



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

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

(11)



1-0030490

(51)⁷ C07K 16/46; A61P 11/06; A61P 37/08; (13) B
C07K 16/24; A61K 39/395; A61P 35/00

(21) 1-2014-00684

(22) 14/10/2008

(62) 1-2010-01237

(86) PCT/US2008/079787 14/10/2008

(87) WO/2009/052081 23/04/2009

(30) 07291259.5 15/10/2007 EP; 61/037,128 17/03/2008 US

(45) 25/12/2021 405

(43) 26/05/2014 314A

(73) SANOFI (FR)

54, rue la Boetie, 75008, Paris, France

(72) RAO, Ercole (DE); MIKOL, Vincent (FR); LI, Danxi (US); KRUIP, Jochen (DE);
DAVISON, Matthew (DE).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP LIÊN KẾT VỚI IL-4 VÀ IL-13 VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh kháng thể được làm giống như của người
kháng IL-4 và IL-13 và kháng thể và mảnh kháng thể đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu với IL-
4 và IL-13. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể này để điều trị hoặc ngăn
ngừa bệnh hoặc rối loạn do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra, bao gồm bệnh hen dị ứng và viêm
da.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-4, kháng thể kháng IL-13 và kháng thể đặc hiệu kép kháng IL-13 và IL-4 mới và việc sử dụng chúng để giảm nhẹ, điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn ở động vật có vú, bao gồm cả người, do hoạt tính hoặc quá trình chuyển hoá IL-4 và/hoặc IL-13 không chính xác. Kháng thể được đề cập có thể chặn quá trình liên kết và/hoặc truyền tín hiệu của phối tử, như IL-4 hoặc IL-13, với thụ thể hoặc phức hệ thụ thể, như IL-4R α , IL-13R α 1 và IL-13R α 2. Sáng chế còn đề cập đến các dược phẩm dùng để điều trị dự phòng, điều trị miễn dịch và chẩn đoán chứa kháng thể được đề cập và việc sử dụng chúng trong các phương pháp để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ở động vật có vú, bao gồm cả người, gây ra do quá trình chuyển hoá và/hoặc hoạt tính của các tế bào bạch huyết và không bạch huyết không thích hợp, bao gồm tế bào đơn nhân, nguyên bào sợi và tế bào nội mô. Những bệnh này gồm có bệnh tự miễn và bệnh gây ra do hoặc đặc trưng bởi quá trình viêm, như hen dị ứng và viêm da.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin-4 (IL-4) là một xytokin nhiều hoạt tính có phổ hoạt tính sinh học rộng lên các tế bào bạch huyết B và T, và nhiều loại tế bào không bạch huyết bao gồm tế bào đơn nhân, tế bào nội mô và nguyên bào sợi. Chẳng hạn, IL-4 kích thích quá trình tăng sinh của một số dòng tế bào phụ thuộc IL-2- và IL-13, kích thích quá trình biểu hiện của các phân tử phức hệ tương hợp mô học chính lớp II trên các tế bào B nghỉ, và tăng cường quá trình tiết IgG4 và IgE bởi các tế bào B của người. IL-4 có liên quan đến đáp ứng miễn dịch typ Th2, và được tạo ra bởi và kích thích quá trình biệt hoá các tế bào Th2. IL-4 được cho là có vai trò trong một số rối loạn, như dị ứng và hen.

IL-13 mới được xác định gần đây (Minty, A. et al., Nature, 1993, 362, 248-250, và McKenzie, A. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1993, 90, 3735-3739) là một xytokin gồm 112 axit amin được tiết bởi các tế bào lympho T, tế bào lympho B được hoạt hoá và dưỡng bào sau hoạt hoá.

Nhờ rất nhiều ưu điểm mà là đặc tính sinh học chung với IL-4 nên IL-13 được mô tả là một xytokin giống IL-4. Hoạt tính của nó thật sự giống với hoạt tính của IL-4 trên

các tế bào B (Defrance, T. et al., J. Exp. Med., 1994, 179, 135-143, Punnonen, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1993, 90, 3730-3734, Fior, R. et al., Eur. Xytokin Network, 1994, 5, 593-600), tế bào đơn nhân (Muzio, M. R. F. et al., Blood, 1994, 83, 1738-1743, De Waal Malefyt, R. et al., J. Immunol, 1993, 151, 6370-6381, Doyle, A. et al., Eur. J. Immunol. 1994, 24, 1441-1445, Montaner, L. J. et al., J. Exp. Med., 1993, 178, 743-747, Sozzani, P. et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 5084-5088) và các tế bào không tạo huyết khác (Herbert, J. M. et al., Febs Lett., 1993, 328, 268-270, và Derocq, J. M. et al., Febs Lett. 1994, 343, 32-36). Mặt khác, ngược lại với IL-4, IL-13 không có tác dụng trên các tế bào T nghỉ hoặc hoạt hoá (Zurawuki, G. et al., Immunol. Today, 1994, 15, 19-26).

Các hoạt tính sinh học của IL-13 lên tế bào đơn nhân/đại thực bào, tế bào lympho B và một số tiền tế bào tạo huyết khác đã được mô tả chi tiết bởi A. J. Minty cũng như trong các bài báo về IL-13. Ngoài ra, một vài số liệu đã chỉ ra rằng xytokin này có nhiều tác dụng lên các loại tế bào khác. Các tế bào không tạo huyết này bị tác động trực tiếp bởi IL-13 là các tế bào nội mô và tế bào thần kinh đệm, tế bào sừng và tế bào ung thư biểu mô thận và ruột.

Một trong những giai đoạn trong quá trình phân tích tín hiệu được truyền bởi một phân tử sinh học trong tế bào là giai đoạn xác định thụ thể trên màng của nó. Các nghiên cứu được tiến hành trên thụ thể IL-13 đã chỉ ra rằng IL-13 và IL-4 có một thụ thể chung, hoặc ít nhất là một vài thành phần trong một phức hệ thụ thể chung, cũng như các yếu tố truyền tín hiệu chung (Zurawski S. M. et al., Embo JouARNI, 1993, 12, 2663-2670, Aversa, G. et al., J. Exp. Med., 1993, 178, 2213-2218, Vita, N. et al., Biol. Chem., 1995, 270, 3512-3517, Lefort, S. et al., Febs Lett., 1995, 366, 122-126). Thụ thể này có trên bề mặt của nhiều loại tế bào khác nhau, với số lượng khác nhau tùy theo loại tế bào được nghiên cứu. Mức độ phân bố tương đương nhau của các thụ thể IL-13 và IL-4 đã được chỉ ra bởi A. J. Minty (Interleukin-13 for Cytokines in Health và Disease. Eds D. G. Remick and J. S. Frie, Marcel Decker, N.Y. 1996).

Các thụ thể và phức hệ thụ thể trên bề mặt tế bào liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 với ái lực khác nhau. Các thành phần cơ bản của thụ thể và phức hệ thụ thể liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 là IL-4R α , IL-13R α 1 và IL-13R α 2. Các chuỗi này được biểu hiện trên bề mặt tế bào ở dạng monome hoặc dị dime của IL-4R α /IL-13R α 1 (IL-4R Typ II)

hoặc IL-4R α / γ c (IL-4R Typ I). Monome IL-4R α và dị dime IL-4R α / γ c liên kết với IL-4, nhưng lại không liên kết với IL-13. Monome IL-13R α 1 và IL-13R α 2 liên kết với IL-13, nhưng không liên kết với IL-4. Dị dime IL-4R α /IL-13R α 1 liên kết với cả IL-4 và IL-13 (Murata et al., Int. J. Hematol., 1999, 69, 13-20).

Các đáp ứng miễn dịch kiểu Th2 kích thích quá trình sản xuất kháng thể và miễn dịch thể dịch, và được tạo ra để kháng lại các mầm bệnh ngoại bào. Các tế bào Th2 là yếu tố trung gian trong quá trình sản xuất Ig (miễn dịch thể dịch) và sản xuất IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 và IL-13 (Tanaka, et, al., Xytokin Regulation of Humoral Imunity, 251- 272, Snapper, ed., John Wiley and Sons, New York (1996)). Các đáp ứng miễn dịch kiểu Th2 đặc trưng bởi sự tạo ra một số xytokin (chẳng hạn, IL-4, IL-13) và các loại kháng thể đặc hiệu (IgE, IgG4) và thường là các phản ứng dị ứng, có thể gây ra triệu chứng mắt mọng nước và hen, như quá trình viêm khí quản và co các tế bào cơ khí quản trong phổi.

Cả IL-4 và IL-13 đều là các xytokin quan trọng trên lâm sàng dựa trên chức năng sinh học của chúng và đóng vai trò quan trọng trong nhiều bệnh, bao gồm hen (Curr Opin Allergic Clin Immunol 2005, Vo. 5, 161-166). IL-4 đã được chứng minh là có khả năng ức chế bệnh tự miễn và IL-4 và IL-13 đều có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng u. Vì cả hai xytokin này đều có vai trò trong quá trình bệnh sinh của các bệnh dị ứng, nên các chất ức chế các xytokin này sẽ có nhiều tác dụng trong điều trị.

Do đó, cần có các hoạt chất được cải thiện để ức chế IL-4, ức chế IL-13, và các hoạt chất đơn nhất ức chế cả IL-4 và IL-13.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể mới đặc hiệu kép, đơn dòng và được làm giống như của người, và mảnh kháng thể và dẫn xuất của chúng, có thể liên kết đặc hiệu với IL-4 và/hoặc IL-13. Một vài trong số các kháng thể đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép kháng IL-4 và/hoặc IL-13, và mảnh kháng thể của nó, có thể được biến đổi để tránh sự hình thành liên kết disulfua nội phân tử trong phân tử ổn định trong quá trình sản xuất và sử dụng *in vivo*. Kháng thể theo sáng chế sẽ trung hoà hoạt tính IL-4 và/hoặc IL-13 trong các thử nghiệm sinh học được mô tả ở đây.

Sáng chế đề xuất trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể và trình tự axit nucleic tương ứng của chúng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các dòng tế bào và vector chứa kháng thể theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể để bào chế được phẩm để điều trị bệnh và rối loạn liên quan đến chức năng và quá trình chuyển hoá của IL-4 và/hoặc IL-13. Cụ thể là, sáng chế mô tả việc điều trị ung thư, bệnh tự miễn và bệnh gây ra do hoặc đặc trưng bởi quá trình viêm, như hen dị ứng và viêm da.

Các đặc tính và ưu điểm khác được mô tả ở đây sẽ trở lên rõ ràng sau khi tham khảo phần mô tả chi tiết sáng chế và phần hình vẽ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là giản đồ của kháng thể đặc hiệu kép kháng IL-4/IL-13 chứa 4 chuỗi polypeptit. Hai chuỗi nhẹ bao gồm N-VLhB-B13-đoạn liên kết-VLh8D4-8-CL-C (CL, vùng cố định chuỗi nhẹ), hai chuỗi nặng gồm N-VHhB-B13-đoạn liên kết-VHh8D4-8-CH1-CH2-CH3-C. Trình tự đoạn liên kết (G4S)₂ là GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6).

Fig.2 minh họa trình tự axit amin của vùng biến đổi được làm giống như của người của kháng thể B-B13 kháng IL-13 (SEQ ID NO: 1 và 2) và vùng biến đổi được làm giống như của người của kháng thể 8D4-8 kháng IL-4 (SEQ ID NO: 3, 4 và 5). Phần gạch chân chỉ ra sự thay đổi axit amin được tạo ra. Phần in đậm chỉ vùng CDR.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế không bị hạn chế ở phương pháp, quy trình, dòng tế bào, vector, hoặc hợp chất cụ thể được mô tả ở đây vì chúng có thể được thay đổi mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, thuật ngữ được sử dụng ở đây dùng để minh họa các phương án cụ thể và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học và các chữ viết tắt được sử dụng ở đây có cùng nghĩa như nghĩa thường được sử dụng bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp và vật liệu bất kỳ giống hoặc tương tự với các phương pháp được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong quá trình thực hiện sáng chế và chỉ là những phương pháp, thiết bị và vật liệu có tính minh họa.

Tất cả các sáng chế và ấn phẩm được đề cập ở đây được đưa vào đây theo cách viện dẫn với mục đích mô tả các protein, enzym, vector, tế bào chủ và phương pháp luận được đề cập trong những tài liệu này có thể được sử dụng trong sáng chế. Tuy nhiên, không nên hiểu rằng sáng chế là tương tự như các tài liệu trên.

Trước khi giải thích việc sử dụng các phương pháp và sản phẩm liên quan đến IL-4 và/hoặc IL-13 được đề cập ở đây, các định nghĩa không hạn chế của một số thuật ngữ được đưa ra để làm rõ nghĩa hơn đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

“Interleukin-4” (IL-4) đề cập đến các protein IL-4 có nguồn gốc tự nhiên, hoặc protein IL-4 nội sinh của động vật có vú và các protein có trình tự axit amin tương tự với protein IL-4 có nguồn gốc tự nhiên hoặc protein nội sinh của động vật có vú tương ứng {chẳng hạn, protein tái tổ hợp, protein tổng hợp (nghĩa là, được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp hoá học tổng hợp hữu cơ)). Do đó, như được định nghĩa ở đây, thuật ngữ này gồm có protein IL-4, các biến thể hình thái hoặc biến thể alen, và các loại protein đồng dạng khác của IL-4 và các dạng được biến đổi hoặc không được biến đổi của các dạng nêu trên (chẳng hạn, dạng được lipit hoá, dạng được glycosyl hoá). IL-4 có nguồn gốc tự nhiên hoặc nội sinh gồm có các protein kiểu đại như IL-4, các biến thể hình thái hoặc biến thể alen và các dạng đồng phân khác và dạng đột biến có nguồn gốc tự nhiên ở động vật có vú (chẳng hạn của người, hoặc linh trưởng không phải người). Các protein có thể được khôi phục hoặc phân lập từ nguồn có thể tạo ra IL-4 một cách tự nhiên, chẳng hạn. Các protein này và các protein có trình tự axit amin giống như trình tự axit amin của IL-4 có nguồn gốc tự nhiên hoặc nội sinh tương ứng, như tên của các động vật có vú tương ứng. Chẳng hạn, trong đó động vật có vú tương ứng là người, protein được gọi là IL-4 của người. Một số protein IL-4 đột biến đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các protein được đề cập trong WO 03/038041.

“Interleukin-13” (IL-13) đề cập đến các protein IL-13 có nguồn gốc tự nhiên, hoặc protein IL-13 nội sinh của động vật có vú và các protein có trình tự axit amin tương tự với protein IL-13 có nguồn gốc tự nhiên hoặc protein nội sinh của động vật có vú tương ứng (chẳng hạn, protein tái tổ hợp, protein tổng hợp (nghĩa là, được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp hoá học tổng hợp hữu cơ)). Do đó, như được định nghĩa ở đây, thuật ngữ này gồm có protein IL-13, các biến thể hình thái hoặc biến thể alen, và các loại protein đồng dạng khác của IL-13 và các dạng được biến đổi hoặc không được biến đổi của các dạng nêu trên (chẳng hạn, dạng được lipit hoá, dạng được glycosyl hoá). IL-13 có nguồn gốc tự nhiên hoặc nội sinh gồm có các protein kiểu đại như IL-13, các biến thể hình thái hoặc biến thể alen và các dạng đồng phân khác và dạng đột biến có nguồn gốc tự nhiên ở động vật có vú (chẳng hạn của người, hoặc linh trưởng không phải người).

người). Chẳng hạn, như được sử dụng ở đây IL-13 gồm có biến thể IL-13 của người trong đó Arg ở vị trí 110 của IL-13 trưởng thành của người được thay thế bằng Gln (vị trí 110 của IL-13 trưởng thành tương ứng với vị trí 130 của protein) cùng với hen (hen dị ứng và không dị ứng) và các biến thể khác của IL-13. (Heinzmann et al, Hum Mol Genet. 9:549-559 (2000).) Các protein có thể được khôi phục hoặc phân lập từ nguồn có thể tạo ra IL-13 một cách tự nhiên, chẳng hạn. Các protein này và các protein có trình tự axit amin giống như trình tự axit amin của IL-13 có nguồn gốc tự nhiên hoặc nội sinh tương ứng, như tên của các động vật có vú tương ứng. Chẳng hạn, trong đó động vật có vú tương ứng là người, protein được gọi là IL-13 của người. Một số protein IL-13 đột biến đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các protein được đề cập trong WO 03/038041.

Thuật ngữ "gần như tương đồng" khi đề cập đến trình tự polypeptit của kháng thể có thể được hiểu là một chuỗi kháng thể có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95% hoặc cao hơn so với trình tự polypeptit đối chứng. Thuật ngữ độ tương đồng về trình tự nucleotit có thể được hiểu là phân tử axit nucleic có độ tương đồng về trình tự ít nhất khoảng 85%, 90%, 95%, hoặc 97% hoặc cao hơn với trình tự axit nucleic đối chứng.

Thuật ngữ "độ tương đồng" chỉ tỷ lệ phần trăm bazơ nucleotit hoặc gốc axit amin trong trình tự tham khảo giống với các gốc trong trình tự tương ứng được so sánh, sau khi so sánh các trình tự và tạo ra các khoảng trống ở các trình tự này, nếu cần, để đạt được tỷ lệ phần trăm mức độ tương đồng tối đa đối với toàn bộ trình tự, và không xét đến một đột biến thay thế bảo toàn bất kỳ như một phần của việc xác định độ tương đồng về trình tự. Các đột biến thêm đoạn cũng như xen đoạn tại đầu N hoặc đầu C sẽ được xét vì chúng làm giảm độ tương đồng. Đã có nhiều phương pháp và chương trình máy tính để so sánh trình tự. Độ tương đồng về trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng các phần mềm phân tích trình tự.

Thuật ngữ "mảnh chức năng, biến thể, dẫn xuất hoặc đồng phân" và các thuật ngữ tương tự, cũng như các dạng biến đổi của chúng, của một kháng thể hoặc kháng nguyên là một hợp chất hoặc phân tử có hoạt tính sinh học định tính giống như kháng thể hoặc kháng nguyên nguyên vẹn được đề cập. Chẳng hạn, mảnh chức năng hoặc đồng phân của kháng thể kháng IL-4 có thể liên kết với phân tử IL-4 hoặc có thể ngăn chặn hoặc

giảm một cách đáng kể khả năng liên kết với IL-4 của một phối tử, hoặc kháng thể chủ vận hoặc kháng thể đối kháng.

Biến thể "thay thế" là các biến thể có ít nhất 1 gốc axit amin trong trình tự gốc được loại bỏ và thay thế bằng một gốc axit amin khác được xen vào đúng vị trí đó. Các đột biến thay thế có thể là đơn nhất, trong đó chỉ một axit amin trong phân tử được thay thế, hoặc có thể là đột biến thay thế nhiều, trong đó hai hoặc nhiều axit amin được thay thế trong cùng một phân tử. Nhiều đột biến thay thế có thể ở các vị trí liền nhau. Tương tự, một axit amin có thể được thay thế bằng nhiều gốc axit amin, trong trường hợp này biến thể này chứa cả đột biến thay thế và đột biến xen đoạn. Biến thể "xen đoạn" là các biến thể có một hoặc nhiều axit amin được xen ngay liền kề với axit amin ở một vị trí cụ thể trong trình tự gốc. Ngay liền kề với một axit amin nghĩa là đoạn xen được nối với nhóm chức năng α -carboxyl hoặc α -amin của axit amin đó. Biến thể "mất đoạn" là các biến thể có một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin gốc được loại bỏ. Thông thường, các biến thể mất đoạn sẽ có một hoặc hai axit amin được loại bỏ trong một vùng cụ thể của phân tử.

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất, và cụ thể chỉ kháng thể đơn dòng (bao gồm kháng thể đơn dòng nguyên vẹn), kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (chẳng hạn, kháng thể đặc hiệu kép), mảnh kháng thể hoặc polypeptit tổng hợp mang một hoặc nhiều CDR hoặc trình tự thu được từ CDR sao cho polypeptit này có hoạt tính sinh học mong muốn. Kháng thể (Abs) và globulin miễn dịch (Ig) là các glycoprotein có cùng đặc điểm cấu trúc. Thông thường, kháng thể được coi là các Ig có độ đặc hiệu nhất định. Do đó, khi kháng thể có độ đặc hiệu liên kết với một đích đặc hiệu, thì globulin miễn dịch gồm cả kháng thể và các phân tử giống kháng thể không có độ đặc hiệu với đích. Kháng thể theo sáng chế có thể thuộc một lớp kháng thể bất kỳ (chẳng hạn, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và tương tự), hoặc các phân lớp bất kỳ (chẳng hạn, IgG1, IgG2, IgG2a, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 và tương tự) ("typ" và "lớp", và "phân typ" và "phân lớp", được sử dụng thay thế cho nhau). Kháng thể và globulin miễn dịch tự nhiên hoặc kiểu đại, nghĩa là kháng thể và globulin miễn dịch thu được từ một thành viên không bị biến đổi nhân tạo trong một nhóm kháng thể thường là các dị glycoprotein tứ phân có trọng lượng phân tử khoảng 150000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ (L) giống nhau và hai chuỗi nặng (H) giống nhau. Mỗi chuỗi nặng có tại một đầu một vùng biến đổi (VH) sau đó là một số vùng cố định. Mỗi chuỗi nhẹ có một vùng

biến đổi ở một đầu (VL) và một vùng cố định ở đầu còn lại. Thuật ngữ “không được biến đổi nhân tạo” nghĩa là không được xử lý để chứa hoặc biểu hiện phân tử liên kết với kháng nguyên lạ. Kiểu đại có thể bao gồm hầu hết các loại hoặc alen tương ứng có trong quần thể kháng thể hoặc chỉ kháng thể thu được từ động vật không được biến đổi, so với một alen hoặc hiện tượng đa hình, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất thu được từ quá trình biến đổi, như gây đột biến, sử dụng phương pháp tái tổ hợp và các phương pháp tương tự để thay đổi axit amin của phân tử liên kết với kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, “kháng thể kháng IL-4” chỉ kháng thể hoặc polypeptit thu được từ kháng thể (dẫn xuất) liên kết đặc hiệu với IL-4 như được định nghĩa ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử ức chế hoặc giảm một cách đáng kể mức độ liên kết của IL-4 với thụ thể của nó hoặc ức chế hoạt tính IL-4.

Như được sử dụng ở đây, “kháng thể kháng IL-13” chỉ kháng thể hoặc polypeptit thu được từ kháng thể (dẫn xuất) liên kết đặc hiệu với IL-13 như được định nghĩa ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử ức chế hoặc giảm một cách đáng kể mức độ liên kết của IL-13 với thụ thể của nó hoặc ức chế hoạt tính IL-13.

Thuật ngữ "biến đổi" trong ngữ cảnh đề cập đến vùng biến đổi của kháng thể chỉ một số phần của phân tử khác hoàn toàn về trình tự giữa các vùng trong kháng thể và giữa các kháng thể và được sử dụng trong quá trình nhận biết đặc hiệu và liên kết của một kháng thể cụ thể đối với đích đặc hiệu của chúng. Tuy nhiên, mức độ biến đổi không được phân bố đều đặc trong vùng biến đổi của kháng thể. Mức độ biến đổi được tập trung chủ yếu vào 3 đoạn được gọi là vùng quyết định bổ thể (CDR; nghĩa là, CDR1, CDR2, và CDR3) còn được gọi là các vùng siêu biến, cả trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Các phần được bảo toàn cao của vùng biến đổi được gọi là vùng hoặc trình tự khung (FR). Mỗi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tự nhiên bao gồm 4 vùng FR, trên quy mô lớn tạo thành cấu hình gấp nếp β , được nối bởi 3 vùng CDR, sẽ tạo thành các vòng nối với, và trong một vài trường hợp tạo thành một phần của cấu trúc gấp nếp β . Các vùng CDR trong mỗi chuỗi được nối kéo lại gần với nhau trong không gian bởi các vùng FR và, cùng với các vùng CDR từ chuỗi kia, sẽ tạo thành vị trí liên kết với đích (epitop hoặc quyết định kháng nguyên) của kháng thể (tham khảo Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). Như được sử dụng ở đây, việc đánh số các

gốc axit amin globulin miễn dịch được thực hiện theo hệ thống đánh số gốc axit amin của globulin miễn dịch theo Kabat và các đồng tác giả, trừ khi được quy định khác. Một vùng CDR có thể có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop cùng gốc.

Thuật ngữ "bản lề" hoặc "vùng bản lề" như được sử dụng theo sáng chế chỉ polypeptit kinh động chứa các axit amin ở giữa vùng cố định thứ nhất và thứ hai của một kháng thể.

Thuật ngữ "mảnh kháng thể" chỉ một phần của một chuỗi nguyên vẹn hoặc một kháng thể, thường là vùng biến đổi hoặc vùng liên kết với đích. Ví dụ về mảnh kháng thể gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mảnh kháng thể Fab, Fab', F(ab')₂ và Fv. "Mảnh chức năng" hoặc "đồng phân của kháng thể kháng IL-4 và/hoặc IL-13" là phân tử có ngăn chặn hoặc giảm một cách đáng kể khả năng liên kết với phối tử hoặc khởi động quá trình truyền tín hiệu của thụ thể. Như được sử dụng ở đây, mảnh chức năng thường là đồng nghĩa với, "mảnh kháng thể" và khi nói đến kháng thể, có thể chỉ mảnh kháng thể, như Fv, Fab, F(ab')₂ và tương tự có thể ngăn chặn hoặc giảm một cách đáng kể khả năng liên kết với phối tử hoặc khởi động quá trình truyền tín hiệu của thụ thể. Mảnh "Fv" gồm có một dime của một chuỗi nặng và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong một liên kết không đồng hoá trị (dime VH-VL). Trong cấu hình đó, 3 vùng CDR của mỗi vùng biến đổi sẽ tương tác để xác định vị trí liên kết kháng nguyên trên bề mặt của dime VH-VL, như trong một kháng thể nguyên vẹn. Nhìn chung, 6 vùng CDR sẽ tạo ra mức độ đặc hiệu liên kết với kháng nguyên trên kháng thể nguyên vẹn. Tuy nhiên, ngay cả một vùng biến đổi đơn (hay một nửa của một mảnh Fv chỉ chứa 3 vùng CDR cũng đặc hiệu đối với kháng nguyên) có thể có khả năng nhận biết và liên kết với kháng nguyên.

Mảnh kháng thể "Fv một chuỗi" "sFv" hoặc "scAb" chứa các vùng VH và VL của một kháng thể, trong đó các vùng này ở dạng một chuỗi polypeptit đơn nhất. Thông thường, polypeptit Fv còn chứa một đoạn liên kết polypeptit, thường là một phân tử linh động, giữa vùng VH và VL, cho phép sFv tạo ra cấu trúc mong muốn để liên kết với kháng nguyên.

Thuật ngữ "kháng thể kép" chỉ mảnh kháng thể có hai vị trí liên kết kháng nguyên, mảnh kháng thể này có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) được nối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong cùng một chuỗi polypeptit. Bằng cách sử dụng

đoạn liên kết rất ngắn để tạo ra sự ghép cặp giữa hai vùng biến đổi trên cùng một chuỗi, các vùng chức năng của kháng thể kép được ghép cặp với vùng liên kết của một chuỗi khác để tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên.

Mảnh Fab chứa vùng cố định và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi và vùng cố định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Mảnh kháng thể Fab' khác với mảnh kháng thể Fab do có sự thêm một vài gốc ở đầu carboxyl của vùng CH1 để chứa một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề của kháng thể. Mảnh kháng thể Fab' có thể được tạo ra bằng cách phân cắt liên kết disulfua ở các xystein trong vùng bản lề của sản phẩm phân huỷ bằng pepsin F(ab')₂. Các quá trình xử lý hoá học và bằng enzym tiếp theo kháng thể có thể tạo ra các mảnh chức năng kháng thể khác đã được đề cập.

Thuật ngữ “Fab thẳng” chỉ kháng thể tứ trị được mô tả bởi Miller và các đồng tác giả (2003), J Immunol. 170: 4854-4861. "Fab thẳng" gồm có bộ đôi CH1-VH giống nhau, được nối với các chuỗi nhẹ giống nhau tại mỗi vị trí CH1-VH. Các phân tử này đã được tạo ra để tăng lực liên kết của kháng thể để làm tăng ái lực chức năng qua tác dụng mạnh, nhưng các kháng thể này là đơn đặc hiệu.

Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép (BsAbs)” chỉ các phân tử kết hợp vị trí liên kết kháng nguyên của hai kháng thể trong cùng một phân tử. Do đó, kháng thể đặc hiệu kép có khả năng liên kết đồng thời với hai kháng nguyên khác nhau. Bên cạnh các ứng dụng đối với chẩn đoán, BsAb sẽ mở đường cho các ứng dụng điều trị mới bằng cách tái tác động các hệ thống chất tác động có khả năng vào các vùng bị bệnh hoặc bằng cách gia tăng hoạt tính trung hoà hoặc kích thích của kháng thể.

Các nỗ lực đầu tiên kết hợp các vùng đặc hiệu liên kết của hai kháng thể nguyên vẹn kháng lại các kháng nguyên đích khác nhau để sử dụng trong điều trị sử dụng các phân tử dị liên hợp được dung hợp hoá học (Staerz et al.(1985), Nature 314: 628-631).

Kháng thể đặc hiệu kép đã được tạo ra từ các tế bào lai bằng các kỹ thuật lai khác nhau và đã chứng tỏ các hoạt tính *in vitro* tương tự như các hoạt tính quan sát được ở các phân tử dị liên hợp (Milstein & Cuello (1983) Nature 305:537-540).

Mặc dù đã thu được các kết quả hứa hẹn khi sử dụng các thể dị liên hợp hoặc kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra từ các thể dung hợp tế bào nêu trên, tuy nhiên một vài yếu tố đã khiến những kết quả này không thể thực hiện được trên quy mô điều trị đại trà. Những yếu tố này gồm có: mức độ thanh thải nhanh của các thể liên hợp lớn *in*

vivo, các kỹ thuật đòi hỏi nhiều nhân lực để tạo ra các loại phân tử khác nhau, sự cần thiết phải có nhiều quá trình tinh chế các thể dị liên hợp từ các thể đồng liên hợp hoặc kháng thể đơn đặc hiệu và sản lượng thường thấp.

Kỹ thuật di truyền đã được sử dụng với tần suất ngày càng tăng để thiết kế, biến đổi, và tạo ra kháng thể hoặc dẫn xuất kháng thể có hoạt tính liên kết mong muốn và chức năng hiệu ứng.

Một loạt các phương pháp tái tổ hợp khác nhau đã được phát triển để tạo ra BsAb một cách có hiệu quả, cả ở dạng mảnh kháng thể (Carter et al. (1995), *J. Hematotherapy* 4: 463-470; Pluckthun et al. (1997) *Immunotechnology* 3: 83-105; Todorovska et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 248: 47-66) và dạng IgG nguyên vẹn (Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248: 7-15).

Việc kết hợp hai scFv khác nhau sẽ tạo ra các dạng BsAb có khối lượng phân tử tối thiểu, được gọi là các sc-BsAb hoặc Ta-scFv (Mack et al.(1995), *Proc. Acad. Sci.USA.* 92: 7021-7025; Mallender et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 199-206). BsAb đã được tạo ra bằng cách dung hợp di truyền hai scFv bằng cách dime hoá nhóm chức như cấu trúc khoá kéo loxin (Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148: 1547-53; de Kruif et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 7630-4).

Như đã nêu, các kháng thể kép là các mảnh kháng thể nhỏ lưỡng trị và đặc hiệu kép. Mảnh kháng thể chứa VH được nối với VL trên cùng một chuỗi polypeptit, bằng cách sử dụng đoạn liên kết rất ngắn (ít hơn 12 axit amin) để cho phép quá trình kết cặp giữa hai vùng chức năng trên cùng một chuỗi. Các vùng chức năng này được kết cặp nội phân tử với các vùng bổ thể của một chuỗi khác và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên. Các mảnh kháng thể dime này, hoặc "kháng thể kép," này là lưỡng trị và đặc hiệu kép. (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6444-6448). Các kháng thể kép là giống nhau về kích thước so với mảnh Fab. Chuỗi polypeptit của các vùng VH và VL được nối với đoạn liên kết có độ dài từ 3 đến 12 axit amin để phần lớn tạo thành các dime (kháng thể kép), trong khi đó với các đoạn liên kết có độ dài từ 0 đến 2 gốc axit amin, các trime (kháng thể ba) và tetrame (kháng thể bốn) sẽ chiếm ưu thế. Ngoài độ dài của đoạn liên kết, khuôn mẫu chính xác của quá trình oligome hoá dường như phụ thuộc vào thành phần cũng như hướng của các vùng V (Hudson et al.

(1999), *J Immunol Methods* 231: 177-189). Khả năng dự đoán cấu trúc cuối cùng của phân tử kháng thể kép là rất hạn chế.

Mặc dù sc-BsAb và các cấu trúc dựa trên kháng thể kép có tiềm năng lâm sàng rất đáng chú ý, nhưng đã được chỉ ra rằng những phân tử được liên kết không đồng hoá trị này không đủ ổn định ở điều kiện sinh lý. Độ ổn định toàn phần của mảnh scFv phụ thuộc vào độ ổn định nội tại của các vùng VL và VH cũng như vào độ ổn định của bề mặt tiếp xúc giữa các vùng chức năng. Độ ổn định không đầy đủ của bề mặt tiếp xúc giữa VH-VL của mảnh kháng thể scFv thường được coi là nguyên nhân chính của hiện tượng bất hoạt scFv không thuận nghịch, vì có hiện tượng phân tách tạm thời bề mặt tiếp xúc này, hiện tượng này có thể là do đoạn liên kết peptit, sẽ làm bộc lộ phần kỵ nước tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình kết tụ và do đó tạo ra sản phẩm không ổn định và sản lượng thấp (Wörn và Plückthun (2001), *J. Mol. Biol.* 305: 989-1010).

Một phương pháp khác để sản xuất các protein liên kết với kháng nguyên đặc hiệu kép lưỡng trị từ các vùng chức năng VH và VL được đề cập trong US 5,989,830. Các mảnh kháng thể hai đầu này có thể thu được bằng cách biểu hiện vector chứa hai gen mã hoá hai chuỗi polypeptit, nhờ đó một chuỗi polypeptit sẽ có hai chuỗi VH liên nhau được nối với nhau bằng một đoạn liên kết peptit (VH1-đoạn liên kết-VH2) và một chuỗi polypeptit khác chứa các vùng VL bổ sung được nối với nhau bởi đoạn liên kết peptit (VL1-đoạn liên kết-VL2). Đã được đề cập trong tài liệu US 5,989,830 rằng mỗi đoạn liên kết chứa ít nhất 10 gốc axit amin.

Các phức hệ protein đa trị (PPC) có lực liên kết gia tăng đã được mô tả trong tài liệu US 2005/0003403 A1. PPC gồm có hai chuỗi polypeptit thường được sắp xếp cạnh bên nhau. Mỗi chuỗi polypeptit thường chứa từ 3 đến 4 "vùng v", các vùng này chứa trình tự axit amin có khả năng tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên khi được ghép cặp với vùng v tương ứng trên chuỗi polypeptit đối diện. Có không quá khoảng 6 "vùng v" có thể được sử dụng trên mỗi chuỗi polypeptit. Các vùng v trên mỗi chuỗi polypeptit được liên kết thẳng với nhau và có thể được nối với nhau bởi các vùng liên kết nằm rải rác trên chuỗi polypeptit. Khi được sắp xếp ở dạng PPC, các vùng v trên mỗi chuỗi polypeptit sẽ tạo thành các vị trí liên kết kháng nguyên riêng rẽ. Phức hệ có thể chứa một hoặc một vài vị trí liên kết đặc hiệu.

Tuy nhiên, việc sử dụng các phân tử này đã cho thấy có hiện tượng kết tụ, không ổn định và hiệu suất biểu hiện thấp (Wu et al. (2001) *Prot. Eng.* 14: 1025-1033). Đây là các vấn đề về độ ổn định thông thường có thể xảy ra khi biểu hiện kháng thể một chuỗi (Wörn và Plückthun (2001), *J. Mol. Biol.* 305: 989-1010).

Do đó, một mục tiêu của sáng chế là tạo ra kháng thể đa trị đặc hiệu kép theo các phương pháp để tránh hiện tượng hình thành kết tụ. Hơn nữa, kháng thể này sẽ có độ ổn định để có thể sử dụng được trong điều trị.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây chỉ kháng thể thu được từ một nhóm kháng thể gần như đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng rẽ trong nhóm kháng thể này là giống nhau ngoại trừ các đột biến có nguồn gốc tự nhiên có thể có với số lượng không đáng kể.

Kháng thể đơn dòng ở đây đặc biệt là bao gồm cả kháng thể "khảm" trong đó một phần chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể thu được từ một loài cụ thể hoặc thuộc vào một lớp hoặc một phân lớp kháng thể cụ thể (typ hoặc phân typ), và phần còn lại của chuỗi là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể thu được từ một loài khác hoặc thuộc vào một lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như mảnh kháng thể của những kháng thể này, miễn là chúng có hoạt tính sinh học liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 mong muốn hoặc tác động đến hoạt tính hoặc quá trình chuyển hoá IL-4 và/hoặc IL-13 (US 4,816,567; và Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851 (1984)). Do đó, các vùng CDR từ một lớp kháng thể có thể được ghép vào vùng FR của một kháng thể thuộc một lớp hoặc một phân lớp kháng thể khác.

Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, kháng lại một vị trí đích, epitop hoặc quyết định kháng nguyên đơn. Hơn nữa, trái với các chế phẩm kháng thể truyền thống (đa dòng) thường chứa nhiều kháng thể khác nhau kháng lại các quyết định kháng nguyên (epitop) khác nhau của một kháng nguyên, mỗi kháng thể đơn dòng sẽ kháng lại một quyết định kháng nguyên đơn nhất trên đích. Ngoài độ đặc hiệu của chúng, kháng thể đơn dòng còn có ưu điểm là được tổng hợp bởi tế bào chủ, không bị nhiễm các globulin miễn dịch khác, và tạo ra các gen và ARN thông tin tương ứng mã hoá chuỗi kháng thể của nó để nhân dòng. Thuật ngữ "đơn dòng" chỉ ra đặc điểm của kháng thể là thu được từ một nhóm kháng thể gần như đồng nhất, và không có nghĩa là thực hiện quá

trình sản xuất kháng thể bằng một phương pháp cụ thể. Chẳng hạn, kháng thể đơn dòng để sử dụng theo sáng chế có thể được phân lập từ ngân hàng kháng thể thực khuẩn bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết hoặc có thể được tính chế từ chế phẩm kháng thể đa dòng. Kháng thể đơn dòng gốc được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp lai tế bào được mô tả bởi Kohler et al., Nature 256:495 (1975), hoặc có thể được tạo ra bằng các phương pháp tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ "kháng thể đa trị" được sử dụng theo sáng chế chỉ kháng thể chứa hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên, do đó có khả năng liên kết với hai hoặc nhiều kháng nguyên, có thể có cấu trúc giống nhau hoặc khác nhau. Thuật ngữ "lưỡng trị" nghĩa là kháng thể có hai vị trí liên kết kháng nguyên. Thuật ngữ "tứ trị" nghĩa là kháng thể có 4 vị trí liên kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "vị trí liên kết kháng nguyên" được sử dụng theo sáng chế chỉ phần chứa vùng liên kết đặc hiệu với và bổ sung với một phần hoặc tất cả các phần của kháng nguyên của kháng thể. Khi một kháng nguyên là quá lớn, kháng thể có thể chỉ liên kết với một phần cụ thể của kháng nguyên, phần này được gọi là epitop. Một vùng liên kết với kháng nguyên có thể được tạo ra bởi một hoặc nhiều vùng biến đổi của kháng thể. Tốt hơn là, vùng liên kết với kháng nguyên sẽ được tạo ra bởi tổ hợp một vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và một vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH).

Thuật ngữ "kháng nguyên" được sử dụng theo sáng chế chỉ phân tử hoặc một phần của phân tử có thể được liên kết bởi kháng thể theo sáng chế. Kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều hơn một epitop. Ví dụ về kháng nguyên có thể được nhận biết bởi kháng thể theo sáng chế gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein huyết thanh, chẳng hạn xytokin như IL-4, IL5, IL9 và IL-13, peptit có hoạt tính sinh học, phân tử trên bề mặt tế bào, chẳng hạn thụ thể, protein vận chuyển, kênh ion, protein của virus và vi khuẩn.

Thuật ngữ "đặc hiệu đơn" được sử dụng theo sáng chế chỉ kháng thể đa trị theo sáng chế chỉ nhận biết một kháng nguyên, tất cả các vị trí liên kết kháng nguyên là giống nhau.

Thuật ngữ "đặc hiệu kép" được sử dụng theo sáng chế chỉ kháng thể đa trị theo sáng chế sẽ nhận biết được hai epitop khác nhau trên cùng một khả năng hoặc trên hai kháng nguyên khác nhau.

Thuật ngữ “đa đặc hiệu” được sử dụng theo sáng chế nghĩa là kháng thể đa trị theo sáng chế sẽ nhận biết được các epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên hoặc trên các kháng nguyên khác nhau.

Thuật ngữ “đoạn liên kết” được sử dụng theo sáng chế chỉ peptit được sử dụng để nối vùng biến đổi của các cấu trúc kháng thể theo sáng chế. Đoạn liên kết peptit có thể chứa một axit amin bất kỳ, tuy nhiên axit amin glyxin (G) và serin (S) là được ưu tiên. Đoạn liên kết có thể có chiều dài bằng nhau hoặc khác nhau giữa và trong các chuỗi nặng polypeptit và chuỗi nhẹ polypeptit. Hơn nữa, đoạn liên kết có thể có chiều dài từ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit amin. Đoạn liên kết peptit được ưu tiên đối với chuỗi nặng cũng như chuỗi nhẹ là GGGGS. Số lượng đoạn liên kết của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể bằng nhau (trật tự đối xứng) hoặc khác nhau (trật tự không đối xứng).

Tốt hơn là, một đoạn liên kết peptit đủ dài để tạo ra mức độ linh động đủ để tránh hiện tượng các phần kháng thể gây ảnh hưởng đến hoạt tính của nhau, chẳng hạn do ảnh hưởng bởi cấu trúc lập thể, để tạo ra sự gấp nếp protein chính xác và, nếu cần, để phân tử kháng thể tương tác với hai hoặc nhiều thụ thể có thể được phân bố trong không gian rộng trên cùng một tế bào; tuy nhiên tốt hơn là, đoạn liên kết cũng đủ ngắn để đảm bảo các cấu trúc kháng thể ổn định trong tế bào.

Do đó, chiều dài, thành phần và/hoặc cấu hình của đoạn liên kết peptit có thể được chọn lựa một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để tối ưu các hoạt tính mong muốn của kháng thể đa trị.

Các dạng "được làm cho giống người" của kháng thể không phải của người (chẳng hạn, chuột) là các globulin miễn dịch, chuỗi globulin miễn dịch hoặc mảnh kháng thể khả năng của nó (như Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc các trình tự nhỏ liên kết với đích khác của kháng thể) chứa các trình tự thu được từ globulin miễn dịch không phải của người, so với kháng thể người. Nhìn chung, kháng thể được làm cho giống người thường chứa một, và điển hình hơn nữa là 2 vùng biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vùng CDR bổ sung với các vùng CDR của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc gần như tất cả các vùng FR là trình tự khuôn của globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm cho giống người cũng có thể chứa ít nhất một phần của vùng cố định của globulin miễn dịch (Fc), thường là vùng cố định của khuôn globulin

miễn dịch của người được chọn. Nhìn chung, mục đích là để có một phân tử kháng thể có tính sinh miễn dịch tối thiểu trong cơ thể người. Do đó, có thể là một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều CDR có thể được biến đổi thành một axit amin khác ít có tính sinh miễn dịch ở người, mà không làm giảm thiểu đáng kể chức năng liên kết đặc hiệu của một hoặc nhiều CDR với IL-4 và/hoặc IL-13. Nói cách khác, FR có thể là FR không phải của người nhưng các axit amin có tính sinh miễn dịch lớn nhất sẽ được thế bằng các axit amin có tính sinh miễn dịch thấp hơn. Hơn nữa, việc ghép CDR, như đã nêu, không phải là cách duy nhất để thu được kháng thể được làm cho giống người. Chẳng hạn, chỉ biến đổi các vùng CDR có thể là không đủ vì sẽ là không bình thường đối với các gốc trong vùng khung đóng vai trò trong việc quyết định cấu trúc ba chiều của các vòng CDR và ái lực toàn phần của kháng thể đối với phối tử của nó. Do đó, có thể thực hiện một phương pháp bất kỳ sao cho phân tử kháng thể gốc không phải của người được biến đổi để có mức độ sinh miễn dịch thấp hơn đối với cơ thể người, và độ tương đồng về trình tự toàn phần với kháng thể người không phải là một điều luôn cần thiết. Do vậy, phương pháp làm cho giống người cũng có thể thực hiện được, chẳng hạn, bằng cách thay thế một phần chỉ một vài gốc, đặc biệt là các gốc được bộc lộ trên phân tử kháng thể và không bị bọc trong phân tử, và do đó, sẽ không thể tiếp cận được với hệ vật chủ. Phương pháp được đề cập ở đây liên quan đến việc thay thế các gốc “chuyển động” hoặc “linh động” trên phân tử kháng thể, mục đích là làm giảm hoặc làm mất đi tính sinh miễn dịch của phân tử tạo thành mà không làm giảm độ đặc hiệu của kháng thể đối với epitop hoặc quyết định kháng nguyên của nó. Chẳng hạn, tham khảo Studnicka et al., *Prot Eng* 7(6):805-814, 1994; Mol Imm 44:1986-1988, 2007; Sims et al., *J Immunol* 151:2296 (1993); Chothia et al., *J Mol Biol* 196:901 (1987); Carter et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285 (1992); Presta et al., *J Immunol* 151:2623 (1993), WO 2006/042333 và US 5,869,619.

Phương pháp làm cho giống người được đề cập ở đây dựa trên mức độ ảnh hưởng của độ linh động phân tử của kháng thể trong quá trình nhận biết miễn dịch. Độ linh động của protein liên quan đến chuyển động phân tử của protein. Độ linh động của protein là khả năng của toàn bộ phân tử protein, một phần của protein hoặc một gốc axit amin có thể tạo được cấu hình khác một cách đáng kể với những phân tử khác. Thông tin về độ linh động protein có thể thu được bằng cách thực hiện các thử nghiệm tinh thể học protein tia X (tham khảo chẳng hạn, Kundu et al. 2002, *Biophys J* 83:723–732.),

cộng hưởng từ hạt nhân (tham khảo chẳng hạn, Freedberg et al., J Am Chem Soc 1998, 120(31):7916-7923) hoặc tạo các kích thích động lực phân tử (MD). Một kích thích MD của protein được thực hiện trên máy tính và sẽ cho phép đánh giá chuyển động của tất cả các nguyên tử trong protein trong một khoảng thời gian bằng cách tính các tương tác vật lý giữa các nguyên tử với nhau. Đầu ra của một kích thích MD là quỹ đạo của protein trong một khoảng thời gian kích thích. Quỹ đạo là một tập hợp các cấu hình của protein, còn được gọi là hình chụp nhanh, sẽ được chụp theo từng giai đoạn trong quá trình kích thích, chẳng hạn cứ 1 pico giây (ps)/lần. Bằng cách phân tích tập hợp ảnh chụp nhanh có thể định lượng độ linh động của các gốc axit amin của protein. Do đó, một gốc linh động là gốc có thể tạo ra một tập hợp các cấu hình khác ở polypeptit chứa nó. Phương pháp MD đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo, chẳng hạn, Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, New York, 1988). Một số phần mềm có thể tạo kích thích MD, như Amber (xem Case et al. (2005) J Comp Chem 26:1668-1688), Charmm (xem Brooks et al. (1983) J Comp Chem 4:187-217; và MacKerell et al. (1998) trong tài liệu "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) hoặc Impact (xem Rizzo et al. J Am Chem Soc; 2000; 122(51):12898-12900.)

Hầu hết các phức hệ protein đều có chung các bề mặt được bọc cả hai chiều và tương đối lớn và đã được chỉ ra rằng độ linh động của các kiểu liên kết là nguồn gốc của độ mềm dẻo của phân tử, làm cho chúng có thể thích nghi về mặt cấu hình với các phân tử khác (Structure (2000) 8, R137-R142). Chẳng hạn, ví dụ về "hiện tượng phù hợp do kích thích" đã được chứng minh là có vai trò ưu thế trong việc tạo bề mặt tiếp xúc giữa protein và protein. Ngoài ra, còn có các số liệu về sự gia tăng độ ổn định chỉ ra rằng protein thực sự liên kết với phối tử có kích thước, hình dạng và thành phần rất đa dạng (Protein Science (2002) 11:184-187) và rằng sự đa dạng về cấu hình dường như là một thành phần cần thiết của khả năng nhận biết các phối tử khác nhau (Science (2003) 299, 1362-1367). Các gốc linh động có vai trò trong quá trình liên kết protein-protein (Structure (2006) 14, 683-693).

Các gốc linh động có thể thích nghi với nhiều cấu hình tạo ra một tập hợp các vùng tương tác có khả năng được nhận biết bởi tế bào B nhớ và tạo ra đáp ứng miễn dịch. Do đó, kháng thể có thể được làm cho giống người bằng cách biến đổi một số gốc

từ vùng khung sao cho một tập hợp các cấu hình và vùng nhận biết được biểu hiện bởi kháng thể được biến đổi cũng giống như kháng thể người.

Có thể thực hiện điều này bằng cách biến đổi một số lượng hạn chế các gốc bằng: (1) xây dựng mô hình độ tương đồng của mAb gốc và tiến hành kích thích MD; (2) phân tích các gốc linh động và xác định các gốc linh động nhất của phân tử kháng thể không phải của người, cũng như xác định các gốc hoặc cấu trúc có khả năng là nguồn của tính không đồng nhất hoặc hoạt động thoái hoá; (3) xác định kháng thể người biểu hiện tập hợp các vùng nhận biết giống nhất với kháng thể gốc; (4) xác định các gốc linh động cần gây đột biến, các gốc hoặc cấu trúc có khả năng là nguồn tạo ra sự không đồng nhất và thoái hoá cũng cần được gây đột biến; và (5) kiểm tra sự có mặt của các epitop đã biết của tế bào T và B. Có thể tìm thấy gốc linh động sử dụng tính toán MD như đã nêu sử dụng mô hình dung môi ẩn, mô hình này sẽ tính đến tương tác của dung môi nước với các nguyên tử trong protein trong thời gian kích thích. Khi tập hợp các gốc linh động đã được xác định trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng biến đổi, thì một tập hợp các vùng khung biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người giống với vùng khung của kháng thể được đề cập sẽ được xác định. Điều này có thể thực hiện được, chẳng hạn, bằng cách sử dụng tìm kiếm blast trên tập hợp các gốc linh động trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm kháng thể người. Cũng có thể thực hiện được bằng cách so sánh động lực của mAb gốc với động lực của ngân hàng cấu trúc dòng mầm tiêu chuẩn. Các gốc trong vùng CDR và các gốc lân cận sẽ được loại bỏ khỏi tìm kiếm để đảm bảo rằng ái lực cao đối với kháng nguyên vẫn được bảo toàn.

Sau đó, các gốc linh động sẽ được thay thế. Khi một vài gốc của người có độ tương đồng, quá trình chọn lọc cũng được thực hiện bởi bản chất của các gốc có khả năng ảnh hưởng đến hoạt động trong dung dịch của kháng thể được làm cho giống người. Chẳng hạn, các gốc phân cực sẽ được ưu tiên trong các vùng linh động được bộc lộ so với các gốc kỵ nước. Các gốc có tiềm năng là nguồn gây bất ổn định và không đồng nhất cũng được gây đột biến ngay cả khi được tìm thấy trong các vùng CDR. Quá trình gây đột biến này sẽ bao gồm các methionin được bộc lộ do sự hình thành sulfoxit từ các gốc oxy, sự phân cắt do thủy phân protein các liên kết axit không bền như liên kết trong dipeptit Asp-Pro (Drug Dev Res (2004) 61:137-154), các vị trí khử amit hoá thấy được với các gốc asparagin được bộc lộ sau các axit amin nhỏ, như Gly, Ser, Ala, His, Asn hoặc Cys (J Chromatog (2006) 837:35-43) và các vị trí N-glycosyl hoá, như

vị trí Asn-X-Ser/Thr. Thông thường, các methionin được bọc lộ sẽ được thế bằng Leu, asparagin bọc lộ sẽ được thay thế bằng glutamin hoặc bằng aspartat, hoặc các gốc tiếp theo sẽ được thay thế. Đối với vị trí glycosyl hoá (Asn-X-Ser/Thr), Asn hoặc gốc Ser/Thr sẽ được thay thế.

Trình tự ghép hình thành được kiểm tra sự có mặt của các epitop của tế bào B hoặc tế bào T. Một tìm kiếm được thực hiện, chẳng hạn, trên IEDB đã được công bố. Nếu một epitop đã biết được tìm thấy trong trình tự ghép này, thì một tập hợp các trình tự khác của người sẽ được tìm và thay thế.

Không giống phương pháp tái tạo bề mặt theo tài liệu US 5,639,641, cả các đáp ứng miễn dịch gây ra bởi tế bào B và T đều được tác động bởi phương pháp này. Phương pháp này cũng tránh được các vấn đề về mất hoạt tính đôi khi quan sát được trong phương pháp ghép CDR (US 5,530,101). Ngoài ra, các vấn đề về độ ổn định và độ tan cũng được xem xét trong quá trình biến đổi di truyền và chọn lọc, tạo ra kháng thể được tối ưu có tính sinh miễn dịch thấp, ái lực với kháng nguyên cao và hoạt tính sinh lý được cải thiện.

Các kỹ thuật và phương pháp để tái tạo bề mặt kháng thể, và các phương pháp khác để giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể trong các vật chủ khác nhau, được mô tả trong, chẳng hạn, US 5,639,641. Một cách vắn tắt, theo một phương pháp được ưu tiên, (1) so sánh các vị trí của một tập hợp các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể để tạo các vị trí được bọc lộ trên bề mặt khung của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó các vị trí so sánh đối với tất cả các vùng biến đổi có độ tương đồng ít nhất khoảng 98%; (2) một tập hợp các gốc axit amin được bọc lộ trên bề mặt khung vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định đối với kháng thể không phải của người, như kháng thể của gặm nhấm (hoặc mảnh kháng thể); (3) một tập hợp các gốc axit amin được bọc lộ trên bề mặt khung vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương đồng nhất với tập hợp các gốc axit amin được bọc lộ trên bề mặt của gặm nhấm được xác định; và (4) tập hợp các gốc axit amin được bọc lộ trên bề mặt khung vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định trong bước (2) được thế bằng tập hợp các gốc axit amin được bọc lộ trên bề mặt khung vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định trong bước (3), ngoại trừ các gốc axit amin that trong khoảng 5Å với nguyên tử bất kỳ của một gốc bất kỳ của CDR của kháng thể gặm nhấm,

để tạo ra kháng thể được làm cho giống người, như kháng thể gặm nhấm vẫn giữ nguyên độ đặc hiệu liên kết.

Kháng thể có thể được làm cho giống người bằng một loạt các kỹ thuật khác nhau bao gồm ghép CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; và US 5,530,101 và US 5,585,089), bọc hoặc tái tạo bề mặt (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; và Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) và đảo trật tự chuỗi (US 5,565,332). Kháng thể người có thể tạo ra bằng một loạt các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, tham khảo US 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806 và 5,814,318; và WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 và WO 91/10741, sử dụng động vật biến đổi gen, như gặm nhấm, sử dụng tế bào khảm và các phương pháp tương tự.

“Kháng thể tương đồng” hoặc “thể tương đồng” chỉ phân tử liên kết đặc hiệu với IL-4 và/hoặc IL-13 như đã được nêu ở đây. Do đó, kháng thể tương đồng gồm có kháng thể tự nhiên hoặc tái tổ hợp, dù được biến đổi hoặc không, các phần của kháng thể vẫn duy trì được hoạt tính sinh học được đề cập ở đây, như liên kết với IL-4 hoặc IL-13, như phân tử Fab hoặc Fv, kháng thể một chuỗi, polypeptit mang một hoặc nhiều vùng CDR và tương tự. Trình tự axit amin của thể tương đồng không cần phải giống với trình tự axit amin của kháng thể có nguồn gốc tự nhiên nhưng có thể được biến đổi hoặc thay đổi để mang các đột biến thay thế axit amin, thêm axit amin, loại bỏ axit amin, hoặc các axit amin khác với 20 loại axit amin thường có trong các protein và các đột biến tương tự để thu được polypeptit có hoạt tính sinh học được gia tăng hoặc có lợi.

Kháng thể có các trình tự tương đồng là các kháng thể có trình tự axit amin có độ tương đồng về trình tự với trình tự axit amin của kháng thể kháng IL-4, IL-13 hoặc kháng thể đặc hiệu kép đối với IL-4/IL-13 theo sáng chế. Tốt hơn là, tương đồng với trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể theo sáng chế. “Độ tương đồng trình tự” được sử dụng với trình tự axit amin ở đây được xác định là một trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94% hoặc hơn, và tốt hơn là ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với một trình tự axit amin khác, khi được xác

định, chẳng hạn, bằng phương pháp tìm kiếm FASTA theo Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85, 2444-2448 (1988).

Kháng thể khảm là kháng thể có các phần khác nhau của một kháng thể thu được từ các nguồn khác nhau, như kháng thể khác, các lớp kháng thể khác, các loài động vật khác, chẳng hạn, kháng thể có vùng biến đổi thu được từ kháng thể đơn dòng của chuột được ghép với vùng cố định của globulin miễn dịch của người và tương tự. Do đó, kháng thể được làm cho giống người là một loại kháng thể khảm. Các phương pháp để tạo ra kháng thể khảm đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo, chẳng hạn, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J Immunol Methods 125:191-202; và US 5,807,715, 4,816,567, và 4,816,397.

Các kháng thể nhân tạo bao gồm mảnh kháng thể scFv, kháng thể khảm, kháng thể kép, kháng thể ba, kháng thể bốn và mru (tham khảo Winter & Milstein, 1991, Nature 349:293-299; và Hudson, 1999, Curr Opin Imm 11:548-557), mỗi loại đều có khả năng liên kết với kháng nguyên hoặc epitop. Trong mảnh Fv một chuỗi (scFv), các vùng VH và VL của một kháng thể được liên kết với nhau bằng một peptit linh động. Thông thường, đoạn liên kết là một peptit dài khoảng 15 axit amin. Nếu đoạn liên kết nhỏ hơn, chẳng hạn, 5 axit amin, kháng thể kép sẽ tạo ra. Đơn vị cấu thành nhỏ nhất của một kháng thể là CDR, thông thường CDR2 của chuỗi nặng có đủ khả năng nhận biết đặc hiệu và liên kết đặc hiệu đầy đủ. Mảnh kháng thể như vậy được gọi là một đơn vị nhận biết phân tử hoặc mru. Một số mru có thể được liên kết với nhau bằng các đoạn liên kết peptit ngắn, do đó sẽ tạo thành protein liên kết nhân tạo có ái lực cao hơn so với một mru đơn.

Sáng chế còn đề cập đến các thể tương đương về mặt chức năng với kháng thể được đề cập. Thuật ngữ “thể tương đương chức năng” gồm có các kháng thể có trình tự tương đồng, kháng thể tương đồng, kháng thể khảm, kháng thể nhân tạo và kháng thể được biến đổi, chẳng hạn, trong đó mỗi thể tương đương về chức năng được xác định bằng khả năng liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13, ức chế khả năng truyền tín hiệu hoặc chức năng của IL-4 và/hoặc IL-13, hoặc ức chế khả năng liên kết của IL-4 và/hoặc IL-13 với thụ thể của chúng. Một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng có sự trùng lặp trong nhóm các phân tử được gọi là “mảnh kháng thể” và nhóm được gọi là “thể tương đương về mặt chức năng”. Phương pháp sản xuất các thể

tương đương về chức năng vẫn duy trì được khả năng liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 đã được biết đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, chẳng hạn, trong WO 93/21319, EP Ser. No. 239,400, WO 89/09622, EP Ser. No. 338,745 và EP Ser. No. 332,424.

Các thể tương đương chức năng theo sáng chế còn bao gồm kháng thể được biến đổi, chẳng hạn, kháng thể được biến đổi bằng cách liên kết đồng hoá trị với một loại phân tử bất kỳ. Chẳng hạn, kháng thể được biến đổi gồm có kháng thể đã được biến đổi, chẳng hạn, bằng cách glycosyl hoá, axetyl hoá, pegyl hoá, khử amit hoá, phosphoryl hoá, amit hoá, tạo dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/phong bế đã biến, phân huỷ bằng proteaza, liên kết với phối tử tế bào, liên kết với độc tố hoặc gốc gây độc tế bào hoặc các protein khác v.v.. Quá trình liên kết đồng hoá trị không cần phải tạo ra một kháng thể có tính miễn dịch bằng cách tạo ra một đáp ứng kháng thể di truyền (anti-idiotypic). Có thể thực hiện các biến đổi này bằng các kỹ thuật đã biết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân cắt hoá học đặc hiệu, axetyl hoá, formyl hoá, tổng hợp chuyển hoá v.v.. Thêm vào đó, kháng thể được biến đổi có thể chứa một hoặc nhiều các axit amin không phải 230 axit amin thường gặp.

Đã có nhiều kỹ thuật được các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến để tối ưu ái lực liên kết. Thông thường, các kỹ thuật này bao gồm việc thể các gốc axit amin khác nhau tại vị trí được đề cập, sau đó là phân tích sàng lọc ái lực liên kết của polypeptit đột biến đối với kháng nguyên hoặc epitop cùng gốc.

Khi kháng thể được xác định và phân lập, sẽ là hữu ích khi tạo ra biến thể kháng thể hoặc thể đột biến, hoặc mutein, trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được biến đổi, chẳng hạn, trong một hoặc nhiều vùng siêu biến của kháng thể. Nói cách khác, hoặc thêm vào đó, một hoặc nhiều đột biến (chẳng hạn, đột biến thay thế) vùng khung có thể được đưa vào kháng thể ở đây những đột biến này sẽ làm tăng ái lực liên kết của kháng thể đột biến đối với IL-4 và/hoặc IL-13. Ví dụ về các gốc trong vùng khung có thể được biến đổi gồm có các gốc liên kết không đồng hoá trị với kháng nguyên một cách trực tiếp (Amit et al., Science 233:747-753 (1986)); tương tác với/ảnh hưởng đến cấu hình của một CDR (Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)); và/hoặc tham gia vào quá trình tạo bề mặt tiếp xúc VL-VH (EP 239 400). Theo một số phương án, quá trình biến đổi một hoặc nhiều gốc trong vùng khung sẽ gia tăng ái lực liên kết của

kháng thể đối với kháng nguyên cùng gốc. Chẳng hạn, từ khoảng một đến khoảng 5 gốc trong vùng khung có thể được gây đột biến theo phương pháp này của sáng chế. Đôi khi, điều này có thể là đủ để tạo ra kháng thể đột biến thích hợp để sử dụng trong các thử nghiệm tiền lâm sàng, ngay cả khi không gây đột biến một gốc bất kỳ trong vùng siêu biến. Thông thường, tuy nhiên, kháng thể đột biến có thể chứa một hoặc nhiều đột biến trong vùng siêu biến. Vùng cố định cũng có thể được biến đổi để thu được các đặc tính hiệu ứng mong muốn.

Các gốc trong vùng siêu biến có thể được gây đột biến một cách ngẫu nhiên, đặc biệt là khi ái lực liên kết ban đầu của kháng thể gốc được gây đột biến ngẫu nhiên thì các kháng thể đột biến được tạo ra ngẫu nhiên có thể được sàng lọc để chọn ra các kháng thể có ái lực liên kết được biến đổi trong thử nghiệm nêu ở đây.

Một kỹ thuật để tạo ra kháng thể đột biến, như thể đột biến CDR, là kỹ thuật "gây đột biến sàng lọc alanin" (Cunningham & Wells, Science 244:1081-1085 (1989); và Cunningham & Wells, Proc Nat Acad Sci USA 84:6434-6437 (1991)). Một hoặc nhiều gốc trong vùng siêu biến sẽ được thay thế bằng alanin hoặc polyalanin. Các gốc trong vùng siêu biến thể hiện độ nhạy với quá trình thay thế sau đó được tinh lọc bằng cách đưa thêm các đột biến thay thế hoặc các đột biến khác tại vị trí gây đột biến thay thế. Do đó, trong khi vị trí để tạo ra sự biến đổi trình tự axit amin được đánh giá trước, bản chất của quá trình đột biến không cần phải đánh giá trước. Các đột biến thay thế tương tự cũng có thể được thực hiện với các axit amin khác, phụ thuộc vào hoạt tính mong muốn của gốc được sàng lọc.

Một phương pháp có hệ thống hơn để xác định các gốc axit amin để biến đổi gồm có việc xác định các gốc trong vùng siêu biến tham gia vào quá trình liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 và các gốc trong vùng siêu biến ít có vai trò hoặc không có vai trò gì trong quá trình liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13. Quá trình gây đột biến thay thế bằng alanin các gốc vùng siêu biến không tham gia vào quá trình liên kết được thực hiện, với mỗi đột biến ala được kiểm tra để có ái lực liên kết gia tăng với IL-4 và/hoặc IL-13. Theo một phương án khác, các gốc có vai trò đáng kể trong quá trình tạo liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 sẽ được chọn để gây đột biến. Quá trình đột biến có thể là loại bỏ gốc đó hoặc thêm một hoặc nhiều gốc liền kề với gốc được đề cập. Tuy nhiên, quá trình gây đột biến thường sẽ là quá trình gây đột biến thay thế gốc đó bằng một axit amin

khác. Quá trình gây đột biến thay thế bảo toàn có thể là đột biến thay thế đầu tiên. Nếu một đột biến thay thế như vậy tạo ra sự thay đổi về hoạt tính sinh học (chẳng hạn, ái lực liên kết), thì một đột biến thay thế bảo toàn khác có thể được tạo ra để xác định liệu có thu được các thay đổi quan trọng hơn hay không.

Ngay cả khi có thể thu được mức độ biến đổi quan trọng về số lượng thứ hạng kháng thể và hoạt tính sinh học bằng cách chọn một axit amin khác nhiều hơn về mặt hoạt tính so với gốc thường có tại vị trí đó. Do đó, vẫn có thể tạo ra đột biến thay thế trong khi vẫn duy trì: (a) cấu trúc của bộ khung polypeptit trong vùng thay thế, chẳng hạn, ở dạng cấu hình gấp nếp hoặc cấu hình xoắn; (b) điện tích hoặc mức độ kỵ nước của phân tử tại vị trí đích, hoặc (c) khối của chuỗi bên.

Chẳng hạn, các axit amin có nguồn gốc tự nhiên có thể được phân vào các nhóm dựa trên hoạt tính chuỗi bên:

(1) kỵ nước: metionin (M hoặc met), alanin (A hoặc ala), valin (V hoặc val), loxin (L hoặc leu) và isoloxin (I hoặc ile);

(2) trung tính, ưa nước: xystein (C hoặc cys), serin (S hoặc ser), threonin (T hoặc thr), asparagin (N hoặc asn) và glutamin (Q hoặc gln);

(3) có tính axit: axit aspartic (D hoặc asp) và axit glutamic (E hoặc glu);

(4) có tính bazơ: histidin (H hoặc his), lyzin (K hoặc lys) và arginin (R hoặc arg);

(5) các gốc ảnh hưởng đến quá trình định hướng chuỗi: glyxin (G hoặc gly) và prolin (P hoặc pro), và

(6) gốc thơm: tryptophan (W hoặc trp), tyrosin (Y hoặc tyr) và phenylalanin (F hoặc phe).

Các thay thế không bảo toàn có thể gồm cả việc thay thế một axit amin bằng một axit amin từ một nhóm khác. Các thay thế bảo toàn có thể là thay thế một axit amin này bằng một axit amin khác trong cùng một nhóm.

Các đột biến thay thế axit amin được ưu tiên bao gồm các đột biến: (1) giảm tính miễn cảm với quá trình thủy phân protein, (2) giảm tính miễn cảm với quá trình oxi hoá, (3) thay đổi ái lực liên kết và (4) tạo ra hoặc biến đổi các đặc tính về hoá lý hoặc chức năng của các đồng phân. Đồng phân có thể bao gồm các mutein khác nhau của một trình tự thay vì các trình tự peptit có nguồn gốc tự nhiên. Chẳng hạn, đột biến thay thế

một hoặc nhiều axit amin (tốt hơn là đột biến thay thế axit amin bảo toàn) có thể được tạo ra trong trình tự có nguồn gốc tự nhiên (tốt hơn là ở phần polypeptit ngoài các vùng chức năng tạo ra tương tác nội phân tử). Đột biến thay thế axit amin bảo toàn sẽ không làm thay đổi đáng kể đặc điểm về cấu trúc của trình tự gốc (chẳng hạn, axit amin thay thế sẽ không phá vỡ cấu trúc xoắn có trong trình tự gốc, hoặc phá vỡ một loạt cấu trúc bậc hai bất kỳ đặc trưng ở trình tự gốc) trừ khi có sự thay đổi về khối hoặc cấu hình của nhóm R hoặc chuỗi bên (Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, ed., W. H. Freeman và Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); và Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Thông thường, kháng thể đột biến có hoạt tính sinh học được cải thiện sẽ có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 75% hoặc có độ tương đồng ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90% và thường ít nhất 95% so với trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể gốc kháng IL-4 và/hoặc IL-13 của người. Độ tương đồng so với trình tự kháng thể gốc được xác định ở đây là tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự so sánh giống (nghĩa là, cùng một axit amin) hoặc tương tự (nghĩa là, gốc axit amin trong cùng một nhóm phân loại dựa trên hoạt tính chuỗi bên chung, sách đã dẫn) với các gốc axit amin trong kháng thể gốc, sau khi so sánh trình tự và đưa vào các lỗ trống, nếu cần, để đạt được tỷ lệ phần trăm tương đồng về trình tự tối đa.

Nói cách khác, kháng thể đột biến có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến toàn bộ các vùng FR và CDR của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, hoặc vùng Fc của kháng thể kháng IL-4, IL-13 hoặc kháng thể đặc hiệu kép kháng IL-4/IL-13. Một phương pháp khác để tạo ra kháng thể đột biến là sử dụng phương pháp hoàn thiện ái lực dùng thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992) và Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991)). Các thể dung hợp protein vỏ thể thực khuẩn (Smith, Science 228:1315 (1985); Scott & Smith, Science 249:386 (1990); Cwirla et al. Proc Natl Acad Sci USA 87:309 (1990); Devlin et al. Science 249:404 (1990); Wells & Lowman, Curr Opin Struct Biol 2:597 (1992); và US 5,223,409) đã được biết là rất có ích trong việc kết nối kiểu hình của protein hoặc peptit được biểu hiện với kiểu gen của các tiểu phần thể thực khuẩn mã hoá chúng. Các vùng Fab của kháng thể cũng được biểu hiện trên thể thực khuẩn (McCafferty et al., Nature

348: 552 (1990); Barbas et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7978 (1991); và Garrard et al. *Biotechnol* 9:1373 (1991)).

Phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn đơn trị gồm việc biểu hiện một tập hợp các biến thể protein ở dạng thể dung hợp của protein vỏ thể thực khuẩn trên các thể thực khuẩn (Bass et al., *Proteins* 8:309 (1990)). Phương pháp hoàn thiện ái lực, hoặc cải thiện về ái lực liên kết cân bằng của các protein khác nhau đã thực hiện được thông qua việc ứng dụng thành công các phương pháp gây đột biến, biểu hiện thể thực khuẩn đơn trị và phân tích chức năng (Lowman & Wells, *J Mol Biol* 234:564-578 (1993); và US 5,534,617), chẳng hạn, bằng cách hướng vào các vùng CDR của kháng thể (Barbas et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3809 (1994); và Yang et al., *J Mol Biol* 254:392 (1995)).

Các thư viện có nhiều biến thể protein (chẳng hạn, 106 hoặc hơn), khác biệt ở các vị trí đã được xác định trong trình tự, có thể được xây dựng trên các tiểu phần thể thực khuẩn, mỗi thư viện sẽ chứa ADN mã hoá một biến thể protein cụ thể. Sau các chu trình tinh chế ái lực, sử dụng kháng nguyên cố định, các dòng thể thực khuẩn riêng rẽ sẽ được phân lập, và trình tự axit amin của protein được biểu hiện được suy ra từ trình tự ADN.

Sau khi tạo kháng thể đột biến, hoạt tính sinh học của phân tử đột biến so với kháng thể gốc có thể được đánh giá như đã nêu. Như đã nêu, việc này có thể gồm có đánh giá ái lực liên kết và/hoặc các hoạt tính sinh học hoặc lý học khác của kháng thể. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, một bảng các kháng thể đột biến được tạo ra và sàng lọc ái lực liên kết đối với kháng nguyên. Một hoặc nhiều kháng thể đột biến được chọn từ quá trình sàng lọc sẽ tùy ý được tiến hành một hoặc nhiều thử nghiệm về hoạt tính sinh học khác để khẳng định rằng kháng thể đột biến có hoạt tính mới hoặc có hoạt tính được cải thiện. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể đột biến sẽ duy trì được khả năng liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 với ái lực liên kết tương tự với hoặc tốt hơn so với kháng thể gốc.

Kháng thể đột biến được chọn có thể được biến đổi thêm nữa, điều này thường phụ thuộc vào mục đích sử dụng của kháng thể. Các biến đổi có thể là biến đổi trình tự axit amin, dung hợp với polypeptit khác dạng và/hoặc các biến đổi đồng hoá trị. Chẳng hạn, gốc cystein không có vai trò trong việc duy trì cấu hình chính xác của kháng thể

đột biến có thể được thay thế, thường bằng serin, để cải thiện độ ổn định với quá trình oxi hoá của phân tử và để ngăn ngừa việc tạo ra liên kết chéo bất thường. Ngược lại, xystein có thể được đưa vào kháng thể để cải thiện độ ổn định (đặc biệt là khi kháng thể là mảnh kháng thể như mảnh Fv).

Một loại kháng thể đột biến khác có kiểu glycosyl hoá được biến đổi. Điều này có thể thực hiện được bằng cách loại bỏ một hoặc nhiều gốc hydratcacbon có trong kháng thể và/hoặc thêm một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá không có trong kháng thể. Quá trình glycosyl hoá kháng thể thường được liên kết tại đầu N với Asn hoặc đầu O với Ser hoặc Thr. Các trình tự tripeptit, asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là một axit amin bất kỳ trừ prolin, là các trình tự nhận biết phổ biến để liên kết bằng enzym một gốc hydratcacbon với chuỗi bên asparagin. N-acetylgalactosamin, galactosa, fucoza hoặc xyloza, chẳng hạn, được liên kết với một hydroxyaxit amin, thường là serin hoặc threonin, mặc dù cũng có thể sử dụng 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylyzin. Việc thêm hoặc thay thế một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự của kháng thể gốc có thể tăng cường khả năng glycosyl hoá tại đầu O.

Có thể biến đổi kháng thể theo sáng chế về chức năng hiệu ứng, để gia tăng hiệu quả của kháng thể. Chẳng hạn, xystein có thể được đưa vào vùng Fc, nhờ đó tạo ra các liên kết disulfua nội phân tử trong vùng này. Các kháng thể dạng đồng dime được tạo ra theo cách này có thể có khả năng nội hấp được cải thiện và/hoặc khả năng giết tế bào qua trung gian bổ thể được gia tăng và khả năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) gia tăng, tham khảo Caron et al., J Exp Med 176:1191-1195 (1992) và Shopes, Immunol 148:2918-2922 (1993). Nói cách khác, kháng thể có thể được xử lý kỹ thuật di truyền để có vùng Fc kép và do đó có thể có khả năng tùy phản bổ thể và ADCC gia tăng, tham khảo Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219 230 (1989).

Các biến đổi đồng hóa trị kháng thể được đưa vào phạm vi của sáng chế. Những biến đổi này có thể được thực hiện bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc phân cắt kháng thể bằng enzym hoặc bằng phương pháp hóa học, nếu có thể. Các loại biến đổi đồng hóa trị kháng thể khác được đưa vào phân tử bằng cách cho gốc axit amin của kháng thể phản ứng với chất tạo dẫn xuất hữu cơ có khả năng phản ứng chọn lọc với chuỗi bên hoặc với các gốc tại đầu N hoặc đầu C.

Các gốc xysteinyl có thể được cho phản ứng với α -haloaxetat (và các amin tương ứng), như axit cloaxetic hoặc cloaxetamit, để tạo ra các dẫn xuất carboxylmetyl hoặc carboxyamidometyl. Các gốc xysteinyl cũng có thể được tạo dẫn xuất bằng cách cho phản ứng với bromtrifloaxeton, axit α -brom- β -(5-imidozoyl) propionic, cloaxetyl phosphat, N-alkylmaleimit, 3-nitro-2-pyridyl disulfua, metyl 2-pyridyl disulfua, p-clomercuribenzoat, 2-clomercura-4-nitrophenol hoặc clo-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, chẳng hạn.

Các gốc histidyl có thể được tạo dẫn xuất bằng phản ứng với diethylpyrocacbonat ở pH 5,5 đến 7,0. Cũng có thể sử dụng p-bromphenaxyl bromua, tốt hơn là phản ứng được thực hiện trong dung dịch natri cacodylat 0,1M ở pH=6,0.

Các gốc lyzinyl và tận cùng α có thể được cho phản ứng với axit succinic hoặc các axit anhydrit carboxylic để bảo toàn điện tích của các gốc này. Các hợp chất thích hợp để tạo dẫn xuất đối với các gốc chứa α -amino gồm có imidoeste, như metyl picolinimidat, pyridoxal phosphat, pyridoxal, cloborohydrua, axit trinitrobenzensulfonic, O-metylisoure và 2,4-pentandion, và axit amin có thể được xúc tác chuyển amin bằng glyoxylat.

Các gốc arginyl có thể được biến đổi bằng cách phản ứng với một hoặc một vài hợp chất truyền thống, như phenylglyoxal, 2,3-butandion, 1,2-xyclohexandion và ninhydrin. Tạo dẫn xuất đối với các gốc arginin thường cần có điều kiện kiềm. Hơn nữa, hợp chất có thể phản ứng với lyzin cũng như nhóm arginin ϵ -amino.

Các biến đổi đặc hiệu đối với các tyrosyl có thể thực hiện với các hợp chất diazoni thơm hoặc tetranitrometan. Chẳng hạn, N-axetylimidizol và tetranitrometan được sử dụng để tạo ra các nhóm O-axetyl tyrosyl và dẫn xuất 3-nitro. Các gốc tyrosyl có thể được iodin hóa sử dụng ^{125}I hoặc ^{131}I để tạo ra các protein được đánh dấu để sử dụng trong thử nghiệm phóng xạ miễn dịch.

Các nhóm bên carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl) có thể được biến đổi bằng cách phản ứng với carbodiimit ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{C}-\text{R}'$), trong đó R và R' có thể là các nhóm alkyl khác nhau, như 1-xyclohexyl-3-(2-morpholiny-4-etyl) carbodiimit hoặc 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpentyl) carbodiimit. Hơn nữa, các gốc aspartyl và glutamyl có thể được chuyển hóa thành các gốc asparaginyl và glutaminyl bằng cách phản ứng với các ion amoni.

Các gốc glutaminyl và asparaginyl thường được khử amit hóa thành các gốc glutamyl và aspartyl tương ứng ở điều kiện bazơ hoặc trung tính. Dạng được khử amit hóa của các gốc này cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Các biến đổi khác gồm có hydroxyl hóa prolin và lyzin, phosphoryl hoá các nhóm hydroxyl của gốc serinyl hoặc threonyl, metyl hóa nhóm α -amino của lyzin, arginin, và chuỗi bên histidin (Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), axetyl hoá amin ở đầu cùng N và amit hoá nhóm carboxyl ở đầu cùng C.

Một loại biến đổi đồng hóa trị khác là kết hợp bằng phương pháp hóa học hoặc enzym các glycosit với kháng thể. Các kỹ thuật này không cần phải tạo ra kháng thể trong tế bào chủ có khả năng glycosyl hoá đối với gốc glycosyl tại đầu N hoặc đầu C. Phụ thuộc vào kiểu kết hợp được sử dụng, (các) phân tử đường có thể được nối với: (a) arginin và histidin; (b) các nhóm carboxyl tự do; (c) các nhóm sulfhydryl tự do, như các nhóm của xystein; (d) các nhóm hydroxyl tự do, như serin, threonin hoặc hydroxyprolin; (e) các gốc thơm như phenylalanin, tyrosin hoặc tryptophan; hoặc (f) nhóm amit của glutamin. Các phương pháp này được mô tả trong WO 87/05330 và Aplin & Wriston, *CRC Crit Rev Biochem*, pp. 259-306 (1981).

Có thể loại bỏ các gốc hydratcacbon bất kỳ có mặt trên kháng thể bằng phương pháp hóa học hoặc dùng enzym. Loại nhóm glycosyl bằng hóa học, chẳng hạn, có thể cần phải bộc lộ kháng thể với hợp chất, axit triflometansulfonic, hoặc một hợp chất tương đương, dẫn đến sự phân cắt hầu hết hoặc tất cả các phân tử đường từ đường liên kết (N-axetylglucosamin hoặc N-axetylgalactosamin), trong khi kháng thể vẫn còn nguyên vẹn.

Phương pháp loại nhóm glycosyl đã được mô tả, chẳng hạn, trong Hakimuddin et al. *Arch Biochem Biophys* 259:52 (1987) và trong Edge et al., *Anal Biochem* 118:131 (1981). Phương pháp phân cắt bằng enzym các gốc hydratcacbon trên kháng thể có thể thực hiện được bằng cách sử dụng một loạt các endoglycosidaza và exoglycosidaza như đã nêu, chẳng hạn, trong Thotakura et al., *Meth Enzymol* 138:350(1987).

Một loại biến đổi đồng hóa trị kháng thể khác là liên kết kháng thể với một gốc polyme không có bản chất là protein, chẳng hạn, polyetylen glycol, polypropylen glycol

hoặc polyoxylalkylen, theo cách được mô tả trong US 4,640,835; US 4,496,689; US 4,301,144; US 4,670,417; US 4,791,192 hoặc US 4,179,337.

Một kỹ thuật khác được ưu tiên để thu được các thể đột biến hoặc mutein là phương pháp hoàn thiện ái lực bằng hệ biểu hiện thể thực khuẩn (Hawkins et al., *J Mol Biol* 254:889-896 (1992); và Lowman et al., *Biochemistry* 30(45):10832-10838 (1991)). Sơ lược là, một vài vị trí vùng siêu biến (chẳng hạn, 6 đến 7 vị trí) được gây đột biến để tạo ra tất cả các thay thế axit amin có thể có tại mỗi vị trí. Kháng thể đột biến thu được theo cách này được biểu hiện theo kiểu đơn trị trên các tiểu phần thể thực khuẩn ở dạng thể dung hợp với protein được tìm thấy trên các tiểu phần. Thể thực khuẩn biểu hiện các thể đột biến khác nhau có thể được thực hiện các vòng chọn lọc ái lực liên kết, sau đó là phân lập và đọc trình tự các thể đột biến hiệu quả ái lực cao.

Phương pháp chọn lọc các polypeptit có khả năng liên kết mới có thể sử dụng một thư viện các polypeptit tương đồng về mặt cấu trúc. Thư viện các polypeptit tương đồng về cấu trúc, chẳng hạn, được dung hợp với protein vỏ thể thực khuẩn, được tạo ra bằng cách gây đột biến, và được biểu hiện trên bề mặt của tiểu phần. Sau đó, các tiểu phần được cho tiếp xúc với phân tử đích và những tiểu phần nào có ái lực cao nhất đối với đích sẽ được phân tách ra khỏi các tiểu phần có ái lực thấp hơn. Các phân tử liên kết ái lực cao sẽ được khuếch đại bằng cách chuyển nhiễm vào một tế bào chủ vi khuẩn thích hợp và bước ái lực cạnh tranh sẽ được lặp lại. Quy trình này sẽ được lặp lại cho đến khi thu được các polypeptit có ái lực mong muốn.

Nói cách khác, thể thực khuẩn đa giá (McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554; và Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628) cũng có thể được sử dụng để biểu hiện các đột biến điểm ngẫu nhiên (chẳng hạn, được tạo ra bằng cách sử dụng ADN polymeraza đọc sửa) để tạo ra thư viện mảnh kháng thể trên thể thực khuẩn, thư viện này sau đó có thể được sàng lọc về ái lực đối với IL-4 và/hoặc IL-13, Hawkins et al., (1992) *J Mol Biol* 254:889-896.

Tốt hơn là, trong quá trình hoàn thiện ái lực, vectơ biểu hiện có khả năng tự sao sẽ được kiểm soát chặt bởi yếu tố điều hoà phiên mã, và điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh để lượng hoặc số lượng các tiểu phần biểu hiện nhiều hơn một bản sao của protein dung hợp là ít hơn khoảng 1%. Tốt hơn là, lượng tiểu phần biểu hiện nhiều hơn

một bản sao của protein dung hợp là ít hơn 10% lượng tiêu phân biểu hiện một bản sao của protein dung hợp. Tốt hơn là lượng này ít hơn 20%.

Thể tương đương chức năng có thể được tạo ra bằng cách đổi chỗ các vùng CDR khác nhau của các chuỗi kháng thể khác nhau trong một vùng khung hoặc một vùng FR ghép thu được từ nhiều kháng thể. Do đó, chẳng hạn, có thể tạo ra các lớp kháng thể khác nhau đối với một tập hợp các CDR khác nhau bằng cách thay thế các chuỗi nặng khác nhau, chẳng hạn, IgG1-4, IgM, IgA1-2 hoặc IgD, để tạo ra các typ và isotyp kháng thể IL-4 và/hoặc IL-13 khác nhau. Tương tự, kháng thể nhân tạo theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách đưa vào một tập hợp xác định các vùng CDR trong một vùng khung tổng hợp hoàn toàn.

Mảnh kháng thể và thể tương đương chức năng theo sáng chế bao gồm các phân tử có mức độ liên kết đặc hiệu với IL-4 và/hoặc IL-13 có thể phát hiện được. Mức độ liên kết có thể phát hiện được là giá trị trong khoảng từ ít nhất 10 đến 100%, tốt hơn là ít nhất 50%, 60% hoặc 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% so với mức độ liên kết của kháng thể được đề cập. Cũng được đề cập theo sáng chế là các thể tương đương chức năng có ái lực lớn hơn 100% ái lực liên kết của kháng thể được đề cập.

Các CDR thường rất quan trọng trong quá trình nhận biết epitop và liên kết kháng thể. Tuy nhiên, có thể thay đổi các gốc trong CDR mà không làm ảnh hưởng đến khả năng nhận diện và liên kết với epitop cùng gốc của kháng thể. Chẳng hạn, có thể tạo ra các thay đổi không những không ảnh hưởng đến khả năng nhận diện epitop, mà còn làm tăng ái lực liên kết của kháng thể đối với epitop. Một vài nghiên cứu đã khảo sát tác dụng của việc đưa một hoặc nhiều thay đổi axit amin vào các vị trí khác nhau trong trình tự của kháng thể, dựa trên hiểu biết về trình tự kháng thể nguyên phát, vào đặc tính của kháng thể, như khả năng liên kết và mức độ biểu hiện (Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; và Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539).

Do đó, các thể tương đương chức năng của kháng thể được đề cập có thể được tạo ra bằng cách thay đổi trình tự của các gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong các vùng CDR1, CDR2 hoặc CDR3, hoặc vùng khung, bằng cách sử dụng các phương pháp như gây đột biến qua oligonucleotit, đột biến điểm, gây đột biến cat-xet, PCR đọc sửa,

đảo ADN hoặc các chủng gây đột biến của *E. coli* (Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535-539; và Adey et al., 1996, Chap. 16, pp. 277-291, trong tài liệu Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press). Các phương pháp thay đổi trình tự axit nucleic của kháng thể ban đầu có thể tạo ra kháng thể có ái lực được cải thiện (Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701-10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365-16370; và Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622-27628).

Các chu trình "chọn lọc polypeptit" lặp lại có thể được sử dụng để chọn lọc các phân tử có ái lực liên kết ngày càng cao, chẳng hạn, việc chọn lọc nhiều thay đổi axit amin được chọn lọc qua nhiều chu trình chọn lọc. Sau vòng chọn lọc thứ nhất, bao gồm vùng chọn lọc thứ nhất của axit amin trong phối tử hoặc kháng thể polypeptit, các vòng chọn lọc tiếp theo ở các vùng khác hoặc axit amin khác của phối tử được tiến hành. Những chu kỳ chọn lọc này được lặp lại cho đến khi đạt được ái lực mong muốn.

Kháng thể có hoạt tính được cải thiện còn là các kháng thể có đặc tính được cải thiện được tạo ra bằng các kỹ thuật chuẩn như miễn dịch động vật, tạo tế bào lai và chọn lọc kháng thể có hoạt tính đặc hiệu.

"Chất đối kháng" chỉ phân tử có khả năng ức chế một hoặc nhiều hoạt tính sinh học phân tử đích, như truyền tín hiệu bằng IL-4 và/hoặc IL-13. Chất đối kháng có thể ảnh hưởng đến khả năng liên kết của một thụ thể với phối tử và ngược lại, bằng cách làm bất lực hoặc giết tế bào được hoạt hóa bởi một phối tử, và/hoặc bằng cách gây ảnh hưởng đến thụ thể hoặc quá trình hoạt hóa phối tử (chẳng hạn, quá trình hoạt hóa tyrosin kinaza) hoặc quá trình truyền tín hiệu sau khi phối tử liên kết với thụ thể. Chất đối kháng có thể phong bế hoàn toàn tương tác thụ thể-phối tử hoặc có thể giảm một cách đáng kể mối tương tác này.

"Chất chủ vận" chỉ hợp chất, bao gồm protein, polypeptit, peptit, kháng thể, mảnh kháng thể, thể liên hợp, phân tử lớn, phân tử nhỏ, hoạt hóa một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của IL-4 và/hoặc IL-13. Chất chủ vận có thể tương tác với quá trình liên kết của thụ thể với phối tử và ngược lại, bằng cách hoạt động như một chất gây phân bào được hoạt hóa bởi phối tử, và/hoặc gây ảnh hưởng đến quá trình bất hoạt tế bào hoặc ức

chế quá trình truyền tín hiệu sau khi phối tử liên kết với thụ thể. Tất cả các giai đoạn can thiệp bởi chất chủ vận đều được coi là tương đương với mục đích của sáng chế.

Thuật ngữ "tế bào," "dòng tế bào," và "giống nuôi cấy tế bào" bao gồm cả thể hệ sau của chúng. Cũng được hiểu rằng tất cả các thể hệ sau không cần phải giống nhau hoàn toàn, như về hàm lượng ADN, do gây đột biến có chủ ý hoặc không chủ ý. Biến thể có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học được đề cập, được sàng lọc đối với tế bào gốc, cũng được đề cập theo sáng chế.

Thuật ngữ "vector" chỉ cấu trúc axit nucleic, phân tử mang, chứa axit nucleic, gen chuyển, gen ngoại lai hoặc gen được đề cập theo sáng chế, có thể được liên kết linh động với một trình tự kiểm soát thích hợp đối với quá trình biểu hiện của gen chuyển trong một vật chủ thích hợp. Trình tự kiểm soát này là, chẳng hạn, đoạn khởi đầu để kiểm soát quá trình phiên mã, một trình tự chỉ huy tùy ý để kiểm soát quá trình phiên mã, trình tự mã hoá vị trí liên kết của ribosom trên ARN thông tin thích hợp và các trình tự kiểm soát quá trình kết thúc phiên mã và dịch mã. Vector có thể là một plasmid, các tiểu phần thể thực khuẩn hoặc chỉ một đoạn xen vào hệ gen có khả năng. Khi đã được biến nạp vào một vật chủ thích hợp, vector có thể tự sao và hoạt động phụ thuộc vào hệ gen của vật chủ, hoặc trong một số trường hợp, có thể kết hợp vào hệ gen của tế bào chủ. Trong bản mô tả này, "plasmid" và "vector" được sử dụng thay thế cho nhau, vì plasmid là một dạng vector thường được sử dụng. Tuy nhiên, sáng chế còn đề cập đến các dạng vector khác có chức năng vận chuyển tương ứng và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như virus, phân tử tổng hợp mang axit nucleic, liposom và các dạng tương tự.

"Động vật có vú" để điều trị chỉ một động vật bất kỳ được phân loại là động vật có vú, bao gồm người, gia súc và thú nuôi, linh trưởng không phải người, và vật nuôi ở vườn thú, động vật thể thao hoặc thú cảnh, như chó, ngựa, mèo, bò v.v..

Kháng thể được đề cập có thể được sàng lọc hoặc sử dụng trong thử nghiệm được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, các thử nghiệm này thường cần một chất có thể phát hiện được, nghĩa là, được đánh dấu. Thuật ngữ "đánh dấu" khi được sử dụng ở đây chỉ một hợp chất hoặc chế phẩm có thể phát hiện được có thể được gắn trực tiếp hoặc gián tiếp vào phân tử hoặc protein, chẳng hạn, kháng thể. Bản thân chất đánh dấu là có thể phát hiện được (chẳng hạn, chất đánh dấu phóng xạ, tiểu phần hoặc chất đánh dấu huỳnh quang) hoặc, trong trường hợp chất đánh

dấu có hoạt tính enzym, có thể xúc tác biến đổi hóa học của cơ chất hoặc chế phẩm có khả năng phát hiện được.

Theo sáng chế, "pha rắn" chỉ chất nền không chứa nước trên đó phân tử, như kháng thể theo sáng chế có thể gắn vào. Ví dụ về pha rắn bao gồm các dạng được tạo một phần hoặc toàn bộ từ thủy tinh (chẳng hạn, miếng thủy tinh đục lỗ), polysaccarit (chẳng hạn, agaroza), polyacrylamit, polystyren, rượu polyvinyllic và silicon. Theo một số phương án, phụ thuộc vào văn cảnh, pha rắn có thể là giếng của đĩa thử nghiệm; trong các trường hợp khác có thể là cột tinh chế (chẳng hạn, cột sắc ký ái lực). Do đó, pha rắn có thể là giấy, hạt, nhựa, chip và các vật tương tự, có thể được tạo ra từ nhiều loại nguyên liệu, như nitroxenluloza, agaroza, polystyren, polypropylen, silicon và tương tự, và có thể nhiều dạng cấu hình khác nhau.

Gen hoặc ADN bổ trợ mã hoá IL-4 và IL-13 đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể được tách dòng vào plasmit hoặc các vectơ biểu hiện khác và biểu hiện trong một hệ biểu hiện bất kỳ nào theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Phân tử axit nucleic mã hoá thể đột biến trình tự axit amin có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, gây đột biến qua trung gian oligonucleotit (hoặc đột biến điểm), gây đột biến bằng PCR và gây đột biến catxet một thể đột biến đã được tạo ra trước hoặc phiên bản chưa đột biến của phân tử được đề cập, (tham khảo chẳng hạn, Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82:488 (1985)).

Quá trình biểu hiện tái tổ hợp kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh, dẫn xuất hoặc đồng phân của nó, (chẳng hạn, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế, kháng thể một chuỗi theo sáng chế hoặc mutein kháng thể theo sáng chế) gồm có việc thiết kế vectơ biểu hiện chứa polynucleotit mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể như được mô tả ở đây. Khi đã thu được polynucleotit mã hoá phân tử kháng thể, vectơ để sản xuất kháng thể có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một vectơ biểu hiện được thiết kế chứa trình tự mã hoá kháng thể và các trình tự tín hiệu kiểm soát phiên mã và dịch mã thích hợp. Các phương pháp này gồm có, chẳng hạn, kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp di truyền *in vivo*.

Vector biểu hiện được biến nạp vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật thông thường và tế bào được biến nạp sẽ được nuôi cấy bằng các kỹ thuật thông thường để tạo ra kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế. Theo một khía cạnh của sáng chế, vector mã hoá cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được đồng biểu hiện trong tế bào chủ để biểu hiện toàn bộ phân tử globulin miễn dịch, như đã được mô tả chi tiết.

Một loạt hệ vật chủ/vector biểu hiện khác nhau có thể được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể theo sáng chế. Các hệ biểu hiện này là vật mang nhờ đó các trình tự mã hoá được đề cập có thể được tạo ra và sau đó được tinh chế, nhưng còn là các tế bào, khi đã được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng các trình tự nucleotit thích hợp, có thể biến nạp phân tử kháng thể theo sáng chế tại chỗ. Các tế bào vi khuẩn, như *E. coli*, và tế bào nhân điển hình thường được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể tái tổ hợp, đặc biệt là đối với quá trình biểu hiện phân tử kháng thể tái tổ hợp toàn phần. Chẳng hạn, các tế bào động vật có vú như tế bào CHO, cùng với vector, như vector mang đoạn khởi đầu gen sớm của xytomegalovirut trên người, là một hệ biểu hiện hiệu quả đối với kháng thể (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); và Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)). Thực vật và giống nuôi cấy tế bào thực vật, tế bào côn trùng và các loại tương tự cũng có thể được sử dụng để tạo ra các protein được đề cập, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ngoài ra, tế bào chủ được chọn sẽ điều biến quá trình biểu hiện của trình tự được xen vào, hoặc biến đổi và xử lý sản phẩm gen theo kiểu mong muốn. Các biến đổi (chẳng hạn, glycosyl hoá) và xử lý (chẳng hạn, cắt) sản phẩm protein là quan trọng đối với chức năng của protein. Các tế bào chủ khác nhau sẽ có các cơ chế đặc hiệu và đặc trưng để xử lý và biến đổi sau dịch mã protein và sản phẩm gen. Các dòng tế bào hoặc hệ vật chủ thích hợp có thể được chọn để đảm bảo sự biến đổi và xử lý chính xác kháng thể được biểu hiện. Do đó, có thể sử dụng tế bào chủ có nhân điển hình có cơ chế nội bào để xử lý chính xác sản phẩm phiên mã sơ cấp, glycosyl hoá và phosphoryl hoá sản phẩm gen. Các tế bào chủ của động vật có vú gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, CHO, COS, 293, 3T3 hoặc tế bào u tủy.

Để sản xuất lâu dài với sản lượng cao protein tái tổ hợp, cần sử dụng một hệ biểu hiện ổn định. Chẳng hạn, các dòng tế bào biểu hiện ổn định phân tử kháng thể có thể được thao tác kỹ thuật di truyền. Thay vì sử dụng vector biểu hiện chứa các điểm bắt đầu

sao chép của virus, tế bào chủ có thể được biến nạp bằng ADN được kiểm soát bởi các yếu tố kiểm soát biểu hiện thích hợp (chẳng hạn, trình tự đoạn khởi đầu, trình tự tăng cường, yếu tố kết thúc phiên mã, vị trí polyadenyl hóa, v.v.) và một chỉ thị có thể chọn lọc được. Sau khi đưa ADN ngoại lai vào tế bào, các tế bào được biến đổi bằng kỹ thuật di truyền có thể được nuôi cấy trong từ 1 đến 2 ngày trong môi trường được làm giàu, và sau đó được chuyển sang môi trường chọn lọc. Chỉ thị có thể chọn lọc được trong plasmit tái tổ hợp sẽ tạo ra tính kháng với quá trình chọn lọc và cho phép tế bào gắn một cách ổn định plasmit vào nhiễm sắc thể và phát triển thành một dòng tế bào. Các dòng tế bào này không chỉ hữu ích trong việc sản xuất kháng thể mà còn hữu ích trong việc sàng lọc và xác định các hợp chất tương tác một cách trực tiếp hoặc gián tiếp với phân tử kháng thể.

Có thể sử dụng một số hệ chọn lọc, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, gen thymidin kinaza của virus Herpes simplex (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza (Szybalska et al., Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992)), chọn lọc glutamat synthaza khi có mặt metionin sulfoximide (Adv Drug Del Rev 58, 671, 2006 và tham khảo trang web hoặc tài liệu của Lonza Group Ltd.) và adenin phosphoribosyltransferaza (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) trong các tế bào tk, hgprt hoặc aprt. Tương tự, tính kháng chất chống chuyển hóa có thể được sử dụng là cơ sở chọn lọc đối với các gen sau: dhfr, tạo tính kháng với methotrexat (Wigler et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:1527 (1981)); gpt, tạo tính kháng với axit mycophenolic (Mulligan et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:2072 (1981)); neo, tạo tính kháng với aminoglycosit, G-418 (Wu et al., Biotherapy 3:87 (1991)); và hygromycin, tạo tính kháng với hygromycin (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Các phương pháp ADN tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để chọn lọc dòng tái tổ hợp mong muốn, và các phương pháp này đã được mô tả, chẳng hạn, trong Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1993); Kriegler, Gene Transfer và Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press (1990); Dracopoli et al., eds., Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons (1994); và Colberre-Garapin et al., J Mol Biol 150:1 (1981).

Mức độ biểu hiện của phân tử kháng thể có thể được gia tăng bằng cách khuếch đại vector (chẳng hạn, tham khảo Bebbington et al., in ADN Cloning, Vol. 3. Academic

Press (1987)). Khi một chỉ thị trong hệ vector biểu hiện kháng thể có khả năng khuếch đại, thì sự gia tăng nồng độ chất ức chế có trong môi trường sẽ gia tăng số lượng bản sao của gen chỉ thị. Vì vùng được khuếch đại có liên quan đến gen kháng thể, nên quá trình tạo kháng thể cũng gia tăng (Crouse et al., Mol Cell Biol 3:257 (1983)).

Tế bào chủ có thể được chuyển nhiễm đồng thời bằng hai hoặc nhiều vector biểu hiện theo sáng chế, chẳng hạn, vector thứ nhất mã hoá polypeptit chuỗi nặng và vector thứ hai mã hoá polypeptit chuỗi nhẹ. Hai vector này có thể chứa các gen chỉ thị có thể chọn lọc được giống nhau cho phép mức độ biểu hiện các polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương đương nhau. Nói cách khác, có thể sử dụng chỉ một vector duy nhất mã hoá và có khả năng biểu hiện cả polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Trong trường hợp này, chuỗi nhẹ cần đặt trước chuỗi nặng để tránh sự dư thừa chuỗi nặng không có độc tố (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); và Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980)). Các trình tự mã hoá chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể là ADN bổ trợ hoặc ADN hệ gen.

Khi phân tử kháng thể theo sáng chế đã được tạo ra bởi động vật, được tổng hợp hóa học hoặc biểu hiện tái tổ hợp, phân tử này có thể được tinh chế bằng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tinh chế phân tử globulin miễn dịch, chẳng hạn, bằng sắc ký (chẳng hạn, trao đổi ion, ái lực, đặc biệt là ái lực đối với IL-4 và/hoặc IL-13 sau khi sắc ký Protein A và sắc ký chọn lọc kích thích và tương tự), ly tâm, tinh chế bằng phương pháp phân biệt độ tan hoặc bằng một kỹ thuật tiêu chuẩn bất kỳ để tinh chế protein. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh kháng thể có thể được dung hợp với trình tự polypeptit khác gốc được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, để tạo thuận lợi cho quá trình tinh chế.

Kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bằng một phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa dòng, mặc dù do sự biến đổi kháng thể để tối ưu hóa việc sử dụng trên người, cũng như tối ưu việc sử dụng kháng thể như đã nêu, kháng thể đơn dòng được ưu tiên hơn vì dễ sản xuất và biến đổi protein. Các phương pháp tạo kháng thể đa dòng đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này (Harlow et al., Antidody: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)).

Kháng thể theo sáng chế tốt hơn là kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng có thể tạo ra được bằng kỹ thuật tế bào lai, như được mô tả bởi Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975); US 4,376,110; Harlow et al., *Antibody: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) và Hammerling et al., *Monoclonal Antibody and T-Cell Hybridomas*, Elsevier (1981), các phương pháp ADN tái tổ hợp, chẳng hạn, tạo và sử dụng các tế bào biến nạp, hoặc các phương pháp đã biết. Ví dụ khác về các phương pháp có thể sử dụng để tạo kháng thể đơn dòng gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật tạo tế bào lai tế bào B của người (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); và Cole et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026 (1983)), và kỹ thuật tế bào lai-EBV (Cole et al., *Monoclonal Antibody and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Các kháng thể này có thể thuộc một lớp globulin miễn dịch bất kỳ bao gồm IgG, IgM, IgE, IgA và IgD, và các phân lớp của các lớp nêu trên. Các tế bào lai tạo ra mAb theo sáng chế có thể được nuôi cấy *in vitro* hoặc *in vivo*.

Trong mô hình tế bào lai, vật chủ như chuột, chuột được làm giống như của người, chuột được chuyển gen trong hệ miễn dịch của người, chuột lang, thỏ, chuột cống, lạc đà hoặc các vật chủ thích hợp khác, được chủng ngừa để tạo ra tế bào lympho sản xuất hoặc có khả năng sản xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với IL-4 hoặc IL-13. Nói cách khác, tế bào lympho có thể được chủng ngừa *in vitro*. Sau đó, tế bào lympho được dung hợp với các tế bào u tủy sử dụng chất dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo tế bào lai (Goding, *Monoclonal Antibody: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)).

Nói chung, trong việc tạo ra tế bào lai sản xuất kháng thể, hoặc tế bào lympho máu ngoại vi ("PBL") sẽ được sử dụng nếu muốn tạo ra các tế bào có nguồn gốc từ người, hoặc các tế bào lách hoặc tế bào hạch bạch huyết được sử dụng nếu muốn tạo ra nguồn tế bào động vật có vú không phải của người. Các dòng tế bào bất tử thường là các dòng tế bào động vật có vú được biến nạp, cụ thể là các tế bào u tủy của gặm nhấm, bò hoặc người. Thông thường, dòng tế bào u tủy của chuột cống hoặc chuột nhắt sẽ được sử dụng. Các tế bào lai có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp tốt hơn là chứa một hoặc nhiều hợp chất ức chế quá trình sinh trưởng hoặc sống sót của các tế bào bất tử không được dung hợp. Chẳng hạn, nếu các tế bào gốc thiếu enzym hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), thì môi trường

nuôi cấy các tế bào lai thường sẽ chứa hypoxanthin, aminopterin và thymidin ("môi trường HAT"), các hợp chất ức chế sự sinh trưởng của các tế bào thiếu HGPRT.

Các dòng tế bào bất tử được ưu tiên là các dòng tế bào dung hợp một cách hiệu quả, có thể sản xuất ở nồng độ cao kháng thể bằng các tế bào tạo kháng thể được chọn lọc, và nhạy cảm với môi trường nuôi cấy như môi trường HAT. Trong số các dòng tế bào u tủy này có dòng tế bào u tủy của chuột, như các dòng tế bào thu được từ khối u MOPC-21 và MPC-11 của chuột được bán ở Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. và SP2/0, FO hoặc các tế bào X63-Ag8-653 có sẵn trong bộ sưu tập giống của Mỹ (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Các dòng tế bào của người và dòng tế bào di u tủy của chuột-người cũng được đề cập đến trong việc sản xuất kháng thể đơn dòng của người (Kozbor, J Immunol 133:3001 (1984); và Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pp. 51-63 (1987)). Dòng tế bào u tủy NSO của chuột cũng có thể được sử dụng (Bộ sưu tập giống Châu Âu - European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK).

Một phương án khác là sử dụng quá trình dung hợp điện thay vì dung hợp hóa học để tạo các tế bào lai. Thay cho phương pháp dung hợp, tế bào B có thể được làm cho bất tử sử dụng, chẳng hạn, virus Epstein Barr Virus hoặc các gen biến nạp khác, tham khảo, chẳng hạn, Zurawaki et al., in Monoclonal Antibody, ed., Kennett et al., Plenum Press, pp. 19-33. (1980). Chuột chuyển gen biểu hiện globulin miễn dịch và chuột suy giảm miễn dịch kết hợp nặng (SCID) được cấy ghép bằng tế bào lympho B của người cũng có thể được sử dụng.

Môi trường nuôi cấy trong đó tế bào lai được nuôi cấy được thử nghiệm về khả năng sản xuất kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp IL-4 và/hoặc IL-13. Độ đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai có thể được xác định bằng thử nghiệm kết tủa miễn dịch hoặc bằng thử nghiệm liên kết *in vitro*, như thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA), phân tích đếm số lượng tế bào theo dòng (FACS) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch gắn enzym (ELISA). Các kỹ thuật này đã được biết và có thể thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng với IL-4 và/hoặc IL-13 có thể được xác định, chẳng hạn, bằng phân tích Scatchard (Munson et al., Anal Biochem 107:220 (1980)).

Sau khi tế bào lai được xác định là có thể sản xuất kháng thể có độ đặc hiệu, ái lực và/hoặc hoạt tính mong muốn, dòng có thể được tách dòng tiếp bằng các phương pháp pha loãng giới hạn và nuôi cấy bằng các phương pháp tiêu chuẩn (Goding, *Monoclonal Antibody: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). Các môi trường nuôi cấy thích hợp gồm có, chẳng hạn, Môi trường Dulbecco biến đổi (D-MEM) hoặc môi trường RPMI-1640. Ngoài ra, tế bào lai có thể được nuôi cấy *in vivo* ở dạng khối u cổ trướng trên động vật.

Kháng thể đơn dòng được tiết bởi các dòng được phân tách và phân lập một cách thích hợp từ môi trường nuôi cấy, dịch cổ trướng hoặc huyết thanh bằng các phương pháp tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, chẳng hạn, protein A-Sepharose, protein G-Sepharose, sắc ký hydroxylapatit, sắc ký chọn lọc kích thước trên gel, điện di trên gel, sắc ký thẩm tách hoặc ái lực.

Một loạt các phương pháp đã có trong lĩnh vực kỹ thuật này để sản xuất kháng thể đơn dòng và do đó, sáng chế không chỉ giới hạn ở một phương pháp sản xuất bằng các tế bào lai. Chẳng hạn, kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra nhờ phương pháp ADN tái tổ hợp, như được mô tả trong US 4,816,567. Trong trường hợp này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" chỉ kháng thể thu được từ dòng có nhân điển hình, thể thực khuẩn hoặc tế bào chưa có nhân điển hình.

ADN mã hoá kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được phân lập một cách dễ dàng và đọc trình tự nhờ sử dụng các phương pháp thông thường (chẳng hạn, bằng cách sử dụng các đầu dò oligonucleotit có khả năng liên kết đặc hiệu với các gen mã hoá chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể của chuột, hoặc các chuỗi này từ người, được làm giống như của người hoặc các nguồn khác) (Innis et al. in *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic (1990), và Sanger et al., *Proc Natl Acad Sci* 74:5463 (1977)). Các tế bào lai đóng vai trò như một nguồn chứa các ADN này. Khi đã được phân lập, ADN có thể được đưa vào vector biểu hiện, sau đó các vector này sẽ được chuyển nhiễm vào tế bào chủ như các tế bào *E. coli*, NSO, COS, tế bào trứng của chuột lang (CHO) hoặc tế bào u tủy không tạo ra globulin miễn dịch, để đạt được quá trình tổng hợp kháng thể đơn dòng trong các tế bào chủ tái tổ hợp. ADN cũng có thể được biến đổi, chẳng hạn, bằng cách thay thế trình tự mã hoá vùng cố định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người bằng các trình tự tương đồng của chuột (US 4,816,567; và

Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)) hoặc liên kết đồng hóa trị với trình tự mã hoá globulin miễn dịch bằng toàn bộ hoặc một phần của trình tự mã hoá polypeptit không phải globulin miễn dịch. Một polypeptit không phải globulin miễn dịch có thể được thay thế cho vùng cố định của kháng thể theo sáng chế, hoặc có thể được thay thế cho vùng biến đổi ở một vị trí kết hợp với IL-4 hoặc IL-13 của kháng thể theo sáng chế để tạo ra kháng thể khả năng trị.

Kháng thể có thể là kháng thể đơn trị. Các phương pháp để tạo ra kháng thể đơn trị đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, một phương pháp là biểu hiện tái tổ hợp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được biến đổi của globulin miễn dịch. Chuỗi nặng thường được cắt ở một vị trí bất kỳ trong vùng Fc để ngăn sự tạo liên kết chéo giữa các chuỗi nặng. Nói cách khác, các gốc cystein tương ứng sẽ được thay thế bằng các gốc axit amin khác hoặc được loại bỏ để ngăn ngừa sự tạo liên kết chéo.

Mảnh kháng thể nhận biết các epitop đặc hiệu có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết. Thông thường, các mảnh kháng thể này thu được qua phân hủy protein kháng thể nguyên vẹn (tham khảo chẳng hạn, Morimoto et al., J Biochem Biophys Methods 24:107 (1992); và Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Chẳng hạn, mảnh kháng thể Fab và F(ab')₂ theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách phân cắt thủy phân protein phân tử globulin miễn dịch, sử dụng các enzym như papain (để tạo ra mảnh kháng thể Fab) hoặc pepsin (để tạo ra mảnh kháng thể F(ab')₂). Mảnh kháng thể F(ab')₂ gồm có vùng biến đổi, vùng cố định chuỗi nhẹ và vùng CH1 của chuỗi nặng. Tuy nhiên, các mảnh kháng thể này có thể tạo ra trực tiếp từ tế bào chủ tái tổ hợp. Chẳng hạn, mảnh kháng thể có thể được phân lập từ thư viện kháng thể thể thực khuẩn. Nói cách khác, mảnh kháng thể F(ab')₂-SH có thể được khôi phục một cách trực tiếp từ *E. coli* và được liên kết hóa học để tạo ra mảnh kháng thể F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992)). Theo một phương pháp khác, mảnh kháng thể F(ab')₂ có thể được phân lập trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Các kỹ thuật khác để sản xuất mảnh kháng thể sẽ là quen thuộc với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án khác, kháng thể được lựa chọn là mảnh Fv một chuỗi (Fv) (WO 93/16185).

Đối với một số mục đích sử dụng, bao gồm cả sử dụng kháng thể *in vivo* ở người và các thử nghiệm phát hiện *in vitro*, có thể tốt hơn là sử dụng kháng thể khả năng, kháng

thể được làm giống như của người hoặc kháng thể người. Phương pháp để sản xuất kháng thể khảm đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo chẳng hạn, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies et al., *J Immunol Methods* 125:191 (1989); và US 5,807,715; 4,816,567; và 4,816,397.

Kháng thể được làm giống như của người thu được từ phân tử kháng thể được tạo ra từ một loài không phải người liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 trong đó một hoặc nhiều CDR được xen vào vùng FR của phân tử globulin miễn dịch của người. Kháng thể có thể được làm giống như của người sử dụng một loạt các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, chẳng hạn, ghép CDR (EP 239,400; WO 91/09967; và US 5,225,539; 5,530,101; và 5,585,089), bọc hoặc tái tạo bề mặt (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28:489 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7:805 (1994); và Roguska et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969 (1994)), và đảo chuỗi (US 5,565,332).

Kháng thể được làm giống như của người có thể có một hoặc nhiều gốc axit amin từ một nguồn không phải người. Các gốc axit amin không phải của người thường được gọi là các gốc "nhập cư", thường được lấy từ một vùng biến đổi "nhập cư". Quá trình làm cho giống của người có thể được thực hiện theo các phương pháp của Winer và cộng sự (Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988); và Verhoeyen et al., *Science* 239:1534 (1988)), bằng cách thay thế các CDR không phải của người hoặc các phần của trình tự CDR cho các trình tự tương ứng của kháng thể người. Do đó, kháng thể "được làm giống như của người" là kháng thể khảm (US 4,816,567), trong đó một phần vùng biến đổi của kháng thể nguyên vẹn của người được thay thế bằng trình tự tương ứng của một loài không phải người. Trong thực nghiệm, kháng thể được làm giống như của người thường là kháng thể người trong đó một vài gốc trong CDR và có thể là một vài gốc trong FR được thay thế ở các vị trí tương đồng trong kháng thể của gặm nhấm. Vùng cố định chuỗi nặng và vùng bản lề có thể từ một kháng thể thuộc một lớp hoặc phân lớp kháng thể bất kỳ để đạt được tác dụng mong muốn, như chức năng hiệu ứng.

Thông thường, các gốc trong vùng khung trong kháng thể của người có thể được thay thế bằng gốc tương ứng trong CDR của kháng thể cho để biến đổi, và có thể là cải thiện mức độ liên kết với kháng nguyên. Các thay thế trong vùng khung được xác định

bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, bằng cách mô hình hóa các tương tác của các gốc trong CDR và vùng khung để xác định các gốc trong vùng khung là quan trọng đối với quá trình liên kết với kháng nguyên và so sánh trình tự để xác định các gốc bất thường trong vùng khung ở các vị trí cụ thể, tham khảo, chẳng hạn, US 5,585,089; và Riechmann et al., Nature 332:323 (1988).

Tốt hơn nữa là kháng thể được làm giống như của người vẫn giữ được ái lực cao đối với IL-4 và/hoặc IL-13, và vẫn duy trì hoặc thu được các hoạt tính sinh học thuận lợi khác. Do đó, kháng thể được làm giống như của người được tạo ra bằng quy trình phân tích trình tự gốc và các sản phẩm được làm giống như của người khác sử dụng mô hình ba chiều của các trình tự gốc và trình tự được làm giống như của người. Mô hình globulin miễn dịch ba chiều thường có sẵn và quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các chương trình máy tính là có sẵn mô tả và biểu thị cấu hình 3 chiều có thể có của các trình tự globulin miễn dịch. Khảo sát quá trình biểu thị cấu hình sẽ cho phép phân tích vai trò tiềm năng của một số gốc trong quá trình hoạt động của các trình tự globulin miễn dịch, nghĩa là, phân tích các gốc ảnh hưởng đến khả năng liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 của globulin miễn dịch. Theo cách này, các gốc trong vùng FR có thể được chọn lọc và tổ hợp từ các trình tự nhận và trình tự nhập cứ sao cho hoạt tính kháng thể mong muốn, như ái lực đối với kháng nguyên tăng, được tối đa hóa, mặc dù các gốc trong vùng CDR mới liên kết trực tiếp và ảnh hưởng gần như hoàn toàn đến khả năng liên kết với IL-4 hoặc IL-13 của kháng thể. Các vùng CDR cũng có thể được biến đổi để chứa một hoặc nhiều axit amin khác với các axit amin thu được từ kháng thể gốc có vùng CDR, để tạo ra hoạt tính được gia tăng hoặc các hoạt tính khác đã được đề cập, như liên kết với ái lực cao hơn, chẳng hạn.

Một số phần của vùng cố định kháng thể có thể được biến đổi để tạo ra các đồng phân kháng thể, dẫn xuất, mảnh kháng thể và các loại tương tự có hoạt tính khác hoặc tốt hơn so với cá hoạt tính có ở kháng thể gốc. Do đó, chẳng hạn, nhiều kháng thể IgG4 tạo các liên kết disulfua nội phân tử gần vùng bản lề. Các liên kết nội phân tử có thể làm mất ổn định phân tử lưỡng trị gốc tạo thành các phân tử đơn trị bao gồm một chuỗi nặng với chuỗi nhẹ đi kèm. Các phân tử này có thể tái liên kết với nhau, nhưng trên một cơ sở ngẫu nhiên.

Đã quan sát được rằng bằng cách biến đổi axit amin trong vùng bản lề của các phân tử IgG4 có thể giảm khả năng tạo liên kết nội phân tử, nhờ đó ổn định hóa phân tử IgG4, điều này sẽ giảm thiểu khả năng hình thành các phân tử đặc hiệu kép. Quá trình biến đổi này có thể có lợi nếu kháng thể điều trị là một phân tử IgG4 vì độ ổn định được gia tăng sẽ giảm thiểu khả năng phân ly của phân tử trong quá trình sản xuất và chế tạo, cũng như *in vivo*. Một kháng thể đơn trị có thể không có hiệu quả tương đương với phân tử lưỡng trị gốc. Chẳng hạn, khi IgG4 lưỡng trị được sử dụng trên bệnh nhân, tỷ lệ phần trăm IgG4 lưỡng trị phân hủy là khoảng 30% trong giai đoạn hai tuần. Một thay thế axit amin ở vị trí 228 sẽ gia tăng độ ổn định của Ig G4. Serin ở vị trí 228 có thể được thay thế bằng một axit amin khác, như một trong số 19 axit amin còn lại. Sự thay đổi như vậy có thể được tạo ra đặc biệt với kháng thể tái tổ hợp trong đó axit nucleic mã hoá trình tự này có thể được gây đột biến để tạo ra sự thay thế axit amin ở vị trí 228. Chẳng hạn, S có thể được thay bằng prolin.

Một tập hợp các axit amin thích hợp để biến đổi gồm có các axit amin trong vùng bản lề, các axit amin trong vùng bản lề sẽ ảnh hưởng đến khả năng liên kết của phân tử chứa chuỗi nặng với thụ thể Fc và quá trình phân tử hóa của kháng thể được liên kết. Các axit amin này gồm có, trong phân tử IgG1, các gốc từ khoảng 233 đến khoảng 237 (Glu-Leu-Leu-Gly-Gly); (SEQ ID NO:49) từ khoảng 252 đến khoảng 256 (Met-Ile-Ser-Arg-Thr) (SEQ ID NO:50) và từ khoảng 318 (Glu) đến khoảng 331 (Pro), bao gồm, chẳng hạn, Lys 320, Lys 322 và Pro 329.

Kháng thể người toàn bộ là đặc biệt ưu tiên để điều trị cho bệnh nhân là người. Kháng thể người có thể được tạo ra nhờ một loạt các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm biểu hiện thể thực khuẩn được mô tả ở trên sử dụng các thư viện kháng thể thu được từ các trình tự globulin miễn dịch của người, tham khảo, US 4,444,887 và 4,716,111; và WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 và WO 91/10741. Các kỹ thuật được đề cập bởi Cole et al. và Boerder et al. cũng được sử dụng để bào chế kháng thể đơn dòng của người (Cole et al., Monoclonal Antibody and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985); và Boerner et al., J Immunol 147:86 (1991)).

Kháng thể người cũng có thể được tạo ra sử dụng chuột chuyển gen không có khả năng biểu hiện globulin miễn dịch nội sinh hoạt động, nhưng lại có khả năng biểu hiện

một số gen globulin miễn dịch của người. Chẳng hạn, các phức hệ gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của người có thể được đưa vào một cách ngẫu nhiên hoặc bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng vào các tế bào gốc phôi chuột. Nói cách khác, các vùng biến đổi, vùng cố định và các vùng đa dạng của người có thể được đưa vào các tế bào gốc phôi chuột, ngoài các gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người. Các gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của chuột có thể được biến đổi thành không hoạt động một cách riêng rẽ hoặc đồng thời với quá trình đưa các locut gen globulin miễn dịch của người vào tế bào bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Cụ thể là, việc loại bỏ đồng hợp tử của vùng JH sẽ ngăn được quá trình tạo kháng thể nội sinh. Các tế bào gốc phôi được biến đổi được cấy trồng và đưa vào túi phôi để tạo ra chuột khảm. Sau đó, chuột khảm được cho giao phối để tạo ra thế hệ con đồng hợp tử biểu hiện kháng thể người, tham khảo, chẳng hạn, Jakobovitis et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., Nature 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol 7:33 (1993); và Duchosal et al., Nature 355:258 (1992)).

Chuột chuyển gen được gây miễn dịch theo kiểu thông thường bằng xytokin IL-4 hoặc IL-13, chẳng hạn, tất cả hoặc một phần của IL-4 hoặc IL-13. Kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp IL-4 và IL-13 có thể thu được từ chuột chuyển gen được gây miễn dịch sử dụng kỹ thuật tế bào lai truyền thống. Các gen chuyển mã hoá globulin miễn dịch của người trong chuột chuyển gen sẽ sắp xếp lại trong quá trình biệt hoá tế bào B, và sau đó sẽ trải qua quá trình chuyển đổi lớp kháng thể và đột biến tế bào sinh dưỡng. Do đó, bằng cách sử dụng kỹ thuật như vậy, có thể tạo ra các kháng thể IgG, IgA, IgM và IgE có ích trong việc điều trị. Để tham khảo, xem tài liệu Lonberg et al., Int Rev Immunol 13:65-93 (1995). Để biết về việc sản xuất kháng thể người và kháng thể đơn dòng của người và quy trình sản xuất tham khảo, chẳng hạn, WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; và WO 96/33735; EP 0598877; và US 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; và 5,939,598. Ngoài ra, các công ty như Amgen (Fremont, CA), Genpharm (San Jose, CA) và Medarex, Inc. (Princeton, NJ) có thể cam kết cung cấp kháng thể người kháng trực tiếp IL-4 và/hoặc IL-13 sử dụng công nghệ tương tự như công nghệ được mô tả ở trên.

Tương tự, mAb của người cũng có thể được tạo ra bằng các gây miễn dịch cho chuột được cấy các tế bào bạch cầu trong máu ngoại vi của người, tế bào lách hoặc tủy xương (chẳng hạn, kỹ thuật trioma của công ty XTL Biopharmaceuticals, Israel). Kháng thể người toàn bộ có khả năng nhận diện được một epitop nhất định có được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật được gọi là "chọn lọc có định hướng". Trong phương pháp này, một kháng thể đơn dòng không phải của người, được chọn chẳng hạn, kháng thể chuột được sử dụng để định hướng quá trình chọn lọc kháng thể người toàn bộ nhận diện được cùng một epitop (Jespers et al., Bio/technology 12:899 (1988)).

Khi sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp, biến thể kháng thể có thể được tạo ra nội bào, trong khoảng nguyên sinh chất, hoặc được tiết trực tiếp vào môi trường. Nếu biến thể kháng thể được tạo ra trong tế bào, như là bước đầu tiên, mảnh vụn tiểu phần, tế bào chủ hoặc mảnh kháng thể được thủy phân, có thể được tách ra, chẳng hạn, bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc. Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992) đã đề cập đến quy trình để phân lập kháng thể được tiết vào khoảng chu chất của *E. coli*. Sơ lược là, mảnh tế bào được bộc lộ với natri axetat (pH 3,5) và EDTA. Mảnh vụn tế bào có thể được tách bằng ly tâm. Khi biến thể kháng thể được tiết vào môi trường, dịch nổi từ các hệ biểu hiện này đầu tiên thường được cô đặc sử dụng máy lọc cô đặc protein có bán sẵn trên thị trường, chẳng hạn, máy siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Một chất ức chế proteaza như PMSF có thể được đưa vào để ức chế quá trình thủy phân protein, và kháng sinh cũng có thể được đưa vào để ngăn ngừa sự sinh trưởng của các mầm bệnh ngẫu nhiên.

Chế phẩm kháng thể được tạo ra từ các tế bào có thể được tinh chế sử dụng, chẳng hạn, sắc ký hydroxylapatit, điện di, thẩm tách và sắc ký ái lực. Độ phù hợp của protein A hoặc protein G là phối tử ái lực phụ thuộc vào loại và isotyp của vùng chức năng Fc của globulin miễn dịch có trong biến thể kháng thể. Protein A có thể được sử dụng để tinh chế kháng thể có nguồn gốc từ chuỗi nặng IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người (Lindmark et al., J Immunol Meth 62:1 (1983)). Protein G có thể được sử dụng cho các isotyp của chuột và cho IgG3 của người (Guss et al., EMBO J 5:1567 (1986)). Chất nền trong đó phối tử ái lực được gắn vào thường là agarosa, nhưng các chất nền khác cũng có thể sử dụng được. Các chất nền ổn định về mặt cơ học, như miếng thủy tinh đục lỗ hoặc poly(styrenediviny)benzen, tạo ra tốc độ dòng chảy nhanh hơn và thời gian xử lý ngắn hơn so với agarosa. Khi biến thể kháng thể chứa vùng chức năng CH3, như

Bakerbond ABXTM (JT Baker; Phillipsburg, NJ) là hữu dụng để thực hiện quá trình tinh chế. Các kỹ thuật khác để tinh chế protein, như phân đoạn trên cột trao đổi ion, kết tủa bằng etanol, HPLC đảo pha, sắc ký trên silica, sắc ký trên heparin, sắc ký trên nhựa trao đổi anion hoặc cation (như cột polyaxit aspartic), sắc ký đẳng điện, SDS-PAGE và kết tủa amoni sulfat cũng có thể sử dụng được, phụ thuộc vào kháng thể hoặc biến thể cần được khôi phục.

Sau (các) bước tinh chế sơ bộ bất kỳ, hỗn hợp chứa kháng thể hoặc biến thể được đề cập và tạp chất có thể được tiến hành sắc ký tương tác kỵ nước ở pH thấp sử dụng đệm tách rửa ở pH từ 2,5 đến 4,5, tốt hơn là được thực hiện trong muối có nồng độ thấp (chẳng hạn, từ nồng độ muối nằm trong khoảng từ 0 đến 0,25M).

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép có thể là đơn dòng, tốt hơn là kháng thể người hoặc được làm giống như của người, kháng thể có độ đặc hiệu liên kết với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đặc hiệu kép, mảnh của nó và các dạng tương tự có độ đặc hiệu liên kết với IL-4 và IL-13.

Các phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu kép đã được biết. Thông thường, quá trình sản xuất tái tổ hợp kháng thể đặc hiệu kép được dựa trên quá trình đồng biểu hiện hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, trong đó hai chuỗi nặng có độ đặc hiệu khác nhau (Milstein et al., *Nature* 305:537 (1983)). Vì sự sắp xếp ngẫu nhiên của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch, các tế bào lai (quadroma) sẽ tạo ra một hỗn hợp gồm có 10 phân tử kháng thể khác nhau, trong số đó chỉ có một phân tử có cấu trúc đặc hiệu kép chính xác. Việc tinh chế phân tử này thường được thực hiện bằng nhiều bước sắc ký ái lực. Các phương pháp tương tự được đề cập trong WO 93/08829 và Traunecker et al., *EMBO J* 10:3655 (1991). Các phương pháp khác để tạo kháng thể đặc hiệu kép được đề cập trong, chẳng hạn, Kufer et al., *Trends Biotech* 22:238-244, 2004.

Vùng biến đổi của kháng thể có độ đặc hiệu liên kết mong muốn có thể được dung hợp vào các trình tự vùng cố định của globulin miễn dịch. Tốt hơn là, được dung hợp cùng với vùng cố định chuỗi nặng globulin miễn dịch, chứa ít nhất một phần vùng bản lề, CH2, và CH3. Kháng thể này có thể có vùng cố định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) chứa vị trí cần thiết cho việc liên kết chuỗi nhẹ có trong ít nhất một trong số các thể

dung hợp. ADN mã hoá thể dung hợp chuỗi nặng globulin miễn dịch, nếu cần, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, được xen vào các vector biểu hiện riêng biệt, và được đồng biến nạp vào vật chủ thích hợp. Chi tiết hơn về phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu kép tham khảo, chẳng hạn, Suresh et al., *Meth Enzyme* 121:210 (1986).

Các kháng thể dị liên hợp cũng được đề cập theo sáng chế. Kháng thể dị liên hợp gồm có hai kháng thể được liên kết đồng hóa trị với nhau. Các kháng thể này, chẳng hạn, đã được trình diện với các tế bào đích của hệ miễn dịch với các tế bào không mong muốn (US 4,676,980). Được đề cập là kháng thể có thể được tạo ra *in vitro* bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực hóa protein tổng hợp, bao gồm các phương pháp sử dụng các chất tạo liên kết chéo. Chẳng hạn, các chất gây độc miễn dịch có thể được thiết kế sử dụng phản ứng trao đổi disulfua hoặc bằng cách tạo liên kết thioeste. Ví dụ về các hợp chất thích hợp đối với mục đích này gồm có iminothiolat và methyl-4-mercaptobutyrimidat, và các hợp chất được đề cập, chẳng hạn, trong US 4,676,980.

Ngoài ra, có thể tạo ra kháng thể một vùng chức năng kháng IL-4 và/hoặc IL-13. Ví dụ về kỹ thuật này đã được đề cập trong WO9425591 đối với kháng thể thu được từ chuỗi nặng Ig của Camelidae, cũng như trong US20030130496 đề cập đến việc phân lập kháng thể một vùng chức năng hoàn toàn gốc người từ các thư viện thể thực khuẩn.

Nói cách khác, các kỹ thuật được đề cập để sản xuất kháng thể đơn chuỗi (US 4,946,778; Bird, *Science* 242:423 (1988); Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879 (1988); và Ward, et al., *Nature* 334:544 (1989)) có thể được sử dụng để sản xuất kháng thể đơn chuỗi. Kháng thể đơn chuỗi được tạo thành bằng cách liên kết chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mảnh kháng thể của vùng Fv bằng liên kết axit amin, tạo ra polypeptit đơn chuỗi. Các kỹ thuật để lắp ghép các mảnh kháng thể Fv chức năng trong *E. coli* cũng có thể được sử dụng (Skerra et al., *Science* 242:1038 (1988)).

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể được dung hợp tái tổ hợp hoặc liên kết hóa học (bao gồm cả liên kết đồng hóa trị và không đồng hóa trị) với polypeptit. Kháng thể được dung hợp hoặc được liên hợp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để tạo điều kiện dễ dàng cho quá trình tinh chế, tham khảo, chẳng hạn, WO 93/21232; EP 439,095; Naramura et al., *Immunol Lett* 39:91 (1994); US 5,474,981; Gillies et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1428 (1992); và Fell et al., *J Immunol* 146:2446 (1991). Trình tự axit

amin chỉ thị có thể là một peptit hexa-histidin, như tag trong vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), trong số đó, nhiều loại đã có bán sẵn trên thị trường, Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989). Các đuôi peptit hữu dụng để tinh chế gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, đuôi "HA", tương ứng với epitop thu được từ protein ngưng kết tổ hồng cầu của virus cúm (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) và đuôi "flag".

Cũng có thể tạo ra một chuỗi peptit liên kết với các phân tử trong đó các vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fv được liên kết với nhau. Kháng thể đơn chuỗi ("scFv") và phương pháp thiết kế chúng được mô tả trong, chẳng hạn, US 4,946,778. Nói cách khác, Fab có thể được thiết kế và biểu hiện bằng các phương pháp tương tự nhau. Tất cả các kháng thể người toàn phần hoặc kháng thể người một phần có thể có tính sinh miễn dịch thấp hơn so với kháng thể đơn dòng hoàn toàn có nguồn gốc chuột, và mảnh kháng thể và kháng thể đơn chuỗi cũng có thể có tính sinh miễn dịch thấp hơn.

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được phân lập từ các ngân hàng kháng thể thể thực khuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong McCafferty et al., Nature 348:552 (1990). Clarkson et al., Nature 352:624 (1991) và Marks et al., J Mol Biol 222:581 (1991) đề cập đến quá trình phân lập kháng thể của chuột và kháng thể người, sử dụng thư viện thể thực khuẩn. Các ấn phẩm tiếp theo đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể người có ái lực cao (mức độ nM) bằng cách đảo chuỗi (Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)), cũng như phương pháp lây nhiễm tái tổ hợp và tái tổ hợp *in vivo* như là một phương pháp để tạo ra các ngân hàng thể thực khuẩn cực lớn (Waterhouse et al., Nucl Acids Res 21:2265 (1993)). Do đó, các kỹ thuật này là các phương án thay thế có thể thực hiện được so với kỹ thuật tạo tế bào lai biểu hiện kháng thể đơn dòng truyền thống để phân lập kháng thể đơn dòng.

Kháng thể kháng IL-4 và/hoặc IL-13 được thử nghiệm bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA), FACS, thẩm tách miễn dịch Western hoặc các kỹ thuật hóa miễn dịch khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Để xác định liệu một thể tương đồng kháng thể cụ thể có liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 của người hay không, thì có thể sử dụng một thử nghiệm liên kết thường quy bất kỳ. Các thử nghiệm liên kết IL-4 và IL-13 hữu dụng gồm có phân tích FACS, thử nghiệm ELISA, cộng hưởng Plasmon bề mặt (Biacore), thử nghiệm phóng xạ miễn dịch và các thử nghiệm tương tự, các thử nghiệm này phát hiện mức độ liên kết của kháng

thể, và chức năng được tạo ra, với IL-4 và/hoặc IL-13 của người. Các dạng tan và toàn vẹn của IL-4 và IL-13 của người được đề cập ở đây là hữu dụng trong các thử nghiệm này. Mức độ liên kết của kháng thể hoặc thể tương đồng với IL-4 và/hoặc IL-13, hoặc với mảnh kháng thể tan của nó, có thể được phát hiện một cách thuận lợi bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai đặc hiệu đối với các globulin miễn dịch của các loài từ đó thu được kháng thể hoặc thể tương đồng.

Để xác định liệu một kháng thể hoặc thể tương đồng cụ thể có chặn đáng kể quá trình liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 có thể sử dụng một thử nghiệm cạnh tranh bất kỳ. Các thử nghiệm hữu dụng gồm có, chẳng hạn, thử nghiệm ELISA, FACS, thử nghiệm phóng xạ miễn dịch và các thử nghiệm tương tự có khả năng định lượng khả năng cạnh tranh với IL-4 và/hoặc IL-13 của kháng thể hoặc thể tương đồng. Tốt hơn là, khả năng chặn quá trình liên kết của IL-4 và/hoặc IL-13 được đánh dấu của người với kháng thể hoặc thể tương đồng kháng thể được cố định của phôi tử người sẽ được xác định.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được đề cập hoặc cụ thể hóa với epitop hoặc một phần của IL-4 và/hoặc IL-13 mà kháng thể nhận diện hoặc liên kết đặc hiệu. (Các epitop hoặc phần polypeptit có thể được cụ thể hóa như được mô tả ở đây, chẳng hạn, bằng các vị trí đầu N và đầu C, bằng kích thước các gốc axit amin gần kề, các epitop phù hợp và các đặc điểm tương tự.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được mô tả hoặc cụ thể hóa về mặt mức độ phản ứng chéo. Kháng thể liên kết với các polypeptit IL-4 và/hoặc IL-13, có độ tương đồng ít nhất 95%, ít nhất 90%, ít nhất 85%, ít nhất 80%, ít nhất 75%, ít nhất 70%, ít nhất 65%, ít nhất 60%, ít nhất 55%, và ít nhất 50% (được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả ở đây) so với IL-4 và/hoặc IL-13 cũng được đề cập theo sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được mô tả hoặc cụ thể hóa về mặt ái lực liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13. Các kháng thể kháng IL-4 và/hoặc IL-13 có thể liên kết với K_D ít hơn khoảng $10^{-7}M$, ít hơn khoảng $10^{-6}M$, hoặc ít hơn khoảng $10^{-5}M$. Các giá trị ái lực liên kết cao hơn của kháng thể được đề cập có thể có lợi, như các kháng thể có hằng số phân ly cân bằng hoặc K_D từ khoảng 10^{-8} đến khoảng $10^{-15}M$, từ khoảng 10^{-8} đến khoảng $10^{-12}M$, từ khoảng 10^{-9} đến khoảng $10^{-11}M$, hoặc từ khoảng 10^{-8} đến khoảng $10^{-10}M$. Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể ức chế cạnh tranh quá trình liên kết của kháng

thể với epitop theo sáng chế như được xác định bằng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để xác định mức độ liên kết cạnh tranh, chẳng hạn như các thử nghiệm miễn dịch được mô tả ở đây. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể sẽ ức chế cạnh tranh khả năng liên kết với epitop với mức độ ít nhất 95%, ít nhất 90%, ít nhất 85%, ít nhất 80%, ít nhất 75%, ít nhất 70%, ít nhất 60%, hoặc ít nhất 50%.

Sáng chế còn đề cập đến thể liên hợp chứa kháng thể được đề cập. Thể liên hợp chứa hai thành phần cơ bản là kháng thể được đề cập và một thành phần thứ hai có thể là chất liên kết tế bào, chất gây độc tế bào và các chất tương tự.

Theo sáng chế, thuật ngữ “chất liên kết tế bào” chỉ chất nhận diện và liên kết đặc hiệu với một phân tử trên bề mặt tế bào. Do đó, chất liên kết tế bào có thể là kháng nguyên CD, kháng nguyên mầm bệnh, như kháng nguyên virus, quá trình biệt hoá kháng nguyên, kháng nguyên ung thư, kháng nguyên đặc hiệu tế bào, kháng nguyên đặc hiệu với mô, Ig hoặc phân tử giống Ig và các chất tương tự.

Chất liên kết tế bào có thể là một loại hoạt chất bất kỳ mới được biết, hoặc các chất sẽ biết, và gồm có peptit, các phân tử không có bản chất peptit, saccarit, axit nucleic, phối tử, thụ thể và các chất tương tự, hoặc hỗn hợp của các chất này. Chất liên kết tế bào có thể là một hợp chất bất kỳ có thể liên kết với tế bào, theo kiểu đặc hiệu hoặc không đặc hiệu. Thông thường, chất này có thể là một kháng thể (đặc biệt là kháng thể đơn dòng), lymphokin, hormon, yếu tố sinh trưởng, vitamin, phân tử vận chuyển chất dinh dưỡng (như transferrin), hoặc các phân tử hoặc chất liên kết với tế bào bất kỳ.

Các ví dụ khác về chất liên kết tế bào có thể sử dụng được gồm có: kháng thể đa dòng; kháng thể đơn dòng; và mảnh kháng thể của kháng thể như Fab, Fab', F(ab')₂ và Fv (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113:470-478 (1974); và Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244 (1960)).

Thành phần thứ hai cũng có thể là chất gây độc tế bào. Thuật ngữ “chất gây độc tế bào” theo sáng chế chỉ chất làm giảm hoặc ngăn chặn chức năng, hoặc quá trình sinh trưởng của tế bào và/hoặc gây ra sự phá vỡ tế bào. Do đó, chất gây độc tế bào có thể là một taxol, maytansinoid, như DM1 hoặc DM4, CC-1065 hoặc đồng phân của CC-1065, rixin, mitomycin C và các chất tương tự. Theo một số phương án, chất gây độc tế bào, cũng như chất liên kết tế bào trong thể liên hợp theo sáng chế được liên kết đồng hóa

trị, trực tiếp hoặc qua một đoạn liên kết có thể phân cắt hoặc không thể phân cắt được với kháng thể được đề cập.

Ví dụ về các maytansinoid hữu dụng gồm có maytansinol và đồng phân của maytansinol. Các maytansinoid sẽ ức chế sự hình thành vi ống và có độc tính cao với các tế bào động vật có vú.

Ví dụ về các đồng phân maytansinol gồm có các chất có vòng thơm được biến đổi và chất có các biến đổi ở các vị trí khác. Các maytansinoid được đề cập trong US 4,424,219; US 4,256,746; US 4,294,757; US 4,307,016; US 4,313,946; US 4,315,929; US 4,331,598; US 4,361,650; US 4,362,663; US 4,364,866; US 4,450,254; US 4,322,348; US 4,371,533; US 6,333,410; US 5,475,092; US 5,585,499 và US 5,846,545.

Ví dụ về các đồng phân thích hợp của maytansinol có vòng thơm được biến đổi bao gồm: (1) C-19-declo (US 4,256,746) (được bảo chế, chẳng hạn, bằng cách khử LAH của ansamytotoxin P2); (2) C-20-hydroxy (hoặc C-20-demetyl) +/- C-19-declo (US 4,361,650 và 4,307,016) (được bào chế, chẳng hạn, bằng cách khử methyl hóa sử dụng *Streptomyces* hoặc *Actinomyces* hoặc khử clorin hóa sử dụng liti alumin hydrua (LAH)); và (3) C-20-demetoxy, C-20-axyloxy (-OCOR), +/-declo (US 4,294,757) (được bào chế bằng cách axyl hóa sử dụng axyl clorua).

Ví dụ về các đồng phân thích hợp của maytansinol có các biến đổi ở các vị trí khác gồm có: (1) C-9-SH (US 4,424,219) (được bào chế bằng cách cho maytansinol phản ứng với H_2S hoặc P_2S_5); (2) C-14-alkoxymetyl (demethoxy/ CH_2OR) (US 4,331,598); (3) C-14-hydroxymetyl hoặc axyloxymetyl (CH_2OH hoặc CH_2OAc) (US 4,450,254) (được bào chế từ *Nocardia*); (4) C-15-hydroxy/axyloxy (US 4,364,866) (được bào chế bằng cách chuyển hóa maytansinol bằng *Streptomyces*); (5) C-15-metoxy (US 4,313,946 và 4,315,929) (được pl từ *Trewia nudiflora*); (6) C-18-N-demetyl (US 4,362,663 và 4,322,348) (được bào chế bằng cách khử methyl hóa maytansinol bằng *Streptomyces*); và (7) 4,5-deoxy (US 4,371,533) (được bào chế bằng cách khử bằng titan trichlorua/LAH maytansinol).

Các thể liên hợp gây độc tế bào có thể được bào chế bằng các phương pháp *in vitro*. Để liên kết chất gây độc tế bào, dược chất hoặc tiền dược chất với kháng thể, một nhóm liên kết thường được sử dụng. Các nhóm liên kết thích hợp đã được biết trong

lĩnh vực kỹ thuật này và gồm có các nhóm disulfua, nhóm thioete, các nhóm không bền với axit, các nhóm không bền với ánh sáng, các nhóm không bền với peptidaza và các nhóm không bền với esteraza. Chẳng hạn, các thể liên hợp có thể được thiết kế sử dụng phản ứng trao đổi disulfua hoặc bằng cách tạo liên kết thioete giữa kháng thể được đề cập và được chất hoặc tiền được chất.

Như đã nêu, sáng chế đề cập đến các trình tự axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể hoặc mảnh chức năng hoặc biến thể của nó như đề cập ở đây, vector chứa trình tự nucleotit mã hoá phần liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13 của kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế, tế bào chủ chứa vector này, và các kỹ thuật tái tổ hợp để sản xuất polypeptit.

Vector thường chứa các thành phần đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều các thành phần sau: trình tự tín hiệu, điểm khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen chỉ thị hoặc gen chọn lọc, các trình tự hỗ trợ và/hoặc tăng cường quá trình dịch mã, yếu tố tăng cường và các thành phần tương tự. Do đó, vector biểu hiện chứa trình tự nucleotit được liên kết linh động với các trình tự nucleotit điều hoà phiên mã hoặc dịch mã thích hợp như các trình tự thu được từ các gen của động vật có vú, vi khuẩn, virus hoặc côn trùng. Ví dụ về các trình tự điều hoà bổ trợ gồm có các đoạn gen vận hành, vị trí liên kết với ribosom của ARN thông tin, và/hoặc các trình tự thích hợp khác kiểm soát quá trình phiên mã và dịch mã, như quá trình khởi động và kết thúc của các quá trình này. Trình tự nucleotit được "liên kết linh động" khi trình tự điều hoà có liên quan về mặt chức năng với trình tự nucleotit mã hoá polypeptit thích hợp. Do đó, trình tự nucleotit khởi đầu sẽ được liên kết linh động với, chẳng hạn, trình tự kháng thể chuỗi nặng nếu trình tự nucleotit khởi đầu kiểm soát quá trình phiên mã của trình tự nucleotit đó.

Ngoài ra, các trình tự mã hoá các peptit tín hiệu thích hợp thường không có liên quan về mặt bản chất với các trình tự kháng thể chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng có thể được đưa vào vector biểu hiện. Chẳng hạn, trình tự nucleotit mã hoá peptit tín hiệu (trình tự dẫn đầu được tiết) có thể được dung hợp vào khung với trình tự polypeptit sao cho kháng thể được tiết vào khoảng chu chất hoặc vào môi trường. Peptit tín hiệu có thể hoạt động trong tế bào chủ sẽ làm tăng quá trình tiết ngoại bào của kháng thể hoặc phần kháng thể thích hợp. Peptit tín hiệu có thể được phân cắt từ polypeptit trong quá trình

tiết kháng thể từ tế bào. Ví dụ về các trình tự tín hiệu tiết này đã được biết rõ và bao gồm, chẳng hạn, các trình tự tín hiệu được mô tả trong US 5,698,435; US 5,698,417 và US 6,204,023.

Vector có thể là một plasmit, vector virus sợi đơn hoặc sợi kép, vector thể thực khuẩn ARN hoặc ADN sợi đơn hoặc sợi kép, phagemit, cosmit hoặc các vật mang khác được đề cập. Các vector này có thể được đưa vào tế bào ở dạng polynucleotit bằng các kỹ thuật đã biết để đưa ADN và ARN vào tế bào. Vector, trong trường hợp là thể thực khuẩn và vector virus có thể được đưa vào các tế bào ở dạng virus được đóng gói hoặc được bao vỏ capsun bằng các kỹ thuật đã biết để chuyển nhiễm và tải nạp. Vector virus có thể có hoạt lực sao chép hoặc thiếu khả năng sao chép. Trong trường hợp thứ hai, việc nhân dòng virus thường chỉ xảy ra trong tế bào chủ hỗ trợ và sử dụng nhiều vector mang các thành phần khác nhau của virus cần thiết để tạo ra một tiểu phần virus. Các hệ thống dịch mã không tế bào cũng có thể được sử dụng để tạo ra protein sử dụng ARN thu được từ các cấu trúc ADN này (tham khảo chẳng hạn, WO 86/05807 và WO 89/01036; và US 5,122,464).

Kháng thể theo sáng chế có thể được biểu hiện từ một loại tế bào chủ thích hợp bất kỳ. Ví dụ về các tế bào chủ hữu dụng theo sáng chế gồm có tế bào chưa có nhân điển hình, tế bào nấm men hoặc các loại tế bào nhân thật cao hơn và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở vi sinh vật như vi khuẩn (chẳng hạn, *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, và *Shigella*, cũng như *Bacilli*, *Pseudomonas* và *Streptomyces*) được biến nạp bằng ADN thể thực khuẩn tái tổ hợp, vector biểu hiện plasmit ADN hoặc cosmit ADN chứa trình tự mã hoá kháng thể được đề cập; nấm men (chẳng hạn, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Trichoderma*, *Neurospora*, và *filamentous fungi*, như *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* và *Aspergillus*) được biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp của nấm men chứa trình tự mã hoá kháng thể; hệ thống tế bào côn trùng được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện virus tái tổ hợp (chẳng hạn, *Baculovirus*) chứa trình tự mã hoá kháng thể; hệ thống tế bào thực vật được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện của virus tái tổ hợp (chẳng hạn, vi rút gây bệnh khảm súp lơ, CaMV; hoặc virus khảm thuốc lá, TMV) hoặc được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện plasmit tái tổ hợp (chẳng hạn, plasmit Ti) chứa trình tự mã hoá kháng thể; hoặc hệ tế bào động vật có vú (chẳng hạn, các tế bào COS, CHO, BHK, 293 hoặc

3T3) chứa cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp chứa đoạn khởi đầu thu được từ hệ gen của tế bào động vật có vú (chẳng hạn, đoạn khởi đầu metallothionin) hoặc từ virus của động vật có vú (chẳng hạn, đoạn khởi đầu muộn của adenovirus; hoặc đoạn khởi đầu 7,5K của virus vaccinia).

Vector biểu hiện để sử dụng trong các tế bào chủ chưa có nhân điển hình thường chứa một hoặc nhiều các gen chỉ thị tạo ra kiểu hình có thể chọn lọc được. Các gen tạo kiểu hình có khả năng chọn lọc là, chẳng hạn, gen mã hoá protein tạo ra tính kháng kháng sinh hoặc các gen tạo ra nhu cầu tự dưỡng. Ví dụ về các vector biểu hiện đối với tế bào chủ chưa có nhân điển hình gồm có các vector thu được từ các plasmid có bán trên thị trường, như pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), pET (Novagen, Madison, WI) và pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) một loạt các vector (Studier, J Mol Biol 219:37 (1991); và Schoepfer, Gene 124:83 (1993)). Các trình tự đoạn khởi đầu thường được sử dụng đối với các vector biểu hiện trong tế bào chủ chưa có nhân điển hình tái tổ hợp gồm có T7, (Rosenberg et al., Gene 56:125 (1987)), β -lactamaza (penicillinaza), đoạn khởi đầu lactoza (Chang et al., Nature 275:615 (1978); và Goeddel et al., Nature 281:544 (1979)), đoạn khởi đầu tryptophan (trp) (Goeddel et al., Nucl Acids Res 8:4057 (1980)), và đoạn khởi đầu tac (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

Vector nấm men thường chứa một trình tự khởi đầu sao chép, như từ plasmid 2 μ của nấm men, trình tự sao chép tự động (ARS), vùng khởi đầu, các trình tự polyadenin hóa, trình tự để kết thúc phiên mã và gen chỉ thị có thể chọn lọc được. Các trình tự đoạn khởi đầu thích hợp đối với vector nấm men, trong số đó, các đoạn khởi đầu đối với metallothionin, 3-phosphoglycerat kinaza (Hitzeman et al., J Biol Chem 255:2073 (1980)) hoặc các enzym thủy phân đường khác (Holland et al., Biochem 17:4900 (1978)) như enolaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglycerat mutaza, pyruvat kinaza, triosephosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza và glucokinaza. Các vector và đoạn khởi đầu thích hợp để sử dụng để biểu hiện kháng thể trong nấm men còn được đề cập trong Fleer et al., Gene 107:285 (1991). Các đoạn khởi đầu và vector thích hợp đối với nấm men và phương pháp biến nạp nấm men đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp biểu hiện nấm men

đã được biết rõ. Một phương pháp đã được mô tả bởi Hinnen et al., Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978), chọn lọc các thể biến nạp Trp^+ trong môi trường chọn lọc.

Có thể sử dụng một môi trường nuôi cấy tế bào có nhân thật bất kỳ, hoặc của động vật có xương sống hoặc không có xương sống. Ví dụ về các tế bào không có xương sống gồm có các tế bào thực vật và côn trùng (Luckow et al., Bio/Technology 6:47 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, pp. 277-9, Plenum Publishing (1986); và Maeda et al., Nature 315:592 (1985)). Chẳng hạn, hệ thống Baculovirus có thể được sử dụng để sản xuất protein khác dạng. Trong một hệ thống tế bào côn trùng, virus polyhedrosis trong nhân *Autographa californica* (AcNPV) có thể được sử dụng là một vectơ để biểu hiện các gen ngoại lai. Virus sinh trưởng trong tế bào *Spodoptera frugiperda*. Trình tự mã hoá kháng thể có thể được nhân dòng dưới sự kiểm soát của đoạn khởi đầu AcNPV (chẳng hạn đoạn khởi đầu polyhedrin). Các vật chủ khác đã được xác định gồm có *Aedes*, *Drosophila melanogaster* và *Bombyx mori*. Một loạt các chủng virus để biến nạp đã được công bố, chẳng hạn, biến thể L-1 của AcNPV và chủng Bm-5 của *Bombyx mori* NPV. Hơn nữa, môi trường nuôi cấy tế bào thực vật của bông, ngô, khoai tây, đậu nành, yên dã thảo, cà chua, và thuốc lá cũng có thể được sử dụng là vật chủ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các tế bào của động vật có xương sống và việc nuôi cấy các tế bào động vật có xương sống trong môi trường (nuôi cấy mô) có thể được thực hiện theo phương pháp truyền thống, mặc dù các dòng tế bào khó nuôi cấy đã có đòi hỏi, chẳng hạn, một môi trường chuyên biệt với các yếu tố đơn nhất, các tế bào cho ăn và các tế bào tương tự, tham khảo Tissue Culture, Kruse et al., eds., Academic Press (1973). Ví dụ về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu dụng là thận khỉ; tế bào thận phôi người; tế bào thận chuột lang non; tế bào trứng chuột lang Trung Quốc/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)); tế bào vô sinh của chuột; tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung của người (chẳng hạn, HeLa); tế bào thận chó; tế bào phổi của người; tế bào gan của người; tế bào u vú của chuột, và các tế bào NSO.

Các tế bào chủ được biến nạp bằng vectơ để sản xuất kháng thể và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường chứa yếu tố sinh trưởng, vitamin, khoáng chất và tương tự, cũng như các chất kích thích thích hợp đối với các tế bào và vectơ được sử dụng. Các trình tự đoạn khởi đầu và trình tự tăng cường thường được sử dụng

có nguồn gốc từ virus polyoma, Adenovirus 2, virus Simian 40 (SV40) và cytomegalovirus của người (CMV). Các trình tự ADN thu được từ hệ gen của SV40 cũng có thể được sử dụng để tạo ra các yếu tố di truyền để biểu hiện trình tự gen cấu trúc trong tế bào chủ của động vật có vú, chẳng hạn, trình tự khởi đầu phiên mã, đoạn khởi đầu sớm và muộn, trình tự tăng cường, các vị trí cắt ghép và polyadenin hóa của SV40. Các đoạn khởi đầu sớm và muộn của virus là đặc biệt hữu dụng vì cả hai đều có thể thu được một cách dễ dàng từ hệ gen virus ở dạng mảnh có thể chứa điểm khởi đầu phiên mã của virus. Các vector biểu hiện có thể sử dụng trong tế bào chủ của động vật có vú đã có sẵn trên thị trường.

Môi trường nuôi cấy có bán trên thị trường như Ham's F10, môi trường cần thiết tối thiểu Minimal Essential Medium (MEM), RPMI-1640 và môi trường đại bàng biến đổi của Dulbecco Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) là thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ. Ngoài ra, môi trường bất kỳ được mô tả trong tài liệu Ham et al., *Meth Enzymol* 58:44 (1979) và Barnes et al., *Anal Biochem* 102:255 (1980), và trong US 4,767,704; 4,657,866; 4,560,655; 5,122,469; 5,712,163; hoặc 6,048,728 cũng có thể được sử dụng là môi trường nuôi cấy tế bào chủ. Môi trường bất kỳ có thể được bổ sung nếu cần bằng hormon và/hoặc các yếu tố sinh trưởng khác (như insulin, transferrin hoặc yếu tố sinh trưởng biểu bì), muối (như clorua, như natri, canxi hoặc magie clorua; và phosphat), đệm (như HEPES), nucleotit (như adenosin và thymidin), kháng sinh, các nguyên tố vi lượng (được xác định là các hợp chất vô cơ thường có nồng độ cuối cùng ở mức micromol) và glucoza hoặc một nguồn năng lượng tương đương. Các thành phần bổ sung cần thiết khác có thể được đưa vào ở nồng độ thích hợp, trong khi thiết kế. Điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, pH và các điều kiện tương tự, như đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này thích hợp đối với tế bào và tạo điều kiện cho quá trình biểu hiện gen chuyển mong muốn.

Polynucleotit được đề cập ở đây có thể thu được, và trình tự nucleotit của polynucleotit có thể được xác định bằng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, nếu trình tự nucleotit của kháng thể đã biết, polynucleotit mã hoá kháng thể có thể thu được từ các oligonucleotit được tổng hợp hóa học (chẳng hạn, như được mô tả trong Kutmeier et al., *Bio/Techniques* 17:242 (1994)) và sau đó khuếch đại oligonucleotit đã được gắn, chẳng hạn, bằng PCR.

Nói cách khác, polynucleotit mã hoá kháng thể có thể được tạo ra từ axit nucleic của tế bào biểu hiện cùng một phân tử đó. Nếu một dòng chứa axit nucleic mã hoá một kháng thể cụ thể không có sẵn, nhưng trình tự của phân tử kháng thể đã biết, một axit nucleic mã hoá globulin miễn dịch có thể thu được từ một nguồn thích hợp, như ngân hàng, cũng có thể là một ngân hàng đặc hiệu với tế bào tạo kháng thể, như tế bào lai được chọn lọc để biểu hiện kháng thể theo sáng chế. Các đoạn môi thích hợp có thể được cấu hình cho việc khuếch đại PCR. Tiếp theo, axit nucleic đã khuếch đại bằng PCR có thể được tách dòng trong vectơ tách dòng có thể sao chép bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Khi trình tự nucleotit và trình tự axit amin tương ứng của kháng thể được xác định, thì trình tự nucleotit của kháng thể có thể được biến đổi để thu được các thể tương đương được đề cập ở đây bằng cách sử dụng các phương pháp biến đổi trình tự nucleotit đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, kỹ thuật ADN tái tổ hợp, gây đột biến điểm, PCR, v.v. (tham khảo chẳng hạn, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); và Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1998) để tạo ra kháng thể có các trình tự axit amin khác nhau, chẳng hạn, để tạo ra các thay thế, loại bỏ và/hoặc thêm axit amin.

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có thể được xác định để phân loại các trình tự của CDR bằng các phương pháp đã biết, chẳng hạn, bằng cách so sánh với trình tự axit amin đã biết của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác để xác định các vùng trình tự siêu biến. Bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường quy, một hoặc nhiều các vùng CDR có thể được xen vào vùng khung, chẳng hạn, vào vùng khung của người để làm cho một kháng thể không phải của người giống của người, như đã được đề cập trong sách đã dẫn. Polynucleotit được đề cập được tạo ra bằng cách tổ hợp vùng khung và một hoặc nhiều CDR mã hoá kháng thể liên kết đặc hiệu với IL-4 và/hoặc IL-13, hoặc ít nhất là vùng ED của các kháng thể này. Chẳng hạn, các phương pháp này có thể được sử dụng để tạo ra các thay thế hoặc loại bỏ axit amin một hoặc nhiều gốc cystein trong vùng siêu biến tham gia tạo liên kết disulfua nội phân tử để tạo ra phân tử kháng thể thiếu một hoặc nhiều liên kết disulfua nội phân tử.

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện IL-4 và/hoặc IL-13, và do đó có thể phát hiện các tế bào biểu hiện IL-4 và/hoặc IL-13, trong một mẫu sinh học *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể kháng IL-4 và/hoặc IL-13 theo sáng chế được sử dụng để xác định sự có mặt và nồng độ của IL-4 và/hoặc IL-13 trong một mô hoặc trong các tế bào thu được từ mô đó. Nồng độ của IL-4 và/hoặc IL-13 trong mô hoặc mẫu sinh thiết có thể được xác định, chẳng hạn, trong một thử nghiệm miễn dịch bằng kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế. Mô hoặc mẫu sinh thiết có thể được làm đông lạnh hoặc cố định. Các phương pháp tương tự hoặc các phương pháp khác có thể được sử dụng để xác định các đặc tính khác của IL-4 và/hoặc IL-13, như nồng độ của chúng, sự định khi trong tế bào, nồng độ ARN thông tin, các đột biến và các đặc tính tương tự.

Phương pháp nói trên có thể được sử dụng, chẳng hạn, để chẩn đoán ung thư ở đối tượng đã biết là bị hoặc bị nghi ngờ ung thư, trong đó nồng độ của IL-4 và/hoặc IL-13 đo được ở bệnh nhân sẽ được so sánh với nồng độ của IL-4 và/hoặc IL-13 của đối tượng tham chiếu bình thường hoặc tiêu chuẩn. Thử nghiệm được đề cập cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán viêm khớp hoặc các bệnh tự miễn khác đặc trưng bởi sự thâm nhiễm và tập trung tế bào B, cùng với sự phát triển các mô bạch huyết biệt hóa.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể đơn dòng, kháng thể được làm giống như của người và mảnh kháng thể liên kết với epitop của các loại kháng thể trên còn được đánh dấu để sử dụng trong nghiên cứu hoặc chẩn đoán. Theo một số phương án, chất đánh dấu là chất phóng xạ, chất phát huỳnh quang, chất phát màu, chất tạo ảnh hoặc ion kim loại.

Phương pháp để chẩn đoán cũng được đề cập trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với epitop của nó được sử dụng trên đối tượng bị nghi ngờ bị ung thư, viêm khớp, bệnh tự miễn hoặc các bệnh gây ra do IL-4 và/hoặc IL-13 khác, và sự phân phối chất đánh dấu trong cơ thể đối tượng được xác định hoặc theo dõi.

Kháng thể và mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng là chất tinh chế ái lực. Trong quy trình này, kháng thể được cố định trên một pha rắn, như nhựa dextran hoặc agarosa hoặc giấy lọc, sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể đã cố định được cho tiếp xúc với mẫu chứa IL-4 và/hoặc IL-13 hoặc các tế bào chứa các phân tử đó cần được tinh chế, và sau đó giá đỡ được rửa bằng một dung

môi thích hợp, dung môi này sẽ loại bỏ gần như hoàn toàn tất cả các vật liệu trong mẫu trừ IL-4 và/hoặc IL-13 hoặc tế bào cần tinh chế, nhưng vật liệu được gắn với kháng thể được cố định. Cuối cùng, giá đỡ được rửa bằng một dung môi thích hợp khác, như đệm glyxin, pH 5,0 để giải phóng IL-4 và/hoặc IL-13 hoặc tế bào ra khỏi kháng thể được đề cập.

Để sử dụng trong chẩn đoán, kháng thể được đề cập thường sẽ được đánh dấu bằng một gốc có thể phát hiện được. Rất nhiều chất đánh dấu đã có sẵn thường được phân vào các nhóm sau đây: (a) đồng vị phóng xạ, như ^{36}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H và ^{131}I (kháng thể có thể được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ sử dụng các phương pháp được mô tả trong *Current Protocols in Immunology*, vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, New York (1991), chẳng hạn, và hoạt tính phóng xạ có thể được xác định sử dụng phương pháp đếm nhấp nháy); (b) chất đánh dấu huỳnh quang, như chất tạo còng đất hiếm (chất tạo còng europi), fluorescein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dansyl, lissamin, phycoerythrin và Texas Red, các chất đánh dấu huỳnh quang có thể được liên hợp với kháng thể sử dụng kỹ thuật được đề cập trong *Current Protocols in Immunology*, sách đã dẫn, chẳng hạn, trong đó mức độ tạo huỳnh quang có thể được định lượng sử dụng huỳnh quang kế; và (c) các chất đánh dấu cơ chất enzym cũng có sẵn (US 4,275,149 đã đưa ra tổng quan về các hợp chất này), enzym thường xúc tác một biến đổi hóa học của cơ chất tạo màu có thể được xác định bằng cách kỹ thuật khác nhau, chẳng hạn, enzym có thể xúc tác sự thay đổi màu cơ chất, có thể được xác định bằng phương pháp quang trắc học, hoặc enzym có thể biến đổi mức độ phát huỳnh quang hoặc mức độ phát quang hóa học của cơ chất. Các kỹ thuật để định lượng sự thay đổi mức độ phát huỳnh quang đã được biết, chẳng hạn, sử dụng máy đo trị số phát sáng, hoặc chất đánh dấu truyền năng lượng cho chất nhận huỳnh quang. Ví dụ về các chất đánh dấu có hoạt tính enzym gồm có luciferaza (chẳng hạn, luciferaza của đom đóm và luciferaza của vi khuẩn; US 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazinedion, malat dehydrogenaza, ureaza, peroxidaza, như peroxidaza của cây rau cải (HRPO), phosphataza kiềm, β -galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, saccarit oxidaza (chẳng hạn, glucoza oxidaza, galactaza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza), oxidaza dị vòng (như uricaza và xanthin oxidaza), lactoperoxidaza, microperoxidaza và các chất tương tự. Các kỹ thuật để liên hợp enzym với kháng thể đã được mô tả trong

tài liệu O'Sullivan et al., Meth Enz, ed. Langone & Van Vunakis, Academic Press, New York, 73 (1981).

Khi các chất đánh dấu này được sử dụng, các cơ chất thích hợp là có sẵn, như: (i) đối với peroxidaza của rau cải với hydrogen peroxidaza là cơ chất, trong đó hydrogen peroxidaza sẽ oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm (chẳng hạn, orthophenylen diamin (OPD) hoặc 3,3',5,5'-tetrametyl benzidin hydroclorua (TMB)); (ii) đối với phosphataza kiềm (AP) với p-nitrophenyl phosphat là cơ chất tạo màu; và (iii) β -D-galactosidaza (β -D-Gal) với cơ chất tạo màu (chẳng hạn, p-nitrophenyl- β -D-galactosidaza) hoặc một cơ chất tạo huỳnh quang như 4-metylbelloferyl- β -D-galactosidaza.

Các tổ hợp enzym-cơ chất đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Để có hiểu biết tổng quan, tham khảo US 4,275,149 và US 4,318,980.

Đôi khi, chất đánh dấu được liên hợp gián tiếp với kháng thể. Chẳng hạn, kháng thể có thể được liên hợp với biotin và một chất chỉ thị bất kỳ nêu trên có thể được liên hợp với avidin, hoặc ngược lại. Biotin sẽ liên kết một cách chọn lọc với avidin và do đó, chất đánh dấu có thể được liên hợp với kháng thể theo cách gián tiếp như vậy. Nói cách khác, để liên hợp gián tiếp chất đánh dấu, kháng thể sẽ được liên hợp với một hapten nhỏ (chẳng hạn, digoxin) và một trong số các loại khác nhau chất đánh dấu hoặc chất chỉ thị nêu trên sẽ được liên hợp với một kháng thể kháng digoxin. Do đó, việc liên hợp gián tiếp chất đánh dấu với kháng thể hoặc mutein có thể thực hiện được sử dụng kháng thể thứ hai.

Theo một phương án khác theo sáng chế, có thể không cần đánh dấu kháng thể, và sự có mặt của kháng thể có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đã được đánh dấu liên kết với kháng thể, một dạng khác của kháng thể thứ hai.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong một phương pháp thử nghiệm bất kỳ đã biết, như các thử nghiệm liên kết cạnh tranh, thử nghiệm sandwich trực tiếp hoặc gián tiếp, và các thử nghiệm kết tủa miễn dịch. Tham khảo tài liệu Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987).

Các thử nghiệm liên kết cạnh tranh dựa trên khả năng của chất chuẩn đã được đánh dấu cạnh tranh với mẫu thử nghiệm trong quá trình liên kết với một lượng kháng thể hạn chế. Lượng kháng nguyên trong mẫu thử nghiệm sẽ tỷ lệ nghịch với lượng chất

chuẩn độ liên kết với kháng thể. Để hỗ trợ việc xác định lượng chất chuẩn độ liên kết với kháng thể, kháng thể thường được làm cho không tan được trước hoặc sau khi cạnh tranh. Kết quả là, chất chuẩn độ và mẫu thử được gắn với kháng thể có thể được phân tách một cách thuận tiện từ các chất chuẩn độ và mẫu thử không liên kết.

Các thử nghiệm sandwich bao gồm việc sử dụng hai kháng thể, mỗi kháng thể có khả năng liên kết với các phần sinh miễn dịch, quyết định kháng nguyên hoặc epitop khác nhau, của đích cần phát hiện. Trong thử nghiệm sandwich, mẫu thử cần được phân tích sẽ được liên kết bởi kháng thể thứ nhất được cố định trực tiếp hoặc gián tiếp trên một giá đỡ rắn, và sau đó kháng thể thứ hai được đánh dấu trực tiếp hoặc gián tiếp sẽ liên kết với mẫu thử đã được gắn với kháng thể thứ nhất, do vậy sẽ hình thành một phức hệ 3 thành phần không tan, tham khảo chẳng hạn, US 4,376,110. Bản thân kháng thể thứ hai có thể được đánh dấu bằng một gốc có thể phát hiện được (thử nghiệm sandwich trực tiếp) hoặc có thể được xác định bằng cách sử dụng kháng thể kháng globulin miễn dịch hoặc các thành phần thích hợp của phức hệ liên kết (kháng thể/kháng nguyên, thụ thể/phối tử, enzym/cơ chất, chẳng hạn) được đánh dấu bằng một gốc có thể phát hiện được (thử nghiệm sandwich gián tiếp). Chẳng hạn, một loại thử nghiệm sandwich là thử nghiệm ELISA, trong trường hợp này gốc có thể phát hiện được là một enzym.

Sáng chế còn đề cập đến các kit, chẳng hạn, chứa kháng thể, mảnh kháng thể, thể tương đồng, dẫn xuất của kháng thể và tương tự, như thể liên hợp được đánh dấu hoặc gây độc, và hướng dẫn sử dụng kháng thể, thể liên hợp để giết một loại tế bào cụ thể và tương tự. Hướng dẫn có thể bao gồm hướng dẫn sử dụng kháng thể, thể liên hợp và tương tự *in vitro*, *in vivo* hoặc *ex vivo*. Kháng thể có thể ở dạng lỏng hoặc rắn, thường được làm đông khô. Kit có thể chứa các hợp chất thích hợp khác, như đệm, dung dịch tái tạo và các thành phần cần thiết khác thích hợp với mục đích sử dụng. Một hỗn hợp các hợp chất được đóng gói với lượng định trước cùng với hướng dẫn sử dụng, như để sử dụng trong điều trị để thực hiện thử nghiệm chẩn đoán cũng được đề cập theo sáng chế. Khi kháng thể được đánh dấu bằng một enzym, kit có thể gồm có cơ chất và các đồng yếu tố cần thiết cho enzym (chẳng hạn, tiền cơ chất tạo ra các chất tạo màu hoặc phát sáng có thể phát hiện được). Ngoài ra, các chất phụ gia khác cũng có thể được đưa vào như chất ổn định, đệm (chẳng hạn, đệm phong bế hoặc đệm thủy phân) và các hợp chất tương tự. Lượng tương đối của các hợp chất khác nhau có thể được biến đổi để tạo

ra thể cô đặc của dung dịch chất phản ứng, điều này sẽ tạo ra sự linh hoạt cho người sử dụng, tiết kiệm không gian, tiết kiệm hợp chất và tương tự. Hợp chất có thể được cung cấp ở dạng bột khô, thường là dạng đông khô, bao gồm tá dược, trong quá trình hòa tan sẽ tạo ra dung dịch hoạt chất có nồng độ thích hợp.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị động vật có vú. Theo một phương án, kháng thể hoặc thể tương đương chức năng được đề cập được sử dụng cho động vật có vú không phải người để thu được các số liệu tiền lâm sàng, chẳng hạn. Các động vật có vú không phải người thử nghiệm sẽ được điều trị gồm có linh trưởng không phải người, chó, mèo, chuột và các động vật có vú khác trong đó các nghiên cứu tiền lâm sàng sẽ được thực hiện. Các động vật có vú này có thể đưa ra các mẫu hình động vật đối với bệnh cần điều trị bằng kháng thể, hoặc có thể được sử dụng để nghiên cứu độc tính của kháng thể được đề cập. Theo mỗi phương án trong các phương án này, các nghiên cứu tăng liều có thể được thực hiện ở động vật có vú này.

Kháng thể, có hoặc không có thành phần thứ hai, như chất điều trị được liên hợp với kháng thể, có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc cùng với (các) yếu tố gây độc tế bào, sẽ được sử dụng như một chất trị liệu. Sáng chế đề cập đến các phương pháp điều trị dựa trên kháng thể bao gồm việc dùng kháng thể theo sáng chế trên động vật, động vật có vú, hoặc người, để điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra.

Thuật ngữ "điều trị" được sử dụng theo sáng chế chỉ điều trị chữa khỏi và điều trị dự phòng hoặc điều trị ngăn ngừa. Thuật ngữ này chỉ việc ngăn ngừa, điều trị chữa khỏi, đảo nghịch, giảm nhẹ, giảm thiểu, ức chế hoặc làm chậm lại tác dụng có hại của tình trạng bệnh, quá trình tiến triển của bệnh, yếu tố gây bệnh (chẳng hạn, vi khuẩn hoặc virus) hoặc các tình trạng bất thường khác.

Do đó, sáng chế còn đề cập đến kháng thể đa trị, bao gồm kháng thể kháng IL-4/IL-13 đặc hiệu kép, được liên kết với phân tử, nguyên tử hoặc các hợp chất khác có chức năng hiệu ứng trong chẩn đoán hoặc điều trị. Chẳng hạn, kháng thể có thể có nhãn chẩn đoán có hoạt tính phóng xạ hoặc nguyên tử gây độc tế bào có hoạt tính phóng xạ hoặc gốc kim loại hoặc gốc gây độc tế bào, chẳng hạn chuỗi rixin, được gắn với kháng thể để chẩn đoán hoặc điều trị ung thư *in vivo*.

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch, trong các phương pháp tinh chế và các phương pháp khác trong đó globulin miễn dịch hoặc mảnh kháng thể của nó được sử dụng. Những ứng dụng này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Do đó, sáng chế còn đề cập đến các chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh kháng thể kháng IL-13 và/hoặc IL-4, trong một hỗn hợp với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được sử dụng có thể dễ dàng thu được trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ "dược phẩm" được sử dụng theo sáng chế chỉ chế phẩm với nhiều dạng bào chế khác nhau. Chế phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị kháng thể đa trị là dung dịch vô trùng, hỗn dịch lỏng hoặc dạng đông khô và tùy ý chứa chất ổn định hóa hoặc tá dược.

Thuật ngữ "rối loạn" được sử dụng theo sáng chế chỉ tình trạng bất kỳ sẽ được cải thiện nhờ quá trình điều trị bằng kháng thể theo sáng chế. Những rối loạn này gồm có rối loạn hoặc bệnh mạn tính hoặc cấp tính bao gồm các tình trạng bệnh làm động vật có vú, và cụ thể là người bị các rối loạn chưa biết. Các ví dụ không hạn chế về rối loạn có thể được điều trị ở đây gồm có ung thư, viêm, bệnh tự miễn, bệnh nhiễm trùng, bệnh tim mạch, bệnh hô hấp, bệnh thần kinh và bệnh chuyển hóa.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, ức chế hoặc ngăn ngừa bệnh, như bệnh dị ứng, bệnh do Th2 gây ra, bệnh do IL-13 gây ra, bệnh do IL-4 gây ra, và/hoặc bệnh do IL-4/IL-13 gây ra. Ví dụ về các bệnh này gồm có, bệnh Hodgkin, hen, hen dị ứng, viêm da cơ địa, dị ứng, viêm ruột loét, xơ cứng bì, viêm mũi dị ứng, phổi xơ hóa tự phát COPD3, thải ghép mạn tính, phổi xơ hóa do bleomycin, phổi xơ hóa do phóng xạ, u phổi dạng hạt, xơ cứng toàn thân điển tiến, bệnh sản màng, xơ gan, ung thư thận, u lympho Burkitt, bệnh Hodgkin, bệnh không Hodgkin, hội chứng Sezary, hen, viêm khớp nhiễm khuẩn, viêm da dạng eczema, mày đay tự phát mạn tính, viêm ruột loét, xơ cứng bì, sẹo lồi, bệnh Whipple, tăng sản tiền liệt tuyến lành tính, rối loạn phổi trong đó thụ thể IL-4 đóng vai trò gây bệnh, tình trạng trong đó quá trình phá vỡ hàng rào bảo vệ biểu bì do thụ thể IL-4 gây ra đóng vai trò, rối loạn của hệ tiêu hóa trong đó thụ thể IL-4 có vai trò, phản ứng dị ứng với thuốc, bệnh Kawasaki, bệnh hồng cầu liềm, hội chứng Churg-Strauss, bệnh Grave, chứng tiền kinh giật, hội chứng Sjogren, hội chứng tăng sinh lympho bào tự miễn, thiếu máu huyết tán tự miễn, bệnh thực quản Barrett,

viêm màng mạch nhỏ tự miễn, lao, bàng quang xơ hóa, nấm phế quản phổi do dị ứng, bệnh tắc phổi mạn tính, bệnh phổi do bleomycin gây ra và xơ hóa phổi, chứng tích protein mô phế nang phổi, hội chứng suy hô hấp người lớn, bệnh sarcoid, hội chứng IgE quá mức, hội chứng tăng ura axit mạn tính tự phát, bệnh mụn nước tự miễn, bệnh pemphigut thông thường, pemphigut có bọt, nhược cơ, hội chứng mệt mỏi kéo dài, hội chứng thận hư).

Thuật ngữ "bệnh dị ứng" chỉ tình trạng bệnh trong đó bệnh nhân miễn cảm với phản ứng dị ứng kháng lại hợp chất thường không có tính sinh miễn dịch. Bệnh dị ứng thường được đặc trưng bởi quá trình hoạt hóa các dưỡng bào bởi IgE tạo ra đáp ứng viêm (chẳng hạn, đáp ứng tại chỗ, đáp ứng toàn thân) có thể tạo ra các triệu chứng lành tính như sổ mũi, đến sốc phản vệ có thể đe dọa mạng sống và tử vong. Ví dụ về bệnh dị ứng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, viêm mũi dị ứng (chẳng hạn, cảm mạo), hen (chẳng hạn, hen dị ứng), viêm da dị ứng (chẳng hạn, eczema), viêm da tiếp xúc, dị ứng thức ăn và mề đay (phát ban).

Theo sáng chế "bệnh do Th2 gây ra" chỉ bệnh trong đó bệnh học được tạo ra (toàn bộ hoặc một phần) bởi đáp ứng miễn dịch (đáp ứng miễn dịch kiểu Th2) được điều hòa bởi tế bào lympho T CD4⁺ Th2, đặc trưng bởi việc tạo ra IL-4, IL-5, IL-9 và IL-13. Đáp ứng miễn dịch kiểu Th2 liên quan đến quá trình sản xuất một số cytokin (chẳng hạn, IL-4, IL-13) và một số lớp kháng thể nhất định (chẳng hạn, IgE), và đi kèm với miễn dịch thể dịch. Bệnh do Th2 gây ra đặc trưng bởi sự có mặt các mức độ tăng dần của cytokin Th2 (chẳng hạn, IL-4, IL-13) và/hoặc một số lớp kháng thể (chẳng hạn, IgE) và bao gồm, chẳng hạn, bệnh dị ứng (chẳng hạn, viêm mũi dị ứng, viêm da cơ địa, hen (chẳng hạn, hen dị ứng), bệnh khí quản dị ứng (AAD), sốc phản vệ, viêm kết mạc), rối loạn tự miễn liên quan đến các mức độ tăng dần của IL-4 và/hoặc IL-13 (chẳng hạn, viêm khớp dạng thấp, bệnh mô ghép kháng vật chủ, bệnh thận (chẳng hạn, hội chứng thận hư, thận hư ban đỏ)), và các bệnh nhiễm trùng liên quan đến mức độ tăng dần của IL-4 và/hoặc IL-13 (chẳng hạn, nhiễm virus, ký sinh trùng, nấm (chẳng hạn, *C. albicans*)). Một số loại ung thư liên quan đến mức độ tăng dần của IL-4 và/hoặc IL-13 hoặc liên quan đến quá trình tăng sinh tế bào ung thư gây ra do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra (chẳng hạn, u lympho tế bào B, u lympho tế bào T, đa u tủy, ung thư đầu và cổ, ung thư vú và ung thư buồng trứng). Các loại ung thư này có được điều trị, ức chế hoặc ngăn ngừa bằng cách sử dụng phối tử theo sáng chế.

Thuật ngữ "ung thư" được sử dụng theo sáng chế chỉ hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở động vật có vú, cụ thể là người, đặc trưng bởi sự sinh trưởng tế bào không kiểm soát được. Ví dụ về ung thư gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư carcinom, u lympho, u nguyên bào, u sarcoma, và bệnh bạch cầu.

Thuật ngữ "bệnh tự miễn" được sử dụng theo sáng chế chỉ bệnh hoặc rối loạn không ác tính xuất phát từ và kháng trực tiếp mô của chính cơ thể. Ví dụ về bệnh tự miễn hoặc rối loạn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đáp ứng viêm như viêm da bao gồm vảy nến và viêm da; dị ứng như eczema và hen; các tình trạng khác liên quan đến sự thâm nhiễm tế bào T và các đáp ứng viêm mạn tính; xơ vữa động mạch; đái tháo đường (chẳng hạn đái tháo đường typ I hoặc đái tháo đường phụ thuộc insulin); đa xơ cứng và rối loạn viêm hệ thần kinh trung ương (CNS).

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng dược phẩm được dùng riêng rẽ hoặc kết hợp với các hoạt chất khác. Kháng thể có thể được sử dụng trong một phép điều trị kết hợp với các phép điều trị IL-13 đã có (chẳng hạn, các hoạt chất IL-13 đã có như kháng IL-13R α 1, IL-4/13 Trap, kháng IL-13) cùng với kháng thể kháng IL-4 và các chất IL-4 đã có (chẳng hạn, kháng IL-4R, IL-4 Mutein, IL-4/13 Trap) cùng với kháng thể kháng IL-13 và kháng thể kháng IL-4 (chẳng hạn, WO05/0076990 (CAT), WO03/092610 (Regeneron), WO00/64944 (Genetic Inst.) và WO2005/062967 (Tanox)).

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng và/hoặc bào chế cùng với một hoặc nhiều các hoạt chất bổ trợ. Khi phối tử được sử dụng cùng với chất điều trị bổ trợ, phối tử có thể được dùng trước, đồng thời với hoặc sau khi sử dụng hoạt chất bổ trợ. Thông thường, phối tử và chất bổ trợ được dùng theo cách tạo ra tác dụng trị liệu gộp đầu. Các chất điều trị bổ trợ có thể được sử dụng hoặc bào chế cùng với phối tử theo sáng chế bao gồm, chẳng hạn, các hoạt chất điều trị miễn dịch khác nhau, như xylcosporin, methotrexat, adriamycin hoặc cisplatin, kháng sinh, chất kháng nấm, chất kháng virus và chất gây độc miễn dịch. Chẳng hạn, khi chất đối kháng được sử dụng ngăn ngừa, ức chế hoặc điều trị quá trình viêm phổi hoặc bệnh hô hấp (chẳng hạn, hen), hoạt chất có thể được sử dụng cùng với các chất ức chế phosphodiesterase (chẳng hạn, chất ức chế phosphodiesterase 4), chất giãn phế quản (chẳng hạn, chất chủ vận β 2, kháng cholinergic, theophyllin), chất chủ vận beta tác dụng ngắn (chẳng hạn, albuterol,

salbuimol, bambuterol, fenoter[sigma]l, isoetherin, isoproterenol, leva[iota]buterol, metaproterenol, pirbuterol, terbutalin và tornlat), chất chủ vận beta tác dụng kéo dài (chẳng hạn, formoterol và salmeterol), chất kháng cholinergic tác dụng ngắn (chẳng hạn, ipratropium bromua và oxitropium bromua), chất kháng cholinergic tác dụng kéo dài (chẳng hạn, tiotropium), theophyllin (chẳng hạn dạng bào chế tác dụng ngắn, dạng bào chế tác dụng kéo dài), steroid xông hít (chẳng hạn, beclomethason, beclometason, budesonit, flunisolit, fluticason propionat và triamxinolon), steroid dùng đường uống (chẳng hạn, methylprednisolon, prednisolon, prednisolon và prednison), chất chủ vận beta tác dụng ngắn kết hợp với chất kháng cholinergic (chẳng hạn, albuterol/salbutamol/ipratropium, và fenoterol/ipratropium), chất chủ vận beta tác dụng kéo dài kết hợp với steroid dùng đường xông hít (chẳng hạn, salmeterol/fluticason, và formolerol/budesonit) và các hoạt chất tiêu niêm mạc (chẳng hạn, erdostein, axetylxystein, bromheksin, carbocyslein, guaifencsin và glyxerol được iot hóa).

Các hoạt chất đồng điều trị thích hợp khác có thể được sử dụng cùng với kháng thể theo sáng chế để ngăn ngừa, ức chế hoặc điều trị hen (chẳng hạn, hen dị ứng), gồm có corticosteroid (chẳng hạn, beclomethason, budesonit, fluticason), cromoglycat, nedocromil, chất chủ vận beta (chẳng hạn, salbutamol, terbutalin, bambuterol, fenoterol, reproterol, tolubuterol, salmeterol, fomtero), zafirlukast, salmeterol, prednison, prednisolon, theophyllin, zileutron, montelukast, và chất điều biến leukotrien. Phối tử theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với một loạt các chất đồng điều trị thích hợp để điều trị bệnh (chẳng hạn, bệnh do Th-2 gây ra, bệnh do YL-A gây ra, bệnh do IL-13 gây ra, bệnh do IL-4 gây ra và ung thư), bao gồm xytokin, thuốc giảm đau/hạ sốt, thuốc chống nôn, và chất hóa trị liệu.

Kháng thể theo sáng chế có thể được đưa vào các dạng dược phẩm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được mô tả ở đây. Thuật ngữ "dược dụng," và các thuật ngữ tương tự chỉ dược phẩm đã được chứng nhận bởi một cơ quan có thẩm quyền của chính phủ liên bang hoặc chính phủ bang hoặc được nêu trong dược điển Hoa Kỳ hoặc các dược điển đã được công nhận khác để sử dụng trên động vật và cụ thể hơn là ở người.

Kháng thể kháng IL-4, kháng IL-13 và kháng thể đặc hiệu kép kháng IL-4/IL-13 có thể được sử dụng trên động vật có vú và cụ thể là người, theo cách đã được biết.

Phương pháp sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngoài đường tiêu hóa, dưới da, dùng vào màng bụng, dùng vào phổi, trong mũi, ngoài màng cứng, dùng đường xông hít và dùng qua đường miệng, và nếu cần điều trị ức chế miễn dịch, có thể dùng trực tiếp vào vết thương. Tiêm truyền ngoài đường tiêu hóa gồm có tiếp bắp, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm động mạch hoặc phúc mạc. Kháng thể hoặc dược phẩm chứa kháng thể có thể được sử dụng theo đường dùng bất kỳ, chẳng hạn, bằng cách truyền dịch hoặc tiêm, bằng cách hấp thu qua miếng dán biểu bì hoặc niêm mạc da (chẳng hạn, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, v.v) và có thể được sử dụng cùng với các hoạt chất sinh học khác. Việc sử dụng có thể là sử dụng toàn thân hoặc tại chỗ. Ngoài ra, có thể đưa kháng thể điều trị hoặc dược phẩm theo sáng chế vào hệ thần kinh trung ương theo một đường dùng thích hợp, bao gồm tiêm vào não thất và tiêm vào vỏ não; tiêm vào não thất có thể được hỗ trợ bằng một ống xông não thất, chẳng hạn, được nối vào khoang, như khoang Ommaya. Ngoài ra, kháng thể được sử dụng một cách thích hợp bằng phương pháp truyền vào mạch, đặc biệt là với liều kháng thể giảm dần. Tốt hơn là, dùng dược phẩm theo đường tiêm, tốt hơn nữa là tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, phụ thuộc một phần vào việc sử dụng ngắn hay kéo dài.

Các hệ thống phân phối thuốc khác nhau đã được biết và có thể được sử dụng để dùng kháng thể theo sáng chế, bao gồm, chẳng hạn, nang hóa trong liposom, vi tiểu phân, vi nang (tham khảo Langer, *Science* 249:1527 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*, Lopez-Berestein et al., eds., p. 353-365 (1989); và Lopez-Berestein, *ibid.*, p. 317-327) và các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện hợp chất; quá trình nhập bào qua trung gian thụ thể (tham khảo chẳng hạn, Wu et al., *J Biol Chem* 262:4429 (1987)); cấu trúc axit nucleic như một phần của vector retrovirus hoặc các vector khác v.v.

Hoạt chất cũng có thể được bao gói vào vi nang, chẳng hạn, bằng các kỹ thuật tạo giọt tụ hoặc bằng phương pháp polyme hóa mặt tiếp xúc, chẳng hạn, hydroxymethylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(methylmetaxylat), trong các hệ phân phối thuốc thể keo (chẳng hạn, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, tiểu phân nano và nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật này đã được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osal, Ed. (1980).

Đường dùng qua phổi cũng có thể được sử dụng, chẳng hạn, bằng cách sử dụng máy xông hít hoặc máy khí dung, và chế phẩm chứa chất tạo sol khí. Kháng thể cũng có thể được dùng vào phổi của biến nạp ở dạng dược phẩm đông khô, tham khảo chẳng hạn, US 6,514,496.

Theo một phương án cụ thể, có thể sử dụng kháng thể điều trị hoặc dược phẩm theo sáng chế tại chỗ vào vùng cần điều trị; điều này có thể thực hiện được bằng cách, chẳng hạn, và không chỉ giới hạn ở, truyền tại chỗ, bôi ngoài da, tiêm, dùng ống xông, dùng thuốc đạn hoặc miếng cấy, miếng cấy này có thể được làm từ vật liệu có lỗ, không có lỗ hoặc gelatin, bao gồm màng, như màng nhựa silicone hoặc sợi. Tốt hơn là, khi dùng kháng thể theo sáng chế, cần thận trọng khi sử dụng các vật liệu không hấp phụ hoặc hấp phụ protein.

Theo các phương án khác, kháng thể có thể được phân phối vào hệ giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, có thể sử dụng bơm (tham khảo Langer, *Science* 249:1527 (1990); Sefton, *CRC Crit Ref Biomed Eng* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); và Saudek et al., *N Engl J Med* 321:574 (1989)). Theo một phương án khác, có thể sử dụng các vật liệu polyme (tham khảo *Medical Applications of Controlled Release*, Langer et al., eds., CRC Press (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., *J Macromol Sci Rev Macromol Chem* 23:61 (1983); tham khảo thêm Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann Neurol* 25:351 (1989); và Howard et al., *J Neurosurg* 71:105 (1989)). Theo một phương án khác, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt gần đích điều trị.

Dạng bào chế điều trị của polypeptit hoặc kháng thể có thể được bào chế để bảo quản ở dạng chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước bằng cách trộn polypeptit có độ tinh khiết mong muốn với các chất mang "dược dụng" tùy ý, chất pha loãng, tá dược hoặc chất ổn định hóa thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, nghĩa là, chất đệm, chất ổn định, chất bảo quản, chất đẳng trương, chất tẩy không ion, chất chống oxi hóa và các chất pha tạp, tham khảo *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed., Osol, ed. (1980). Các chất bổ trợ thường là các chất không độc với người sử dụng ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, do đó, tá dược, chất pha loãng, chất mang và các chất tương tự đều là các chất dược dụng.

Kháng thể "được phân lập" hoặc "được tinh chế" là kháng thể gần như không có các vật liệu tế bào hoặc các protein tạp khác từ tế bào hoặc mô hoặc môi trường nuôi cấy, hoặc gần như không có các tiền chất hóa học hoặc các chất hóa học khác khi được tổng hợp hóa học. Thuật ngữ "gần như không có các vật liệu tế bào" gồm có các chế phẩm kháng thể trong đó polypeptit/protein được phân tách từ các thành phần tế bào của tế bào từ đó có thể phân lập hoặc tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp protein này. Do đó, kháng thể gần như không có các vật liệu tế bào là các chế phẩm kháng thể có ít hơn khoảng 30%, 20%, 10%, 5%, 2,5% hoặc 1%, (theo trọng lượng khô) protein tạp. Khi kháng thể được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp, tốt hơn là protein gần như không lẫn môi trường nuôi cấy, nghĩa là, môi trường nuôi cấy chiếm tỷ lệ ít hơn khoảng 20%, 10%, 5%, 2,5% hoặc 1% thể tích của chế phẩm protein. Khi kháng thể được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học, tốt hơn là chế phẩm protein gần như không lẫn các tiền chất hóa học hoặc các chất hóa học và hợp chất khác, nghĩa là, kháng thể được đề cập được tách ra từ các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất khác tham gia vào quá trình tổng hợp protein. Do đó, các chế phẩm kháng thể này sẽ chứa ít hơn khoảng 30%, 20%, 10%, 5% hoặc 1% (theo trọng lượng khô) các tiền chất hóa học hoặc hợp chất không phải kháng thể được đề cập. Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, kháng thể sẽ được phân lập hoặc được tinh chế.

Theo sáng chế, thuật ngữ "từ mức độ kết tụ thấp đến mức độ kết tụ không thể phát hiện được" chỉ các mẫu chứa không quá 5%, không quá 4%, không quá 3%, không quá 2%, không quá 1% và thường không quá 0,5% kết tụ, theo trọng lượng protein, được xác định bằng, chẳng hạn, sắc ký phân loại kích thước hiệu năng cao (HPSEC).

Theo sáng chế, thuật ngữ "từ mức độ phân đoạn thấp đến mức độ phân đoạn không thể phát hiện được" chỉ các mẫu chứa lượng bằng hoặc không quá 80%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 99%, tổng lượng protein, chẳng hạn, trong một đỉnh đơn, được xác định bằng HPSEC, hoặc trong hai đỉnh (chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) được xác định bằng, chẳng hạn, điện di mao dẫn khử trên gel (rCGE) và không đỉnh đơn nào khác có hơn 5%, hơn 4%, hơn 3%, hơn 2%, hơn 1% hoặc hơn 0,5% tổng số protein, mỗi đỉnh. Phương pháp rCGE theo sáng chế chỉ điện di mao dẫn trên gel ở điều kiện khử đủ để khử liên kết disulfua trong kháng thể hoặc phân tử giống kháng thể.

Theo sáng chế, thuật ngữ "độ ổn định" và "ổn định" trong ngữ cảnh chế phẩm lỏng chứa kháng thể IL-4 và/hoặc IL-13 hoặc mảnh liên kết của nó chỉ mức độ kháng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên trong chế phẩm kháng với sự duỗi xoắn do nhiệt hoặc hóa học, quá trình kết tụ, quá trình thoái hóa hoặc phân đoạn ở điều kiện sản xuất, bảo chế, vận chuyển và bảo quản nhất định. Các chế phẩm "ổn định" theo sáng chế sẽ giữ được hoạt tính sinh học bằng hoặc hơn 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 99,5% ở điều kiện sản xuất, bảo chế, vận chuyển và bảo quản nhất định. Độ ổn định của chế phẩm kháng thể có thể được đánh giá bằng mức độ kết tụ, thoái hóa hoặc phân đoạn bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, rCGE, điện di trên gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit(SDS-PAGE) và HPSEC, so với đối chứng.

Thuật ngữ, "chất mang," chỉ chất pha loãng, tá dược hoặc chất dẫn thuốc được sử dụng trong điều trị. Những chất mang sinh lý có thể là dịch lỏng vô trùng, như nước và dầu, bao gồm các loại dầu mỏ, mỡ động vật, dầu thực vật hoặc tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, dầu vừng và các dạng tương tự. Nước là chất mang khi được phẩm được dùng đường tiêm tĩnh mạch. Dung dịch muối sinh lý và dextroza và dung dịch glyxerol cũng có thể được sử dụng là chất mang lỏng, đặc biệt là đối với dung dịch tiêm. Các tá dược được dùng thích hợp gồm có tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột, phấn, silica gel, natri stearat, glyxerol monostearat, talc, natri clorua, váng sữa khô, glyxerol, propylen glycol, nước, etanol và các chất tương tự. Dược phẩm, nếu muốn, có thể chứa một lượng nhỏ các chất tạo ẩm và chất nhũ hóa, hoặc chất đệm pH. Dược phẩm có thể ở dạng dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, bột, chế phẩm giải phóng duy trì, và các dạng tương tự. Dược phẩm có thể được bao chế ở dạng thuốc đạn, với các chất liên kết và chất mang thông thường như triglyxerit. Chế phẩm dùng đường miệng cũng có thể chứa các chất mang tiêu chuẩn như mannitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri saccharin, xenluloza, magie cacbonat được dùng. Ví dụ về các chất mang thích hợp được mô tả trong "Remington's Pharmaceutical Sciences," Martin. Dược phẩm sẽ chứa lượng có hiệu quả kháng thể, tốt hơn là ở dạng được tinh chế, cùng với một lượng thích hợp chất mang để tạo ra dạng sử dụng thích hợp với người sử dụng. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, dạng bào chế sẽ được thiết kế để phù hợp với kiểu sử dụng.

Chất đệm sẽ giúp duy trì pH trong khoảng tương đương với điều kiện sinh lý. Đệm tốt hơn là có nồng độ từ khoảng 2mM đến khoảng 50mM. Chất đệm thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm cả các axit hữu cơ và vô cơ, và muối của nó, như đệm xitrat (chẳng hạn, hỗn hợp mononatri xitrat-dinatri xitrat, hỗn hợp axit xitric-trinatri xitrat, hỗn hợp axit xitric-mononatri xitrat, v.v), đệm succinat (chẳng hạn, hỗn hợp axit succinic-mononatri succinat, axit succinic-natri hydroxit, axit succinic-dinatri succinat, v.v), đệm tartrat (chẳng hạn, hỗn hợp axit tartaric-natri tartrat, axit tartaric-kali tartrat, axit tartaric-natri hydroxit, v.v), đệm fumarat (chẳng hạn, hỗn hợp axit fumaric-mononatri fumarat, axit fumaric-dinatri fumarat, mononatri fumarat-dinatri fumarat, v.v), đệm gluconat (chẳng hạn, hỗn hợp axit gluconic-natri gluconat, hỗn hợp axit gluconic-natri hydroxit, hỗn hợp axit gluconic-kali gluconat, v.v), đệm oxalat (chẳng hạn, hỗn hợp axit oxalic-natri oxalat, hỗn hợp axit oxalic-natri hydroxit, hỗn hợp axit oxalic-kali oxalat v.v), đệm lactat (chẳng hạn, hỗn hợp axit lactic-natri lactat, hỗn hợp axit lactic-natri hydroxit, hỗn hợp axit lactic-kali lactat v.v) và đệm axetat (chẳng hạn, hỗn hợp axit axetic-natri axetat, hỗn hợp axit axetic-natri hydroxit v.v). Đệm phosphat, đệm cacbonat, đệm histidin, muối trimetylamin như Tris, HEPES và các dung dịch đệm đã biết khác có thể được sử dụng.

Chất bảo quản có thể được thêm vào để làm chậm sự sinh trưởng của vi khuẩn, và có thể được thêm vào với lượng từ 0,2% đến 1% (trọng lượng/thể tích). Các chất bảo quản thích hợp để sử dụng theo sáng chế gồm có phenol, benzyl ancol, m-cresol, metyl paraben, propyl paraben, octadecyldimethylbenzyl amoni clorua, benzyamoni halua (chẳng hạn, clorua, bromua và iodua), hexameton clorua, alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben, catechol, resorcinol, xyclohexanol và 3-pentanol.

Chất đẳng trương có trong dược phẩm để đảm bảo mức độ đẳng trương sinh lý của dược phẩm lỏng theo sáng chế và gồm có các ancol đường polyhydric, tốt hơn là trihydric hoặc ancol đường cao hơn, như glyxerin, erythritol, arabitol, xylitol, sorbitol và mannitol. Các rượu polyhydric có thể có hàm lượng từ 0,1% đến khoảng 25%, theo trọng lượng, tốt hơn là 1% đến 5% tính theo lượng tương đối so với các thành phần khác.

Chất ổn định hóa chỉ một nhóm tá dược lớn có thể có chức năng thay đổi từ chức năng tạo khối đến chất hỗ trợ có chức năng hòa tan hoạt chất điều trị hoặc giúp ngăn

ngừa biến tính hoặc dính hoạt chất vào thành lọ chứa. Các chất ổn định hóa điển hình có thể là rượu đa chức; axit amin, như arginin, lyzin, glyxin, glutamin, asparagin, histidin, alanin, ornitin, L-loxin, 2-phenylalanin, axit glutamic, threonin v.v, hoặc các ancol đường hoặc đường hữu cơ, như lactoza, trehaloza, stachyoza, arabitol, erythritol, manitol, sorbitol, xylitol, ribitol, myoinisitol, galactitol, glyxerol và các chất tương tự, bao gồm xyclitol như inositol; polyetylen glycol; polyme axit amin; các chất khử chứa lưu huỳnh, như ure, glutathion, axit thioctic, natri thioglycolat, thioglyxerol, α -monothioglyxerol và natri thiosulfat; các polypeptit có trọng lượng phân tử thấp (nghĩa là, <10 gốc); protein, như albumin huyết thanh của người, albumin huyết thanh bò, gelatin hoặc globulin miễn dịch; các polyme ưa nước, như polyvinylpyrrolidon, saccarit, monosaccarit, như xyloza, mannoza, fructoza, glucoza; disaccarit, như lactoza, maltoza và sucroza; trisaccarit như raffinosa; polysaccarit như dextran và các hợp chất tương tự. Chất ổn định hóa có hàm lượng từ 0,1 đến 10000 theo trọng lượng/phần protein hoạt tính.

Các tá dược pha tạp gồm có chất tạo khối, (chẳng hạn, tinh bột), chất tạo cang (chẳng hạn, EDTA), chất chống oxi hóa (chẳng hạn, axit ascorbic, metionin hoặc vitamin E) và các đồng dung môi.

Dạng bào chế theo sáng chế cũng có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất cần thiết cho một chỉ định cụ thể, tốt hơn là các chất có hoạt tính bổ trợ và không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Chẳng hạn, có thể đưa vào thêm chất ức chế miễn dịch thích hợp. Các phân tử này sẽ có hàm lượng thích hợp trong hỗn hợp để có thể tạo ra tác dụng có hiệu quả đối với mục đích sử dụng.

Theo sáng chế, thuật ngữ "chất hoạt động bề mặt" chỉ các hợp chất hữu cơ có cấu trúc lưỡng cực, cụ thể là, được tạo bởi các nhóm có tính tan đối nghịch nhau, thường là một chuỗi hydrocarbon tan trong dầu và một nhóm có tính ion tan trong nước. Chất hoạt động bề mặt có thể được phân loại, dựa vào điện tích của gốc hoạt động bề mặt, thành chất hoạt động bề mặt anion, cation và không ion. Chất hoạt động bề mặt thường được sử dụng là các chất tạo ẩm, nhũ hóa, chất hòa tan và chất phân tán đối với các loại dược phẩm và chế phẩm nguyên liệu sinh học khác nhau.

Các chất hoạt động bề mặt không ion hoặc chất tẩy (còn được gọi là "chất tạo ẩm") có thể được thêm vào để giúp hòa tan hoạt chất, cũng như bảo vệ hoạt chất khỏi sự

kết tụ do quá trình lắng, điều này cũng cho phép được phẩm được bộc lộ với các áp lực kéo bề mặt mà không làm biến tính protein. Các chất hoạt động bề mặt không ion thích hợp gồm có polysorbat (20, 80 v.v), polyoxamer (184, 188 v.v), Pluronic® polyol và polyoxyetylen sorbitan monoete (TWEEN-20®, TWEEN-80® v.v). Các chất hoạt động bề mặt không ion có thể có trong chế phẩm ở nồng độ khoảng 0,05mg/ml đến khoảng 1,0mg/ml, tốt hơn là khoảng 0,07mg/ml đến khoảng 0,2mg/ml.

Theo sáng chế, thuật ngữ, "muối vô cơ," chỉ hợp chất bất kỳ không chứa cacbon do sự thay thế một phần hoặc tất cả nguyên tử hydro hoặc một gốc axit bằng kim loại hoặc nhóm hoạt động như kim loại, và thường được sử dụng là chất điều chỉnh trương lực trong dược phẩm và các chế phẩm nguyên liệu sinh học. Các muối vô cơ thường gặp nhất là NaCl, KCl, NaH₂PO₄ v.v

Sáng chế đề cập đến các dược phẩm lỏng có độ ổn định ở các nhiệt độ trong tủ lạnh hoặc tủ bảo quản có bán trên thị trường, như từ khoảng -20°C đến khoảng 5°C, độ ổn định này được đánh giá bằng, chẳng hạn, sắc ký phân loại kích thước hiệu năng cao (HPSEC), để bảo quản, như trong khoảng 60 ngày, trong khoảng 120 ngày, trong khoảng 180 ngày, trong khoảng 1 năm, trong khoảng 2 năm hoặc nhiều hơn. Dược phẩm lỏng theo sáng chế còn có độ ổn định như được đánh giá chẳng hạn bằng HSPEC, ở nhiệt độ phòng, trong ít nhất một vài giờ, như 1 giờ, hai giờ hoặc khoảng 3 giờ trước khi sử dụng.

Thuật ngữ "phân tử nhỏ" và các thuật ngữ tương tự gồm các chất, nhưng không chỉ giới hạn ở, peptit, các phân tử giả peptit, axit amin, đồng phân axit amin, polynucleotit, đồng phân polynucleotit, nucleotit, đồng phân nucleotit, các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ (nghĩa là, bao gồm các hợp chất dị hữu cơ và/hoặc hợp chất hữu cơ – kim loại) có trọng lượng phân tử ít hơn khoảng 10000g/mol, các hợp chất vô cơ hoặc hữu cơ có trọng lượng phân tử ít hơn khoảng 5000g/mol, các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ có trọng lượng phân tử ít hơn khoảng 1000g/mol, các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ có trọng lượng phân tử ít hơn khoảng 500g/mol, và muối, este, và các dạng dược dụng khác của những hợp chất này.

Do đó, trong trường hợp ung thư, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc cùng với các loại chất điều trị ung thư khác, bao gồm các chất hóa trị liệu thông thường (paclitaxel, carboplatin, cisplatin và doxorubicin), chất chống EGFR

(gefitinib, erlotinib và cetuximab), chất chống tân tạo mạch (bevacizumab và sunitinib), cũng như các chất điều biến miễn dịch, như interferon- α và thalidomit.

Theo sáng chế, thuật ngữ "hoạt chất điều trị" và "các hoạt chất điều trị" chỉ (các) hợp chất bất kỳ có thể được sử dụng trong quá trình điều trị, kiểm soát hoặc giảm nhẹ bệnh, rối loạn và các tình trạng tương tự liên quan đến rối loạn quá trình chuyển hoá và hoạt tính của IL-4 và/hoặc IL-13.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với các phân tử hiệu ứng khác như các polypeptit, dược chất, nucleotit phóng xạ hoặc chất độc, tham khảo, chẳng hạn, WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; US 5,314,995; và EP 396,387. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được liên hợp với một gốc điều trị như chất gây độc tế bào (chẳng hạn, chất kìm tế bào hoặc chất gây chết tế bào), chất điều trị hoặc ion kim loại có hoạt tính phóng xạ (chẳng hạn, chất phát sáng α 213Bi). Chất gây độc tế bào là một hoạt chất bất kỳ có hại đối với tế bào. Ví dụ như paclitaxol, cytochalasin B, gramixidin D, ethidium bromua, emetin, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristin, vinblastin, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracindion, mitoxantron, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosteron, glucocorticoid, procain, tetracain, lidocain, propranolol và puromycin và các đồng phân của chúng. Các hoạt chất điều trị gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất chống chuyển hóa (chẳng hạn, methotrexat, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, xytarabin, 5-flouracil và decarbazin), chất alkyl hóa (chẳng hạn, mecloetamin, chlorambucil, melphalan, carmustin (BSNU) và lomustin (CCNU), cyclophosphamid, busulfan, dibrommannitol, streptozotocin, mitomycin C, và cis-diclodiamin platinum (II) (DDP) cisplatin), thuốc chống u bướu (chẳng hạn, daunorubicin, daunomycin và doxorubicin), kháng sinh (chẳng hạn, dactinomycin, actinomycin, bleomycin, mithramycin và anthramycin (AMC)), và chất chống phân bào (chẳng hạn, vincristin và vinblastin).

Các kỹ thuật liên hợp gốc điều trị với kháng thể đã được biết rõ, tham khảo, chẳng hạn, Arnon et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., in *Controlled Drug Delivery*, 2nd ed., Robinson et al., eds., p. 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, in *Kháng thể đơn dòng '84: Biological và Clinical Applications*, Pinchera et al., eds., p. 475-506 (1985); *Clone Antibody For Cancer Detection và Therapy*, Baldwin et al., eds., p. 303-16, Academic

Press (1985); và Thorpe, et al., Immunol Rev 62:119 (1982). Nói cách khác, kháng thể có thể được liên hợp với một kháng thể thứ hai để tạo ra thể dị liên hợp kháng thể, như kháng thể hai chức năng, tham khảo, chẳng hạn, US 4,676,980.

Các thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng để biến đổi một đáp ứng sinh học xác định, hoạt chất điều trị hoặc dược chất không nên hiểu là chỉ hạn chế ở các hoạt chất điều trị hóa học cổ điển. Chẳng hạn, dược chất có thể là protein hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học mong muốn. Các protein này có thể bao gồm, chẳng hạn, độc tố như abrin, rixin A, ngoại độc tố của pseudomonas, hoặc độc tố diphtheria; protein như yếu tố hoại tử ung thư, α -interferon, β -interferon, yếu tố sinh trưởng thần kinh, yếu tố sinh trưởng thu được từ tiểu cầu, chất hoạt hóa plasminogen mô, chất gây chết theo chương trình, chẳng hạn, TNF- α , TNF- β , AIM I (WO 97/33899), AIM II (WO 97/34911), phối tử Fas (Takahashi et al., Int Immunol, 6:1567 (1994)), VEGF (WO 99/23105); chất gây khuyết khối; chất chống tân tạo mạch, chẳng hạn, angiostatin hoặc endostatin; hoặc chất điều biến đáp ứng sinh học như, chẳng hạn, lymphokin, interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), yếu tố kích thích đám tế bào đại thực bào bạch cầu hạt (GM-CSF), yếu tố kích thích tạo đám tế bào bạch cầu hạt (GCSF) hoặc các yếu tố sinh trưởng khác.

Dược phẩm được sử dụng *in vivo* cần phải vô trùng. Điều này có thể thực hiện được, chẳng hạn, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Chẳng hạn, dược phẩm lỏng theo sáng chế có thể được vô trùng bằng cách lọc sử dụng màng lọc 0,2 μ m hoặc 0,22 μ m.

Các dạng bào chế giải phóng duy trì có thể được bào chế. Ví dụ về dạng bào chế giải phóng duy trì gồm có chất nền bán thấm của các polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, các chất nền ở dạng định hình. Ví dụ về dạng chất nền giải phóng duy trì gồm có polyeste, hydrogel (chẳng hạn, poly(2-hydroxyethylmethacrylat), poly(vinylancol)), polylactit (US 3,773,919), copolyme của L-axit glutamic và etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không phân hủy, copolyme axit lactic-axit glycolic có thể phân hủy được (như dạng vi cầu có thể tiêm được tạo bởi copolyme axit lactic-axit glycolic) và poly-D-(-)-3-hydroxybutyric. Khi polyme như etylen-vinyl axetat và axit lactic-axit glycolic có thể duy trì quá trình giải phóng trong 100 ngày, một số dạng hydrogel giải phóng protein trong thời gian ngắn hơn. Có thể sử dụng các phương pháp

hợp lý để ổn định chế phẩm phụ thuộc vào cơ chế liên quan. Chẳng hạn, nếu cơ chế kết tụ có liên quan đến quá trình hình thành liên kết S-S nội phân tử qua sự trao đổi thio-disulfua, có thể ổn định hóa chế phẩm bằng cách biến đổi các gốc sulfhydryl, đông khô từ dung dịch axit, kiểm soát lượng ẩm, sử dụng các chất phụ gia thích hợp, thay thế axit amin và tạo ra các chế phẩm chất nền polyme đặc hiệu.

Chế phẩm kháng thể hoặc biến thể sẽ được bào chế, phân liều và sử dụng theo cách phù hợp với mục đích sử dụng. Các yếu tố cần xem xét trong ứng dụng này gồm có rối loạn cụ thể cần điều trị, động vật có vú hoặc người cụ thể được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân cụ thể, nguyên nhân của rối loạn, vị trí dùng thuốc, phương pháp sử dụng, thời gian sử dụng, và các yếu tố khác đã được biết đối với các chuyên gia y tế. Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" của kháng thể hoặc biến thể cần được sử dụng sẽ được điều chỉnh sau khi xem xét tất cả các yếu tố trên, và có thể là lượng tối thiểu cần để ngăn ngừa, giảm nhẹ hoặc điều trị bệnh, tình trạng hoặc rối loạn do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra.

Kháng thể hoặc biến thể tùy ý được bào chế cùng với một hoặc nhiều hoạt chất hiện được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn. Lượng có hiệu quả điều trị của những hợp chất khác này phụ thuộc vào lượng kháng thể có trong chế phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị và các yếu tố khác nêu trên. Những hoạt chất này thường được sử dụng với liều lượng giống nhau với đường dùng tương tự như được sử dụng trước đây hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng đã được sử dụng trước đây.

Theo sáng chế, thuật ngữ "lượng có hiệu quả" chỉ lượng của hoạt chất điều trị (chẳng hạn, hoạt chất điều trị dự phòng hoặc điều trị), đủ để làm giảm được mức độ nghiêm trọng và/hoặc quá trình của bệnh do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra, giảm nhẹ một hoặc nhiều triệu chứng bệnh, ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra hoặc tạo ra sự thoái lui của bệnh, hoặc là đủ để ngăn ngừa sự phát triển, tái phát, xuất hiện, hoặc diễn tiến của bệnh do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, hoặc tăng cường hoặc cải thiện tác dụng điều trị dự phòng và/hoặc điều trị của một chất điều trị khác (chẳng hạn, chất điều trị khác) hữu dụng để điều trị bệnh do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra.

Lượng kháng thể hoặc mảnh kháng thể điều trị có hiệu quả trong sử dụng hoặc điều trị một rối loạn hoặc tình trạng cụ thể sẽ phụ thuộc vào bản chất của rối loạn hoặc

tình trạng đó, và có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Khi có thể, đường cong đáp ứng liều và dược phẩm theo sáng chế đầu tiên sẽ được thiết lập *in vitro*. Nếu có một mẫu hình động vật thích hợp, một lần nữa có thể thu được đường cong đáp ứng liều và số liệu này sẽ được sử dụng để ngoại suy liều dùng cho người. Tuy nhiên, dựa trên hiểu biết chung trong lĩnh vực kỹ thuật này, dược phẩm có hiệu quả trong việc kích thích quá trình giảm tác dụng gây viêm, chẳng hạn, có thể tạo ra nồng độ hoạt chất tại chỗ từ khoảng 5 và 20ng/ml, và, tốt hơn là, từ khoảng 10 đến 20ng/ml.

Theo một phương án được ưu tiên, dung dịch nước của polypeptit điều trị, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được sử dụng bằng cách tiêm dưới da. Mỗi liều có thể thay đổi từ khoảng 0,5mg đến khoảng 50mg/kg thể trọng, hoặc tốt hơn nữa là, từ khoảng 3mg đến khoảng 30mg/kg thể trọng. Liều lượng có thể được xác định theo kinh nghiệm đối với loại bệnh, nhóm bệnh nhân, kiểu sử dụng cụ thể và các yếu tố tương tự, các phương pháp thực hiện đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chế độ liều để dùng qua đường dưới da có thể thay đổi từ 1 lần/tuần đến hàng ngày phụ thuộc vào số lượng các yếu tố lâm sàng, bao gồm loại bệnh, mức độ nghiêm trọng của bệnh và độ nhạy cảm của đối tượng với hoạt chất điều trị.

Sáng chế đề cập đến các phương pháp bào chế được phẩm dạng lỏng chứa kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với IL-4 và/hoặc IL-13, phương pháp này bao gồm việc cô đặc phân đoạn của kháng thể đã tinh chế đến nồng độ cuối cùng khoảng 15mg/ml, khoảng 20mg/ml, khoảng 30mg/ml, khoảng 40mg/ml, khoảng 50mg/ml, khoảng 60mg/ml, khoảng 70mg/ml, khoảng 80mg/ml, khoảng 90mg/ml, khoảng 100mg/ml, khoảng 200mg/ml, khoảng 250mg/ml, khoảng 300mg/ml hoặc cao hơn bằng cách sử dụng, chẳng hạn, màng bán thấm với giới hạn trọng lượng phân tử (mw) (chẳng hạn, 30kD giới hạn cho mảnh kháng thể F(ab')₂; và 10kD đối với mảnh kháng thể Fab).

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các dược phẩm dạng lỏng ổn định chứa các sản phẩm được đề cập có thời gian bán hủy *in vivo* được cải thiện. Do đó, kháng thể được đề cập có thời gian bán hủy trong đối tượng, tốt hơn là người, lớn hơn 3 ngày, lớn hơn 7 ngày, lớn hơn 10 ngày, lớn hơn 15 ngày, lớn hơn 25 ngày, lớn hơn 30 ngày, lớn hơn 35 ngày, lớn hơn 40 ngày, lớn hơn 45 ngày, lớn hơn 2 tháng, lớn hơn tháng, lớn hơn 4 tháng, lớn hơn 5 tháng hoặc hơn.

Để kéo dài thời gian tuần hoàn trong huyết thanh của kháng thể *in vivo*, các kỹ thuật khác nhau đã được sử dụng. Chẳng hạn, phân tử polyme trơ, như polyetylen glycol trọng lượng phân tử cao (PEG), có thể được gắn vào kháng thể có hoặc không có đoạn liên kết đa chức năng qua liên kết đặc hiệu vị trí của PEG với đầu N hoặc với đầu C của kháng thể hoặc qua nhóm ϵ amin có trong gốc lyzin. Quá trình tạo dẫn xuất với polyme thẳng hoặc phân nhánh sẽ tạo ra mức độ mất hoạt tính sinh học tối thiểu. Mức độ liên hợp có thể được kiểm soát chặt chẽ bằng SDS-PAGE và đo quang phổ khối để đảm bảo sự liên hợp chính xác của các phân tử PEG với kháng thể. PEG không phản ứng có thể được phân tách từ thể liên hợp kháng thể-PEG bằng sắc ký chọn lọc kích thước hoặc sắc ký trao đổi ion. Kháng thể được liên kết với PEG có thể được thử nghiệm hoạt tính liên kết cũng như hoạt lực *in vivo* sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, bằng các thử nghiệm miễn dịch được mô tả ở đây.

Kháng thể có thời gian bán hủy *in vivo* được gia tăng cũng có thể được tạo ra bằng cách tạo ra một hoặc nhiều biến đổi axit amin (nghĩa là, thay thế, thêm hoặc loại bỏ) trên vùng cố định IgG, hoặc mảnh liên kết với FcR (như mảnh Fc hoặc vùng Fc bản lề), tham khảo, chẳng hạn, WO 98/23289; WO 97/34631; và US 6,277,375.

Hơn nữa, kháng thể có thể được liên hợp với albumin để tạo ra kháng thể ổn định hơn *in vivo* hoặc có thời gian bán hủy *in vivo* dài hơn. Các kỹ thuật này đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, tham khảo chẳng hạn, WO 93/15199, WO 93/15200 và WO 01/77137; và EP 413622. Kháng thể cũng có thể được cải biến, chẳng hạn, bằng cách glycosyl hoá, axetyl hoá, phosphoryl hoá, amit hoá, tạo dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/phong bế đã biết, phân cắt thủy phân protein, liên kết với phối tử nội bào hoặc các protein khác và các kỹ thuật tương tự.

Theo một phương án, dược phẩm được bào chế theo các phương pháp quen thuộc ở dạng dược phẩm được làm phù hợp để dùng đường tiêm tĩnh mạch cho người. Thông thường, dược phẩm dùng đường tiêm tĩnh mạch là dung dịch trong đệm đẳng trương vô trùng. Khi cần, dược phẩm có thể chứa chất hòa tan và chất gây tê cục bộ như lidocain hoặc các chất gây tê dạng “cain” khác để làm dịu nỗi đau tại vị trí tiêm. Thông thường, các thành phần được cung cấp một cách riêng rẽ hoặc được trộn với nhau thành dạng liều đơn vị, chẳng hạn, ở dạng bột đông khô hoặc dạng cô đặc không chứa nước

trong bình chứa được hàn kín, như ống tiêm hoặc gói thuốc chỉ rõ hàm lượng của hoạt chất. Khi được phẩm được sử dụng qua đường truyền tĩnh mạch, được phẩm có thể được phân tán vào lọ truyền dịch chứa nước cất pha tiêm hoặc muối sinh lý vô trùng. Khi được phẩm được dùng qua đường tiêm, lọ thuốc tiêm chứa nước cất pha tiêm vô trùng hoặc muối sinh lý có thể được cung cấp, chẳng hạn, trong một kit, để các thành phần có thể được trộn với nhau trước khi sử dụng.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm dạng lỏng được bao gói trong lọ chứa được hàn kín như lọ thuốc tiêm hoặc gói thuốc chỉ rõ hàm lượng của sản phẩm theo sáng chế. Được phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể được chứa trong lọ chứa đã hàn kín chỉ rõ hàm lượng và nồng độ của kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Được phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể được cho vào lọ chứa đã hàn kín với ít nhất 15mg/ml, 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml, 50mg/ml, 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml, 200mg/ml, 250mg/ml, hoặc 300mg/ml kháng thể kháng IL-4 và/hoặc IL-13 với 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 6ml, 7ml, 8ml, 9ml, 10ml, 15ml hoặc 20ml dung dịch, chẳng hạn.

Bao bì của nhà sản xuất là các nguyên liệu hữu ích đối với quá trình điều trị các rối loạn nêu trên cũng được đề cập theo sáng chế. Các nguyên liệu này gồm có lọ chứa và nhãn. Các loại lọ chứa thích hợp gồm có, chẳng hạn, chai, lọ, bơm tiêm và ống nghiệm. Có thể sản xuất lọ chứa từ các loại nguyên liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa. Lọ chứa giữ được phẩm có hiệu quả trong chẩn đoán, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng do IL-4 và/hoặc IL-13 gây ra và có thể có nắp vô trùng (chẳng hạn, lọ chứa có thể là túi đựng dung dịch tiêm tĩnh mạch hoặc lọ có nắp có thể chọc qua bằng kim tiêm). Nhãn trên hoặc trong lọ chứa chỉ ra thành phần được sử dụng để điều trị tình trạng liên quan. Bao bì của nhà sản xuất có thể chứa thêm một lọ chứa thứ hai chứa đệm được dụng, như dung dịch muối sinh lý được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Bao bì còn có thể gồm các vật liệu khác được yêu cầu từ khía cạnh thương mại và quan điểm của người dùng, bao gồm đệm, chất pha loãng, màng lọc, kim tiêm, bơm tiêm và tờ hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế sẽ được thử nghiệm theo một số phương án trong phần ví dụ thực hiện sáng chế sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Giải trình tự vùng Fv của kháng thể đơn dòng kháng IL-13 người của chuột dòng B-B13

Hóa chất được sử dụng trong phương pháp dưới đây là kháng thể đơn dòng kháng IL-13 của chuột dòng B-B13 mua từ Cell Sciences, Inc. (Canton, MA, USA). Cell Sciences là nhà cung cấp tại Mỹ của Diaclone (Besançon, France), công ty sản xuất kháng thể B-B13.

Trình tự axit amin của kháng thể đơn dòng kháng IL-13 của dòng B-B13 được xác định bằng cách kết hợp phương pháp đọc trình tự đầu tận cùng N theo phương pháp Edman và phân tích quang phổ khối. Kháng thể được tiến hành theo các phương pháp khác nhau dưới đây để tạo ra các polypeptit hoặc peptit mảnh kháng thể, và polypeptit được phân đoạn bằng các phương pháp khác nhau để chuẩn bị mẫu sau đó sẽ được tiến hành đọc trình tự đầu tận cùng N theo phương pháp Edman, và phân tích sắc ký lỏng-quang phổ khối/quang phổ khối (LC-MS/MS) cùng với phương pháp so sánh trình tự tương đồng trên cơ sở dữ liệu trình tự protein.

SDS-PAGE kháng thể, dạng không được xử lý hoặc đã qua xử lý với pyroglutaminopeptidaza, để tách chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, sau đó là thẩm tách vào màng polyvinyliden florua (PVDF) và đọc trình tự đầu tận cùng N theo phương pháp Edman đối với các băng.

Quá trình thủy phân protein một phần được giới hạn với các proteaza đặc hiệu của kháng thể sau SDS-Page và thẩm tách vào màng PVDF và đọc trình tự đầu tận cùng N theo phương pháp Edman của các băng.

Phân cắt hóa học một phần có giới hạn các băng kháng thể toàn phần, hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trên gel SDS-Page, sau đó là SDS-Page và thẩm tách vào màng PVDF và đọc trình tự đầu tận cùng N theo phương pháp Edman các băng.

Quá trình thủy phân protein các băng kháng thể toàn phần hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trên gel SDS-Page bằng các proteaza đặc hiệu và phân tích LC/MS/MS.

Quá trình thủy phân protein các băng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trên gel SDS-Page bằng các proteaza đặc hiệu sau đó là sắc ký phân đoạn áp lực cao đảo pha (rp-hplc), và sau đó là đọc trình tự đầu tận cùng N theo phương pháp Edman và phân tích LC/MS/MS các phân đoạn.

Quá trình thuỷ phân protein có giới hạn kháng thể bằng proteaza papain, phân đoạn bằng Fd (mảnh VH-CH1 của chuỗi nặng kháng thể) bằng SDS-Page, quá trình thuỷ phân protein bằng các proteaza đặc hiệu, sắc lý lỏng hiệu năng cao đảo pha (rp-hplc), và sau đó là đọc trình tự đầu tận cùng N theo phương pháp Edman và phân tích LC/MS/MS các phân đoạn.

Ví dụ 2: Giải trình tự vùng Fv của kháng thể đơn dòng kháng il-4 người của chuột dòng 8d4-8

Kháng thể đơn dòng kháng IL-4 của chuột dòng 8D4-8 được mua từ Biozol diagnostica Vertrieb GmbH (Eching, Germany). Biozol là nhà phân phối tại Đức của BioLegend (San Diego, CA, USA) công ty sản xuất kháng thể 8D4-8.

Trình tự axit amin kháng thể đơn dòng kháng IL-4 của chuột (dòng D4-8) được xác định bằng cách kết hợp phương pháp đọc trình tự đầu tận cùng N theo phương pháp Edman và phân tích quang phổ khối (Pham et al., 2006, Anal. Biochem. 352: 77-86; Roberts et al., 2005, Anal. Chem. 67: 3613-25). Sơ lược là, kháng thể đầu tiên được phân tách thành chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và sau đó mỗi chuỗi được phân cắt bằng các proteaza đặc hiệu trình tự hoặc hóa học. Các peptit tạo ra được phân cắt bằng sắc ký đảo pha và phân tích bằng quang phổ ion hóa/khử hấp thu laser được hỗ trợ bằng chất nền (MALDI) và/hoặc LC-MS/MS. Các peptit duy nhất cũng như chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nguyên vẹn sau đó được tiến hành đọc trình tự theo phương pháp Edman để xác định rõ ràng trình tự protein.

Ví dụ 3: Tạo vùng Fv của kháng thể đơn dòng kháng IL-13 người của chuột dòng B-B13 giống như của người

Phương pháp làm cho có tính chất giống người được mô tả trên đây được jsd để làm cho có tính chất giống người dòng B-B13. Sáu phiên bản được làm giống như của người được đề xuất gồm có các đột biến trong vùng CDR để tác động vào các gốc cần gây đột biến (vị trí khử amit hoá, metionin được bộc lộ với dung môi, các vị trí không bền với axit).

Các trình tự VL & VH của B-B13 được so sánh trình tự với phiên bản được tạo ra vào tháng 7/2007 của ngân hàng dữ liệu Protein Data Bank (PDB). Các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng giống nhiều nhất được thu lại. Phân tử tương đồng nhiều nhất với vùng biến đổi chuỗi nhẹ là 1EGJ. Phân tử tương đồng nhiều nhất với

vùng biến đổi chuỗi nặng là 1FNS. Các cấu trúc 1EGJ & 1FNS được sử dụng để tạo ra mô hình độ tương đồng của vùng biến đổi sau đó được tối thiểu hóa năng lượng sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn được thực hiện trong môi trường vận hành phân tử (MOE). MOE là một tập hợp các phần mềm toàn diện thiết kế thuốc được hỗ trợ bằng máy tính được phân phối bởi tập đoàn Chemical Computing. Tính toán động lực phân tử (MD) của mô hình tương đồng 3D của B-B13 được thực hiện trong 1,7 nano giây trong dung môi trường tuyệt đối Generalized Born. 1,700 điểm ảnh hình thành từ quỹ đạo MD sau đó được sử dụng để thực hiện tính toán, đối với từng axit amin B-B13, sự phân phối độ lệch chuẩn căn bình phương trung bình (rmsd) so với điểm medoid tham chiếu. Kiểm tra thống kê so sánh phân phối rmsd của từng axit amin với phân phối rmsd toàn phần, được sử dụng để xác định liệu axit amin đó có đủ độ linh hoạt hay không, như thấy trong MD, để được xem xét khả năng tương tác với thụ thể tế bào B và đáp ứng đối với quá trình hoạt hóa đáp ứng miễn dịch. Các vị trí linh hoạt của vùng biến đổi B-B13 của chuột được so sánh với các vị trí tương ứng trong trình tự kháng thể người trong phiên bản tháng 1/2007 của cơ sở dữ liệu ImMunoGeneTics đã được tải xuống tại chỗ. Chỉ có những gốc có độ linh hoạt lớn hơn 3 lần với mức trung bình và một số gốc bên cạnh bảo toàn cấu trúc 3D của những gốc linh động đó được giữ lại để thực hiện tìm kiếm. Vùng biến đổi của kháng thể người với các gốc linh động tương đồng nhiều nhất, cùng với các vị trí trong vòng bán kính 5,0Å của CDR, được chọn để thay thế các gốc linh động trong vùng biến đổi của kháng thể B-B13 của chuột. Một số đột biến trong CDR cũng được đưa vào các phiên bản đề xuất để tránh các gốc gây trở ngại. Các cấu trúc trình tự lặp lại sau đây được xem xét: Asp-Pro (liên kết không bền với axit), Asn-X-Ser/Thr (glycosyl hoá), Asn-Gly/Ser/Thr (vị trí khử amit hoá trong vùng được bộc lộ), Met (quá trình oxi hoá trong vùng được bộc lộ). Các trình tự được làm giống như của người hình thành được so sánh trình tự để xác định độ tương đồng trình tự với cơ sở dữ liệu UniProtKB/Swiss-Prot đã tạo ra độ tin cậy đối với giả thiết là hợp lý. Đã phát hiện được rằng tất cả các trình tự đều có mức độ tương đồng cao với một số kháng thể người. Ngoài ra, không có trình tự nào chứa các epitop đã biết của tế bào B- hoặc T được lưu trong cơ sở dữ liệu Immune Epitop và Analysis Resource (cơ sở dữ liệu IEDB).

3 phiên bản đối với chuỗi nặng (H1, H2, H3) và 3 phiên bản được đề xuất đối với chuỗi nhẹ (L1, L2, L3). Ba phiên bản của chuỗi nhẹ thu được từ CAA83271.1 (số đăng

ký Genebank CAA83271). Phiên bản L1 có 4 đột biến. Phiên bản L2 có thêm hai đột biến để loại bỏ vị trí DP (Pro99) trong CDR3. L3 đưa vào thêm hai động vật trong các vùng CDR khi được so sánh với L2 hai vị trí được cho là các vị trí khử amit hoá (N34Q, N96A). Các phiên bản H1, H2 và H3 của chuỗi nặng thu được từ CAC39364.1 (số đăng ký Genebank CAC39364). Đây không phải khuôn có điểm số tốt nhất nhưng là khuôn có điểm số cao nhất không chứa các trình tự có độ tương đồng cao (> 70%) với các trình tự có tính sinh miễn dịch đã biết. Phiên bản H1 chứa 6 đột biến và trình tự H2 chứa thêm hai đột biến để loại bỏ ba vị trí khử amit hoá (N60A, N73T, và N83T). Việc đánh số thứ tự axit amin phản ánh trật tự tự nhiên trong (từ đầu N đến đầu C). H3 chứa thêm hai đột biến (Y100R & D106K) các đột biến được cho là làm gia tăng khả năng. 6 tổ hợp biến thể VL và VH được đề xuất để tạo kháng thể được làm giống như của người: VL1xVH1, VL2xVH2, VL1xVH3, VL3xVH1, VL3xVH2 và VL3xVH3. Như nêu trong bảng 1, các thay đổi axit amin được tạo ra trong biến thể VL và VH được làm giống như của người của B-B13 bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tạo bề mặt được mô tả trong phần mô tả chi tiết sáng chế. Cột bên trái chỉ ra axit amin gốc và vị trí của chúng trong kháng thể mAb B-B13 của chuột.

Bảng 1

Chuỗi nhẹ (Đánh số thứ tự)	(VL1)	(VL2)	(VL3)
Asn1	Asp	Asp	Asp
Asn34	Asn	Asn	Gln
Pro44	Ala	Ala	Ala
Glu83	Gln	Gln	Gln
Asp85	Glu	Glu	Glu
Asn96	Asn	Asn	Ala
Pro99	Pro	Ser	Ser
	4 đột biến	5 đột biến	7 đột biến
Chuỗi nặng	(VH1)	(VH2)	(VH3)
Gln1	Glu	Glu	Glu
Ser15	Gly	Gly	Gly
Gln16	Gly	Gly	Gly
Asn60	Asn	Ala	Ala
Ser61	Asp	Asp	Asp

Asn73	Asn	Ser	Ser
Lys81	Glu	Glu	Glu
Asn83	Asn	Thr	Thr
Gln86	Arg	Arg	Arg
Tyr100	Tyr	Tyr	Arg
Asp106	Asp	Asp	Lys
	6 đột biến	9 đột biến	11 đột biến

Ví dụ 4: Tạo vùng Fv của kháng thể đơn dòng kháng IL-4 người của chuột dòng 8D4-8 giống như của người

Kỹ thuật làm cho giống như của người được mô tả trên đây được sử dụng để làm cho giống như của người dòng 8D4-8. Hai phiên bản được làm giống như của người được chuẩn bị. Một phiên bản gồm 1 đột biến trong các vùng CDR của chuỗi nặng được cho là thay thế gốc gây trở ngại (các vị trí không bền với axit được bộc lộ).

Các trình tự VL & VH của 8D4-8 được so sánh trình tự với phiên bản tháng 7/2007 của PDB. Các trình tự axit amin chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có độ tương đồng cao nhất được tập hợp. Thể tương đồng có độ tương đồng trình tự cao nhất đối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ là 1YDJ. Thể tương đồng có độ tương đồng trình tự cao nhất đối với vùng biến đổi chuỗi nặng là 1IQW. Các cấu trúc 1YDJ & 1IQW được sử dụng để tạo ra mô hình độ tương đồng của vùng biến đổi sau đó được tối thiểu hóa năng lượng sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn được thực hiện trong môi trường vận hành phân tử (MOE). MOE là một tập hợp các phần mềm toàn diện thiết kế thuốc được hỗ trợ bằng máy tính được phân phối bởi tập đoàn Chemical Computing. Tính toán động lực phân tử (MD) của mô hình tương đồng 3D của 8D4-8 được thực hiện trong 1,7 nano giây trong dung môi trường tuyệt đối Generalized Born. 1,700 điểm ảnh hình thành từ quỹ đạo MD sau đó được sử dụng để thực hiện tính toán, đối với từng axit amin 8D4 sự phân phối độ lệch chuẩn căn bình phương trung bình (rmsd) so với điểm medoid tham chiếu. Kiểm tra thống kê so sánh phân phối rmsd của từng axit amin với phân phối rmsd toàn phần, được sử dụng để xác định liệu axit amin đó có đủ độ linh hoạt hay không, như thấy trong MD, để được xem xét khả năng tương tác với thụ thể tế bào B và đáp ứng đối với quá trình hoạt hóa đáp ứng miễn dịch. Các vị trí linh hoạt của vùng biến đổi 8D4-8 của chuột được so sánh với các vị trí tương ứng trong trình tự kháng thể

người trong phiên bản tháng 1/2007 của cơ sở dữ liệu ImMunoGeneTics đã được tải xuống tại chỗ. Chỉ có những gốc có độ linh hoạt lớn hơn 3 lần so với mức trung bình và một số gốc bên cạnh bảo toàn cấu trúc 3D của những gốc linh động đó được giữ lại để thực hiện tìm kiếm. Vùng biến đổi của kháng thể người với các gốc linh động tương đồng nhiều nhất, cùng với các vị trí trong vòng bán kính 5,0Å của CDR, được chọn để thay thế các gốc linh động trong vùng biến đổi của kháng thể 8D4-8 của chuột. Một số đột biến trong CDR cũng được đưa vào các phiên bản đề xuất để tránh các gốc gây trở ngại. Các cấu trúc trình tự lặp lại say đây được xem xét: Asp-Pro (liên kết không bền với axit), Asn-X-Ser/Thr (glycosyl hoá), Asn-Gly/Ser/Thr (vị trí khử amit hoá trong vùng được bộc lộ), Met (quá trình oxi hoá trong vùng được bộc lộ). Gốc duy nhất gây trở ngại tìm được là vị trí DP trong CDR2 của chuỗi nặng. Các trình tự được làm giống như của người hình thành được so sánh trình tự để xác định độ tương đồng trình tự với cơ sở dữ liệu UniProtKB/Swiss-Prot đã tạo ra độ tin cậy đối với giả thiết là hợp lý. Đã phát hiện được rằng tất cả các trình tự đều có mức độ tương đồng cao với một số kháng thể người. Ngoài ra, không có trình tự nào chứa các epitop đã biết của tế bào B- hoặc T được lưu trong cơ sở dữ liệu Immune Epitop và Analysis Resource (cơ sở dữ liệu IEDB).

Hai phiên bản đối với chuỗi nặng (H1, H2) và một phiên bản đối với chuỗi nhẹ (L1) được đề xuất. Phiên bản L1 của chuỗi nhẹ thu được từ BAC01676.1 (Số đăng ký Genebank BAC01676). Phiên bản L1 có 3 đột biến. Các phiên bản H1 và H2 của chuỗi nặng nhận được từ BAC02418.1 (Số đăng ký Genebank BAC02418). Phiên bản H1 chứa 9 đột biến và phiên bản H2 chứa thêm 1 đột biến để loại bỏ vị trí DP (Pro53) trong CDR2. Hai tổ hợp, VL1xVH1 và VL1xVH2, được tạo ra.

Bảng 2 thể hiện các thay đổi axit amin được tạo ra trong biến thể VL và VH được làm giống như của người của 8D4-8 sử dụng kỹ thuật tái tạo bề mặt. Cột bên trái chỉ ra axit amin gốc và vị trí của chúng trong mAb 8D4-8 của chuột.

Bảng 2

Chuỗi nhẹ (Đánh số thứ tự)	(VL1)	
Asn5	Thr	
Leu15	Val	
Ser39	Lys	

Chuỗi nhẹ (Đánh số thứ tự)	(VL1)	
	3 đột biến	
Chuỗi nặng	(VH1)	(VH2)
Gln10	Glu	Glu
Arg13	Lys	Lys
Thr16	Ala	Ala
Pro53	Pro	Ala
Lys65	Gln	Gln
Asp66	Gly	Gly
Arg74	Glu	Glu
Ser76	Thr	Thr
Leu93	Val	Val
Thr118	Leu	Leu
	9 đột biến	10 đột biến

Ví dụ 5: Tách dòng và tạo kháng thể đơn dòng kháng IL-13 của dòng B-B13, kháng thể đơn dòng kháng IL-4 của dòng 8D4-8 và các biến thể giống như của người

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng IL-13 dòng B-B13 và kháng IL-4 dòng 8D4-8 được dịch mã ngược thành trình tự nucleotit và được tạo ra một cách lần lượt sử dụng quy trình biến đổi của quy trình PCR tổng hợp gói đầu (OE-PCR) được mô tả bởi Young L. và Dong Q. (Nucl. Acids Res. (2004), 32(7), e59). Các sản phẩm PCR được tách dòng vào pCR®4-TOPO sử dụng kit tách dòng Invitrogen TOPO TA (Cat # 45-0641) và đọc trình tự sử dụng các cặp mồi M13 xuôi và ngược. Vùng biến đổi được dung hợp lần lượt cùng với vùng cố định chuỗi nặng (IGHG1, Số đăng ký Genebank Q569F4) hoặc chuỗi nhẹ (IGKC) Số đăng ký Genebank Q502W4), được cắt bằng NheI và HindIII và mỗi đoạn được nối vào các vị trí NheI/HindIII của vector biểu hiện pXL episom, một đồng phân của vector pTT được mô tả bởi Durocher et al. (2002), Nucl. Acids Res. 30(2), E9, tạo ra các plasmit đối với quá trình biểu hiện trong động vật có vú của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng kháng B-B13 và chuỗi nhẹ và chuỗi nặng kháng 8D4-8.

Các dòng biến nạp mã hoá biến thể được làm giống như của người của kháng thể kháng IL-13 dòng B-B13 và kháng thể kháng IL-4 dòng 8D4-8 cũng được tổng hợp

bằng phương pháp PCR tổng hợp gói đầu (OE-PCR), dựa trên sự trao đổi axit amin của trình tự gốc.

Plasmit biểu hiện mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được biến nạp vào *E.coli* DH5 α . Các plasmit được sử dụng để biến nạp được tách từ *E.coli* sử dụng Qiagen EndoFree Plasmid Mega Kit.

Để biến nạp các tế bào HEK293FreeStyle (Invitrogen) được nuôi cấy ở mật độ 3×10^5 tế bào/mL trong 100mL môi trường FreeStyle không huyết thanh (Invitrogen) trong bình nón 500mL. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong máy ủ với không khí được làm ẩm 8% CO₂, trên bề mặt lắc orbital xoay với tốc độ 110 vòng/phút.

Ba ngày sau nuôi cấy, tế bào tổng số và tế bào sống được xác định bằng máy đếm tế bào điện tử CASY (Schärfe System GmbH). Các tế bào với khả năng sống hơn 90% được sử dụng để biến nạp với nồng độ tế bào từ 1 đến $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL. 100mL tế bào được biến nạp vào bình nón 500mL với hỗn hợp các plasmit biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (5×10^{-7} μ gADN/tế bào) sử dụng EugeneHD (Roche) với tỷ lệ ADN:EugeneHD là 2:7, ở các điều kiện được mô tả bởi nhà sản xuất. Các tế bào đã biến nạp được nuôi cấy trong 7 ngày trong máy ủ 37°C (8% CO₂) trên mặt lắc orbital xoay ở tốc độ 110 vòng/phút.

Đĩa Nunc F96-MaxiSorp-Immuno được phủ bằng IgG dê kháng người (đặc hiệu Fc) [NatuTec A80-104A]. Kháng thể được pha loãng đến nồng độ 10 μ g/mL trong đệm phủ cacbonat (50mM natri cacbonat pH 9,6) và được phân tán với lượng 50 μ L/giếng. Đĩa được hàn kín bằng băng dính, và bảo quản qua đêm ở 4°C. Đĩa được rửa 3 lần bằng đệm rửa (PBS pH 7,4 Tween20 0,1%). 150 μ L dung dịch phong bế (1% BSA / PBS) được phân tán vào từng giếng để phủ đĩa. Sau 1 giờ ở nhiệt độ phòng, đĩa được rửa 3 lần bằng đệm rửa. 100 μ L mẫu hoặc đối chứng (nồng độ từ 1500ng/mL đến 120ng/mL) được thêm vào và để yên trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Đĩa được rửa 3 lần bằng đệm rửa. 100 μ L thể liên hợp FC – HRP – IgG dê kháng người [NatuTec A80-104P-60] được pha loãng 1:10.000 được thêm vào sử dụng dung dịch ủ (0,1%BSA, PBS pH 7,4, 0,05% Tween20). Sau một giờ ủ ở nhiệt độ phòng, đĩa được rửa 3 lần bằng đệm rửa. 100 μ L cơ chất ABTS (10mg viên nén ABTS (Pierce 34026) trong 1mL 0,1M Na₂HPO₄, dung dịch 0,05M axit xitric, pH 5,0. Việc thêm 10 μ L H₂O₂ 30%/10mL đệm cơ chất trước khi sử dụng) được phân tán vào các giếng, và để lên màu. Sau khi đã lên màu (khoảng 10 đến

15 phút), 50uL dung dịch SDS 1% được thêm vào để dừng phản ứng. Đã được đọc ở bước sóng A405.

Protein được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên Protein A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Life Sciences). Sau khi tách rửa khỏi cột bằng 100mM đệm axetat với 100mM NaCl pH=3,5, kháng thể đơn dòng được cho vào PBS và lọc qua màng lọc 0,22µm. Nồng độ protein được xác định bằng cách độ hấp thụ ở bước sóng 280nm. Mỗi mẻ được phân tích bằng cách sử dụng Protein 200 Plus LabChip trên máy phân tích sinh học Agilent 2100 ở điều kiện khử và không khử để xác định độ tinh khiết và trọng lượng phân tử của mỗi dưới đơn vị và của monome.

Ví dụ 6: Xác định đặc điểm của biến thể được làm giống như của người kháng IL-13 dòng B-B13 và biến thể được làm giống như của người kháng IL-4 dòng 8D4-8

IL-13 và IL-4 tái tổ hợp của người được mua từ Chemicon (USA). Phân tích động lực Biacore được thực hiện như sau.

Kỹ thuật cộng hưởng bề mặt plasmon trên Biacore 3000 (GE Healthcare) được sử dụng để xác định đặc điểm động lực chi tiết của các kháng thể đã tinh chế. Thử nghiệm bắt giữ sử dụng kháng thể đặc hiệu loài (chẳng hạn MAB đặc hiệu với Fc của người 1302, Chemicon) để bắt giữ và định hướng kháng thể thử nghiệm được sử dụng. Kháng thể bắt giữ được cố định bằng các nhóm amin bậc 1 (10000 RU) trên chip CM5 (GE Life Sciences) sử dụng các quy trình chuẩn. Kháng thể cần phân tích được bắt giữ bằng giá trị RU được điều chỉnh sẽ tạo ra mức độ liên kết tối đa là 30RU với tốc độ chảy là 10µl/phút. Động lực liên kết được xác định so với IL-4 và IL-13 tái tổ hợp của người với khoảng nồng độ thay đổi từ 0 đến 50nM trong HBS EP (HEPES 10mM pH = 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) với tốc độ chảy là 30µl/phút. Bề mặt chip được tạo ra bằng glyxin 10mM pH=2,5. Các tham số động lực được phân tích và tính toán trong chương trình BIAevaluation sử dụng dòng tế bào không có kháng thể bắt giữ là đối chứng. Để khảo sát mức độ liên kết hỗ trợ của cả hai kháng nguyên, phương pháp thử nghiệm song song được vận hành bởi máy được sử dụng trong đó một kháng nguyên được đưa vào ngay lập tức sau hỗn hợp kháng nguyên IL-13/IL-4.

Kháng thể theo sáng chế được xác định hoạt tính sinh học bằng cách đo mức độ ức chế quá trình tăng sinh tế bào do IL-4 hoặc IL-13 gây ra trong các tế bào TF-1. Sơ

lược là, sử dụng IL-4 hoặc IL-13 để kích thích sự sinh trưởng của các tế bào TF-1. TF-1 là dòng tế bào phụ thuộc vào xytokin để có thể sinh trưởng được và đáp ứng với nhiều xytokin bao gồm IL-4 và IL-13. Quá trình sinh trưởng được kích thích (so với các điều kiện ban đầu khi không có xytokin) cho thấy hoạt tính sinh học của IL-4 hoặc IL-13. Các kháng thể kháng IL-4, kháng IL-13 và đặc hiệu kép kháng IL-4/IL-13 được chỉ ra là chặn quá trình sinh trưởng của các tế bào TF-1 do IL-4 hoặc IL-13 gây ra. Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu kép kháng IL-4/IL-13 được chỉ ra là chặn quá trình tăng sinh tế bào TF-1 được kích thích bằng kích thích kết hợp của IL-4 và IL-13. Tác dụng chặn được xác định theo cách phụ thuộc liều để đưa ra giá trị IC50 (nồng độ kháng thể tạo ra mức độ ức chế 50%) là khả năng trung hòa của kháng thể đối với đích, nghĩa là, IL-4 hoặc IL-13. Chi tiết của phương pháp sử dụng được mô tả dưới đây.

Các tế bào TF-1 (ATCC, CRL-2003) được duy trì trong môi trường hoàn toàn (DMEM với glucoza nồng độ cao, 25mM đệm Hepes và glutamin, 10% FBS, 1x P/S, 1mM natri pyruvat) chứa hGM-CSF mới được thêm vào ở nồng độ cuối cùng là 4ng/ml. 24 giờ trước khi xử lý IL-13 (15ng/ml) hoặc IL-4 (1ng/ml). Tế bào được cấy trải trong đĩa 96 giếng ở nồng độ $0,05 \times 10^6$ /ml trong môi trường hoàn toàn không có hGM-CSF. Dịch pha loãng liên tục của kháng thể với xytokin tương ứng được ủ sơ bộ trong 30 phút ở 37°C trước khi thêm vào giếng tế bào. Tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ (37°C, 5% CO₂). Dung dịch MTS/PMS chứa dịch chuẩn độ tế bào CellTiter 96 Aqueous được thêm vào. Sau đó, tế bào được ủ trong 3 giờ. Sau giai đoạn này, độ hấp thụ ở bước sóng 490nm sử dụng máy đọc đĩa được ghi lại. Giá trị IC50 được tính bằng phần mềm Speed.

Động lực liên kết và hoạt tính trung hòa của biến thể được làm giống như của người B-B13 được nêu trong bảng 3. (nt, không được thử nghiệm).

Bảng 3

Kháng thể	Mức độ liên kết (M ⁻¹ ×S ⁻¹)	Mức độ phân ly (S ⁻¹)	KD (M)	IC50 (M)
B-B13 của chuột	8,64E+05	3,73E-04	5,63E-10	Nt
chB-B13 WT	1,76E+06	4,61E-04	2,61E-10	7,4E-9
huB-B13 VL1×VH1	1,74E+06	6,91E-04	3,96E-10	1,57E-8
huB-B13 VL1×VH3	1,93E+06	3,95E-04	2,05E-10	Nt

Kháng thể	Mức độ liên kết ($M^{-1} \times S^{-1}$)	Mức độ phân ly (S^{-1})	KD (M)	IC50 (M)
huB-B13 VL2×VH2	1,13E+06	1,77E-04	1,57E-10	Nt
huB-B13 VL3×VH1	1,93E+06	3,33E-04	1,72E-10	5,2E-9
huB-B13 VL3×VH2	2,55E+06	1,12E-04	4,39E-11	3,2E-9
huB-B13 VL3×VH3	2,14E+06	4,05E-04	1,89E-10	Nt

Một biến thể được làm giống như của người B-B13, huB-B13 VL3xVH2, có ái lực cao hơn đáng kể so với B-B13 gốc của chuột (13 lần) và kháng thể khảm B-B13 (6 lần). Ái lực được gia tăng có thể gia tăng khả năng và hiệu quả khi các kháng thể được làm giống như của người kháng IL-13 được sử dụng để điều trị bệnh nhân hen. Ngoài ra, kháng thể được làm giống như của người có thể có tính sinh miễn dịch bị giảm so với kháng thể hoặc kháng thể khảm của chuột khi được sử dụng trên người.

Động lực liên kết và hoạt tính trung hòa của biến thể được làm giống như của người 8D4-8 biến thể được nêu trong bảng 4.

Bảng 4

kháng thể	Tốc độ liên kết ($M^{-1} \times S^{-1}$)	Tốc độ phân ly (S^{-1})	KD (M)	IC50 (M)
8D4-8 của chuột	5,57E+06	2,17E-04	3,77E-11	9,7E-11
ch8D4-8 WT	2,49E+07	1,95E-04	7,83E-12	8,4E-11
Hu8D4-8 VL1×VH1	4,72E+07	1,55E-04	3,29E-12	4,1E-11
Hu8D4-8 VL1×VH2	2,57E+07	3,48E-04	1,39E-11	1,35E-10

Biến thể được làm giống như của người 8D4-8, hu8D4-8 VL1xVH1 có ái lực cao hơn đáng kể so với 8D4-8 gốc của chuột (11 lần) và kháng thể khảm 8D4-8 (2 lần). Ái lực được gia tăng có thể gia tăng khả năng và hiệu quả khi các kháng thể được làm giống như của người kháng IL-4 được sử dụng để điều trị bệnh nhân hen. Ngoài ra, kháng thể được làm giống như của người có thể có tính sinh miễn dịch bị giảm so với kháng thể hoặc kháng thể khảm của chuột khi được sử dụng trên người.

Ví dụ 7: Tách dòng và tạo kháng thể đặc hiệu kép được làm giống như của người kháng IL-4/IL-13

Phân tử khuôn được sử dụng để biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép (BsAb) là biến thể IgG của khuôn hai đầu hai vùng chức năng được mô tả trong US 5,989,830. Trong

khuôn này, phân tử IgG được kéo dài ở đầu N trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tương ứng, bằng cách thêm vùng biến đổi của kháng thể thứ hai. Do đó, phân tử IgG hình thành là một heterotetrame gồm có hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng gồm có hai vùng biến đổi chuỗi nặng (VH1-VH2) thụ được từ hai kháng thể khác nhau được nối với nhau bằng đoạn liên kết gồm có 10 axit amin (G4S)₂ và được dung hợp với vùng cố định IgG4. Chuỗi nhẹ gồm có hai vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL1-VL2) thu được từ hai kháng thể khác nhau được nối với nhau bằng đoạn liên kết gồm có 10 axit amin (G4S)₂ và được dung hợp với vùng cố định kapa.

Các trình tự của các vùng chức năng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác nhau của biến thể 8D4-8 được tạo ra bằng PCR tạo ra vị trí cắt BamHI (GGA TCC) tại các đầu 5' mã hoá một phần (G4S)₂-(GGA TCC)-8D4-8. Trình tự 3' của VH của biến thể được làm giống như của người 8D4-8 kết thúc bằng vị trí cắt của ApaI (mã hoá axit amin đầu tiên của vùng CH1) để dung hợp sau với trình tự IGHG4 (Q569F4, có đột biến loại bỏ Lys tận cùng và đột biến kép S241P và L248E). Đầu 3' của VL8D4-8 kết thúc bằng vị trí cắt BsiWI mã hoá hai axit amin đầu tiên của chuỗi cố định kapa để dung hợp sau với IGKC (Số đăng ký trong Gene Bank Q502W4).

Các trình tự của các vùng chức năng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác nhau của biến thể B-B13 được tạo ra bằng PCR tạo ra vị trí cắt BamHI (GGA TCC) tại các đầu 5' mã hoá một phần (G4S)₂-(B-B13)-(GGA GGC GGA GGG TCC GGA GGC GGA GGA TCC (SEQ ID NO: 7)). Cả hai trình tự đối với VH và VL của biến thể B-B13 được tạo ra bằng các vị trí cắt của NheI ở các đầu 5', sau đó là mã bộ ba khởi đầu ATG và trình tự mã hoá peptit dẫn đầu.

VH của B-B13 và 8D4-8 được dung hợp với nhau qua các vị trí BamHI trong đoạn liên kết (G4S)₂. VL của B-B13 và 8D4-8 được dung hợp với nhau qua vị trí BamHI trong đoạn liên kết (G4S)₂. Do đó, việc lắp ghép chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tạo ra có thành phần như sau.

Chuỗi nặng của kháng thể đặc hiệu kép: NheI- Peptit dẫn đầu-VH-B-B13 - (G4S)₂ - VH 8D4-8-ApaI.

Kháng thể đặc hiệu kép chuỗi nhẹ: NheI- Peptit dẫn đầu-VL-B-B13 - (G4S)₂ - VL 8D4-8- BsiWI.

Các sản phẩm PCR mảnh kháng thể trung gian được tách dòng vào pCR®4-TOPO sử dụng kit tách dòng Invitrogen TOPO TA (Cat #: 45-0641) và đọc trình tự sử dụng môi M13 xuôi và ngược.

Sau khi xác định trình tự của cặp chuỗi nặng được dung hợp qua vị trí ApaI với trình tự IGHG4 và cặp vùng biến đổi chuỗi nhẹ được dung hợp qua vị trí BsiWI với IGKC. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kép hình thành được cắt bằng NheI và HindIII và mỗi phân tử được nối ở các vị trí NheI/HindIII vào vector biểu hiện episom pXL, tạo ra các plasmit để biểu hiện trong động vật có vú chuỗi nhẹ và chuỗi nặng TBTL.

Bốn kháng thể được làm giống như của người đặc hiệu kép kháng IL-4/IL-13 được tạo ra dựa trên quá trình tổ hợp các phiên bản được làm giống như của người VH và VL của B-B13 và 8D4-8 như nêu trong bảng 5.

Bảng 5

Ab đặc hiệu kép kháng IL-4/IL-13	Fv kháng IL-13	Fv kháng IL-4
huTBTI3_1_1	B-B13 VL3xVH2	8D4-8 VL1xVH2
huTBTI3_2_1	B-B13 VL3xVH2	8D4-8 VL1xVH1
huTBTI3_1_2	B-B13 VL2xVH2	8D4-8 VL1xVH2
huTBTI3_2_2	B-B13 VL2xVH2	8D4-8 VL1xVH1

Ví dụ 8: Xác định đặc điểm của kháng thể được làm giống như của người đặc hiệu kép

Các thử nghiệm hoạt tính liên kết và hoạt tính trung hòa được thực hiện theo ví dụ trên.

Bảng 6 mô tả động lực liên kết của 4 biến thể kháng thể được làm giống như của người kháng IL-4/IL-13. Cả 4 cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép đều liên kết với IL-4 và IL-13 với ái lực cao.

Bảng 6

BsAB	Ái lực với IL-13			Ái lực với IL-4		
	Tốc độ liên kết ($M^{-1} \times S^{-1}$)	Tốc độ phân ly (S^{-1})	KD (M)	Tốc độ liên kết ($M^{-1} \times S^{-1}$)	Tốc độ phân ly (S^{-1})	KD (M)
huTBTI3-1_1	2,27E+06	1,70E-04	7,47E-11	2,55E+06	3,78E-04	1,48E-10
huTBTI3-2_1	2,17E+06	1,69E-04	7,80E-11	4,00E+06	1,39E-04	3,47E-11

huTBTI3-1_2	8,50E+05	1,64E-04	1,93E-10	2,23E+06	3,08E-04	1,38E-10
huTBTI3-2_2	8,20E+05	2,12E-04	2,59E-10	3,96E+06	1,32E-04	3,32E-11

Hoạt tính trung hòa của biến thể kháng thể đặc hiệu kép được làm giống như của người kháng IL-4/IL-13 được nêu trong bảng 7. Cả huTBTI3-1_1 và huTBTI3-2_1 đều trung hòa hoàn toàn quá trình tăng sinh tế bào TF-1 do IL-4/IL-13 gây ra với IC50 được nêu dưới đây.

Bảng 7

Kháng thể	IC50 (nM) trong thử nghiệm IL-13	IC50 (nM) trong thử nghiệm IL-4
huTBTI3-1_1	3,7	1,7
huTBTI3-2_1	4,1	0,32

Đã biết rõ rằng thể đột biến IL-13 được có liên quan nhiều đến bệnh hen (Heinzmann A. et al., 2000, Hum Mol Genet 9, 4, p549-559). Do đó, động lực liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với thể đột biến IL-13 (biến thể IL-13 R112Q của người, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) được nghiên cứu. Kết quả chỉ ra rằng huTBTI3-1_1 và huTBTI3-2_1 liên kết với biến thể IL-13 với ái lực tương tự như đối với IL-13 kiểu dại.

Bảng 8 thể hiện động lực liên kết của kháng thể được làm giống như của người kháng IL-4/IL-13 với protein IL-13 đột biến.

Bảng 8

BsAB	Ái lực với biến thể IL-13		
	Tốc độ liên kết ($M^{-1} \times S^{-1}$)	Tốc độ phân ly (S^{-1})	KD (M)
huTBTI3-1_1	9,74E+05	1,18E-04	1,21E-10
huTBTI3-2_1	9,48E+05	2,00E-04	2,11E-10

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó liên kết đặc hiệu với IL-13 và IL-4,

trong đó kháng thể đặc hiệu kép này hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng;

trong đó các chuỗi nhẹ này bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N liên kết với miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C mà liên kết với miền cố định chuỗi nhẹ (CL), và các chuỗi nặng chứa miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm trong phần đầu N liên kết với miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C mà liên kết với miền cố định chuỗi nặng (CH1); và

trong đó:

(a) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm trong phần đầu N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

(b) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm trong phần đầu N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5;

(c) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm trong phần đầu N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(d) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm

trong phần đầu N có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(e) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm trong phần đầu N có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRID (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13), và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19);

(f) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm trong phần đầu N có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRID (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13), và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22);

(g) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm trong phần đầu N có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18), và

LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19), và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRID (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13); hoặc

(h) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài nằm trong phần đầu N có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong nằm trong phần đầu C có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài nằm trong phần đầu N có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22), và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong nằm trong phần đầu C có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGR1D (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13).

2. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó liên kết đặc hiệu với IL-13 và IL-4, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó bao gồm cặp polypeptit thứ nhất và cặp polypeptit thứ hai;

trong đó cặp polypeptit thứ nhất này bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài (đầu N) liên kết với miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong (đầu C) mà liên kết với miền cố định chuỗi nhẹ (CL), và cặp polypeptit thứ hai bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài (đầu N) liên kết với miền biến đổi chuỗi nặng bên trong (đầu C) mà liên kết với miền cố định chuỗi nặng (CH1); và trong đó:

(a) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài (đầu N) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong (đầu C) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 và có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài (đầu N) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất

95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRID (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13), và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong (đầu C) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4 và có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19);

(b) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài (đầu N) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong (đầu C) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 và có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài (đầu N) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRJD (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13), và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong (đầu C) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 và có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22);

(c) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài (đầu N) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 và có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong (đầu C) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài (đầu N) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4 và có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18), và

LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19), và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong (đầu C) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRID (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13); hoặc

(d) miền biến đổi chuỗi nhẹ bên ngoài (đầu N) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 và có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nhẹ bên trong (đầu C) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nặng bên ngoài (đầu N) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 và có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22), và miền biến đổi chuỗi nặng bên trong (đầu C) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRID (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13).

3. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó còn bao gồm các miền trong vùng cổ định bổ sung.

4. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó theo điểm 3, trong đó các miền trong vùng cổ định bổ sung này chứa CH2 và CH3.

5. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó liên kết đặc hiệu với IL-13 và IL-4, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó bao gồm phân tử IgG có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng;

trong đó từng chuỗi nhẹ này được kéo dài tại đầu N của nó nhờ miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung, và từng chuỗi nặng này được kéo dài tại đầu N của nó nhờ miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung; và trong đó:

(a) các chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, các chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, và miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(b) các chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, các chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, và miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(c) các chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, các chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

(d) các chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, các chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5;

(e) các chuỗi nhẹ này có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung này có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), các chuỗi nặng có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19), và miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung này có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRID (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13);

(f) các chuỗi nhẹ này có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung này có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), các chuỗi nặng có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21), và

LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22), và miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung này có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRiD (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13);

(g) các chuỗi nhẹ này có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung này có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), các chuỗi nặng có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRJD (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13), và miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung này có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19); hoặc

(h) các chuỗi nhẹ này có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (CDR1; SEQ ID NO: 8), LASNLES (CDR2; SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (CDR3; SEQ ID NO: 10), miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung này có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16), các chuỗi nặng có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (CDR1; SEQ ID NO: 11), DGRID (CDR2; SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (CDR3; SEQ ID NO: 13), và miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung này có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22),

trong đó liên kết peptit liên kết miền biến đổi chuỗi nhẹ bổ sung với các chuỗi nhẹ, và liên kết peptit liên kết miền biến đổi chuỗi nặng bổ sung với các chuỗi nặng.

6. Kháng thể đặc hiệu kép này hoặc mảnh kháng thể của nó theo điểm 5, trong đó liên kết peptit này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

7. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó liên kết đặc hiệu với IL-13 và IL-4;

trong đó kháng thể đặc hiệu kép này hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó bao gồm hai chuỗi nhẹ có cấu trúc VL1-L1-VL2-CL, và hai chuỗi nặng có cấu trúc VH1-L2-VH2-CH1;

trong đó CL là miền cố định chuỗi nhẹ và CH1 là miền cố định chuỗi nặng;

trong đó L1 và L2 là các liên kết axit amin; và

trong đó:

(a) VL1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, VL2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, VH1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và VH2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

(b) VL1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, VL2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, VH1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và VH2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5;

(c) VL1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, VL2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, VH1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, và VH2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(d) VL1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, VL2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, VH1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, và VH2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(e) VL1 có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), VL2 có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), VH1 có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), và VH2 có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (SEQ ID NO: 18), và LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19);

(f) VL1 có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), VL2 có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), VH1 có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), và VH2 có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 22);

(g) VL1 có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), VL2 có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), VH1 có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (SEQ ID NO: 18), và LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19), và VH2 có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13); hoặc

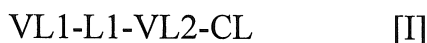
(h) VL1 có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), VL2 có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), VH1 có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 22), và VH2 có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13).

8. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó theo điểm 7, trong đó L1 và L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

9. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó liên kết đặc hiệu với IL-13 và IL-4;

trong đó kháng thể đặc hiệu kép này hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên;

trong đó hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

VL1 là miền biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ nhất;

VL2 là miền biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch thứ hai;

VH1 là miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ nhất;

VH2 là miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch thứ hai;

CL là miền cố định chuỗi nhẹ globulin miễn dịch;

CH1 là miền cố định chuỗi nặng CH1 globulin miễn dịch;

LI và L2 là các liên kết axit amin; và

trong đó:

(a) VL1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, VL2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, VH1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và VH2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

(b) VL1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, VL2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, VH1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và VH2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5;

(c) VL1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, VL2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, VH1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, và VH2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(d) VL1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, VL2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, VH1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, và VH2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

(e) VL1 có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), VL2 có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), VH1 có các trình tự axit amin GFSLTDSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), và VH2 có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (SEQ ID NO: 18), và LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19);

(f) VL1 có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), VL2 có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), VH1 có các trình tự axit amin GFSLTDSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), và VH2 có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 22); hoặc

(g) VL1 có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), VL2 có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), VH1 có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (SEQ ID NO: 18), và LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19), và VH2 có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13); hoặc

(h) VL1 có các trình tự axit amin HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15), và QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), VL2 có các trình tự axit amin RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9), và QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), VH1 có các trình tự axit amin GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (SEQ ID NO: 21), và LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 22), và VH2 có các trình tự axit amin GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12), và DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13).

10. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó theo điểm 9, trong đó L1 và L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

11. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó còn được liên hợp với phân tử tác động.

12. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó theo điểm 11, trong đó phân tử tác động là polypeptit khác loại, dược chất, nucleotit phóng xạ, hoặc độc tố.

13. Dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 và chất mang dược dụng.

14. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó còn chứa chất đánh dấu, trong đó chất đánh dấu này là chất đánh dấu phóng xạ, nhóm phát huỳnh quang, nhóm mang màu, chất chụp hình, hoặc ion kim loại.

15. Phân tử axit nucleic phân tách được mã hóa kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh kháng thể đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.
16. Vector chứa phân tử axit nucleic theo điểm 15.
17. Tế bào vật chủ phân lập được chứa vector theo điểm 16.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> sanofi-aventis US Inc
 Rao, Ercole
 Mikol, Vincent
 Li, Danxi
 Kruip, Jochen
 Davison, Matthew

<120> Kháng thể đặc hiệu kép liên kết với IL-4 và IL-13 và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> US2008/020

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng VL3 của chuột/của chuột được làm cho giống như của người

<400> 1

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

Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Ser	Tyr
			20					25					30		

Gly	Gln	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ala	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			

Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
	50					55					60				

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

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

Glu	Asp	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110	

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng VH2 của chuột/của chuột được làm cho giống như của người

<400> 2

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

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng VL1 của chuột/của chuột được làm cho giống như của người

<400> 3

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

<210> 4

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

<220>

<223> Vùng VH1 của chuột/của chuột được làm cho giống như của người

<400> 4

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

<210> 5
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng VH2 của chuột/của chuột được làm cho giống như của người

<400> 5

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

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

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

Gly Met Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

Thr	Arg	Leu	Lys	Glu	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asp	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val
			100					105					110		

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

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

<220>
<223> Đoạn liên kết

$\langle 400 \rangle$ 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210>	7
<211>	30
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

```
<400> 7
ggaggcggag ggtccggagg cggaggatcc
```

30

Fig.1

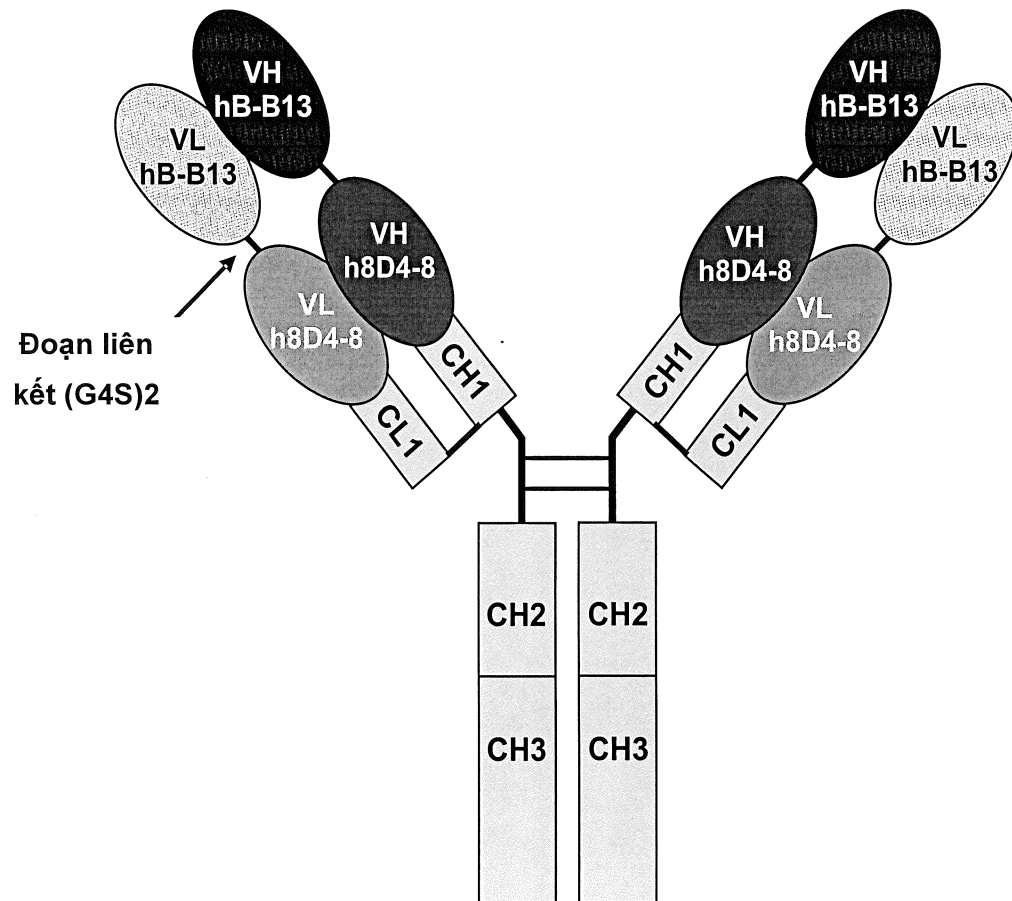


Fig.2

hB-B13 VL3 kháng IL13 (SEQ ID NO: 1):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCR**RASESVD SYGQSYM**HWY QQKAGQPPKL
LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YC**QQNAEDSR**
TFGGGTKLEI K

hB-B13 VH2 kháng IL13 (SEQ ID NO: 2):

EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVS**GFSLT DSSIN**WVRQP PGKGLEWLGM
IWG**DGRIDYA** DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARD**GY**
FPYAMDFWGQ GTSVTVSS

h8D4-8 VL1 kháng IL4 (SEQ ID NO: 3):

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LT**CHASQNID VWLS**WFQQKP GNIPKLLIY**K**
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYC**QQ AHSYPFT**FGG
GTKLEIKR

h8D4-8 VH1 kháng IL4 (SEQ ID NO: 4):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGM
IDPSDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK**
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

h8D4-8 VH2 kháng IL4 (SEQ ID NO: 5):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGM
IDASDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK**
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA