctgtgctgag agggagagga gcagagatgc tgctgagggg 180
ggagggaggc caagctgccca ggtttggggc tgggggccaa gtggagttag aaactgggat 240
cccaggggga ggggtgcagat gagggagcga cccagattag gtgaggacag ttctctcatt 300
agccttttcc tacagggtgtg tgcattcttg gcaatggtca tgggaaccca cacctacagc 360
cactggccca gctgctgccc cagcaaaggg caggacacct ctgaggagct gctgagggtg 420
agcactgtgc ctgtgcctcc cctagagcct gctaggccca accgccaccc agagtcctgt 480
agggccagtg aagatggacc cctcaacagc agggccatct ccccttgagg atatgagttg 540
gacagagact tgaaccggtc ccccaggac ctgtaccacg cccgttgccct gtgcccgcac 600
tgcgtcagcc tacagacagg ctcccacatg gacccccggg gcaactcgga gctgctctac 660
cacaaccaga ctgtcttcta ccggcgccca tgccatggcg agaagggcac ccacaagggc 720
tactgcttg agcgcaggct gtaccgtgtt tccttagctt gtgtgtgtgt gcggccccgt 780
gtgatgggct agccggacct gctggaggct ggtccctttt tgggaaacct ggagccaggt 840
gtacaaccac ttgccatgaa gggccaggat gccagatgc ttggccctg tgaagtgtg 900
tctggagcag caggatcccc ggacaggatg gggggctttg gggaagcct gcacttctgc 960
acattttgaa aagagcagct gctgcttagg gccgcccggaa gctgggtgtc tgtcattttc 1020
tctcaggaaa ggttttcaaa gttctgcccc tttctggagg ccaccactcc tgtctcttcc 1080
tcttttccca tccctgcta cctggccca gcacaggcac tttctagata tttccccctt 1140
gctggagaag aaagagcccc tggtttttatt tgtttgttta ctcactc agtgagcatc 1200
tactttgggt gcattctagt gtagttacta gtcttttgac atggatgatt ctgaggagga 1260
agctgttatt gaatgtatag agatttatcc aaataaatat ctttatttta aaatgaaaaa 1320
aaaaaaaaa aaaaa 1335

<210> 278
<211> 177
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IL-25 người

<400> 278
Met Arg Glu Arg Pro Arg Leu Gly Glu Asp Ser Ser Leu Ile Ser Leu
1 5 10 15
Phe Leu Gln Val Val Ala Phe Leu Ala Met Val Met Gly Thr His Thr
20 25 30
Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr Ser
35 40 45
Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu Pro
50 55 60
Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly
65 70 75 80
Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg
85 90 95
Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys

			100					105					110			
Pro	His	Cys	Val	Ser	Leu	Gln	Thr	Gly	Ser	His	Met	Asp	Pro	Arg	Gly	
		115					120					125				
Asn	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	His	Asn	Gln	Thr	Val	Phe	Tyr	Arg	Arg	Pro	
	130					135					140					
Cys	His	Gly	Glu	Lys	Gly	Thr	His	Lys	Gly	Tyr	Cys	Leu	Glu	Arg	Arg	
145					150					155					160	
Leu	Tyr	Arg	Val	Ser	Leu	Ala	Cys	Val	Cys	Val	Arg	Pro	Arg	Val	Met	
				165				170						175		
Gly																