(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) **1-0037607**

(51)[7] **C07K 16/40**; C12N 15/13; C12N 1/19; C07K 16/46; C12N 1/15

(13) **B**

(21) 1-2019-04967
(22) 09/02/2018
(86) PCT/US2018/017680 09/02/2018
(87) WO 2018/148585 16/08/2018
(30) 62/457,722 10/02/2017 US
(45) 27/11/2023 428
(43) 30/01/2020 382A
(73) Genentech, Inc. (US)
1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, United States of America
(72) CHEN, Xiaocheng (CN); DENNIS, Mark (US); JACKMAN, Janet (US); KOERBER, James, T. (US); LU, Mason (US); MAUN, Henry, R. (DE); RAJAPAKSA, Kathila (US); RAMANUJAN, Saroja (US); STATON, Tracy (US); WU Lawren (US); YI, Tangsheng (CN).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP KHÁNG TRYPTAZA VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng tryptaza và dược phẩm chứa kháng thể này, cũng như các phương pháp sản xuất kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng tryptaza, các chế phẩm dược, và các phương pháp sử dụng chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tryptaza beta của người là proteaza serin giống trypsin mà dồi dào ở các dưỡng bào và, đến một mức độ ít hơn, ở các bạch cầu ưa bazơ. Tryptaza beta của người (mà trong đó có ba loại phụ, tryptaza beta 1, tryptaza beta 2, và tryptaza beta 3) được sản xuất bởi các ổ gen *TPSAB1* và *TPSB2* là tryptaza có hoạt tính nổi trội được sản xuất bởi các dưỡng bào của người. Hai ổ gen này sản xuất bốn dạng đồng đẳng tryptaza; *TPSAB1* sản xuất tryptaza alpha và tryptaza beta 1, trong khi *TPSB2* sản xuất tryptaza beta 2 và tryptaza beta 3. Tryptaza alpha, cũng như các dạng đồng đẳng khác như tryptaza gamma, tryptaza delta, và tryptaza epsilon chủ yếu là không có hoạt tính.

Tryptaza beta có hoạt tính, đã được chế biến theo kiểu thủy phân protein được tích trữ trong các hạt tiết của các dưỡng bào ở dạng tetrame trong phức hợp với heparin. Hiện tượng thoát hạt dưỡng bào, hiện tượng này có thể là do các tác nhân kích thích phụ thuộc IgE (ví dụ, dị ứng nguyên), hoặc các tác nhân kích thích không phụ thuộc IgE (ví dụ, chất P hoặc tryptaza có hoạt tính) gây ra, dẫn đến việc giải phóng tryptaza beta cùng với các enzym hạt khác và histamin. Các nghiên cứu trước đó đã quan sát thấy số dưỡng bào tăng ở cơ trơn phế quản và biểu mô của các bệnh nhân hen suyễn, cũng như mức tryptaza beta tăng ở chất lưu súc rửa tiểu phế quản-phế nang. Ngoài ra, tryptaza góp phần vào tình trạng tăng tính đáp ứng và tình trạng co thắt phế quản khí đạo, và cũng đã cho thấy là có đóng một vai trò nào đó trong chứng xơ hóa và sự cân bằng thay thế cơ chất ngoại bào, đây là dấu hiệu điển hình của quá trình tổ chức lại khí đạo.

Tryptaza đã cho thấy là có liên can đến các bệnh và rối loạn khác nhau, bao gồm cả hen suyễn và các rối loạn phổi, viêm, tự miễn dịch và xơ hóa khác, mà vì đó, vẫn còn nhu cầu về phép trị liệu được cải thiện, bao gồm cả các chất đối kháng kháng tryptaza trị liệu, và các phương pháp điều trị. Đã có những cố gắng nhằm phát triển các chất ức

chế tryptaza phân tử nhỏ (ví dụ, xem tài liệu: Cairns, J.A., 2005, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 18:55-66); tuy nhiên, theo hiểu biết của chúng tôi, không có phép trị liệu có tính đối kháng tryptaza sinh học nào, đặc biệt là các kháng thể có tính đối kháng kháng tryptaza, được ghi nhận.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế này đề cập đến các kháng thể kháng tryptaza và các chế phẩm dược của chúng, cũng như các phương pháp sử dụng chất này.

Theo một khía cạnh, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). Theo một số phương án, kháng thể này được định ranh giới bởi sáu HVR bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, 2, 8, 4, 5, và 6. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm S43, P46, và W47 ở vùng khung L2 miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) (FR-L2) (cách đánh số Kabat). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các vùng khung (FR) miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 11); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 12); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 13); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14). Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 15); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKSPKPWIY (SEQ ID NO: 16); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 17); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18). Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77. Theo các phương án khác, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77. Theo các phương án khác, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng

thể này bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RDNYDWYFDV (SEQ ID NO: 29); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 21); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 22); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCAR (SEQ ID NO: 23); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24). Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC (SEQ ID NO: 25); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO: 26); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC (SEQ ID NO: 27); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 28). Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90%, ít nhất 95% trình tự, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 21); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 22); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCAR (SEQ ID NO: 23); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24). Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19. Theo

một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC (SEQ ID NO: 25); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO: 26); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC (SEQ ID NO: 27); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 28). Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc tất cả bốn gốc được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc tất cả bốn gốc được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm His51 và ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, hoặc tất cả mười hai gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO:71. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza beta 1 của người. Theo một số

phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly cả mặt phân giới nhỏ của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người và mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là ETSILTS (SEQ ID NO: 34); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). Theo một số phương án, kháng thể này được định ranh giới bởi sáu HVR bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, và 35. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm Arg71 và Val78 ở FR-H3 miền VH (cách đánh số Kabat). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81. Theo các phương án khác, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51, và 52; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 37, 53, 58, hoặc 59; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81. Theo các phương án khác, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 và miền VL

bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81. Theo các phương án khác, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Gln100, Leu101, và Leu102 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, ít nhất mười hai, ít nhất mười ba, hoặc tất cả mười bốn gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop bao gồm Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129, và Arg216 của

SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, epitop này là so với tetrame tryptaza beta 1 của người, và epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc cả hai gốc trong số Gln35 và Arg216 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly mặt phân giới nhỏ và/hoặc mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 của người.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này còn liên kết tryptaza của khỉ đuôi dài (cyno). Theo một số phương án, kháng thể này còn liên kết tryptaza alpha của người. Theo một số phương án, kháng thể này còn liên kết tryptaza beta 2 của người hoặc tryptaza beta 3 của người. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza beta 2 của người và tryptaza beta 3 của người.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là khoảng 1nM trở xuống. Theo một số phương án, K_D được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là từ khoảng 120pM đến khoảng 0,5nM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là từ khoảng 120pM đến khoảng 300pM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là từ khoảng 120pM đến khoảng 200pM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là khoảng 180pM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là khoảng 400pM. Theo một số phương án, thử nghiệm SPR được thực hiện ở 25°C. Theo một số phương án, K_D được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm SPR BIACORE®, ví dụ, như được mô tả ở Ví dụ 1, Mục (A)(vii). Theo một số phương án, thử nghiệm SPR có thể sử dụng BIACORE® T200 hoặc một thiết bị tương đương. Theo một số phương án, chip cảm biến CM5 Series S BIACORE® (hoặc các chip cảm biến tương đương) được làm bất động bằng kháng thể IgG đơn dòng của chuột kháng của người (Fc) và các kháng thể kháng tryptaza được bắt một cách kế tiếp trên pin dòng chảy. Các dịch pha loãng 3 lần theo dãy nối tiếp của monome tryptaza beta 1 của người được gắn thẻ His (SEQ ID NO: 128) được bơm ở tốc độ dòng chảy là 30µl/phút. Mỗi mẫu được phân tích bằng thời gian kết hợp 3 phút và thời gian phân ly 10 phút. Thử nghiệm này được thực hiện ở 25°C. Sau mỗi lần tiêm, chip được tái tạo bằng cách sử

dụng $MgCl_2$ 3M. Mức đáp ứng liên kết được chỉnh sửa bằng cách lấy pin dòng chảy bắt IgG không liên quan ở mật độ tương tự trừ đi đơn vị đáp ứng (RU). Mô hình Languir 1:1 của phương pháp khớp đồng thời của k_{on} và k_{off} được sử dụng cho phép phân tích động học.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính enzym của tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, kháng thể này ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là khoảng 2,5nM trở xuống như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza beta của người bằng cách sử dụng peptit S-2288 tổng hợp làm chất nền. Theo một số phương án, kháng thể này ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là từ khoảng 550pM đến khoảng 2,5nM. Theo một số phương án, kháng thể này ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là từ khoảng 500pM đến khoảng 2nM. Theo một số phương án, kháng thể này ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là từ khoảng 550nM và 1,5nM. Theo một số phương án, kháng thể này ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là từ khoảng 500pM đến khoảng 700pM. Theo một số phương án, hoạt tính ức chế của kháng thể được xác định như được mô tả ở Ví dụ 1(A)(viii)(a)). Theo một số phương án, nồng độ cuối của heparin trong thử nghiệm enzym tryptaza beta của người bằng cách sử dụng peptit S-2288 tổng hợp là 66µg/ml. Theo một số phương án, enzym có hoạt tính tetrame tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người được pha loãng đến 0,75nM trong dung dịch đệm TNH (Tris 200mM, NaCl 150mM, heparin 0,1mg/ml, TRITON™ X-100 0,01%, độ pH 8,0), và được kết hợp theo tỷ lệ 1:1 với các kháng thể kháng tryptaza (được pha loãng trong PBS) trong các đĩa 384 lỗ. Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ. Chất nền so màu S-2288 (Chromogenix, Số hiệu bộ phận: 82-0852-39), hoặc một chất nền tương đương, được pha loãng đến 1200µM trong dung dịch đệm TNH và được bổ sung vào đĩa. Theo một số phương án, nồng độ trong lỗ cuối cùng là S-2288 400µM, tetrame tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người 0,25nM, heparin 66µg/ml, và kháng thể kháng tryptaza từ 0,10 đến 222nM. Các đĩa được ủ trong 40 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ và sau đó, được đọc ở A_{405}. IC50 của các kháng thể kháng tryptaza được xác định từ đồ thị khớp bốn thông số của các đường cong tương ứng của chúng.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính enzym của tryptaza beta 1 của người ở độ pH 6. Cụ thể là, hoạt tính ức chế của kháng thể có thể được xác định ở độ pH 6.

Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế quá trình kích thích sự tăng sinh tế bào cơ trơn phế quản và/hoặc tình trạng co trên cơ sở colagen do tryptaza làm trung gian. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin dưỡng bào. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin do IgE khởi động và/hoặc quá trình giải phóng histamin do tryptaza khởi động. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế tryptaza D1 của cyno như được đánh giá bằng thử nghiệm ELISA tryptaza có hoạt tính. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính tryptaza trong chất súc rửa phế quản-phế nang (broncheoloar lavage-BAL) của khỉ đuôi dài hoặc mẫu hấp thụ qua màng nhầy mũi. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người khi ở dạng thức có hóa trị một. Theo một số phương án, dạng thức có hóa trị một là dạng thức Fab. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người khi có mặt heparin. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta dạng tetrame khi có mặt heparin 66µg/ml.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể mà liên kết vào cùng một epitop với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây. Theo một số phương án, dù kháng thể này liên kết vào cùng một epitop hay cạnh tranh để liên kết vào tryptaza beta 1 của người thì cũng được xác định bằng thử nghiệm phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng. Theo một số phương án, thử nghiệm phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng là thử nghiệm phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng OCTET® như được mô tả ở Ví dụ 3, Mục C. Theo một số phương án, protein monome tryptaza beta 1 của người được biotin hóa ở gốc Lys bằng cách phản ứng với NHS-PEG4-biotin. Monome đã được biotin hóa được pha loãng đến 5µg/ml trong dung dịch đệm động học (ForteBio, Inc.) và được làm bất động lên trên các mũi cảm biến streptavidin (ForteBio, Inc.). Sau bước làm bất động, thiết bị cảm biến đã được làm bất động vào tryptaza beta 1 của người được làm bão hòa bằng kháng thể

thứ nhất, được pha loãng ở mức 10-20µg/ml, sau đó là quá trình liên kết với kháng thể thứ hai được pha loãng ở mức 2,5µg/ml. Theo một số phương án, thử nghiệm phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng được thực hiện ở 30°C.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật kháng thể mà cạnh tranh để liên kết vào tryptaza beta 1 của người bằng, hoặc phong bế chéo hoặc được phong bế chéo bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này là đơn dòng, của người, được nhân tính hóa, hoặc thể khảm. Theo một số phương án, kháng thể này được nhân tính hóa.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này là mảnh kháng thể mà liên kết tryptaza. Theo một số phương án, mảnh kháng thể này được chọn lựa từ nhóm gồm các mảnh Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, và $(Fab')_2$.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này là kháng thể có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể IgG. Theo một số phương án, kháng thể IgG này là kháng thể IgG1. Theo một số phương án, kháng thể IgG này là kháng thể IgG4. Theo một số phương án, kháng thể IgG4 này bao gồm đột biến ở vùng bản lề. Theo một số phương án, đột biến này là đột biến dạng thay thế. Theo một số phương án, đột biến dạng thay thế này là ở gốc axit amin S228 (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, kháng thể IgG4 này bao gồm đột biến S228P (cách đánh số Châu Âu).

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này là kháng thể đơn đặc hiệu.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể song đặc hiệu. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm miền liên kết thứ nhất mà liên kết vào tryptaza và miền liên kết thứ hai mà liên kết vào một phân tử sinh học thứ hai, trong đó phân tử sinh học thứ hai này được chọn lựa từ nhóm gồm interleukin-13 (IL-13), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-17 (IL-17), IgE, và interleukin-33 (IL-33). Theo một số phương án, phân tử sinh học thứ hai này là IL-13. Theo một số phương án, phân tử sinh học thứ hai này là IL-33. Theo một số phương án, phân tử sinh học thứ hai này là IgE.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này hoặc tập hợp gồm các axit nucleic được phân lập cùng nhau mã hóa kháng thể.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, hoặc tập hợp gồm các axit nucleic được phân lập cùng nhau mã hóa kháng thể, trong đó axit nucleic này bao gồm trình tự mà đồng nhất ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 104 và/hoặc SEQ ID NO: 105. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77, và trong đó axit nucleic hoặc tập hợp này bao gồm trình tự mà đồng nhất ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 106 và/hoặc SEQ ID NO: 107. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79, và trong đó axit nucleic hoặc tập hợp này bao gồm trình tự mà đồng nhất ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 108 và/hoặc SEQ ID NO: 107. Theo một số phương án, axit nucleic hoặc tập hợp này bao gồm trình tự là SEQ ID NO: 108 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37, hoặc tập hợp gồm các axit nucleic được phân lập cùng nhau mã hóa kháng thể, trong đó axit nucleic này bao gồm trình tự mà đồng nhất ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 109 và/hoặc SEQ ID NO: 110. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81, và trong đó axit nucleic hoặc tập hợp này bao gồm trình tự mà đồng nhất ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 111 và/hoặc SEQ ID NO: 112. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83, và trong

đó axit nucleic hoặc tập hợp này bao gồm trình tự mà đồng nhất ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 113 và/hoặc SEQ ID NO: 112. Theo một số phương án, axit nucleic hoặc tập hợp này bao gồm trình tự là SEQ ID NO: 113 và/hoặc SEQ ID NO: 112.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật vật truyền (ví dụ, vật truyền biểu hiện) hoặc tập hợp gồm các vật truyền bao gồm axit nucleic bất kỳ trong số các axit nucleic được phân lập hoặc tập hợp gồm các axit nucleic được phân lập được mô tả trong bản mô tả này. Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật các tế bào chủ bao gồm các axit nucleic và/hoặc các vật truyền và/hoặc tập hợp gồm các axit nucleic và/hoặc tập hợp gồm các vật truyền trên đây. Theo một số phương án, tế bào chủ này là tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, tế bào động vật có vú này là tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (CHO). Theo một số phương án, tế bào chủ này là tế bào nhân sơ. Theo một số phương án, tế bào nhân sơ này là *E. coli*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật phương pháp sản xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ mà bao gồm vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền trên đây (ví dụ, vật truyền biểu hiện) hoặc tập hợp gồm các vật truyền trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp mà cho phép sản xuất kháng thể. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc thu hồi kháng thể từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây. Theo một số phương án, chế phẩm này còn bao gồm chất mang, tá dược, hoặc chất pha loãng dược dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật chế phẩm dược bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và chất mang, tá dược, hoặc chất pha loãng dược dụng, trong đó kháng thể này liên kết vào tryptaza beta 1 dạng monome với K_D là khoảng 0,1nM đến khoảng 1nM, và/hoặc trong đó kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính enzym của tryptaza với nồng độ ức chế một nửa mức tối đa (IC50) là khoảng 0,1nM đến khoảng 5nM như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza in vitro bằng cách sử dụng S-2288 làm chất nền.

Theo một số phương án của khía cạnh trên đây, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D từ khoảng 0,5nM đến khoảng 1nM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D từ khoảng 0,1nM đến khoảng 0,5nM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là khoảng 0,4nM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là khoảng 0,2nM. Theo một số phương án, K_D được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Theo một số phương án, thử nghiệm SPR được thực hiện ở 25°C. Theo một số phương án, K_D được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm SPR BIACORE®, ví dụ, như được mô tả ở Ví dụ 1, Mục (A)(vii). Theo một số phương án, thử nghiệm SPR có thể sử dụng BIACORE® T200 hoặc một thiết bị tương đương. Theo một số phương án, chip cảm biến CM5 Series S BIACORE® (hoặc các chip cảm biến tương đương) được làm bất động bằng kháng thể IgG đơn dòng của chuột kháng của người (Fc) và các kháng thể kháng tryptaza được bắt một cách kế tiếp trên pin dòng chảy. Các dịch pha loãng 3 lần theo dãy nối tiếp của monome tryptaza beta 1 của người được gắn thẻ His (SEQ ID NO: 128) được bơm ở tốc độ dòng chảy là 30µl/phút. Mỗi mẫu được phân tích bằng thời gian kết hợp 3 phút và thời gian phân ly 10 phút. Thử nghiệm này được thực hiện ở 25°C. Sau mỗi lần tiêm, chip được tái tạo bằng cách sử dụng $MgCl_2$ 3M. Mức đáp ứng liên kết được chỉnh sửa bằng cách lấy pin dòng chảy bắt IgG không liên quan ở mật độ tương tự trừ đi đơn vị đáp ứng (RU). Mô hình Languir 1:1 của phương pháp khớp đồng thời của k_{on} và k_{off} là được sử dụng cho phép phân tích động học.

Theo một số phương án của khía cạnh trên đây, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là khoảng 0,5nM đến khoảng 5nM. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là khoảng 0,1nM đến khoảng 2nM. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 4nM. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là khoảng 0,6nM. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính tryptaza ở độ pH 6 trong thử nghiệm enzym tryptaza in vitro bằng cách sử dụng S-2288 làm chất nền. Theo một số phương án, hoạt tính ức chế của kháng thể được xác định như được mô tả trong phần các Ví dụ (ví dụ, Ví dụ 1, Mục (A)(viii)(a)). Theo một số phương án, enzym có hoạt tính tetrame tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người được pha loãng đến 0,75nM trong

dung dịch đệm TNH (Tris 200mM, NaCl 150mM, heparin 0,1mg/ml, TRITON™ X-100 0,01%, độ pH 8,0), và được kết hợp theo tỷ lệ 1:1 với các kháng thể kháng tryptaza (được pha loãng trong PBS) trong các đĩa 384 lỗ. Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ. Chất nền so màu S-2288 (Chromogenix, Số hiệu bộ phận: 82-0852-39), hoặc một chất nền tương đương, được pha loãng đến 1200µM trong dung dịch đệm TNH và được bổ sung vào đĩa. Theo một số phương án, nồng độ trong lỗ cuối cùng là S-2288 400µM, tetrame tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người 0,25nM, heparin 66µg/ml, và kháng thể kháng tryptaza từ 0,10 đến 222nM. Các đĩa được ủ trong 40 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ và sau đó, được đọc ở A_{405}. IC50 của các kháng thể kháng tryptaza được xác định từ đồ thị khớp bốn thông số của các đường cong tương ứng của chúng. Theo một số phương án, nồng độ cuối của heparin trong thử nghiệm enzym tryptaza beta của người bằng cách sử dụng peptit S-2288 tổng hợp là 66µg/ml.

Theo một số phương án của khía cạnh trên đây, kháng thể này có khả năng ức chế quá trình kích thích sự tăng sinh tế bào cơ trơn phế quản và/hoặc tình trạng co trên cơ sở colagen do tryptaza làm trung gian. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin dưỡng bào. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin do IgE khởi động và/hoặc quá trình giải phóng histamin do tryptaza khởi động. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính tryptaza trong chất súc rửa phế quản-phế nang (BAL) của khỉ đuôi dài hoặc mẫu hấp thụ qua màng nhầy mũi. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người khi ở dạng thức có hóa trị một. Theo một số phương án, dạng thức có hóa trị một là dạng thức Fab. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người khi có mặt heparin. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta dạng tetrame khi có mặt heparin 66µg/ml.

Theo một số phương án của khía cạnh trên đây, kháng thể này bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID

NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 11); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 12); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 13); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14). Theo một số phương án, miền VH của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 15); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKSPKPWIY (SEQ ID NO: 16); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 17); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18). Theo một số phương án, miền VL của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc tất cả bốn gốc được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm His51 và ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Val 80, Lys81, và Asp82 của SEQ

ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, hoặc tất cả mười hai gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO:71. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly cả mặt phân giới nhỏ của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người và mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người.

Theo các phương án khác của khía cạnh trên đây, kháng thể này bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là ETSILTS (SEQ ID NO: 34); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51, và 52; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 37, 53, 58, hoặc 59; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) FR-H3 bao gồm trình

tự axit amin là RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). Theo một số phương án, miền VH của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). Theo một số phương án, miền VL của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Gln100, Leu101, và Leu102 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, ít nhất mười hai, ít nhất mười ba, hoặc tất cả mười bốn gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop bao gồm Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129, và Arg216 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, epitop này là so với tetrame tryptaza beta 1 của người, và epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc cả hai gốc trong số Gln35 và Arg216 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop

được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly mặt phân giới nhỏ và/hoặc mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 của người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và chất mang, tá dược, hoặc chất pha loãng dược dụng, trong đó kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc tất cả bốn gốc được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm His51 và ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, hoặc tất cả mười hai gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO:71. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly cả mặt phân giới nhỏ của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người và mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3

bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 11); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 12); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 13); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14). Theo một số phương án, miền VH của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 15); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKSPKPWIY (SEQ ID NO: 16); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 17); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18). Theo một số phương án, miền VL của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và chất mang, tá dược, hoặc chất pha loãng dược dụng, trong đó kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Gln100, Leu101, và Leu102 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55,

Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, ít nhất mười hai, ít nhất mười ba, hoặc tất cả mười bốn gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop bao gồm Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129, và Arg216 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, epitop này là so với tetrame tryptaza beta 1 của người, và epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc cả hai gốc trong số Gln35 và Arg216 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly mặt phân giới nhỏ và/hoặc mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là ETSILTS (SEQ ID NO: 34); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51, và 52; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 37, 53, 58, hoặc 59; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VH sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) FR-H3 bao gồm trình

tự axit amin là RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). Theo một số phương án, miền VH của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR miền VL sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). Theo một số phương án, miền VL của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83.

Theo một số phương án, kháng thể này còn có khả năng liên kết vào tryptaza alpha của người, tryptaza beta 2, tryptaza beta 3 và/hoặc tryptaza D1 của cyno.

Trong chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược), kháng thể này có thể là đơn dòng, của người, được nhân tính hóa, hoặc thể khảm. Theo một số phương án, kháng thể này được nhân tính hóa.

Trong chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược), chế phẩm này có thể dùng để sử dụng ở người.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể được đông khô. Theo các phương án khác, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể là chất lỏng.

Trong chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược), tá dược này có thể là chất chống oxy hóa. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều chất chống oxy hóa được chọn lựa từ nhóm gồm N-axetyltryptophan, tryptophan, metionin, xystein, glutathion, thiosorbitol, axit ascorbic, monothioglyxerol, xyclodextrin, Trolox (axit 6-hydroxy-2,5,7,8- tetrametylchroman-2-carboxylic), pyridoxin, manitol, và chất tạo chelat kim loại. Theo một số phương án, chế

phẩm bao gồm N-axetyltryptophan hoặc metionin. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm N-axetyltryptophan và metionin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) bao gồm: (i) kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), trong đó mức oxy hóa của tryptophan ở vị trí 6 của HVR-H3 (SEQ ID NO: 8) là không nhiều hơn 30%. Theo một số phương án, mức oxy hóa của tryptophan ở vị trí 6 của HVR-H3 (SEQ ID NO: 8) là không nhiều hơn 28%, 25%, 20%, 15%, 10%, hoặc 6%. Theo một số phương án, mức oxy hóa của tryptophan ở vị trí 6 của HVR-H3 (SEQ ID NO: 8) được xác định sau xét nghiệm về tình trạng căng thẳng AAPH.Theo một số phương án, mức oxy hóa của tryptophan ở vị trí 6 của HVR-H3 (SEQ ID NO: 8) được xác định trong vòng một năm từ thời điểm sản xuất ban đầu của chế phẩm.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể bao gồm N-axetyltryptophan ở mức nồng độ là khoảng 0,1mM đến khoảng 5mM. Theo một số phương án, nồng độ của N-axetyltryptophan là khoảng 0,1mM đến khoảng 1mM. Theo một số phương án, nồng độ của N-axetyltryptophan là khoảng 0,3mM. Theo một số phương án, chế phẩm bao gồm metionin ở mức nồng độ là khoảng 1mM đến khoảng 20mM. Theo một số phương án, nồng độ của metionin là khoảng 1mM đến khoảng 10mM. Theo một số phương án, nồng độ của metionin là khoảng 5mM.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) bao gồm: (i) kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao

gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và

(f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6); (ii) N-axetyltryptophan ở mức nồng độ là khoảng 0,1mM đến khoảng 1mM; và (iii) metionin ở mức nồng độ là khoảng 1mM đến khoảng 10mM.

Trong chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược), nồng độ kháng thể có thể là khoảng 1mg/ml đến khoảng 250mg/ml. Theo một số phương án, nồng độ kháng thể là khoảng 150mg/ml.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể còn bao gồm một hoặc nhiều tá dược bổ sung được chọn lựa từ nhóm gồm chất làm ổn định, dung dịch đệm, chất hoạt động bề mặt, và chất trương lực. Theo một số phương án, chế phẩm này còn bao gồm dung dịch đệm. Theo một số phương án, dung dịch đệm này là arginin suxinat và/hoặc histidin suxinat. Theo một số phương án, dung dịch đệm bao gồm arginin suxinat và histidin suxinat. Theo một số phương án, nồng độ của arginin suxinat là khoảng 50mM đến khoảng 500mM. Theo một số phương án, nồng độ của arginin suxinat là khoảng 100mM đến khoảng 300mM. Theo một số phương án, nồng độ của arginin suxinat là khoảng 200mM. Theo một số phương án, nồng độ của histidin suxinat là khoảng 1mM đến khoảng 50mM. Theo một số phương án, nồng độ của histidin suxinat là khoảng 15mM đến khoảng 25mM. Theo một số phương án, nồng độ của histidin suxinat là khoảng 20mM. Theo một số phương án, chế phẩm này còn bao gồm chất hoạt động bề mặt. Theo một số phương án, chất hoạt động bề mặt là poloxame 188 hoặc polysorbat 20. Theo một số phương án, chất hoạt động bề mặt là poloxame 188. Theo một số phương án, nồng độ của poloxame 188 là khoảng 0,005% đến khoảng 0,1%. Theo một số phương án, nồng độ của poloxame 188 là khoảng 0,005% đến khoảng 0,05%. Theo một số phương án, nồng độ của poloxame 188 là khoảng 0,02%. Theo một số phương án, độ pH của chế phẩm là khoảng 4,5 đến khoảng 7,0. Theo một số phương án, độ pH của chế phẩm là khoảng 4,5 đến khoảng 6,5. Theo một số phương án, độ pH của chế phẩm là khoảng 5,5. Theo một số phương án, chế phẩm là ở trong vật chứa chắn sáng. Theo một số phương án, chế phẩm này là ở trong bơm tiêm được làm đầy trước.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể còn bao gồm chất đối kháng liên kết trục IL-13, chất đối kháng liên kết trục IL-5,

chất đối kháng liên kết trục IL-33, chất đối kháng mồi M1, chất đối kháng IgE, chất đối kháng TRPA1, chất đối kháng CRTH2, chất làm giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn, chất điều biến miễn dịch, corticosteroit, chất ức chế con đường Th2, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-13 là lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33. Theo một số phương án, chất đối kháng mồi M1 là quilizumab. Trong một số trường hợp, chất đối kháng IgE là omalizumab (XOLAIR®).

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể được tạo dạng chế phẩm để cho con người dùng. Theo các phương án nhất định, các chế phẩm dược bao gồm các kháng thể mà không bao gồm trình tự vùng hằng định không phải của người. Theo các phương án nhất định, các chế phẩm dược bao gồm các kháng thể mà không bao gồm trình tự vùng khung không phải của người và trình tự vùng hằng định không phải của người. Theo các phương án nhất định, các chế phẩm dược bao gồm các kháng thể là kháng thể của người, kháng thể được nhân tính hóa hoặc kháng thể thể khảm.

Theo một số khía cạnh, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây có thể được sử dụng làm dược phẩm.

Theo một số khía cạnh, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây có thể được sử dụng trong việc điều trị rối loạn. Theo một số phương án, rối loạn này được chọn lựa từ nhóm gồm rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi. Theo một số phương án, rối loạn phổi được chọn lựa từ nhóm

gồm hen suyễn, tình trạng tăng tính đáp ứng khí đạo, và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Theo một số phương án, rối loạn phổi này là hen suyễn. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 cao hoặc hen suyễn do mức Th2 thấp. Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch được chọn lựa từ nhóm gồm viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, bệnh viêm ruột (IBD), và bệnh Crohn. Theo một số phương án, rối loạn viêm là mày đay vô căn mạn tính (CIU, còn được gọi là mày đay tự phát mạn tính, CSU), hiện tượng phản vệ, sốc phản vệ, viêm da cơ địa, hoặc viêm mũi dị ứng. Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là bệnh thâm nhiễm dưỡng bào. Theo một số phương án, kháng thể này là để sử dụng ở dạng kết hợp với chất trị liệu phụ thêm. Theo một số phương án, chất trị liệu phụ thêm này là chất đối kháng liên kết trục IL-13, chất đối kháng liên kết trục IL-5, chất đối kháng liên kết trục IL-33, chất đối kháng mồi M1, chất đối kháng IgE, chất đối kháng TRPA1, chất đối kháng CRTH2, chất làm giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn, chất điều biến miễn dịch, corticosteroit, chất ức chế con đường Th2, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-13 là lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33. Theo một số phương án, chất đối kháng mồi M1 là quilizumab. Theo một số phương án, kháng thể này là để cho dùng theo kiểu dưới da, theo kiểu trong tĩnh mạch, theo kiểu trong cơ, theo kiểu khu trú, bằng đường miệng, theo kiểu qua da, theo kiểu trong màng bụng, theo kiểu trong hốc mắt, bằng phương pháp cấy ghép, bằng phương pháp xông hít, theo kiểu trong khoang dịch não tủy, theo kiểu trong não thất, hoặc theo kiểu trong mũi. Theo một số

phương án, kháng thể này là để cho dùng theo kiểu dưới da. Theo một số phương án, kháng thể này là để sử dụng ở đối tượng là người.

Theo một số khía cạnh, một chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể được sử dụng làm dược phẩm.

Theo một số khía cạnh, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể được sử dụng trong việc điều trị rối loạn. Theo một số phương án, rối loạn này được chọn lựa từ nhóm gồm rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi. Theo một số phương án, rối loạn phổi được chọn lựa từ nhóm gồm hen suyễn, tình trạng tăng tính đáp ứng khí đạo, và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Theo một số phương án, rối loạn phổi này là hen suyễn. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 cao hoặc hen suyễn do mức Th2 thấp. Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch được chọn lựa từ nhóm gồm viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, bệnh viêm ruột (IBD), và bệnh Crohn. Theo một số phương án, rối loạn viêm là mày đay vô căn mạn tính (CIU hoặc CSU), hiện tượng phản vệ, sốc phản vệ, viêm da cơ địa, hoặc viêm mũi dị ứng. Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là bệnh thâm nhiễm dưỡng bào. Theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) này là để sử dụng ở dạng kết hợp với chất trị liệu phụ thêm. Theo một số phương án, chất trị liệu phụ thêm là chất đối kháng liên kết trục IL-13, chất đối kháng liên kết trục IL-5, chất đối kháng liên kết trục IL-33, chất đối kháng mồi M1, chất đối kháng IgE, chất đối kháng TRPA1, chất đối kháng CRTH2, chất làm giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn, chất điều biến miễn dịch, corticosteroit,

chất ức chế con đường Th2, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-13 là lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33. Theo một số phương án, chất đối kháng mồi M1 là quilizumab. Theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) này là để cho dùng theo kiểu dưới da, theo kiểu trong tĩnh mạch, theo kiểu trong cơ, theo kiểu khu trú, bằng đường miệng, theo kiểu qua da, theo kiểu trong màng bụng, theo kiểu trong hốc mắt, bằng phương pháp cấy ghép, bằng phương pháp xông hít, theo kiểu trong khoang dịch não tủy, theo kiểu trong não thất, hoặc theo kiểu trong mũi. Theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) này là để cho dùng theo kiểu dưới da. Theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) này là để sử dụng ở đối tượng là người.

Theo một số khía cạnh, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây có thể được sử dụng trong việc sản xuất dược phẩm dùng để điều trị rối loạn. Theo một số phương án, rối loạn này được chọn lựa từ nhóm gồm rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi. Theo một số phương án, rối loạn phổi được chọn lựa từ nhóm gồm hen suyễn, tình trạng tăng tính đáp ứng khí đạo, và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Theo một số phương án, rối loạn phổi này là hen suyễn. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 cao hoặc hen suyễn do mức Th2 thấp. Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch được chọn lựa từ nhóm gồm viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, bệnh viêm ruột (IBD), và bệnh Crohn. Theo một số phương án, rối loạn viêm là mày đay vô căn mạn tính (CIU hoặc CSU), hiện tượng phản vệ, sốc phản vệ, viêm da cơ địa,

hoặc viêm mũi dị ứng. Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là bệnh thâm nhiễm dưỡng bào. Theo một số phương án, dược phẩm này được tạo dạng chế phẩm để sử dụng ở dạng kết hợp với chất trị liệu phụ thêm. Theo một số phương án, chất trị liệu phụ thêm là chất đối kháng liên kết trục IL-13, chất đối kháng liên kết trục IL-5, chất đối kháng liên kết trục IL-33, chất đối kháng mồi M1, chất đối kháng IgE, chất đối kháng TRPA1, chất đối kháng CRTH2, chất làm giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn, chất điều biến miễn dịch, corticosteroit, chất ức chế con đường Th2, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-13 là lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33. Theo một số phương án, chất đối kháng mồi M1 là quilizumab. Theo một số phương án, dược phẩm này được tạo dạng chế phẩm để cho dùng theo kiểu dưới da, theo kiểu trong tĩnh mạch, theo kiểu trong cơ, theo kiểu khu trú, bằng đường miệng, theo kiểu qua da, theo kiểu trong màng bụng, theo kiểu trong hốc mắt, bằng phương pháp cấy ghép, bằng phương pháp xông hít, theo kiểu trong khoang dịch não tủy, theo kiểu trong não thất, hoặc theo kiểu trong mũi. Theo một số phương án, dược phẩm này được tạo dạng chế phẩm để cho dùng theo kiểu dưới da. Theo một số phương án, dược phẩm này được tạo dạng chế phẩm để sử dụng ở đối tượng là người.

Theo một số khía cạnh, một chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược) có thể được sử dụng trong việc sản xuất dược phẩm dùng để điều trị rối loạn. Theo một số phương án, rối loạn này được chọn lựa từ nhóm gồm rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn

bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi. Theo một số phương án, rối loạn phổi được chọn lựa từ nhóm gồm hen suyễn, tình trạng tăng tính đáp ứng khí đạo, và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Theo một số phương án, rối loạn phổi này là hen suyễn. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 cao hoặc hen suyễn do mức Th2 thấp. Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch được chọn lựa từ nhóm gồm viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, bệnh viêm ruột (IBD), và bệnh Crohn. Theo một số phương án, rối loạn viêm là mày đay vô căn mạn tính (CIU hoặc CSU), hiện tượng phản vệ, sốc phản vệ, viêm da cơ địa, hoặc viêm mũi dị ứng. Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là bệnh thâm nhiễm dưỡng bào. Theo một số phương án, dược phẩm này được tạo dạng chế phẩm để sử dụng ở dạng kết hợp với chất trị liệu phụ thêm. Theo một số phương án, chất trị liệu phụ thêm là chất đối kháng liên kết trục IL-13, chất đối kháng liên kết trục IL-5, chất đối kháng liên kết trục IL-33, chất đối kháng mồi M1, chất đối kháng IgE, chất đối kháng TRPA1, chất đối kháng CRTH2, chất làm giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn, chất điều biến miễn dịch, corticosteroit, chất ức chế con đường Th2, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-13 là lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33. Theo một số phương án, chất đối kháng mồi M1 là quilizumab. Theo một số phương án, dược phẩm này được tạo dạng chế phẩm để cho

dùng theo kiểu dưới da, theo kiểu trong tĩnh mạch, theo kiểu trong cơ, theo kiểu khu trú, bằng đường miệng, theo kiểu qua da, theo kiểu trong màng bụng, theo kiểu trong hốc mắt, bằng phương pháp cấy ghép, bằng phương pháp xông hít, theo kiểu trong khoang dịch não tủy, theo kiểu trong não thất, hoặc theo kiểu trong mũi. Theo một số phương án, dược phẩm này được tạo dạng chế phẩm để cho dùng theo kiểu dưới da. Theo một số phương án, dược phẩm này được tạo dạng chế phẩm để sử dụng ở đối tượng là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật phương pháp điều trị rối loạn ở đối tượng cần đến phương pháp này, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu về mặt trị liệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây. Theo một số phương án, rối loạn này được chọn lựa từ nhóm gồm rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi. Theo một số phương án, rối loạn phổi được chọn lựa từ nhóm gồm hen suyễn, tình trạng tăng tính đáp ứng khí đạo, và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Theo một số phương án, rối loạn phổi này là hen suyễn. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 cao hoặc hen suyễn do mức Th2 thấp. Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch được chọn lựa từ nhóm gồm viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, bệnh viêm ruột (IBD), và bệnh Crohn. Theo một số phương án, rối loạn viêm là mày đay vô căn mạn tính (CIU hoặc CSU), hiện tượng phản vệ, sốc phản vệ, viêm da cơ địa, hoặc viêm mũi dị ứng. Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là bệnh thâm nhiễm dưỡng bào. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho đối tượng dùng chất trị liệu phụ thêm. Theo một số phương án, chất trị liệu phụ thêm là chất đối kháng liên kết trục IL-

13, chất đối kháng liên kết trục IL-5, chất đối kháng liên kết trục IL-33, chất đối kháng mồi M1, chất đối kháng IgE, chất đối kháng TRPA1, chất đối kháng CRTH2, chất làm giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn, chất điều biến miễn dịch, corticosteroit, chất ức chế con đường Th2, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-13 là lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33. Theo một số phương án, chất đối kháng mồi M1 là quilizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng IgE là omalizumab (XOLAIR®). Theo một số phương án, kháng thể được cho dùng theo kiểu dưới da, theo kiểu trong tĩnh mạch, theo kiểu trong cơ, theo kiểu khu trú, bằng đường miệng, theo kiểu qua da, theo kiểu trong màng bụng, theo kiểu trong hốc mắt, bằng phương pháp cấy ghép, bằng phương pháp xông hít, theo kiểu trong khoang dịch não tủy, theo kiểu trong não thất, hoặc theo kiểu trong mũi. Theo một số phương án, đối tượng này là con người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế nêu bật phương pháp điều trị rối loạn ở đối tượng cần đến phương pháp này, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu về mặt trị liệu của một chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm trên đây (ví dụ, các chế phẩm dược). Theo một số phương án, rối loạn này được chọn lựa từ nhóm gồm rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi. Theo một số phương án, rối loạn phổi được chọn lựa từ nhóm gồm hen suyễn, tình trạng tăng tính đáp ứng khí đạo, và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Theo một số phương án, rối loạn phổi này là hen suyễn. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 cao hoặc hen suyễn do mức Th2 thấp. Theo một số phương

án, rối loạn tự miễn dịch được chọn lựa từ nhóm gồm viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, bệnh viêm ruột (IBD), và bệnh Crohn. Theo một số phương án, rối loạn viêm là mày đay vô căn mạn tính (CIU hoặc CSU), hiện tượng phản vệ, sốc phản vệ, viêm da cơ địa, hoặc viêm mũi dị ứng. Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là bệnh thâm nhiễm dưỡng bào. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho đối tượng dùng chất trị liệu phụ thêm. Theo một số phương án, chất trị liệu phụ thêm này là chất đối kháng liên kết trục IL-13, chất đối kháng liên kết trục IL-5, chất đối kháng liên kết trục IL-33, chất đối kháng mồi M1, chất đối kháng IgE, chất đối kháng TRPA1, chất đối kháng CRTH2, chất làm giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn, chất điều biến miễn dịch, corticosteroit, chất ức chế con đường Th2, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-13 là lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33. Theo một số phương án, chất đối kháng mồi M1 là omalizumab (XOLAIR®). Theo một số phương án, chế phẩm được cho dùng theo kiểu dưới da, theo kiểu trong tĩnh mạch, theo kiểu trong cơ, theo kiểu khu trú, bằng đường miệng, theo kiểu qua da, theo kiểu trong màng bụng, theo kiểu trong hốc mắt, bằng phương pháp cấy ghép, bằng phương pháp xông hít, theo kiểu trong khoang dịch não tủy, theo kiểu trong não thất, hoặc theo kiểu trong mũi. Theo một số phương án, đối tượng này là con người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

HÌNH 1 là dạng xếp thẳng hàng trình tự của miền VH và miền VL của hu31A.v11 và huE104.v2 thể hiện các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) theo các tên gọi Kabat, Chothia và Contact. Các vùng siêu biến (HVR) thì được gạch dưới.

HÌNH 2A là một dãy nối tiếp gồm các biểu đồ thể hiện các kết quả của phép phân tích về sự ức chế của IgG hu31A.v11 và IgG huE104.v2 như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza của người. Cả hai kháng thể đã ức chế hoàn toàn hoạt tính enzym tryptaza.

Các **Hình 2B** và **2C** là các biểu đồ thể hiện các kết quả của các thử nghiệm về sự tăng sinh tế bào cơ trơn (SMC) khí đạo sơ cấp của người (Hình 2B) và tình trạng co tế bào cơ trơn (SMC) khí đạo sơ cấp của người (Hình 2C). Việc bổ sung tryptaza beta đã kích thích quá trình tăng sinh SMC khí đạo sơ cấp của người, quá trình này được ức chế theo phương thức phụ thuộc liều lượng bằng việc bổ sung kháng thể kháng tryptaza IgG4 hu31A.v11 hoặc IgG4 huE104.v2 (Hình 2B). Việc bổ sung tryptaza cũng đã kích thích tình trạng co SMC khí đạo sơ cấp của người, quá trình này cũng được ức chế bằng việc bổ sung IgG4 hu31A.v11 và IgG4 huE104.v2 (Hình 2C).

Các **Hình 2D** và **2E** là các biểu đồ thể hiện các kết quả của các thử nghiệm về hiện tượng thoát hạt dưỡng bào mà trong đó các dưỡng bào được kích thích in vitro bằng việc bổ sung tryptaza beta hoặc IgE kháng 4-hydroxy-3-nitrophenylaxetyl (NP) và NP. Việc bổ sung tryptaza đã đem lại quá trình giải phóng histamin, quá trình này được phong bế bằng việc bổ sung hu31A.v11 (Hình 2D). Tryptaza đột biến không có hoạt tính theo kiểu xúc tác (S195A) đóng vai trò là đối chứng. Việc bổ sung IgE và NP cũng đã đem lại quá trình giải phóng histamin, quá trình này được ức chế (30-50%) bằng việc bổ sung chất ức chế phân tử nhỏ (SMI) của tryptaza hoặc hu31A.v11 (Hình 2E).

Hình 3A là biểu đồ thể hiện các kết quả của hiện tượng phân ly của tetrame tryptaza beta 1 của người bằng Fab hu31A.v11 được phân tích bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC). Ba lần chạy được phân tích bằng SEC: lần chạy 1 chứa một mình tryptaza dạng tetrame WT mà thôi, lần chạy này đã đem lại đỉnh 1 với thời gian lưu Tr = 26 phút, thể tích lưu Vr = 13ml; lần chạy 2 chứa tryptaza dạng tetrame WT + Fab hu31A.v11 + heparin, lần chạy này đã đem lại đỉnh 2 (Tr = 27,6 phút, Vr= 13,8ml) và đỉnh 4 (Tr = 31 phút, Vr = 15,5ml); lần chạy 3 chứa tryptaza dạng tetrame WT + Fab hu31A.v11 mà

không có heparin, lần chạy này đã đem lại đỉnh 3 (Tr = 28,1 phút, Vr = 14ml) và đỉnh 4 (Tr = 31 phút, Vr = 15,5ml).

Hình 3B là biểu đồ thể hiện các kết quả của hiện tượng phân ly của tetrame tryptaza beta 1 của người bằng Fab huE104.v2. Ba lần chạy được phân tích bằng SEC: lần chạy 1 chứa tryptaza dạng monome được gắn thẻ His + Fab huE104.v2, lần chạy này đã đem lại đỉnh 2 (Tr = 25,8 phút) và đỉnh 6 (31,6 phút); lần chạy 2 chứa tryptaza dạng tetrame WT + Fab huE104.v2, lần chạy này đã đem lại đỉnh 3 (Tr = 26 phút) và đỉnh 7 (Tr = 31,8 phút); và lần chạy 3 chứa tryptaza dạng tetrame WT + Fab huE104.v2 + heparin, lần chạy này đã đem lại đỉnh 1 (Tr= 21 phút), đỉnh 4 (Tr = 27,2 phút) và đỉnh 5 (Tr= 31,2 phút).

Các **Hình 4A** và **4B** là dãy nối tiếp gồm các biểu đồ thể hiện các kết quả của sự mô phỏng dược động (PK) mà so sánh PK và hoạt tính trung hòa của kháng thể kháng tryptaza làm phân ly với kháng thể làm ổn định đặc hiệu với tetrame tryptaza ở mức tryptaza đường chuẩn (huyết thanh 4ng/ml, mô phổi 10ng/ml, Hình 4A) hoặc mức tryptaza cao (huyết thanh 10ng/ml, mô phổi 40ng/ml, Hình 4B).

Hình 4C là một dãy nối tiếp gồm các biểu đồ thể hiện các kết quả của sự mô phỏng hoạt tính trung hòa so sánh kháng thể kháng tryptaza làm phân ly và kháng thể làm ổn định đặc hiệu với tetrame tryptaza ở mức tryptaza đường chuẩn hoặc mức tryptaza cao.

Các **Hình 5A** và **5B** thể hiện các hình ảnh của các gel điện di gel polyacrylamit natri dodexyl sulfat (SDS-PAGE) được nhuộm bằng phẩm xanh lam Coomassie (các ô trên cùng), thể hiện rằng tryptaza beta 1 của người đã phân cắt fibrinogen thành các mảnh peptit ở cả độ pH 6 (Hình 5A) và 7,5 (Hình 5B). Kháng thể kháng tryptaza Fab hu31A.v11 đã phong bế quá trình phân cắt fibrinogen ở cả độ pH 6 và pH 7,5, trong khi Fab huE102.v2 thì không, trong các điều kiện thử nghiệm có nồng độ cao của heparin. Làn 1, chỉ fibrinogen mà thôi, thể hiện các chuỗi alpha, beta, và gamma của fibrinogen không được phân cắt; làn 2, fibrinogen và tryptaza beta; làn 3, fibrinogen, tryptaza beta, và Fab hu31A.v11; làn 4, fibrinogen, tryptaza beta, và IgG B12; làn 5, fibrinogen, tryptaza beta 1, và Fab huE104.v2; và làn 6 thể hiện chỉ một mình mIgG1 B12. Sự giảm về cường độ của chuỗi alpha biểu lộ hoạt tính thủy phân protein tryptaza, hoạt tính này được phân tích và được định lượng trong các ô dưới cùng.

Hình 6A là biểu đồ thể hiện các kết quả của hiện tượng phân ly của tetrame WT hoặc tetrame đột biến bằng Fab hu31A.v11. Bốn lần chạy được phân tích bằng SEC: lần chạy 1 chứa tetrame WT + Fab huE104.v1, lần chạy này đã đem lại đỉnh tham chiếu (Tr = 21,6 phút); lần chạy 2 chứa tetrame biến thể Y75C + Fab hu31A.v11, lần chạy này đã đem lại đỉnh 1 (Tr = 25,6 phút) và đỉnh 4 (Tr = 31,6 phút); lần chạy 3 chứa tetrame biến thể I99C + Fab hu31A.v11, lần chạy này đã đem lại đỉnh 2 (Tr = 23,9 phút) và đỉnh 4 (Tr = 31,6 phút); và lần chạy 4 chứa tetrame WT + Fab hu31A.v11, lần chạy này đã đem lại đỉnh 3 (Tr = 28,1 phút) và đỉnh 4 (Tr = 31,6 phút).

Hình 6B thể hiện các kết quả của phép phân tích gel SDS-PAGE được nhuộm bằng phẩm xanh lam Coomassie của sắc ký loại trừ theo kích cỡ các đỉnh của Hình 6A. Fab hu31A.v11 đã tạo các phức hợp với các thể đột biến tryptaza Y75C và I99C và đã làm phân ly tetrame thành các dime được liên kết theo kiểu cộng hóa trị.

Hình 6C là biểu đồ thể hiện các kết quả của hiện tượng phân ly của tetrame WT hoặc tetrame đột biến bằng Fab huE104.v2. Ba lần chạy được phân tích bằng SEC: lần chạy 1 chứa tetrame biến thể Y75C + Fab huE104.v2, lần chạy này đã đem lại đỉnh 1 (Tr = 21,6 phút) và đỉnh 4 (Tr= 31 phút); lần chạy 2 chứa tetrame biến thể I99C + Fab huE104.v2, lần chạy này đã đem lại đỉnh 2 và đỉnh 5 (Tr = 31 phút); và lần chạy 3 chứa tetrame WT + Fab huE104.v2, lần chạy này đã đem lại đỉnh 3 (Tr = 26 phút) và đỉnh 6 (Tr = 31,8 phút). Các kết quả này thể hiện rằng Fab huE104.v2 đã tạo các phức hợp với các thể đột biến tryptaza Y75C và I99C và chỉ làm phân ly tetrame được khóa vào mặt phân giới lớn I99C thành các dime được liên kết theo kiểu cộng hóa trị. Các đỉnh 4, 5 và 6 đều chứa lượng dư Fab như được xác định bằng SDS-PAGD (dữ liệu không được thể hiện).

Hình 7 thể hiện trình tự axit amin của tryptaza beta 1 trưởng thành của người cùng với cách đánh số trình tự gen và hệ thống đánh số chymotrypsinogen ("chymo-numb") thường được sử dụng cho serin trypsin động vật có vú.

Hình 8 thể hiện epitop liên kết của Fab hu31A.v11 trên tryptaza beta 1 của người (các gốc tryptaza đều theo cách đánh số chymotrypsinogen).

Hình 9 là dạng kết xuất đồ họa thể hiện dạng lập mô hình của Fab hu31A.v11 lên trên tetrame tryptaza. Các monome tryptaza trong phức hợp với Fab hu31A.v11 được xếp thẳng hàng với các protome A và C ở tetrame tryptaza. Các chuỗi nặng và các chuỗi

nhẹ được biểu lộ. Các điểm đối nghịch giữa các chuỗi nhẹ của Fab hu31A.v11 trên các protome tryptaza liền kề ở mô hình này được làm nổi bật bằng hình trái xoan nét đứt.

Hình 10 thể hiện những thay đổi hình thể ở vòng 60s của tryptaza được phát hiện ở cấu trúc phức hợp. Val60c và Val90 (được thể hiện ở dạng que) tạo ra túi kỵ nước dùng cho quá trình liên kết Tyr173d từ protome lân cận trong vai trò là một phần của hiện tượng tương tác protein-protein ở mặt phân giới lớn của tryptaza dạng tetrame. Các protome tryptaza ở hình thể tetrame được biểu lộ. Tryptaza đã được liên kết vào Fab hu31A.v11 được xếp chồng với một protome của phức hợp tetrame. Hình thể của Val60c thay đổi khi Fab hu31A.v11 được liên kết, điều này tạo ra sự cản trở không gian mà được kỳ vọng là phòng ngừa Tyr173d khỏi liên kết vào túi đó (các gốc tryptaza đều theo cách đánh số chymotrypsinogen).

Hình 11 thể hiện những thay đổi hình thể ở vòng 30s của tryptaza nằm ở mặt phân giới nhỏ được phát hiện ở cấu trúc phức hợp sau khi liên kết vào hu31A.v11.

Hình 12A là dạng kết xuất đồ họa của cấu trúc tinh thể của tetrame tryptaza WT trong phức hợp với bốn Fab huE104.v1. Các protome tryptaza được biểu lộ theo quá trình đánh dấu bằng chữ hoặc các protome (xem Pereira et al. *Nature* 392:306-311, 1998).

Hình 12B là dạng kết xuất đồ họa của tác dụng của sự liên kết huE104.v1 đối với mặt phân giới nhỏ của tetrame tryptaza như được đánh giá bằng phương pháp trao đổi hydro-dơteri (HDX).

Hình 13 là biểu đồ thể hiện các kết quả của phép phân tích dược động (PK) của các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa huE104.v2 và hu31A.v11, mỗi chất được cho dùng bằng phương pháp tiêm trong tĩnh mạch (IV) các con chuột C57BL/6 ở mức 1 hoặc 10mg/kg. Biểu đồ này thể hiện nồng độ kháng thể kháng tryptaza (µg/ml) ở dạng hàm số của thời gian (ngày). Các kết quả này là từ ba con vật.

Hình 14 là biểu đồ thể hiện các kết quả của phép phân tích PK của các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa huE104.v2 và hu31A.v11 so với kháng thể IgG4 kháng gD đối chứng. Mỗi kháng thể được cho dùng bằng phương pháp tiêm IV các con khỉ đuôi dài (cyno) ở 30mg/kg. Biểu đồ này thể hiện nồng độ kháng thể kháng tryptaza (µg/ml) ở dạng hàm số của thời gian (ngày).

Hình 15 là sơ đồ dạng giản đồ của các thử nghiệm dùng để đo lượng của tryptaza có hoạt tính (ô bên trái) và tryptaza tổng (ô bên phải) trong mẫu. Các tetrame và monome tryptaza được biểu lộ. Ở ô bên trái, chất ức chế trypsin đậu tương (SBTI) được bổ sung. Tiếp theo, mẫu dò trên cơ sở hoạt tính được biotin hóa làm ví dụ (ABP) được bổ sung vào mẫu chứa tryptaza (ví dụ, chất lưu súc rửa tiểu phế quản-phế nang (BAL)) để đánh dấu tryptaza có hoạt tính. Quá trình đánh dấu được ngừng lại bằng việc bổ sung chất ức chế phân tử nhỏ làm ví dụ G02849855 (ví dụ, BMS-262084, Sutton et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:3229-33, 2002, Qian et al., *J. Org. Chem.* 2002, 67:3595-3600). Kháng thể hu31A.v11 được bổ sung để làm phân ly các tetrame tryptaza. Sau đó, tryptaza đã được đánh dấu được phát hiện trong thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) bằng cách sử dụng peroxidaza cải ngựa được tiếp hợp vào streptavidin. Trong thử nghiệm tryptaza tổng, hu31A.v11 được bổ sung vào mẫu để làm phân ly các tetrame tryptaza trong mẫu. Sau đó, lượng của tryptaza được xác định bằng cách sử dụng ELISA.

Hình 16 thể hiện các kết quả của thử nghiệm tryptaza có hoạt tính được thực hiện trên các mẫu BAL thu được từ khỉ cyno mà đã được cho dùng kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 bằng phương pháp cho dùng trong tĩnh mạch (IV) ở mức 30mg/kg. Ô trên cùng thể hiện sơ đồ dạng giản đồ của quy trình thử nghiệm.

Hình 17 là sơ đồ dạng giản đồ thể hiện quy trình thử nghiệm của mô hình thử thách *Ascaris* cyno được mô tả ở Ví dụ 6.

Các **Hình 18A** và **18B** là các biểu đồ thể hiện các kết quả của thử nghiệm tryptaza có hoạt tính (Hình 18A) và thử nghiệm tryptaza tổng (Hình 18B) được thực hiện trên BAL thu được từ các con vật riêng biệt trong thử nghiệm thử thách *Ascaris* cyno được mô tả ở Ví dụ 6.

Hình 18C là biểu đồ thể hiện các kết quả của thử nghiệm tryptaza tổng để xác định lượng của tryptaza tổng trong chất lưu lớp niêm mạc mũi (mucosal lining fluid-MLF) thu được bằng phương pháp hấp thụ qua màng nhầy mũi bằng cách sử dụng cơ chất hấp thụ tổng hợp (synthetic absorptive matrix-SAM) từ các con vật riêng biệt trong thử nghiệm thử thách *Ascaris* cyno được mô tả ở Ví dụ 6.

Hình 19 là biểu đồ thể hiện rằng quá trình cho dùng kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 đã ức chế hiện tượng phản vệ toàn thân thụ động do IgE làm trung gian ở các con chuột được nhận ghép của người. Sau thử thách IgE, các con chuột được điều

trị bằng kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 đã thể hiện mức duy trì thân nhiệt được cải thiện so với các con chuột được điều trị bằng kháng thể kháng gD đối chứng. *** $P < 0,0001$ (Xét nghiệm T theo cặp).

Mô tả chi tiết các phương án của sáng chế

I. Các định nghĩa

Thuật ngữ "khoảng" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ khoảng sai số thông thường dùng cho trị số tương ứng mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng biết được. Việc đề cập đến "khoảng" trị số hoặc thông số trong bản mô tả này bao gồm (và mô tả) các phương án mà hướng đến chính trị số hoặc thông số đó.

"Khung nhận của người" vì các mục đích trong bản mô tả này là khung bao gồm trình tự axit amin là khung miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) được tạo ra từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, như được định nghĩa dưới đây. Khung nhận của người "được tạo ra từ" khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể bao gồm cùng một trình tự axit amin của chúng, hoặc nó có thể chứa các dạng thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số dạng thay đổi axit amin là 10 trở xuống, 9 trở xuống, 8 trở xuống, 7 trở xuống, 6 trở xuống, 5 trở xuống, 4 trở xuống, 3 trở xuống, hoặc 2 trở xuống. Theo một số phương án, khung nhận VL của người là đồng nhất về trình tự với trình tự khung VL globulin miễn dịch của người hoặc trình tự khung liên ứng của người.

"Ái lực" được dùng để chỉ độ mạnh của tổng số của các tương tác không cộng hóa trị giữa một vị trí liên kết đơn lẻ của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác liên kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi được biểu lộ khác, như được sử dụng trong bản mô tả này, "ái lực liên kết" được dùng để chỉ ái lực liên kết nội tại mà phản ánh sự tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp liên kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với đối tác Y của nó thường có thể được biểu diễn bằng hằng số phân ly (K_D). Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp phổ biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm cả những loại được mô tả trong bản mô tả này. Các phương án làm ví dụ và minh họa cụ thể dùng để đo ái lực liên kết thì được mô tả trong phần sau đây.

Thuật ngữ "K_D được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt", khi được sử dụng trong ngữ cảnh của các điểm yêu cầu bảo hộ, có nghĩa là K_D được đo theo phương pháp được mô tả ở Ví dụ 1(A)(vii), phương pháp này đo các thông số động học về khả năng liên kết các kháng thể kháng tryptaza vào monome tryptaza beta 1 của người, ví dụ, monome tryptaza được gắn thẻ His6 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 128, chất này không tạo thành tetrame tryptaza một cách tự phát. Thử nghiệm này có thể sử dụng BIACORE® T200 hoặc một thiết bị tương đương. Nói một cách vắn gọn, chip cảm biến CM5 Series S BIACORE® (hoặc các chip cảm biến tương đương) được làm bất động bằng kháng thể IgG đơn dòng của chuột kháng của người (Fc) và các kháng thể kháng tryptaza được bắt một cách kế tiếp trên pin dòng chảy. Các dịch pha loãng 3 lần theo dãy nối tiếp của monome tryptaza beta 1 của người được bơm ở tốc độ dòng chảy là 30µl/phút. Mỗi mẫu được phân tích bằng thời gian kết hợp 3 phút và thời gian phân ly 10 phút. Thử nghiệm này được thực hiện ở 25°C. Sau mỗi lần tiêm, chip được tái tạo bằng cách sử dụng $MgCl_2$ 3M. Mức đáp ứng liên kết được chỉnh sửa bằng cách lấy pin dòng chảy bắt IgG không liên quan ở mật độ tương tự trừ đi đơn vị đáp ứng (RU). Mô hình Languir 1:1 của phương pháp khớp đồng thời của k_{on} và k_{off} được sử dụng cho phép phân tích động học.

Kháng thể "được làm trưởng thành về ái lực" là kháng thể có một hoặc nhiều dạng thay đổi ở một hoặc nhiều HVR và/hoặc vùng khung mà đem lại sự cải thiện về ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên, so với kháng thể mẹ mà không sở hữu (các) dạng thay đổi đó. Các kháng thể được làm trưởng thành về ái lực được ưu tiên sẽ có ái lực ở nồng độ nanomol hoặc thậm chí là picomol đối với kháng nguyên đích. Các kháng thể được làm trưởng thành về ái lực được sản xuất bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783, 1992 mô tả quá trình làm trưởng thành ái lực bằng phương pháp xáo trộn miền VH và VL. Quá trình gây đột biến ngẫu nhiên các gốc HVR và/hoặc khung được mô tả bởi: Barbas et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813, 1994; Schier et al. *Gene* 169:147-155, 1995; Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004, 1995; Jackson et al. *J. Immunol.* 154(7):3310-3319, 1995; và Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 226:889-896, 1992.

Thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao quát các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các

kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể song đặc hiệu), và các mảnh kháng thể với điều kiện là chúng biểu hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên mong muốn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "tryptaza" được dùng để chỉ tryptaza nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Tryptaza trong lĩnh vực kỹ thuật này còn được gọi là tryptaza dưỡng bào, proteaza dưỡng bào II, tryptaza da, tryptaza phổi, tryptaza tuyến yên, proteinaza trung tính của dưỡng bào, và proteinaza serin II của dưỡng bào. Thuật ngữ "tryptaza" bao quát tryptaza alpha (được mã hóa ở người bởi *TPSAB1*), tryptaza beta (được mã hóa ở người bởi *TPSAB1* và *TPSB2*; xem dưới đây), tryptaza delta (được mã hóa ở người bởi *TPSD1*), tryptaza gamma (được mã hóa ở người bởi *TPSG1*), và tryptaza epsilon (được mã hóa ở người bởi *PRSS22*). Các protein tryptaza alpha, beta, và gamma là tan được, trong khi đó các protein tryptaza epsilon được neo móc vào màng. Tryptaza beta và gamma là các proteaza serin có hoạt tính, mặc dù chúng có các tính đặc hiệu khác nhau. Các protein tryptaza alpha và delta chủ yếu là các proteaza không có hoạt tính khi mà chúng có các gốc ở vị trí quan trọng mà khác biệt với các proteaza serin có hoạt tính điển hình. Trình tự protein có chiều dài đầy đủ của tryptaza alpha làm ví dụ có thể được phát hiện ra theo Mã truy cập GenBank NCBI số ACZ98910.1 (SEQ ID NO: 118). Các trình tự protein có chiều dài đầy đủ của tryptaza gamma làm ví dụ có thể được phát hiện ra theo Mã truy cập Uniprot số Q9NRR2 hoặc các Mã truy cập GenBank số Q9NRR2.3, AAF03695.1, NP_036599.3 hoặc AAF76457.1. Các trình tự protein có chiều dài đầy đủ của tryptaza delta làm ví dụ có thể được phát hiện ra theo Mã truy cập Uniprot số Q9BZJ3 hoặc Mã truy cập GenBank số NP_036349.1. Một vài gen tryptaza được phân cụm trên nhiễm sắc thể 16p13.3 của người. Thuật ngữ này bao quát tryptaza chưa được chế biến, có "chiều dài đầy đủ" cũng như dạng bất kỳ của tryptaza mà hình thành từ quá trình chế biến ở tế bào. Tryptaza beta là tryptaza chính được biểu hiện ở các dưỡng bào, trong khi tryptaza alpha là tryptaza chính được biểu hiện ở các bạch cầu ưa bazơ. Tryptaza alpha và tryptaza beta thường bao gồm trình tự dẫn đầu có xấp xỉ 30 axit amin và trình tự xúc tác có xấp xỉ 245 axit amin (ví dụ, xem tài liệu: Schwartz, *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 26:451-463, 2006).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "tryptaza beta" được dùng để chỉ tryptaza beta nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Tryptaza beta là proteaza serin mà là cấu tử chính của các hạt tiết dưỡng bào. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ này bao quát tryptaza beta 1 (được mã hóa bởi gen *TPSAB1*, gen này cũng mã hóa tryptaza alpha 1), tryptaza beta 2 (được mã hóa bởi gen *TPSB2*), và tryptaza beta 3 (cũng được mã hóa bởi gen *TPSB2*). Trình tự tryptaza beta 1 của người làm ví dụ được thể hiện ở SEQ ID NO: 71 (xem thêm: Mã truy cập GenBank số NP_003285.2). Trình tự tryptaza beta 2 của người làm ví dụ được thể hiện ở SEQ ID NO: 72 (xem thêm: Mã truy cập GenBank số AAD13876.1). Trình tự tryptaza beta 3 của người làm ví dụ được thể hiện ở SEQ ID NO: 73 (xem thêm: Mã truy cập GENBANK số NP_077078.5). Thuật ngữ tryptaza beta bao quát tryptaza beta chưa được chế biến, có "chiều dài đầy đủ" cũng như tryptaza beta mà hình thành từ các dạng cải biến sau dịch mã, bao gồm cả quá trình chế biến thủy phân protein. Pro-tryptaza beta có chiều dài đầy đủ được cho là được chế biến trong hai bước thủy phân protein. Trước tiên, hiện tượng phân cắt liên phân tử tự xúc tác ở R^{-3} xảy ra, cụ thể là ở độ pH có tính axit và khi có mặt polyanion (ví dụ, heparin hoặc dextran sulfat). Tiếp theo, pro' dipeptit còn lại được loại bỏ (chắc chắn là bằng dipeptidyl peptidaza I). Đối với tryptaza beta 1 có chiều dài đầy đủ của người, liên quan đến SEQ ID NO: 71 dưới đây, các gốc axit amin được gạch dưới tương ứng với trình tự dẫn đầu nguyên thể, và các gốc axit amin có bóng màu xám và được bôi đậm tương ứng với tiền miền, phần này được phân cắt để tạo thành protein trưởng thành (ví dụ, xem tài liệu: Sakai et al. *J. Clin. Invest.* 97:988-995, 1996)

MLNLLLLALPVLASR**AYAAPAPGQALQRVG**IVGGQEAPR
SKWPWQVSLRVHGPYWMHFCG
GSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQD
QLLPVSRIIVHPQFYTAQIGA
DIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGW
GDVDNDERLPPPFPLKQVKV
PIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDS
CQGDSGGPLVCKVNGTWLQAG

VVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP (SEQ ID NO: 71).

Tryptaza beta có hoạt tính theo kiểu enzym, trưởng thành thường là homotetrame hoặc heterotetrame, mặc dù monome có hoạt tính đã được ghi nhận (ví dụ, xem tài liệu: Fukuoka et al. *J. Immunol.* 176:3165, 2006). Các đơn vị con của tetrame tryptaza beta được giữ cùng nhau bằng các tương tác phân cực và kỵ nước giữa các đơn vị con và được làm ổn định bằng các polyanion (cụ thể là heparin và dextran sulfat). Thuật ngữ tryptaza có thể được dùng để chỉ tetrame tryptaza hoặc monome tryptaza. Các trình tự làm ví dụ của tryptaza beta 1 trưởng thành của người, beta 2, và beta 3 lần lượt được thể hiện ở SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 116, và SEQ ID NO: 117. Vị trí có hoạt tính của mỗi đơn vị con hướng vào lỗ trung tâm của tetrame, phương pháp này đo xấp xỉ 50 x 30 angstrom (ví dụ, xem tài liệu: Pereira et al. *Nature* 392:306-311, 1998). Kích cỡ của lỗ trung tâm thường giới hạn sự tiếp cận các vị trí có hoạt tính của các chất ức chế. Các chất nền làm ví dụ của tryptaza beta bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PAR2, C3, fibrinogen, fibronectin, và kininogen.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng tryptaza", "kháng thể mà liên kết vào tryptaza", và "kháng thể mà liên kết đặc hiệu tryptaza" được dùng để chỉ kháng thể mà có khả năng liên kết tryptaza với ái lực đủ sao cho kháng thể này là hữu ích trong vai trò là tác nhân chẩn đoán và/hoặc chất trị liệu trong việc hướng đích tryptaza. Theo một phương án, mức độ liên kết của kháng thể kháng tryptaza vào protein không tryptaza, không liên quan là nhỏ hơn khoảng 10% của khả năng liên kết của kháng thể vào tryptaza như được đo, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể mà liên kết vào tryptaza có hằng số phân ly (K_D) là $\leq$ 1μM, $\leq$ 100nM, $\leq$ 10nM, $\leq$ 1nM, $\leq$ 0,1nM, $\leq$ 0,01nM, hoặc $\leq$ 0,001nM (ví dụ, 10^{-8} M trở xuống, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng tryptaza liên kết vào epitop của tryptaza mà được bảo toàn trong số tryptaza từ các loài khác nhau.

"Kháng thể mà liên kết vào cùng một epitop" với kháng thể tham chiếu được dùng để chỉ kháng thể mà tiếp xúc một tập hợp chồng lấn gồm các gốc axit amin của kháng nguyên so với kháng thể tham chiếu hoặc phong bế khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu vào kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh là 50% trở lên,

60% trở lên, 70% trở lên, 80% trở lên, hoặc 90% trở lên. Theo một số phương án, tập hợp gồm các gốc axit amin được tiếp xúc bởi kháng thể có thể là chồng lấn hoàn toàn hoặc chồng lấn một phần với tập hợp gồm các gốc axit amin được tiếp xúc bởi kháng thể tham chiếu. Theo một số phương án, kháng thể mà liên kết vào cùng một epitop với kháng thể tham chiếu phong bế khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu vào kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh là 50% trở lên, 60% trở lên, 70% trở lên, 80% trở lên, hoặc 90% trở lên, và ngược lại, kháng thể tham chiếu phong bế khả năng liên kết của kháng thể vào kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh là 50% trở lên, 60% trở lên, 70% trở lên, 80% trở lên, hoặc 90% trở lên. Một thử nghiệm cạnh tranh làm ví dụ được đề xuất trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "được xác định bằng thử nghiệm phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng", trong ngữ cảnh của các điểm yêu cầu bảo hộ, có nghĩa là kháng thể được xác định là liên kết vào cùng một epitop và/hoặc cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng tryptaza tham chiếu (ví dụ, hu31A.v11 hoặc huE104.v2) bằng cách sử dụng thử nghiệm phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng OCTET® như được mô tả ở Ví dụ 3, Mục C. Nói một cách vắn gọn, protein monome tryptaza beta 1 của người được biotin hóa ở gốc Lys bằng cách phản ứng với NHS-PEG4-biotin. Monome đã được biotin hóa được pha loãng đến 5µg/ml trong dung dịch đệm động học (ForteBio, Inc.) và được làm bất động lên trên các mũi cảm biến streptavidin (ForteBio, Inc.). Sau bước làm bất động, thiết bị cảm biến đã được làm bất động vào tryptaza beta 1 của người được làm bão hòa bằng kháng thể thứ nhất, được pha loãng ở mức 10-20µg/ml, sau đó là quá trình liên kết với kháng thể thứ hai được pha loãng ở 2,5µg/ml. Nhiệt độ chạy của các thử nghiệm liên kết epitop như vậy là 30°C. Tín hiệu liên kết bởi kháng thể thứ hai nói lên rằng hai kháng thể này có thể liên kết kháng nguyên một cách đồng thời ở các epitop không chồng lấn khác biệt, trong khi đó không có tín hiệu liên kết nói lên rằng chúng chia sẻ một epitop chung. Trong một số trường hợp, tín hiệu một phần bởi kháng thể thứ hai được quan sát (tức là, tín hiệu này là nhỏ hơn tín hiệu được quan sát nếu kháng thể thứ nhất không được bổ sung, nhưng lớn hơn mức nền tảng), điều này nói lên các epitop này là chồng lấn một phần.

"Các mảnh kháng thể" bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn, tốt hơn, nếu là vùng liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của kháng thể nguyên vẹn. Các

ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm các mảnh Fab, Fab', $F(ab')_2$, và Fv; song thể; kháng thể tuyến tính (xem Patent Mỹ số 5,641,870, Ví dụ 2; Zapata et al. *Protein Eng.* 8(10):1057-1062, 1995); các phân tử kháng thể chuỗi đơn; và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các mảnh kháng thể.

Quá trình tiêu hóa bằng papain các kháng thể tạo ra hai mảnh liên kết kháng nguyên đồng nhất, được gọi là mảnh "Fab", và mảnh "Fc" tồn dư, một tên gọi phản ánh khả năng kết tinh một cách dễ dàng. Mảnh Fab gồm toàn bộ chuỗi L cùng với miền của vùng biến đổi của chuỗi H (VH), và miền hằng định thứ nhất của một chuỗi nặng (C_H1). Quá trình xử lý kháng thể bằng pepsin thu được một mảnh $F(ab')_2$ lớn đơn lẻ mà gần tương ứng với hai mảnh Fab được liên kết disulfua có hoạt tính liên kết kháng nguyên có hóa trị hai và vẫn có khả năng liên kết ngang kháng nguyên. Mảnh Fab' khác biệt với mảnh Fab là có một ít gốc phụ thêm ở đầu tận cùng carboxy của miền C_H1 bao gồm cả một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề kháng thể. Fab'-SH là tên gọi trong bản mô tả này dùng cho Fab' mà trong đó (các) gốc xystein của các miền hằng định mang nhóm thiol tự do. Các mảnh kháng thể $F(ab')_2$ ban đầu được tạo ra ở dạng cặp gồm các mảnh Fab' mà có các xystein bản lề giữa chúng. Các dạng liên hợp hóa học khác của các mảnh kháng thể thì cũng đã biết.

Thuật ngữ "vùng Fc" trong bản mô tả này được sử dụng để định nghĩa vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần của vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm các trình tự vùng Fc nguyên thể và các biến thể vùng Fc. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng của IgG của người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận cùng C (Lys447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Trừ khi được chỉ rõ khác trong bản mô tả này, cách đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ thống đánh số Châu Âu, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Fv" gồm dime của một miền của vùng biến đổi của chuỗi nặng và một miền của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ dưới dạng kết hợp không cộng hóa trị chặt chẽ. Từ sự gấp cuộn của hai miền này nảy sinh sáu vòng siêu biến (3 vòng mỗi vòng là từ chuỗi H và chuỗi L) mà đóng góp các gốc axit amin cho khả năng liên kết kháng nguyên và đem lại

tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên cho kháng thể. Tuy nhiên, thậm chí một miền biến đổi đơn lẻ (hoặc một nửa của Fv bao gồm chỉ ba H đặc hiệu đối với kháng nguyên) có khả năng nhận biết và liên kết kháng nguyên, mặc dù thường ở ái lực thấp hơn so với toàn bộ vị trí liên kết.

"Fv chuỗi đơn" còn được viết tắt là "sFv" hay "scFv" là các mảnh kháng thể mà bao gồm các miền kháng thể VH và VL được kết nối thành một chuỗi polypeptit đơn lẻ. Tốt hơn, nếu polypeptit sFv còn bao gồm gốc liên kết polypeptit giữa miền VH và miền VL mà cho phép sFv tạo được cấu trúc mong muốn dùng cho quá trình liên kết kháng nguyên. Để tìm hiểu về sFv, xem tài liệu: Pluckthun trong *Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315, 1994.

Thuật ngữ "các song thể" được dùng để chỉ các mảnh kháng thể nhỏ được điều chế bằng cách kiến tạo các mảnh sFv (xem đoạn văn trên đây) với các gốc liên kết ngắn (khoảng 5-10 gốc) giữa miền VH và miền VL sao cho đạt được hiện tượng ghép cặp liên chuỗi, chứ không phải nội chuỗi của các miền V, đem lại mảnh có hóa trị hai, tức là, mảnh có hai vị trí liên kết kháng nguyên. Các song thể song đặc hiệu là các heterodime có hai mảnh sFv "trao đổi chéo" mà trong đó miền VH và miền VL của hai kháng thể này có mặt trên các chuỗi polypeptit khác nhau. Các song thể được mô tả một cách đầy đủ hơn trong tài liệu: ví dụ, EP 404,097; WO 93/11161; và Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993.

Nói là "miền liên kết" có nghĩa là một phần của hợp chất hoặc phân tử mà liên kết đặc hiệu vào epitop, kháng nguyên, phối tử, hoặc thụ thể đích. Các miền liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các kháng thể (ví dụ, các kháng thể đơn dòng, đa dòng, tái tổ hợp, được nhân tính hóa, và thể khảm), các mảnh kháng thể hoặc các phần của chúng (ví dụ, mảnh Fab, Fab'2, kháng thể scFv, SMIP, kháng thể miền, song thể, tiểu thể, scFv-Fc, ái lực thể, nano thể, và miền VH và/hoặc miền VL của các kháng thể), thụ thể, phối tử, aptamer, và các phân tử khác có đối tác liên kết đã được nhận diện.

Kháng thể "phong bế" hoặc kháng thể "đối kháng" là kháng thể mà ức chế hoặc làm giảm hoạt tính sinh học của kháng nguyên nó liên kết. Các kháng thể phong bế hoặc kháng thể đối kháng nhất định ức chế về cơ bản hoặc hoàn toàn hoạt tính sinh học của kháng nguyên. Theo một số phương án, hoạt tính này có thể là hoạt tính enzym tryptaza,

ví dụ, hoạt tính proteaza. Trong các trường hợp khác, hoạt tính này có thể là quá trình kích thích sự tăng sinh tế bào cơ trơn phế quản và/hoặc tình trạng co trên cơ sở colagen do tryptaza làm trung gian. Trong các trường hợp khác, hoạt tính này có thể là quá trình giải phóng histamin dưỡng bào (ví dụ, quá trình giải phóng histamin do IgE khởi động và/hoặc quá trình giải phóng histamin do tryptaza khởi động). Kháng thể theo sáng chế có thể ức chế hoạt tính sinh học của tryptaza ít nhất khoảng 1%, khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc khoảng 100%.

Thuật ngữ "như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza beta của người bằng cách sử dụng peptit S-2288 tổng hợp làm chất nền", trong ngữ cảnh của các điểm yêu cầu bảo hộ, có nghĩa là hoạt tính ức chế được đo theo thử nghiệm được mô tả ở Ví dụ 1(A)(viii)(a). Nói một cách vắn gọn, enzym có hoạt tính tetrame tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người được pha loãng đến 0,75nM trong dung dịch đệm TNH (Tris 200mM, NaCl 150mM, heparin 0,1mg/ml, TRITON™ X-100 0,01%, độ pH 8,0), và được kết hợp theo tỷ lệ 1:1 với các kháng thể kháng tryptaza (được pha loãng trong PBS) trong các đĩa 384 lỗ. Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ. Chất nền so màu S-2288 (Chromogenix, Số hiệu bộ phận: 82-0852-39), hoặc một chất nền tương đương, được pha loãng đến 1200µM trong dung dịch đệm TNH và được bổ sung vào đĩa. Nồng độ trong lỗ cuối cùng là S-2288 400µM, tetrame tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người 0,25nM, heparin 66µg/ml, và kháng thể kháng tryptaza từ 0,10 đến 222nM. Các đĩa được ủ trong 40 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ và sau đó, được đọc ở A_{405}. IC50 của các kháng thể kháng tryptaza được xác định từ đồ thị khớp bốn thông số của các đường cong tương ứng của chúng.

"Nhóm" của kháng thể được dùng để chỉ loại của miền hằng định hoặc vùng hằng định do chuỗi nặng của nó sở hữu. Có năm nhóm kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài nhóm trong số này có thể được chia thêm thành các phân nhóm (các kiểu tương đương), ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, và IgA_2. Các miền hằng định của chuỗi nặng mà tương ứng với các nhóm khác nhau của các globulin miễn dịch lần lượt được gọi là α, δ, ε, γ, và µ.

"Chức năng tác động" kháng thể được dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy được cho vùng Fc (trình tự vùng Fc nguyên thể hoặc biến thể trình tự vùng Fc axit amin) của kháng thể, và thay đổi với kháng thể kiểu tương đương. Các ví dụ về chức năng tác động kháng thể bao gồm: khả năng liên kết C1q và tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể; khả năng liên kết thụ thể Fc; tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể qua trung gian tế bào (ADCC); quá trình thực bào; quá trình điều hòa giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và quá trình hoạt hóa tế bào B.

"Tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể qua trung gian tế bào" hay "ADCC" được dùng để chỉ một dạng của tính gây độc tế bào mà trong đó Ig đã được tiết được liên kết lên trên các thụ thể Fc (FcR) có mặt trên các tế bào gây độc tế bào nhất định (ví dụ, các tế bào tiêu diệt tự nhiên (Natural Killer-NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) cho phép các tế bào tác động gây độc tế bào này liên kết đặc hiệu vào tế bào đích mang kháng nguyên và kế tiếp, tiêu diệt tế bào đích bằng các độc tố tế bào. Các kháng thể "trang bị cho" các tế bào gây độc tế bào và hoàn toàn cần thiết cho quá trình tiêu diệt như vậy. Các tế bào sơ cấp dùng để làm trung gian cho ADCC, các tế bào NK, chỉ biểu hiện FcγRIII mà thôi, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân to biểu hiện FcγRI, FcγRII, và FcγRIII. Quá trình biểu hiện FcR trên các tế bào tạo huyết được tóm tắt trong bảng 3 ở trang 464 của tài liệu: Ravetch et al. *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991. Để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang được quan tâm, thử nghiệm ADCC *in vitro*, như loại được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 5,500,362 hoặc 5,821,337 có thể được thực hiện. Các tế bào tác động hữu ích dùng cho các thử nghiệm như vậy bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào tiêu diệt tự nhiên (Natural Killer-NK). Ngoài ra hoặc theo cách khác, hoạt tính ADCC của phân tử đang được quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, ở mô hình động vật như loại được bộc lộ trong tài liệu: Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656, 1998.

"Thụ thể Fc" hay "FcR" mô tả một thụ thể mà liên kết vào vùng Fc của kháng thể. FcR được ưu tiên là FcR của người có trình tự nguyên thể. Hơn nữa, FcR được ưu tiên là thụ thể mà liên kết kháng thể IgG (thụ thể gamma) và bao gồm các thụ thể của các phân nhóm FcγRI, FcγRII, và FcγRIII, bao gồm cả các biến thể alen và theo cách khác, các dạng được tách ghép vùng nội của các thụ thể này. Các thụ thể FcγRII bao gồm FcγRIIA ("thụ thể hoạt hóa") và FcγRIIB ("thụ thể ức chế"), các thụ thể này có các

trình tự axit amin tương tự mà khác biệt chủ yếu về các miền bào chất của chúng. Thụ thể hoạt hóa FcγRIIA chứa motif hoạt hóa trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch (ITAM) ở miền bào chất của nó. Thụ thể ức chế FcγRIIB chứa motif ức chế trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch (ITIM) ở miền bào chất của nó (tìm hiểu, xem tài liệu: M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234, 1997). Các FcR được tìm hiểu, ví dụ, trong tài liệu: Ravetch et al. *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Capel et al. *Immunomethods* 4:25-34, 1994; và de Haas et al. *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41, 1995. Các FcR khác, bao gồm cả những loại sẽ được nhận diện trong tương lai, thì được bao quát bởi thuật ngữ "FcR" trong bản mô tả này. Thuật ngữ này còn bao gồm thụ thể sơ sinh, FcRn, thụ thể này chịu trách nhiệm về việc chuyển các IgG của người mẹ sang bào thai (ví dụ, xem tài liệu: Guyer et al. *J. Immunol.* 117:587, 1976; và Kim et al. *J. Immunol.* 24:249, 1994).

"Các tế bào tác động của người" là các bạch cầu mà biểu hiện một hoặc nhiều FcR và thực hiện chức năng tác động. Tốt hơn, nếu các tế bào này biểu hiện ít nhất FcγRIII và thực hiện chức năng tác động ADCC. Các ví dụ về bạch cầu của người mà làm trung gian cho ADCC bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), tế bào tiêu diệt tự nhiên (Natural Killer-NK), bạch cầu đơn nhân to, tế bào T gây độc tế bào, và bạch cầu trung tính; mà tế bào PBMC và tế bào NK thì được ưu tiên. Các tế bào tác động có thể được phân lập từ một nguồn nguyên thể, ví dụ, từ máu.

"Tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể" hay "CDC" được dùng để chỉ quá trình phân giải của tế bào đích khi có mặt bổ thể. Quá trình hoạt hóa con đường bổ thể cổ điển được khởi đầu bằng quá trình liên kết hợp phần thứ nhất của hệ thống bổ thể (C1q) vào các kháng thể (thuộc phân nhóm thích hợp) mà được liên kết vào kháng nguyên cùng gốc của chúng. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC, ví dụ, như được mô tả trong Gazzano-Santoro et al. *J. Immunol. Methods* 202:163, 1996, có thể được thực hiện.

"Epitop" là phần của kháng nguyên mà kháng thể liên kết một cách chọn lọc vào đó. Đối với kháng nguyên polypeptit, epitop tuyến tính có thể là phần peptit là khoảng 4-15 gốc axit amin (ví dụ, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 gốc axit amin). Epitop theo hình thể, không tuyến tính có thể bao gồm các gốc của trình tự polypeptit được đưa vào vùng lân cận gần trong cấu trúc không gian ba chiều (3D) của protein này. Theo một số phương án, epitop này bao gồm các axit amin mà trong phạm vi 4 angstrom (Å) của

nguyên tử bất kỳ của kháng thể. Theo một số phương án, epitop bao gồm axit amin của protome tryptaza mà trong phạm vi 4Å của nguyên tử bất kỳ của Fab đối tác. Theo các phương án nhất định, epitop này bao gồm các axit amin mà trong phạm vi 3,5 Å, 3 Å, 2,5 Å, hoặc 2 Å của nguyên tử bất kỳ của kháng thể. Các gốc axit amin của kháng thể mà tiếp xúc kháng nguyên (tức là, paratop) có thể được xác định, ví dụ, bằng cách xác định cấu trúc tinh thể của kháng thể trong phức hợp với kháng nguyên hoặc bằng cách thực hiện phương pháp trao đổi hydro/dơteri.

Thuật ngữ "epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X", khi được sử dụng trong ngữ cảnh của các điểm yêu cầu bảo hộ, có nghĩa là nguyên tử của gốc axit amin tryptaza (ví dụ, gốc tryptaza beta 1 của người) được xác định là trong phạm vi 4Å của nguyên tử bất kỳ của kháng thể kháng tryptaza (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, hu31A.v11 hoặc huE104.v2) ở mô hình tinh thể học tia X, ví dụ, như được mô tả ở Ví dụ 3. Theo một số phương án, mô hình tinh thể học tia X có độ phân giải là khoảng 3,5Å trở xuống, khoảng 3Å trở xuống, khoảng 2,5Å trở xuống, khoảng 2,15Å trở xuống, hoặc khoảng 2Å trở xuống.

Các thuật ngữ "kháng thể có chiều dài đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn", và "kháng thể nguyên" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản tương tự với cấu trúc kháng thể nguyên thể hoặc có các chuỗi nặng mà chứa vùng Fc như được định nghĩa trong bản mô tả này.

"Kháng thể của người" là kháng thể mà sở hữu trình tự axit amin mà tương ứng với trình tự axit amin của kháng thể được sản xuất bởi con người và/hoặc đã được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật dùng để tạo ra các kháng thể của người. Định nghĩa này về kháng thể của người loại trừ một cách cụ thể kháng thể được nhân tính hóa bao gồm các gốc liên kết kháng nguyên không phải của người.

"Khung liên ứng của người" là khung mà biểu diễn các gốc axit amin thường có nhất trong quá trình chọn lựa các trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người. Nhìn chung, quá trình chọn lựa các trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm của các trình tự miền biến đổi. Nhìn chung, phân nhóm gồm các trình tự này là phân nhóm như trong tài liệu: Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD, vols. 1-3, 1991. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa III hoặc

kappa IV như trong tài liệu: Kabat et al. *trên đây.* Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như trong tài liệu: Kabat et al. *trên đây.*

Các dạng "được nhân tính hóa" của các kháng thể không phải của người (ví dụ, động vật gặm nhấm) là các kháng thể thể khảm mà chứa trình tự tối thiểu được tạo ra từ kháng thể không phải của người. Đối với phần lớn, các kháng thể được nhân tính hóa là các globulin miễn dịch của người (kháng thể đối tượng tiếp nhận) mà trong đó các gốc từ vùng siêu biến của đối tượng tiếp nhận được thay thế bằng các gốc từ vùng siêu biến của loài không phải là người (kháng thể đối tượng cho) như chuột nhắt, chuột cống, thỏ hoặc động vật linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực, và năng lực kháng thể mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc vùng khung (FR) của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải của người tương ứng. Ngoài ra, các kháng thể được nhân tính hóa có thể bao gồm các gốc mà không được tìm thấy ở kháng thể đối tượng tiếp nhận hoặc ở kháng thể đối tượng cho. Các dạng cải biến này được tạo ra để tinh chỉnh thêm tính năng kháng thể. Nhìn chung, kháng thể được nhân tính hóa sẽ bao gồm về cơ bản tất cả các miền biến đổi trong số ít nhất là một, và thông thường là hai miền biến đổi, mà trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vòng siêu biến trong số các vòng siêu biến tương ứng với các vòng siêu biến của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc về cơ bản tất cả các FR trong số các FR là những FR của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được nhân tính hóa tùy ý cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định globulin miễn dịch (Fc), thông thường là vùng hằng định của globulin miễn dịch của người. Để biết thêm chi tiết, xem tài liệu: Jones et al. *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann et al. *Nature* 332:323-329, 1988; và Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992.

"Thể tiếp hợp miễn dịch" là kháng thể được tiếp hợp vào một hoặc nhiều (các) phân tử khác nguồn gốc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chất gây độc tế bào.

Thuật ngữ "được phân lập" khi được sử dụng để mô tả các kháng thể khác nhau được bộc lộ trong bản mô tả này, nghĩa là kháng thể mà đã được nhận diện và được tách và/hoặc được thu hồi từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào mà từ đó, nó được biểu hiện. Các hợp phần gây bẩn của môi trường tự nhiên của nó là các chất liệu mà thường cản trở cách sử dụng chẩn đoán hoặc trị liệu của polypeptit này, và có thể bao gồm các enzym, các hormon, và các chất tan protein hoặc không phải protein khác. Theo một số

phương án, kháng thể này được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bằng, ví dụ, các phương pháp điện di (ví dụ, phương pháp điện di gel polyacrylamit natri dodexyl sulfat (SDS-PAGE), điện di hội tụ đẳng điện (IEF), điện di mao quản) hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo). Để tìm hiểu về các phương pháp dùng cho việc đánh giá độ tinh khiết kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Flatman et al. *J. Chromatogr. B* 848:79-87, 2007. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể sẽ được tinh chế (1) đến mức độ đủ để thu được ít nhất 15 gốc của trình tự axit amin bên trong hoặc trình tự axit amin đầu tận cùng N bằng việc sử dụng máy giải trình tự kiểu cốc quay, hoặc (2) đến tính thuần nhất bằng SDS-PAGE trong điều kiện khử hoặc điều kiện không khử bằng cách sử dụng phẩm xanh lam Coomassie hoặc, tốt hơn, nếu là thuốc nhuộm bạc. Kháng thể được phân lập bao gồm các kháng thể *in situ* trong các tế bào tái tổ hợp, bởi vì ít nhất một hợp phần của môi trường tự nhiên polypeptit sẽ không có mặt. Tuy nhiên, thông thường, polypeptit được phân lập sẽ được điều chế bằng ít nhất một bước tinh chế.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể của các kháng thể về cơ bản thuần nhất, tức là, các kháng thể riêng biệt bao gồm quần thể này là đồng nhất và/hoặc liên kết cùng một epitop trên kháng nguyên, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong suốt quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể như vậy thường có mặt theo lượng nhỏ. Trái ngược với các chế phẩm kháng thể đa dòng, chế phẩm này thường bao gồm các kháng thể khác nhau được dẫn dắt hướng đến các quyết định tố (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng được dẫn dắt hướng đến một quyết định tố đơn lẻ trên kháng nguyên. Vì vậy, từ bổ nghĩa "đơn dòng" biểu lộ đặc tính của kháng thể là thu được từ quần thể về cơ bản thuần nhất của các kháng thể, và không được hiểu là cần đến sự sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng sẽ được sử dụng theo sáng chế này có thể được tạo ra bằng một loạt kỹ thuật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp tế bào lai, các phương pháp ADN tái tổ hợp, các phương pháp thể hiện thể thực khuẩn, và các phương pháp sử dụng các động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần của ổ gen globulin miễn dịch của người, các phương pháp như vậy và các phương pháp làm ví dụ khác dùng để tạo các kháng thể

đơn dòng được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" bao quát các kháng thể song đặc hiệu.

Thuật ngữ "kháng thể có hóa trị hai" được dùng để chỉ kháng thể mà có hai vị trí liên kết đối với kháng nguyên. Kháng thể có hóa trị hai có thể là, mà không chỉ giới hạn ở, ở dạng thức IgG hoặc ở dạng thức $F(ab')_2$.

Thuật ngữ "kháng thể đa đặc hiệu" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao hàm kháng thể mà liên kết vào hai quyết định tố hoặc epitop trở lên trên một kháng nguyên hoặc hai quyết định tố hoặc epitop trở lên trên nhiều kháng nguyên. Các kháng thể đa đặc hiệu như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể có chiều dài đầy đủ, các kháng thể có hai miền VL và miền VH trở lên, các mảnh kháng thể như Fab, Fv, dsFv, scFv, các song thể, các song thể song đặc hiệu và các tam thể, các mảnh kháng thể mà đã được liên kết theo kiểu cộng hóa trị hoặc không theo kiểu cộng hóa trị. "Tính đặc hiệu đa epitop" được dùng để chỉ khả năng liên kết đặc hiệu vào hai epitop khác nhau trở lên trên cùng một đích hoặc trên (các) đích khác nhau. Theo các phương án nhất định, kháng thể đa đặc hiệu này là kháng thể song đặc hiệu. "Tính đặc hiệu kép" hoặc "tính song đặc hiệu" được dùng để chỉ khả năng liên kết đặc hiệu vào hai epitop khác nhau trên cùng một đích hoặc trên (các) đích khác nhau. Tuy nhiên, trái ngược với các kháng thể song đặc hiệu, các kháng thể đặc hiệu kép có hai nhánh liên kết kháng nguyên mà đồng nhất về trình tự axit amin và mỗi nhánh Fab có khả năng nhận biết hai kháng nguyên. Tính đặc hiệu kép cho phép các kháng thể tương tác với ái lực cao với hai kháng nguyên khác nhau ở dạng phân tử Fab hoặc IgG đơn lẻ. Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu liên kết vào mỗi epitop với ái lực là 5μM đến 0,001pM, 3μM đến 0,001pM, 1μM đến 0,001pM, 0,5μM đến 0,001pM hoặc 0,1μM đến 0,001pM. "Đơn đặc hiệu" được dùng để chỉ khả năng liên kết chỉ một epitop.

"Kháng thể trần" được dùng để chỉ kháng thể mà không được tiếp hợp vào một gốc khác nguồn gốc (ví dụ, gốc gây độc tế bào) hoặc chất đánh dấu phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt trong chế phẩm dược.

Liên quan đến khả năng liên kết của kháng thể này vào phân tử đích, thuật ngữ "liên kết" hoặc "khả năng liên kết" hoặc "khả năng liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết đặc hiệu" hoặc là "đặc hiệu đối với" một polypeptit hoặc một epitop cụ thể trên một đích polypeptit cụ thể nghĩa là khả năng liên kết mà khác ở mức có thể đo được so với quá

trình tương tác không đặc hiệu. Khả năng liên kết đặc hiệu có thể được đo, ví dụ, bằng cách xác định khả năng liên kết của một phân tử nào đó so với khả năng liên kết của phân tử đối chứng. Ví dụ, khả năng liên kết đặc hiệu có thể được xác định bằng quá trình cạnh tranh với phân tử đối chứng mà tương tự với đích, ví dụ, lượng dư của đích không được đánh dấu. Trong trường hợp này, khả năng liên kết đặc hiệu được biểu lộ nếu khả năng liên kết đích đã được đánh dấu vào mẫu dò được ức chế theo kiểu có tính cạnh tranh bởi đích không được đánh dấu dư. Thuật ngữ "khả năng liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết đặc hiệu vào" hoặc là "đặc hiệu đối với" một polypeptit hoặc một epitop cụ thể trên một đích polypeptit cụ thể như được sử dụng trong bản mô tả này có thể được biểu hiện, ví dụ, bởi phân tử có K_D đối với đích là 10^{-4} M trở xuống, theo cách khác, 10^{-5} M trở xuống, theo cách khác, 10^{-6} M trở xuống, theo cách khác, 10^{-7} M trở xuống, theo cách khác, 10^{-8} M trở xuống, theo cách khác, 10^{-9} M trở xuống, theo cách khác, 10^{-10} M trở xuống, theo cách khác, 10^{-11} M trở xuống, theo cách khác, 10^{-12} M trở xuống hoặc K_D nằm trong khoảng là 10^{-4} M đến 10^{-6} M hoặc 10^{-6} M đến 10^{-10} M hoặc 10^{-7} M đến 10^{-9} M. Như chuyên gia có trình độ sẽ nhìn nhận, ái lực và trị số K_D là có quan hệ tỷ lệ nghịch. Ái lực cao đối với kháng nguyên được đo bằng trị số K_D thấp. Theo một phương án, thuật ngữ "khả năng liên kết đặc hiệu" được dùng để chỉ khả năng liên kết trong đó phân tử liên kết vào một polypeptit cụ thể hoặc epitop trên một polypeptit cụ thể mà về cơ bản không liên kết vào polypeptit hoặc epitop polypeptit bất kỳ khác.

Nói là "paratop" có nghĩa là phần của kháng thể mà liên kết epitop của kháng nguyên. Paratop thường là vùng có khoảng 15-22 gốc axit amin của vùng Fv của kháng thể và có thể chứa axit amin từ các chuỗi V_H và V_L của kháng thể.

Thuật ngữ "biến đổi" được dùng để chỉ sự việc thực tế là các đoạn nhất định của các miền biến đổi khác biệt lớn về trình tự trong số các kháng thể. Miền biến đổi hoặc miền "V" làm trung gian cho khả năng liên kết kháng nguyên và xác định tính đặc hiệu của một kháng thể cụ thể đối với kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, độ biến đổi không được phân bố đều xuyên suốt quãng 110 axit amin của các miền biến đổi. Thay vào đó, các vùng V gồm các đoạn duỗi tương đối bất biến được gọi là các vùng khung (FR) có 15-30 axit amin được tách bằng các vùng ngắn hơn có độ biến đổi cực độ được gọi là "các vùng siêu biến" mà mỗi vùng dài 9-12 axit amin. Thuật ngữ "vùng siêu biến" hay "HVR" khi được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ các gốc axit amin

của kháng thể mà chịu trách nhiệm về khả năng liên kết kháng nguyên. Vùng siêu biến nhìn chung bao gồm các gốc axit amin từ, ví dụ, quanh khoảng các gốc 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) ở VL, và quanh khoảng các gốc 26-35 (H1), 49-65 (H2) và 95-102 (H3) ở VH (theo một phương án, H1 là quanh khoảng các gốc 31-35); Kabat et al. *trên đây*) và/hoặc các gốc đó từ "vòng siêu biến" (ví dụ, các gốc 26-32 (L1), 50-52 (L2), và 91-96 (L3) ở VL, và 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) ở VH; Chothia et al. *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987. Các miền biến đổi của các chuỗi nhẹ và nặng nguyên thể mà mỗi miền bao gồm bốn FR, chủ yếu sử dụng dạng kết cấu tấm beta, được kết nối bằng ba vùng siêu biến, dạng này tạo thành các vòng kết nối, và trong một số trường hợp, tạo thành một phần của, cấu trúc tấm beta. Các vùng siêu biến ở mỗi chuỗi được giữ cùng nhau ở trạng thái ở gần sát nhau bởi các FR và, bằng các vùng siêu biến từ chuỗi kia, góp phần vào việc tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên của các kháng thể (xem Kabat et al. *trên đây*). Do vậy, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện ở trình tự sau đây ở VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. Các miền hằng định không liên có thể một cách trực tiếp đến quá trình liên kết kháng thể vào kháng nguyên, nhưng biểu hiện các chức năng tác động khác nhau, như sự tham gia của kháng thể vào tính gây độc tế bào của tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC).

Thuật ngữ "cách đánh số gốc miền biến đổi như trong tài liệu Kabat" hoặc "cách đánh số vị trí axit amin như trong tài liệu Kabat", và các dạng thay đổi của chúng, được dùng để chỉ hệ thống đánh số được sử dụng cho miền biến đổi của các chuỗi nặng hoặc miền biến đổi của các chuỗi nhẹ của phần sưu tập về các kháng thể trong tài liệu: Kabat et al. *trên đây*. Bằng cách sử dụng hệ thống đánh số này, trình tự axit amin tuyến tính thực tế có thể chứa ít axit amin hơn hoặc axit amin phụ thêm tương ứng với dạng làm ngắn đi của, hoặc dạng chèn vào, FR hoặc HVR của miền biến đổi. Ví dụ, miền biến đổi của chuỗi nặng có thể bao gồm một đoạn chèn axit amin đơn lẻ (gốc 52a theo Kabat) sau gốc 52 của H2 và các gốc được chèn (ví dụ, các gốc 82a, 82b, và 82c, v.v. theo Kabat) sau gốc 82 của FR chuỗi nặng. Cách đánh số Kabat về các gốc có thể được xác định đối với một kháng thể đã cho bằng dạng xếp thẳng hàng ở các vùng có độ tương đồng của trình tự của kháng thể với trình tự được đánh số theo Kabat "tiêu chuẩn".

Hệ thống đánh số Kabat thường được sử dụng khi đề cập đến một gốc nào đó ở miền biến đổi (xấp xỉ các gốc 1-107 của chuỗi nhẹ và các gốc 1-113 của chuỗi nặng) (ví

dụ, Kabat et al. *trên đây*). "Hệ thống đánh số Châu Âu" hoặc "chỉ số EU" thường được sử dụng khi đề cập đến một gốc nào đó ở vùng hằng định chuỗi nặng globulin miễn dịch (ví dụ, chỉ số EU được ghi nhận trong tài liệu Kabat et al. *trên đây*). "Chỉ số EU như trong tài liệu Kabat" được dùng để chỉ cách đánh số về gốc của kháng thể IgG1 của người theo EU. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, các phần đề cập đến số gốc ở miền biến đổi của các kháng thể nghĩa là cách đánh số về gốc bằng hệ thống đánh số Kabat. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, các phần đề cập đến số gốc ở miền hằng định của các kháng thể nghĩa là cách đánh số về gốc bằng hệ thống đánh số Châu Âu (ví dụ, xem Đơn Tạm Thời Mỹ số 60/640,323, các Hình dùng cho cách đánh số Châu Âu).

"Rối loạn" hoặc "bệnh" là tình trạng bất kỳ mà sẽ được hưởng lợi từ phương pháp điều trị bằng kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này). Tình trạng này bao gồm các rối loạn hoặc bệnh cấp tính và mạn tính bao gồm cả các tình trạng bệnh lý mà làm cho động vật có vú dễ mắc rối loạn đang được xem xét. Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi. Theo một số ví dụ, rối loạn này có thể là rối loạn gắn liền với tryptaza hoặc rối loạn do tryptaza làm trung gian.

Các thuật ngữ "rối loạn gắn liền với tryptaza" và "rối loạn do tryptaza làm trung gian", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ rối loạn hoặc tình trạng bất kỳ do tryptaza làm trung gian, hoặc gắn liền với tryptaza. Theo một số phương án, các rối loạn gắn liền với tryptaza là gắn liền với các mức tryptaza dư hoặc hoạt tính mà trong đó các triệu chứng không điển hình có thể biểu hiện do các mức hoặc hoạt tính của tryptaza theo kiểu cục bộ và/hoặc theo kiểu toàn thân trong cơ thể.

Theo một số phương án, rối loạn phổi này là hen suyễn. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn trầm trọng mạn tính dai dẳng có các sự biến cấp tính của các triệu chứng trở nên tồi tệ hơn (các đợt trầm trọng hoặc các đợt trở nặng) mà có

thể là đe dọa đến tính mạng. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn cơ địa dị ứng (còn được gọi là dị ứng), hen suyễn không dị ứng (ví dụ, thường được khởi động bởi tình trạng lây nhiễm virut hô hấp (ví dụ, bệnh cúm, bệnh phó cúm, virut mũi, virut metapneumo ở người, và virut hợp bào hô hấp) hoặc chất gây kích ứng hít vào (tác nhân gây ô nhiễm không khí, khói bụi, hạt diesel, hóa chất dễ bay hơi và các chất khí trong nhà hoặc ngoài trời, hoặc thậm chí bởi không khí khô lạnh).

Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn ngắt quãng hoặc do tập thể dục kích thích do tình trạng phơi nhiễm "khói" sơ cấp hoặc thụ động cấp tính hoặc mạn tính (thông thường là điếu thuốc lá, điếu xì gà, tẩu thuốc), hít vào hoặc "hít hơi" (thuốc lá, cần sa hoặc các chất như vậy khác), hoặc hen suyễn được khởi động bởi quá trình uống aspirin hoặc NSAIDS có liên quan gần đây. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là nhẹ, hoặc hen suyễn nguyên sơ với corticosteroit, hen suyễn mới được chẩn đoán và chưa được điều trị, hoặc trước đó, không cần đến cách dùng kinh niên các steroit dùng toàn thân hoặc khu trú bên ngoài dạng xông hít để kiểm soát các triệu chứng (ho, thở khò khè, thở hụt hơi/khó thở, hoặc đau ngực). Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là mạn tính, hen suyễn kháng lại corticosteroit, hen suyễn chai lờn với corticosteroit, hen suyễn không kiểm soát được đối với corticosteroit hoặc các phương thuốc kiểm soát hen suyễn mạn tính khác.

Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn từ vừa phải đến trầm trọng. Theo các phương án nhất định, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 cao. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn trầm trọng. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn cơ địa dị ứng, hen suyễn dị ứng, hen suyễn không dị ứng (ví dụ, do tình trạng lây nhiễm và/hoặc virut hợp bào hô hấp (RSV)), hen suyễn do tập thể dục kích thích, hen suyễn thêm trầm trọng/nhạy cảm với aspirin, hen suyễn nhẹ, hen suyễn từ vừa phải đến trầm trọng, hen suyễn nguyên sơ với corticosteroit, hen suyễn mạn tính, hen suyễn kháng lại corticosteroit, hen suyễn chai lờn với corticosteroit, hen suyễn mới được chẩn đoán và chưa được điều trị, hen suyễn do khói thuốc lá, hen suyễn không kiểm soát được đối với corticosteroit. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do bạch huyết bào T trợ giúp loại 2 (Th2) hoặc loại 2 (Th2) cao, hoặc hen suyễn do Loại 2 (T2) thúc đẩy. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn bạch cầu ưa eosin. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này

là hen suyễn dị ứng. Theo một số phương án, cá thể đã được xác định là Dương tính với chứng Viêm Bạch cầu ưa eosin (Eosinophilic Inflammation Positive -EIP). Xem tài liệu: WO 2015/061441. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức periostin cao (ví dụ, có mức periostin ít nhất khoảng mức bất kỳ trong số 20ng/ml, 25ng/ml, hoặc 50ng/ml huyết thanh). Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức bạch cầu ưa eosin cao (ví dụ, ít nhất khoảng mức bất kỳ trong số 150, 200, 250, 300, 350, 400 bạch cầu ưa eosin/ml máu). Theo các phương án nhất định, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 thấp hoặc hen suyễn không do Th2 thúc đẩy. Theo một số phương án, cá thể đã được xác định là Âm tính với chứng Viêm Bạch cầu ưa eosin (Eosinophilic Inflammation Negative-EIN). Xem tài liệu: WO 2015/061441. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức periostin thấp (ví dụ, có mức periostin nhỏ hơn khoảng 20ng/ml huyết thanh). Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức bạch cầu ưa eosin thấp (ví dụ, nhỏ hơn khoảng 150 bạch cầu ưa eosin/µl máu hoặc nhỏ hơn khoảng 100 bạch cầu ưa eosin/µl máu).

Thuật ngữ "hen suyễn do mức Th2 cao", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ bệnh hen suyễn mà biểu hiện các mức cao của một hoặc nhiều xytokin liên quan đến tế bào Th2, ví dụ, IL13, IL4, IL9, IL5, hoặc biểu hiện viêm gắn liền với xytokin Th2. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ hen suyễn do mức Th2 cao có thể được sử dụng thay thế cho hen suyễn do mức bạch cầu ưa eosin cao. Theo các phương án nhất định, bệnh hen suyễn do Th2 cao này là hen suyễn do Th2 thúc đẩy. Theo một số phương án, bệnh nhân hen suyễn đã được xác định là Dương tính với chứng Viêm Bạch cầu ưa eosin (EIP). Ví dụ, xem tài liệu: Công bố Đơn yêu cầu cấp patent Quốc tế số WO 2015/061441, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có mức tăng cao của ít nhất một gen trong số các gen chỉ dấu bạch cầu ưa eosin so với mức tham chiếu hoặc đối chứng. Xem tài liệu: WO2015/061441. Theo các phương án nhất định, hen suyễn do mức Th2 cao là hen suyễn do mức periostin cao. Theo một số phương án, cá thể có periostin huyết thanh cao. Theo các phương án nhất định, cá thể này là mười tám tuổi trở lên. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có mức tăng cao của periostin huyết thanh so với mức tham chiếu hoặc đối chứng. Theo các phương án nhất định, mức tham chiếu hoặc đối chứng là mức trung vị của periostin trong quần thể. Theo

các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có periostin huyết thanh 20ng/ml trở lên. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có periostin huyết thanh 25ng/ml trở lên. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có periostin huyết thanh 50ng/ml trở lên. Theo các phương án nhất định, mức tham chiếu hoặc đối chứng của periostin huyết thanh là 20ng/ml, 25ng/ml, hoặc 50ng/ml. Theo các phương án nhất định, hen suyễn là hen suyễn do mức bạch cầu ưa eosin cao. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin tăng cao so với mức tham chiếu hoặc đối chứng. Theo các phương án nhất định, mức tham chiếu hoặc đối chứng là mức trung vị của quần thể. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 150 trở lên /µl máu. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 200 trở lên /µl máu. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 250 trở lên /µl máu. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 300 trở lên /µl máu. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 350 trở lên /µl máu. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 400 trở lên /µl máu. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 450 trở lên /µl máu. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 500 trở lên /µl máu. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin 300 trở lên/µl máu. Theo các phương án nhất định, bạch cầu ưa eosin là bạch cầu ưa eosin máu ngoại vi. Theo các phương án nhất định, bạch cầu ưa eosin là bạch cầu ưa eosin đờm. Theo các phương án nhất định, cá thể này biểu hiện mức tăng cao của FeNO (axit nitric thở ra theo phân đoạn) và/hoặc mức tăng cao của IgE. Ví dụ, trong một số trường hợp, cá thể này biểu hiện mức FeNO cao hơn khoảng 250 phần tỷ (ppb), cao hơn khoảng 275 ppb, cao hơn khoảng 300 ppb, cao hơn khoảng 325 ppb, cao hơn khoảng 325 ppb, hoặc cao hơn khoảng 350 ppb. Trong một số trường hợp, cá thể này có mức IgE mà cao hơn 50 IU/ml.

Thuật ngữ "hen suyễn do mức Th2 thấp" hoặc "hen suyễn do mức Th2 không cao" như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ bệnh hen suyễn mà biểu hiện các mức thấp của một hoặc nhiều xytokin liên quan đến tế bào Th2, ví dụ, IL13, IL4, IL9, IL5, hoặc biểu hiện viêm không gắn liền với xytokin Th2. Theo các phương

án nhất định, thuật ngữ hen suyễn do mức Th2 thấp có thể được sử dụng thay thế cho hen suyễn do mức bạch cầu ưa eosin thấp. Theo một số phương án, bệnh nhân hen suyễn đã được xác định là Âm tính với chứng Viêm Bạch cầu ưa eosin (EIN). Ví dụ, xem tài liệu: WO 2015/061441. Theo các phương án nhất định, hen suyễn do mức Th2 thấp là hen suyễn do Th17 thúc đẩy. Theo các phương án nhất định, hen suyễn do mức Th2 thấp là hen suyễn do mức periostin thấp. Theo các phương án nhất định, cá thể này là mười tám tuổi trở lên. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có mức periostin huyết thanh giảm so với mức tham chiếu hoặc đối chứng. Theo các phương án nhất định, mức tham chiếu hoặc đối chứng là mức trung vị của periostin trong quần thể. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có periostin huyết thanh nhỏ hơn 20ng/ml. Theo các phương án nhất định, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức bạch cầu ưa eosin thấp. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin giảm so với mức tham chiếu hoặc đối chứng. Theo các phương án nhất định, mức tham chiếu hoặc đối chứng là mức trung bình của quần thể. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin nhỏ hơn 150 /µl máu. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin nhỏ hơn 100 /µl máu. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, cá thể đã được xác định là có số lượng bạch cầu ưa eosin nhỏ hơn 300/µl máu.

Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào là viêm thực quản (ví dụ, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin), viêm mũi dị ứng, viêm mũi không dị ứng, viêm mũi xoang có polyp, chứng polyp mũi, viêm phế quản, viêm phổi mạn tính, viêm phế quản phổi dị ứng do nhiễm nấm cúc, viêm khí đạo, viêm mũi dị ứng, bệnh giãn phế quản, và/hoặc viêm phế quản mạn tính.

Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào, là viêm khớp. Theo một số phương án, bệnh viêm khớp này là viêm khớp dạng thấp. Theo một số phương án, bệnh viêm khớp này là viêm khớp xương, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp tuổi thiếu niên, viêm khớp dạng thấp ở tuổi thiếu niên, viêm khớp sớm, viêm đa khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp khởi

phát toàn thân, viêm khớp bệnh đường ruột, viêm khớp phản ứng, viêm khớp vảy nến, và/hoặc viêm khớp là kết quả của tổn thương.

Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào là tình trạng viêm dạ dày-ruột. Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là IBD (bệnh viêm ruột), viêm loét kết tràng (UC), bệnh Crohn (CD), viêm kết tràng (ví dụ, viêm kết tràng do các tác nhân gây hại từ môi trường gây ra (ví dụ, do chế độ trị liệu gây ra hoặc gắn liền với chế độ trị liệu, như liệu pháp hóa học, liệu pháp phóng xạ, v.v.)), viêm kết tràng lây nhiễm, viêm kết tràng do thiếu máu cục bộ, viêm kết tràng colagen hoặc viêm kết tràng bạch huyết bào, viêm kết tràng-ruột non gây hoại tử, viêm kết tràng trong các tình trạng như bệnh u hạt mạn tính hoặc bệnh hệ tiêu hóa không hấp thụ dưỡng chất do gluten, di ứng thực phẩm, viêm dạ dày, viêm dạ dày-ruột, viêm dạ dày lây nhiễm hoặc viêm kết tràng-ruột non (ví dụ,viêm dạ dày hoạt động mạn tính có nhiễm *Helicobacter pylori*), viêm thực quản, và các dạng khác của bệnh viêm dạ dày-ruột do tác nhân lây nhiễm gây ra, hoặc viêm kết tràng không xác định.

Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào là tình trạng viêm dạ dày-ruột. Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là IBD (bệnh viêm ruột). Theo một số phương án, bệnh viêm ruột này là viêm loét kết tràng (UC) hoặc bệnh Crohn (CD). Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là viêm kết tràng (ví dụ, viêm kết tràng do các tác nhân gây hại từ môi trường gây ra (ví dụ, do chế độ trị liệu gây ra hoặc gắn liền với chế độ trị liệu, như liệu pháp hóa học, liệu pháp phóng xạ, v.v.), viêm kết tràng lây nhiễm, viêm kết tràng do thiếu máu cục bộ, viêm kết tràng colagen hoặc viêm kết tràng bạch huyết bào, viêm kết tràng-ruột non gây hoại tử, viêm kết tràng trong các tình trạng như bệnh u hạt mạn tính hoặc bệnh hệ tiêu hóa không hấp thụ dưỡng chất do gluten, di ứng thực phẩm, viêm dạ dày, viêm dạ dày-ruột, viêm dạ dày lây nhiễm hoặc viêm kết tràng-ruột non (ví dụ,viêm dạ dày hoạt động mạn tính có nhiễm *Helicobacter pylori*), và các dạng khác của bệnh viêm dạ dày-ruột do tác nhân lây nhiễm gây ra, hoặc viêm kết tràng không xác định. Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này

là viêm loét kết tràng (UC) hoặc bệnh Crohn (CD). Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là viêm loét kết tràng (UC). Theo một số phương án, bệnh viêm loét kết tràng này là viêm kết tràng xa từ nhẹ đến vừa phải. Theo một số phương án, bệnh viêm loét kết tràng này là viêm kết tràng lan rộng từ nhẹ đến vừa phải. Theo một số phương án, bệnh viêm loét kết tràng này là viêm kết tràng trầm trọng. Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là bệnh Crohn (CD). Theo một số phương án, bệnh Crohn này là ở giai đoạn bệnh cấp tính. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là ở giai đoạn thuyên giảm lâm sàng có kích thích. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là ở giai đoạn thuyên giảm/đáp ứng duy trì. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là bệnh từ nhẹ đến vừa phải. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là bệnh từ vừa phải đến trầm trọng. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là bệnh trầm trọng/kịch phát. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là bệnh hồi tràng, hồi tràng-kết tràng, hoặc kết tràng.

Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc) là lupus hoặc Lupus ban đỏ toàn thân (SLE), hoặc một hoặc nhiều biểu hiện đặc trưng theo cơ quan cụ thể của lupus (ví dụ, lupus viêm thận (LN) ảnh hưởng đến thận, hoặc lupus ngoài thận (ERL) ảnh hưởng đến máu và/hoặc các cơ quan dạng bạch huyết (hạch bạch huyết, lá lách, tuyến ức, và các mạch bạch huyết gắn liền), và/hoặc khớp và/hoặc các cơ quan khác, nhưng không nhất thiết là thận).

Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, hoặc rối loạn xơ hóa là liên quan đến nhiễm trùng máu và/hoặc chấn thương, tình trạng lây nhiễm HIV, hoặc vô căn (thuộc bệnh nguyên học chưa biết) như viêm mạch gắn liền với ANCA (AAV), bệnh tạo u hạt có viêm đa mạch (trước đây được gọi là bệnh tạo u hạt Wegener), bệnh Behcet, bệnh tim mạch, viêm phế quản bạch cầu ưa eosin, Hội chứng Reiter, Hội chứng SEA (Hội chứng của Tình trạng âm tính huyết thanh, Bệnh điểm bám tận, Bệnh khớp), viêm cột sống dính khớp, viêm da-cơ, xơ cứng bì, ví dụ, xơ cứng bì toàn thân còn được gọi là xơ cứng toàn thân, viêm mạch (ví dụ, Viêm động mạch Tế bào khổng

lồ (Giant Cell Arteritis-GCA), còn được gọi là viêm động mạch thái dương, viêm động mạch sọ hoặc bệnh Horton), viêm cơ, viêm đa cơ, viêm da-cơ, viêm đa động mạch dạng nút, viêm động mạch, đau nhức đa cơ, bệnh u hạt phần thịt, xơ cứng đường mật nguyên phát, viêm đường mật xơ cứng hóa, hội chứng Sjogren, bệnh vảy nến, bệnh vảy nến mảng bám, bệnh vảy nến dạng chấm giọt, bệnh vảy nến thể uốn, bệnh vảy nến thể mủ, bệnh vảy nến thể đỏ toàn thân, viêm da, viêm da cơ địa, pemphigus, ví dụ, pemphigus thể thông thường, xơ vữa động mạch, lupus, bệnh Still, nhược cơ năng, bệnh hệ tiêu hóa không hấp thụ dưỡng chất do gluten, xơ cứng rải rác (MS) gồm các loại phụ xơ cứng rải rác tái phát-thuyên giảm (RRMS) hoặc xơ cứng rải rác nguyên phát ngày càng nặng (PPMS) hoặc xơ cứng rải rác thứ phát ngày càng nặng (SPMS), bệnh Guillain-Barre, bệnh đái tháo đường loại I (T1DM) hoặc loại bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin (IDDM) hoặc loại DM khởi phát ở tuổi thiếu niên, viêm tuyến giáp (ví dụ, bệnh Graves), bệnh hệ tiêu hóa không hấp thụ dưỡng chất do gluten, hội chứng Churg-Strauss, hội chứng đau cơ, hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin, các phản ứng phù bao gồm cả chứng phù mạch từng hồi, tình trạng lây nhiễm giun sán, viêm da do bệnh giun chỉ, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, viêm ruột non bạch cầu ưa eosin, viêm kết tràng bạch cầu ưa eosin, chứng ngừng thở lúc ngủ do tắc nghẽn, chứng xơ hóa cơ tim-màng trong tim, bệnh Addison, hiện tượng hoặc bệnh Raynaud, viêm gan tự miễn dịch, bệnh mô ghép chống lại vật chủ (GVHD), hoặc tình trạng đào thải miếng ghép cơ quan.

Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn viêm ở da. Theo một số phương án, rối loạn này là viêm da cơ địa hoặc viêm da do bệnh giun chỉ. Theo một số phương án, rối loạn này là mày đay vô căn mạn tính (CIU hoặc CSU).

Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin này là rối loạn xơ hóa. Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa bao gồm chứng xơ hóa phổi, chứng xơ hóa gan (ví dụ, chứng xơ hóa gắn liền với xơ gan (ví dụ, xơ gan do rượu kích thích, xơ gan do virut kích thích, xơ gan sau viêm gan C, và xơ ống mật nguyên phát), bệnh nhiễm sán máng, viêm đường mật (ví dụ, viêm đường mật xơ cứng hóa), và viêm gan do bệnh tự miễn dịch kích thích), chứng xơ hóa thận (ví dụ, chứng xơ hóa ống-kẽ, xơ cứng bì, viêm thận do đái tháo đường, và viêm thận tiểu cầu thận), chứng xơ hóa da (ví dụ, xơ cứng bì, tình trạng hình thành sẹo phì đại và sẹo lồi, bệnh da xơ hóa do thận, và các vết bỏng), xơ tủy,

bệnh u xơ thần kinh, u xơ, chứng xơ hóa ruột, và các dạng bám dính xơ hóa hình thành từ các quy trình phẫu thuật), chứng xơ hóa tim (ví dụ, chứng xơ hóa gắn liền với nhồi máu cơ tim), chứng xơ hóa mạch (ví dụ, chứng xơ hóa gắn liền với chứng tái phát hẹp động mạch sau phẫu thuật tạo hình mạch máu và xơ vữa động mạch), chứng xơ hóa mắt (ví dụ, chứng xơ hóa gắn liền với phẫu thuật sau bệnh đục thể thủy tinh, bệnh võng mạc-dịch thủy tinh tăng sinh, và chứng xơ hóa sau hốc mắt), và chứng xơ hóa tủy xương (ví dụ, xơ tủy vô căn và xơ tủy do thuốc kích thích). Chứng xơ hóa có thể là đặc trưng theo cơ quan hoặc toàn thân (ví dụ, xơ cứng toàn thân và chứng xơ hóa gắn liền với GVHD). Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa là chứng xơ hóa phổi. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là viêm phổi kẽ xơ hóa. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF), còn được gọi là viêm phế nang xơ hóa không rõ nguyên nhân. Theo một số phương án, IPF là theo giới tính, độ tuổi và sinh lý học (gender, age and physiology-GAP)-giai đoạn I. Theo một số phương án, IPF là theo GAP-giai đoạn II. Theo một số phương án, IPF là theo GAP-giai đoạn III. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là IPF tản phát. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là chứng xơ hóa phổi có tính gia đình. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là bệnh tràn khí và chứng xơ hóa phổi kết hợp. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi này là gắn liền với một hoặc nhiều chứng bệnh trong số các chứng bệnh sau đây: viêm phổi kẽ thông thường; viêm phổi kẽ vô căn; viêm phổi kẽ bong vảy; viêm tiểu phế quản hô hấp-bệnh phổi kẽ; viêm phổi kẽ cấp tính; viêm phổi kẽ không đặc hiệu; bệnh u hạt phần thịt; viêm phổi tổ chức hóa không rõ nguyên nhân; viêm phổi bạch cầu ưa eosin; tình trạng lây nhiễm; tình trạng phơi nhiễm tác nhân môi trường và nghề nghiệp; tình trạng hút thuốc lá; bệnh phổi kẽ do thuốc hoặc bức xạ kích thích; bệnh phổi kẽ gắn liền với bệnh thấp khớp; viêm phổi kẽ dạng bạch huyết; bệnh xơ chun phổi-màng phổi; chứng tăng sinh mô bào tế bào Langerhans phổi; bệnh phổi kẽ-xơ cứng toàn thân; hội chứng Hermansky-Pudlak; và bệnh telomere.

Theo một số phương án, rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin là bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Theo một số phương án, COPD là chủng loại A theo Chiến lược Toàn cầu về Bệnh Phổi Tắc nghẽn Mạn tính (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease-GOLD). Theo một số phương án, COPD là chủng loại B theo

GOLD. Theo một số phương án, COPD là chủng loại C theo GOLD. Theo một số phương án, COPD là chủng loại D theo GOLD. Theo một số phương án, COPD là viêm phế quản mạn tính. Theo một số phương án, COPD là bệnh tràn khí. Theo một số phương án, bệnh tràn khí này là bệnh tràn khí tuyến nang gần, tất cả tuyến nang, hoặc tuyến nang xa. Theo một số phương án, bệnh tràn khí là bệnh tràn khí do thuốc lá kích thích. Theo một số phương án, COPD là gắn liền với tình trạng phơi nhiễm bụi dạng hạt, khói hóa học, và/hoặc tình trạng ô nhiễm không khí. Theo một số phương án, COPD là gắn liền với sự phát triển phổi bị sút kém. Theo một số phương án, COPD là hen suyễn tắc nghẽn mạn tính. Theo một số phương án, COPD là gắn liền với tình trạng thiếu hụt chất kháng trypsin alpha-1. Theo một số phương án, COPD là gắn liền với tình trạng phá vỡ chất ức chế proteaza serin nhánh E, thành viên 2 (SERPINE2). Theo một số phương án, COPD này là COPD có viêm toàn thân dai dẳng. Theo một số phương án, COPD này là COPD bạch cầu ưa eosin hoặc COPD do T-trợ giúp loại 2 (T_H2) cao. Theo một số phương án, COPD này là COPD có sự cư trú dai dẳng của vi khuẩn. Theo một số phương án, COPD này là COPD có các đợt trầm trọng thường xuyên. Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin là hội chứng chồng lấn hen suyễn-COPD (ACOS). Theo một số phương án, ACOS là ACOS nổi trội về bạch cầu ưa eosin, nổi trội về bạch cầu trung tính, mẫu hình hỗn hợp hoặc không có viêm (ít bạch cầu hạt). Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin là hội chứng chồng lấn COPD-chứng ngừng thở lúc ngủ do tắc nghẽn (OSA).

Các danh sách trên đây là không bao gồm tất cả, và chuyên gia có trình độ sẽ hiểu rằng một bệnh hoặc rối loạn nào đó có thể rơi vào các chủng loại khác nhau.

Thuật ngữ "tờ hướng dẫn sử dụng" được sử dụng để chỉ các hướng dẫn thường được đưa vào các gói thương mại của các sản phẩm trị liệu, mà chứa thông tin về các chỉ định, cách sử dụng, liều dùng, phương thức cho dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc các cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu như vậy.

Các thuật ngữ "dạng chế phẩm dược" và "chế phẩm dược" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, và được dùng để chỉ chế phẩm ở dạng mà cho phép hoạt tính sinh học của thành phần có hoạt tính được chứa trong đó trở nên hữu hiệu, và

chế phẩm này không chứa hợp phần phụ thêm nào mlà độc hại đến mức không thể chấp nhận được đối với đối tượng mà sẽ được cho dùng dạng chế phẩm này. Các dạng chế phẩm như vậy là vô trùng. Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm dược hoặc dạng chế phẩm dược được cho dùng đối với đối tượng là người.

Dạng chế phẩm dược "vô trùng" là vô khuẩn hoặc không có hoặc về cơ bản không có tất cả các vi sinh vật sống và các bào tử của chúng.

Dạng chế phẩm dược "ổn định" là dạng chế phẩm mà trong đó protein (ví dụ, kháng thể, như kháng thể kháng tryptaza) trong đó về cơ bản giữ lại tính ổn định vật lý và/hoặc tính ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó sau quá trình lưu rữ. Tốt hơn, nếu dạng chế phẩm này về cơ bản giữ lại tính ổn định vật lý và tính ổn định hóa học của nó, cũng như hoạt tính sinh học của nó sau quá trình lưu rữ. Khoảng thời gian lưu trữ thường được chọn lựa dựa trên thời hạn sử dụng được dự định của dạng chế phẩm. Ví dụ, các kỹ thuật phân tích khác nhau dùng để đo tính ổn định của protein là sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này và được tìm hiểu trong tài liệu: *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) và Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). Tính ổn định có thể được đo ở lượng tiếp xúc ánh sáng và/hoặc nhiệt độ được chọn lựa trong khoảng thời gian được chọn lựa. Tính ổn định có thể được đánh giá về định tính và/hoặc về định lượng theo một loạt cách khác nhau, bao gồm cả việc đánh giá về sự hình thành dạng kết tụ (ví dụ, bằng cách sử dụng sắc ký loại trừ theo kích cỡ, bằng cách đo độ đục, và/hoặc bằng phương pháp khảo sát bằng mắt); việc đánh giá về sự hình thành ROS (ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm về tình trạng căng thẳng do ánh sáng hoặc thử nghiệm về tình trạng căng thẳng AAPH); việc oxy hóa các gốc axit amin cụ thể của protein (ví dụ, gốc Trp và/hoặc gốc Met của kháng thể đơn dòng); bằng cách đánh giá tính không thuần nhất điện tích bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi cation, điện di hội tụ đẳng điện mao quản có hình ảnh (icIEF) hoặc điện di vùng mao quản; phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin hoặc trình tự đầu tận cùng carboxy; phép phân tích đo phổ khối; phép phân tích SDS-PAGE để so sánh kháng thể giảm và kháng thể nguyên vẹn; phép phân tích bản đồ peptit (ví dụ, trypsin hoặc LYS-C); đánh giá hoạt tính sinh học hoặc chức năng liên kết đích của protein (ví dụ, chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể); và các phương pháp tương tự. Tính không ổn định có thể bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm bất kỳ

trong số các đặc điểm: quá trình kết tụ, quá trình khử amit (ví dụ, quá trình khử amit Asn), sự oxy hóa (ví dụ, sự oxy hóa Met và/hoặc sự oxy hóa Trp), quá trình đồng phân hóa (ví dụ, quá trình đồng phân hóa Asp), quá trình xén/thủy phân/phân mảnh (ví dụ, quá trình phân mảnh vùng bản lề), sự hình thành suxinimit, (các) xystein không được ghép cặp, quá trình kéo dài đầu tận cùng N, quá trình chế biến đầu tận cùng C, những chênh lệch về mức glycosyl hóa, và các đặc điểm tương tự.

Kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) "giữ lại tính ổn định vật lý của nó" trong dạng chế phẩm dược nếu nó không thể hiện dấu hiệu nào hoặc thể hiện rất ít dấu hiệu về quá trình kết tụ, quá trình kết tủa, quá trình phân mảnh, và/hoặc quá trình làm biến tính sau khi kiểm tra bằng mắt đối với màu và/hoặc độ trong, hoặc như được đo bằng tán xạ ánh sáng UV hoặc bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ.

Kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) "giữ lại tính ổn định hóa học của nó" trong dạng chế phẩm dược, nếu tính ổn định hóa học ở thời điểm đã cho là sao cho kháng thể được xem là vẫn giữ lại hoạt tính sinh học của nó như được định nghĩa dưới đây. Tính ổn định hóa học có thể được đánh giá bằng cách phát hiện và định lượng các dạng được thay đổi về mặt hóa học của kháng thể. Ví dụ, dạng thay đổi hóa học có thể bao gồm sự oxy hóa protein mà có thể được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp lập bản đồ peptit trypsin, sắc ký lỏng hiệu suất cao pha đảo (HPLC) và sắc ký lỏng-phép đo phổ khối (LC/MS). Các loại khác của dạng thay đổi hóa học bao gồm dạng thay đổi điện tích của kháng thể mà có thể được đánh giá bằng, ví dụ, sắc ký trao đổi ion hoặc icIEF.

Kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) "giữ lại hoạt tính sinh học của nó" trong dạng chế phẩm dược, nếu hoạt tính sinh học của kháng thể ở thời điểm đã cho là trong phạm vi khoảng 20% (như trong phạm vi khoảng 10%) của hoạt tính sinh học được biểu hiện vào thời điểm dạng chế phẩm dược được điều chế (trong phạm vi sai số của thử nghiệm), như được xác định, ví dụ, trong thử nghiệm liên kết kháng nguyên hoặc thử nghiệm ức chế in vitro đối với kháng thể đơn dòng (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza đơn dòng). Theo một số phương án, hoạt tính sinh học của kháng thể ở thời điểm đã cho là trong phạm vi khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50% của hoạt tính sinh học được biểu hiện vào thời điểm dạng chế phẩm dược được điều chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "hoạt tính sinh học" của kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) được dùng để chỉ khả năng của kháng thể trong việc liên kết đích của nó, ví dụ, khả năng của kháng thể đơn dòng trong việc liên kết vào kháng nguyên. Hoạt tính này có thể còn bao gồm đáp ứng sinh học mà có thể được đo *in vitro* hoặc *in vivo*. Hoạt tính như vậy có thể là có tính đối kháng hoặc có tính chủ vận.

Protein (ví dụ, kháng thể, như kháng thể kháng tryptaza) mà "dễ bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa" là protein bao gồm một hoặc nhiều (các) gốc mà đã được phát hiện là dễ bị sự oxy hóa như, nhưng không chỉ giới hạn ở, metionin (Met), xystein (Cys), histidin (His), tryptophan (Trp), và tyrosin (Tyr). Ví dụ, axit amin tryptophan trong phần Fab của kháng thể đơn dòng hoặc axit amin metionin trong phần Fc của kháng thể đơn dòng có thể là dễ bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa.

Thuật ngữ "mức oxy hóa tính theo phần trăm" được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm của các kháng thể trong dạng chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược) mà được oxy hóa ở một gốc axit amin cụ thể, ví dụ, gốc Trp (ví dụ, Trp100 trong HVR-H3 của hu31A.v11) hoặc gốc Met. Mức oxy hóa tính theo phần trăm có thể được xác định bằng, ví dụ, phép phân tích đo phổ khối (MS) của một hoặc nhiều peptit trypsin, mà trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin dễ bị oxy hóa cụ thể cư trú. Theo các phương án nhất định, mức oxy hóa tính theo tỷ lệ phần trăm của Trp100 trong HVR-H3 của hu31A.v11 được xác định bằng khối lượng của peptit trypsin được oxy hóa mà trong đó Trp 100 cư trú, so với khối lượng của peptit trypsin tổng thể (được oxy hóa và không được oxy hóa), như được xác định bằng phép phân tích MS. Mức oxy hóa tính theo phần trăm có thể được xác định, ví dụ, trong vòng 9 tháng, 12 tháng, 18 tháng, hoặc hai năm từ thời điểm sản xuất ban đầu của kháng thể hoặc chế phẩm dược của nó.

Thuật ngữ "được xác định sau xét nghiệm về tình trạng căng thẳng AAPH", như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là mức oxy hóa tính theo phần trăm ở một gốc axit amin cụ thể (ví dụ, ở Trp100 trong HVR-H3 của hu31A.v11) được xác định bằng phép phân tích đo phổ khối các peptit trypsin sau quá trình tạo dạng chế phẩm kháng thể ở mức 150mg/ml trong AAPH 5mM trong 25 giờ ở 40°C, ví dụ, như được mô tả ở Ví dụ 5. Kháng thể đã được gây căng thẳng được tiêu hóa bằng trypsin và các peptit đã được tiêu hóa được tiến hành sắc ký lỏng hiệu suất siêu cao-phép đo phổ khối độ phân giải cao (UHPLC-HRMS) để xác định tỷ lệ phần trăm của mức oxy hóa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "dung dịch đệm" được dùng để chỉ dung dịch được đệm mà kháng cự lại những thay đổi về độ pH bởi tác dụng của các hợp phần thể tiếp hợp axit-bazơ của nó. Tốt hơn, nếu dung dịch đệm theo sáng chế này có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 8,0 (ví dụ, khoảng 4,5, khoảng 5, khoảng 5,5, khoảng 6, khoảng 6,5, khoảng 7, khoảng 7,5, hoặc khoảng 8), ví dụ, khoảng độ pH 5,5. Ví dụ, histidin axetat là một ví dụ về dung dịch đệm mà sẽ kiểm soát độ pH trong khoảng này. Một dung dịch đệm thích hợp khác là arginin suxinat và/hoặc histidin suxinat.

"Chất bảo quản" là hợp chất mà có thể được tùy ý lấy vào dạng chế phẩm để làm giảm về cơ bản tác dụng của vi khuẩn trong đó, vì vậy tạo thuận lợi cho quá trình sản xuất, ví dụ, dạng chế phẩm đa dụng. Các ví dụ về chất bảo quản tiềm năng bao gồm octadexyldimetylbenzyl amoni clorua, hexametoni clorua, benzalkoni clorua (hỗn hợp của alkylbenzyldimetylamoni clorua mà trong đó các nhóm alkyl là các hợp chất chuỗi dài), và benzethoni clorua. Các loại khác của các chất bảo quản bao gồm các rượu thơm như phenol, butyl, và rượu benzyl; các paraben alkyl như paraben propyl hoặc metyl; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol, và m-cresol. Theo một phương án, chất bảo quản trong bản mô tả này là rượu benzyl.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "chất hoạt động bề mặt" được dùng để chỉ chất có hoạt tính bề mặt, tốt hơn, nếu là chất hoạt động bề mặt không ion. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả này bao gồm polysorbat (ví dụ, polysorbat 20 và polysorbat 80); poloxame (ví dụ, poloxame 188); TRITON®; natri dodexyl sulfat (SDS); natri laurel sulfat; natri octyl glycosit; lauryl-sulfobetain, myristyl-sulfobetain, linoleyl-sulfobetain, hoặc stearyl-sulfobetain; lauryl-sarcosin, myristyl-sarcosin, linoleyl-sarcosin hoặc stearyl-sarcosin; linoleyl-betain, myristyl-betain, hoặc xetyl-betain; lauroamidopropyl-betain, cocamidopropyl-betain, linoleamidopropyl-betain, myristamidopropyl-betain, palmidopropyl-betain, hoặc isostearamidopropyl-betain (ví dụ, lauroamidopropyl); myristamidopropyl-dimetylamin, palmidopropyl-dimetylamin, hoặc isostearamidopropyl-dimetylamin; natri metyl cocoyl-taurat, hoặc dinatri metyl oleyl-taurat; và dãy nối tiếp MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polyetyl glycol, polypropyl glycol, và các copolyme của etylen và propylen glycol (ví dụ, các copolyme khối loại PLURONIC®, ví dụ, PLURONIC® F-68); và các chất tương

tự. Theo một phương án, chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả này là polysorbat 20. Theo một phương án khác nữa, chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả này là poloxame 188.

"Chất mang dược dụng" được dùng để chỉ thành phần trong dạng chế phẩm dược, không phải là thành phần có hoạt tính, chất này là không độc hại đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ "tiền dược chất" như được sử dụng trong đơn này được dùng để chỉ dạng tiền chất hoặc dạng dẫn xuất của chất có hoạt tính về mặt dược lý mà ít gây độc tế bào hơn đối với các tế bào khối u so với thuốc mẹ và có khả năng được hoạt hóa hoặc chuyển hóa theo kiểu enzym thành dạng mẹ có hoạt tính hơn. Ví dụ, xem tài liệu: Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) và Stella et al. "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Các tiền dược chất theo sáng chế này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tiền dược chất chứa phosphat, các tiền dược chất chứa thiophosphat, các tiền dược chất chứa sulfat, các tiền dược chất chứa peptit, các tiền dược chất được cải biến ở D-axit amin, các tiền dược chất được glycosyl hóa, tiền dược chất chứa β-lactam, các tiền dược chất chứa phenoxyaxetamit tùy ý được thế hoặc các tiền dược chất chứa phenylaxetamit tùy ý được thế, 5-floxytosin và các tiền dược chất 5-flouridin khác mà có thể được chuyển hóa thành thuốc tự do gây độc tế bào có hoạt tính hơn. Các ví dụ về thuốc gây độc tế bào mà có thể được tạo dẫn xuất thành dạng tiền dược chất để sử dụng theo sáng chế này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất hóa trị liệu được mô tả trên đây.

"Đối tượng" là động vật có xương sống, tốt hơn, nếu là động vật có vú, tốt hơn nữa, nếu là con người. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gia súc (như bò, và cừu), động vật thể thao, thú cưng (như mèo, chó và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, con người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ (ví dụ, khỉ đuôi dài)), và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "quá trình cho dùng" có nghĩa là phương pháp cho dùng liều dùng của hợp chất (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế

hoặc chất trị liệu phụ thêm) hoặc chế phẩm (ví dụ, chế phẩm dược, ví dụ, chế phẩm dược bao gồm cả kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế, tùy ý còn bao gồm cả chất trị liệu phụ thêm, chất này có thể bao gồm một tá dược như chất chống oxy hóa (ví dụ, N-axetyltryptophan và/hoặc metionin)) đối với đối tượng. Các chế phẩm được sử dụng trong các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được cho dùng, ví dụ, theo kiểu trong dịch kính, theo kiểu trong cơ, theo kiểu trong tĩnh mạch, theo kiểu trong da, theo kiểu qua da, theo kiểu trong động mạch, theo kiểu trong màng bụng, theo kiểu trong tổn thương, theo kiểu trong sọ, theo kiểu trong khớp, theo kiểu trong tuyến tiền liệt, theo kiểu trong màng phổi, theo kiểu trong khí quản, theo kiểu trong khoang dịch não tủy, theo kiểu trong mũi, theo kiểu trong âm đạo, theo kiểu trong trực tràng, theo kiểu khu trú, theo kiểu trong khối u, theo kiểu qua màng bụng, theo kiểu dưới da, theo kiểu dưới kết mạc, theo kiểu trong túi dịch biểu bì, theo kiểu qua màng nhầy, theo kiểu trong màng bao tim, theo kiểu trong rốn, theo kiểu trong mắt, theo kiểu trong hốc mắt, bằng đường miệng, theo kiểu khu trú, theo kiểu qua da, theo kiểu quanh mắt, theo kiểu qua kết mạc, theo kiểu dưới bao Tenon, theo kiểu trong buồng, theo kiểu dưới võng mạc, theo kiểu sau nhãn cầu, theo kiểu trong tiểu quản, bằng phương pháp xông hít, bằng phương pháp tiêm, bằng phương pháp cấy ghép, bằng phương pháp tiêm truyền, bằng phương pháp tiêm truyền liên tục, bằng cách rửa truyền khu trú trực tiếp các tế bào đích, bằng ống thông, bằng phương pháp súc rửa, dưới dạng các thuốc kem, hoặc trong các chế phẩm lipit. Các chế phẩm được sử dụng trong các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được cho dùng theo kiểu toàn thân hoặc theo kiểu cục bộ. Phương pháp cho dùng này có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau (ví dụ, hợp chất hoặc chế phẩm đang được cho dùng và mức độ trầm trọng của tình trạng, bệnh, hoặc rối loạn đang được điều trị).

"Lượng hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu về mặt trị liệu" của một chất nào đó, ví dụ, kháng thể kháng tryptaza hoặc dạng chế phẩm dược (ví dụ, dạng chế phẩm dược mà bao gồm kháng thể kháng tryptaza, chất này có thể bao gồm một tá dược như chất chống oxy hóa (ví dụ, N-axetyltryptophan và/hoặc metionin)), được dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở các mức liều dùng và trong các khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả trị liệu hoặc phòng bệnh mong muốn. Lượng hữu hiệu về mặt trị liệu của kháng thể hoặc mảnh kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza), hoặc chế phẩm của nó, có thể làm

thuyên giảm hoặc điều trị rối loạn hoặc bệnh, hoặc phòng ngừa, làm giảm, làm thuyên giảm, hoặc điều trị các triệu chứng gắn liền với rối loạn hoặc bệnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "việc điều trị" (và các dạng thay đổi về ngữ pháp của nó như "điều trị" hoặc "đang điều trị") được dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng nhằm cố gắng để thay đổi tiến trình tự nhiên của cá thể đang được điều trị, và có thể được thực hiện vì sự phòng bệnh hoặc trong suốt tiến trình của bệnh học lâm sàng. Các tác dụng thích hợp của việc điều trị bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phòng ngừa sự xảy ra hoặc sự tái phát của bệnh, sự giảm bớt của các triệu chứng, sự giảm nhẹ của các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, phòng ngừa hiện tượng di căn, làm giảm tốc độ tiến triển của bệnh, làm thuyên giảm hoặc làm dịu tình trạng bệnh, và sự thuyên giảm hoặc sự tiên lượng được cải thiện. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc để làm chậm sự tiến triển của bệnh. Bệnh nhân có thể được "điều trị" một cách thành công đối với bệnh hen suyễn nếu, ví dụ, sau khi tiếp nhận liệu pháp hen suyễn, thì bệnh nhân thể hiện mức giảm có thể quan sát được và/hoặc có thể đo được về một hoặc nhiều hiện tượng trong số các hiện tượng sau đây hoặc sự thiếu vắng một hoặc nhiều hiện tượng trong số các hiện tượng sau đây: hiện tượng thở khò khè tái phát, hiện tượng ho, khó thở, chứng tức ngực, các triệu chứng mà xảy ra hoặc trở nên tồi tệ hơn vào ban đêm, các triệu chứng mà được khởi động bởi không khí lạnh, tập thể dục hoặc tình trạng phơi nhiễm dị ứng nguyên.

Thuật ngữ "interleukin-5 (IL-5)", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ IL-5 nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao quát IL-5 chưa được chế biến có "chiều dài đầy đủ", IL-5 trưởng thành, cũng như dạng bất kỳ của IL-5 mà hình thành từ các dạng cải biến sau dịch mã. Thuật ngữ này cũng bao quát các biến thể có trong tự nhiên của IL-5, như các biến thể tách ghép vùng nội hoặc các biến thể alen. Có thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-5 làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: P05113.

Thuật ngữ "chất đối kháng liên kết trục IL-5" được dùng để chỉ phân tử mà làm giảm, phong bế, ức chế, triệt tiêu hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu hình thành từ

quá trình tương tác của IL-5 với một hoặc nhiều đối tác liên kết trong số các đối tác liên kết của nó, như thụ thể IL-5, alpha (*IL5RA*). Các chất đối kháng liên kết trục IL-5 làm ví dụ mà có thể được sử dụng trong các phương pháp của sáng chế bao gồm, ví dụ, các chất đối kháng liên kết IL-5 (ví dụ, kháng thể kháng IL-5 (ví dụ, mepolizumab, benralizumab, và reslizumab) và các chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5 (ví dụ, các kháng thể kháng IL-5R)).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "interleukin-13 (IL-13)" được dùng để chỉ IL-13 nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. IL-13 là xytokin do nhiều loại tế bào tiết, bao gồm cả các tế bào T trợ giúp loại 2 (Th2). Thuật ngữ này bao quát IL-13 chưa được chế biến có "chiều dài đầy đủ", IL-13 trưởng thành, cũng như dạng bất kỳ của IL-13 mà hình thành từ các dạng cải biến sau dịch mã. Có thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-13 của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: P35225.

Thuật ngữ "chất đối kháng liên kết trục IL-13" được dùng để chỉ phân tử mà làm giảm, phong bế, ức chế, triệt tiêu hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu hình thành từ quá trình tương tác của IL-13 với một hoặc nhiều đối tác liên kết trong số các đối tác liên kết của nó, như thụ thể IL-4 alpha (IL4Rα), thụ thể IL-13 alpha1 (IL13RA1) và thụ thể IL-13 alpha2 (IL13RA2). Các chất đối kháng liên kết trục IL-13 bao gồm các chất đối kháng liên kết IL-13 (ví dụ, kháng thể kháng IL-13, ví dụ, lebrikizumab, 228B/C-1, 228A-4, 227-26, và 227-43 (ví dụ, xem tài liệu: các Patent Mỹ số 7,674,459; 8,067,199; 8,088,618; 8,318,160; và 8,734,797) và các chất đối kháng liên kết thụ thể IL-13 (ví dụ, kháng thể kháng IL4Rα, kháng thể kháng IL13RA1, hoặc kháng thể kháng IL13RA2).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "interleukin-17 (IL-17)" được dùng để chỉ IL-17 nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác, và bao gồm các thành viên họ IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, và IL-17F. Thuật ngữ này bao quát IL-17 chưa được chế biến có "chiều dài đầy đủ", IL-17 trưởng thành, cũng như dạng bất kỳ của IL-17 mà hình thành từ các dạng cải biến sau dịch mã. Có thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-17A của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: Q16552. Có

thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-17B của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: Q9UHF5. Có thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-17C của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: Q9P0M4. Có thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-17D của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: Q8TAD2. Có thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-17E của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: Q9H293. Có thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-17F của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: Q96PD4.

Thuật ngữ "chất đối kháng liên kết trục IL-17" được dùng để chỉ phân tử mà làm giảm, phong bế, ức chế, triệt tiêu hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu hình thành từ quá trình tương tác của IL-17 với một hoặc nhiều đối tác liên kết trong số các đối tác liên kết của nó, như các protein thành viên họ thụ thể interleukin-17 (IL-17R) thụ thể interleukin 17 A (IL17RA), thụ thể interleukin 17 B (IL17RB), thụ thể interleukin 17 C (IL17RC), thụ thể interleukin 17 D (IL17RD), thụ thể interleukin 17 E (IL17RE), và chất giống thụ thể interleukin 17 E (IL17REL). Các chất đối kháng liên kết trục IL-17 làm ví dụ bao gồm, ví dụ, các chất đối kháng liên kết IL-17 (ví dụ, các kháng thể kháng IL-17 (ví dụ, secukinumab (AIN417), ixekizumab (LY2439821), bimekizumab, và NI-1401) và các chất đối kháng liên kết thụ thể IL-17 (ví dụ, các kháng thể kháng IL-17R (ví dụ, brodalumab (AMG-827))). Ví dụ, xem tài liệu: WO 2006/013107, WO 2007/070750, WO 2012/156219, và Patent Mỹ số 8,715,669.

Thuật ngữ "interleukin-33 (IL-33)", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ IL-33 nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, con người và khỉ đuôi dài) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. IL-33 trong lĩnh vực kỹ thuật này còn được gọi là yếu tố nhân của các tĩnh mạch nhỏ nội mạc cao (NF-HEV; ví dụ, xem tài liệu: Baekkevold et al. *Am. J. Pathol.* 163(1): 69-79, 2003), DVS27, C9orf26, và interleukin-1 thành viên họ 11 (IL-1F11). Thuật ngữ này bao quát IL-33 chưa được chế biến có "chiều dài đầy đủ", IL-33 trưởng thành, cũng như dạng bất kỳ của IL-33 mà hình thành từ các dạng cải biến sau dịch mã. IL-33 chưa được chế biến có chiều dài đầy đủ của người chứa 270 axit amin (a.a.) và còn có thể được gọi là IL-$33_{1\text{-}270}$. Các dạng đã được chế biến của IL-33 của người bao gồm, ví dụ, IL-$33_{95\text{-}270}$, IL-$33_{99\text{-}270}$, IL-$33_{109\text{-}270}$, IL-$33_{112\text{-}270}$, IL-$33_{1\text{-}178}$, và IL-$33_{179\text{-}270}$ (Lefrançais et al. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. 109(5):1673-1678, 2012 và Martin, *Semin. Immunol.* 25: 449-457, 2013). Theo một số phương án, các dạng đã được chế biến của IL-33 của người, ví dụ, IL-33$_{95-270}$, IL-33$_{99-270}$, IL-33$_{109-270}$, hoặc các dạng khác được chế biến bằng các proteaza như calpain, proteinaza 3, elastaza bạch cầu trung tính, và cathepsin G có thể có hoạt tính sinh học tăng so với IL-33 có chiều dài đầy đủ. Thuật ngữ này cũng bao quát các biến thể có trong tự nhiên của IL-33, ví dụ, các biến thể tách ghép vùng nội (ví dụ, biến thể tách ghép vùng nội spIL-33 có hoạt tính theo kiểu cơ hữu mà thiếu exon 3, Hong et al. *J. Biol. Chem.* 286(22):20078-20086, 2011) hoặc các biến thể alen. IL-33 có thể có mặt trong tế bào (ví dụ, trong hạt nhân) hoặc ở dạng xytokin được tiết. Protein IL-33 có chiều dài đầy đủ chứa motif liên kết ADN vòng xoắn-khúc quanh-vòng xoắn bao gồm cả trình tự định vị nhân (a.a.1-75 của IL-33 của người), phần này bao gồm motif liên kết chất nhiễm sắc (a.a. 40-58 của IL-33 của người). Các dạng của IL-33 mà được chế biến và được tiết thiếu các motif đầu tận cùng N này. Có thể tìm thấy trình tự axit amin của IL-33 của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: O95760.

Các thuật ngữ "chất 1 giống thụ thể interleukin 1 (IL1RL1)" và "ST2", được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, được dùng để chỉ ST2 nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. ST2 trong lĩnh vực kỹ thuật này còn được gọi là DER4, T1, và FIT-1. Thuật ngữ này bao quát ST2 chưa được chế biến có "chiều dài đầy đủ", ST2 trưởng thành, cũng như dạng bất kỳ của ST2 mà hình thành từ các dạng cải biến sau dịch mã. Ít nhất bốn dạng đồng đẳng của ST2 là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm cả ST2 tan được (sST2, còn được gọi là IL1RL1-a) và ST2 xuyên màng (ST2L, còn được gọi là IL1RL1-b), mà phát sinh từ quá trình biểu hiện ARN thông tin vi phân từ hệ thống gen khởi đầu kép, và ST2V và ST2LV, mà phát sinh từ dạng tách ghép vùng nội thay thế khác, như được mô tả dưới đây. Cấu trúc miền của ST2L bao gồm ba miền C2 giống globulin miễn dịch ngoại bào, miền xuyên màng, và miền Toll/thụ thể Interleukin-1 (TIR) bào chất. Chất sST2 thiếu miền xuyên màng và miền bào chất được chứa trong ST2L và bao gồm một trình tự đầu tận cùng C 9 axit amin (a.a.) độc nhất (ví dụ, xem tài liệu: Kakkar et al. *Nat. Rev. Drug Disc.* 7: 827-840, 2008). Chất sST2 có thể hoạt động trong vài trò là thụ thể mồi để ức chế IL-33 tan được. Thuật ngữ này cũng

bao quát các biến thể có trong tự nhiên của ST2, ví dụ, các biến thể tách ghép vùng nội (ví dụ, ST2V, mà thiếu motif globulin miễn dịch thứ ba và có đuôi kỵ nước độc nhất, và ST2LV, mà thiếu miền xuyên màng của ST2L) hoặc các biến thể alen (ví dụ, các biến thể mà có tính bảo vệ trước nguy cơ hen suyễn hoặc mà đem lại nguy cơ hen suyễn như được mô tả trong bản mô tả này). Có thể tìm thấy trình tự axit amin của ST2 của người làm ví dụ, ví dụ, theo số truy cập UniProtKB: Q01638. ST2 là một phần của thụ thể IL-33 cùng với đồng thụ thể protein IL-1RAcP. Khả năng liên kết IL-33 vào ST2 và đồng thụ thể protein phụ trợ thụ thể interleukin-1 (IL-1RAcP) tạo thành phức hợp truyền tín hiệu bậc ba 1:1:1 để thúc đẩy quá trình tải nạp tín hiệu phía cuối nguồn (ví dụ, xem tài liệu: Lingel et al. *Structure* 17(10): 1398-1410, 2009, và Liu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(37): 14918-14924, 2013).

Nói là "trục IL-33" có nghĩa là axit nucleic (ví dụ, gen hoặc ARN thông tin được phiên mã từ gen này) hoặc polypeptit mà liên can đến quá trình tải nạp tín hiệu IL-33. Ví dụ, trục IL-33 có thể bao gồm phối tử IL-33, thụ thể (ví dụ, ST2 và/hoặc IL-1RAcP), các phân tử điều hợp (ví dụ, MyD88), hoặc các protein mà kết hợp với các phân tử thụ thể và/hoặc các phân tử điều hợp (ví dụ, các kinaza, như kinaza 1 gắn liền với thụ thể interleukin-1 (IRAK1) và kinaza 4 gắn liền với thụ thể interleukin-1 (IRAK4), hoặc các ligaza ubiquitin E3, như yếu tố 6 gắn liền với thụ thể TNF (TRAF6)).

"Chất đối kháng liên kết trục IL-33" được dùng để chỉ phân tử mà ức chế quá trình tương tác của đối tác liên kết trục IL-33 với một hoặc nhiều đối tác liên kết trong số các đối tác liên kết của nó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, chất đối kháng liên kết trục IL-33 bao gồm các chất đối kháng liên kết IL-33, các chất đối kháng liên kết ST2, và các chất đối kháng liên kết IL1RAcP. Các chất đối kháng liên kết trục IL-33 làm ví dụ bao gồm kháng thể kháng IL-33 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng (ví dụ, kháng thể kháng IL-33 như ANB-020 (AnaptysBio, Inc.) hoặc kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả trong tài liệu: EP1725261, US8187596, WO2011031600, WO2014164959, WO2015099175 hoặc WO2015106080, mỗi tài liệu được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn); các polypeptit mà liên kết IL-33 và/hoặc thụ thể của nó (ST2 và/hoặc IL-1RAcP) và phong bế quá trình tương tác phối tử-thụ thể (ví dụ, các protein ST2-Fc, như những loại được mô tả trong tài liệu: WO 2014/152195, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn; các chất kết dính miễn dịch,

các peptit thể, và ST2 tan được, hoặc các dẫn xuất của chúng); các kháng thể kháng thụ thể IL-33 (ví dụ, kháng thể kháng ST2, ví dụ, AMG-282 (Amgen) hoặc STLM15 (Janssen) hoặc kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng ST2 được mô tả trong tài liệu: WO 2013/173761 và WO 2013/165894, mỗi tài liệu được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn; hoặc các protein ST2-Fc, như những loại được mô tả trong tài liệu: WO 2013/173761; WO 2013/165894; hoặc WO 2014/152195, mỗi tài liệu được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn); và các chất đối kháng thụ thể IL-33, như chất ức chế phân tử nhỏ, aptamer mà liên kết IL-33, và các axit nucleic mà lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với các trình tự axit nucleic trục IL-33 (ví dụ, các ARN cản trở ngắn (short interfering RNA-siRNA) hoặc các ARN lặp lại hoán vị tương tự được đặt cách đều theo cụm (clustered regularly interspaced short palindromic repeat RNA-CRISPR-RNA hay crRNA), bao gồm các ARN hướng dẫn đơn (sgRNA) có trình tự crRNA và tracrRNA như được mô tả trong tài liệu: Mali et al. (*Science*. 339: 823-26, 2013), tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn).

Các thuật ngữ "kháng thể kháng IL-33", "kháng thể mà liên kết vào IL-33", và "kháng thể mà liên kết đặc hiệu IL-33" được dùng để chỉ kháng thể mà có khả năng liên kết IL-33 với ái lực đủ sao cho kháng thể này là hữu ích trong vai trò là tác nhân chẩn đoán và/hoặc chất trị liệu trong việc hướng đích IL-33. Theo một phương án, mức độ liên kết của kháng thể kháng IL-33 vào protein không IL-33 không liên quan là nhỏ hơn khoảng 10% của khả năng liên kết của kháng thể vào IL-33 như được đo, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể mà liên kết vào IL-33 có hằng số phân ly (K_D) là $\leq$ 1μM, $\leq$ 100nM, $\leq$ 10nM, $\leq$ 1nM, $\leq$ 0,1nM, $\leq$ 0,01nM, hoặc $\leq$ 0,001nM (ví dụ, 10^{-8} M trở xuống, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng IL-33 liên kết vào epitop của IL-33 mà được bảo toàn trong số IL-33 từ các loài khác nhau.

Thuật ngữ "chất đối kháng liên kết ST2" được dùng để chỉ phân tử mà ức chế quá trình tương tác của ST2 với IL-33, IL1RAcP, và/hoặc phân tử ST2 thứ hai. Chất đối kháng liên kết ST2 có thể là protein, như "protein ST2-Fc" mà bao gồm miền liên kết IL-33 (ví dụ, tất cả hoặc một phần của protein ST2 hoặc protein IL1RAcP) và miền multime hóa (ví dụ, phần Fc của globulin miễn dịch, ví dụ, miền Fc của IgG được chọn lựa từ các kiểu tương đương lgG1, lgG2, lgG3, và lgG4, cũng như kiểu khác loại bất kỳ

trong phạm vi mỗi nhóm kiểu tương đương), phần này được gắn kết vào nhau một cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua gốc liên kết (ví dụ, gốc liên kết serin-glyxin (SG), gốc liên kết glyxin-glyxin (GG), hoặc biến thể của chúng (ví dụ, SGG, GGS, SGS, hoặc gốc liên kết GSG)), và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các protein ST2-Fc và các biến thể của chúng được mô tả trong tài liệu: WO 2013/173761, WO 2013/165894, và WO 2014/152195, mỗi tài liệu được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết ST2 có thể là kháng thể kháng ST2, ví dụ, AMG-282 (Amgen) hoặc STLM15 (Janssen) hoặc kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng ST2 được mô tả trong tài liệu: WO 2013/173761 và WO 2013/165894.

"Axit nucleic được phân lập" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic mà đã được tách từ hợp phần của môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic được chứa trong các tế bào mà thường chứa phân tử axit nucleic, nhưng phân tử axit nucleic này có mặt theo kiểu ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể mà khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

Thuật ngữ "trình tự kiểm soát" được dùng để chỉ các trình tự ADN cần thiết cho quá trình biểu hiện trình tự ghi mã được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được ở một sinh vật chủ cụ thể. Trình tự kiểm soát mà thích hợp cho sinh vật nhân sơ, ví dụ, bao gồm gen khởi đầu, tùy ý là trình tự gen điều khiển, và vị trí liên kết ribosom. Các tế bào nhân thực được biết đến là có sử dụng các gen khởi đầu, tín hiệu polyadenyl hóa, và yếu tố tăng cường.

Các thuật ngữ "tế bào chủ", "dòng tế bào chủ", và "môi trường nuôi cấy tế bào chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và được dùng để chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào đó, bao gồm cả thế hệ con của các tế bào như vậy. Các tế bào chủ bao gồm "các thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp", mà bao gồm tế bào được biến nạp sơ cấp và thế hệ con được tạo ra từ đó mà không liên quan đến số lần chuyển tiếp. Thế hệ con có thể là không đồng nhất hoàn toàn về hàm lượng axit nucleic với tế bào mẹ, nhưng có thể chứa các đột biến. Thế hệ con đột biến mà có cùng một chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lựa cho tế bào được biến nạp gốc được lấy vào bản mô tả này.

Axit nucleic được "liên kết theo kiểu có thể hoạt động được" khi nó được đặt vào mối quan hệ chức năng với một trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN của tiền trình tự

hoặc đoạn dẫn đầu tiết được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào ADN của polypeptit nếu nó được biểu hiện ở dạng preprotein mà tham gia vào quá trình tiết polypeptit này; gen khởi đầu hoặc yếu tố tăng cường được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ghi mã nếu nó ảnh hưởng đến quá trình phiên mã của trình tự này; hoặc một vị trí liên kết ribosom được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ghi mã nếu nó được đặt ở vị trí mà tạo thuận lợi cho quá trình dịch mã. Nhìn chung, "được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được" có nghĩa là các trình tự ADN được liên kết là liên tiếp, và, trong trường hợp đoạn dẫn đầu tiết, là liên tiếp và trong pha đọc. Tuy nhiên, yếu tố tăng cường không buộc phải là liên tiếp. Việc liên kết được thực hiện bằng cách thắt ở các vị trí giới hạn thuận tiện. Nếu các vị trí như vậy không tồn tại, thì các gốc liên kết và điều hợp của oligonucleotit tổng hợp được sử dụng theo thực tiễn thông thường.

"Độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo phần trăm (%)" liên quan đến các trình tự polypeptit được nhận diện trong bản mô tả này được định nghĩa là tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin ở trình tự ứng viên mà đồng nhất với các gốc axit amin ở polypeptit đang được so sánh, sau khi xếp thẳng hàng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần thiết, để đạt được độ đồng nhất trình tự tính theo phần trăm tối đa, và không xem các dạng thay thế có tính bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Có thể đạt được dạng xếp thẳng hàng dùng cho các mục đích của việc xác định độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo phần trăm theo các cách khác nhau mà trong phạm vi kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy vi tính sẵn có cho công chúng như BLAST, BLAST-2, ALIGN, hoặc phần mềm Megalign (DNASTAR). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp dùng để đo dạng xếp thẳng hàng, bao gồm cả các thuật toán bất kỳ cần thiết để đạt được dạng xếp thẳng hàng tối đa trên khắp chiều dài đầy đủ của trình tự đang được so sánh. Tuy nhiên, vì các mục đích trong bản mô tả này, các trị số về độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình vi tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình vi tính so sánh trình tự ALIGN-2 được viết bởi Genentech, Inc. và mã nguồn đã được nộp với hồ sơ người sử dụng tại Cục Bản quyền Mỹ, Thủ đô Washington, 20559, mà tại đó nó được đăng ký theo Giấy Đăng ký Bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 là sẵn có cho công chúng thông qua

Genentech, Inc., South San Francisco, California. Chương trình ALIGN-2 cần phải được biên dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, tốt hơn, nếu là UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả thông số so sánh trình tự được ấn định bằng chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong các tình huống mà ALIGN-2 được sử dụng cho các so sánh trình tự axit amin, thì độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % của trình tự axit amin A đã cho so với, với, hoặc đối với trình tự axit amin B đã cho (câu này có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự axit amin A đã cho mà có hoặc bao gồm độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % nhất định so với, với, hoặc đối với trình tự axit amin B đã cho) được tính toán như sau:

100 nhân với phân số X/Y

trong đó X là số gốc axit amin được tính điểm là các đoạn khớp bắt cặp đồng nhất bằng chương trình xếp thẳng hàng trình tự ALIGN-2 trong dạng xếp thẳng hàng A và B của chương trình đó, và trong đó Y là tổng số của các gốc axit amin ở B. Sẽ đánh giá được rằng trường hợp độ dài của trình tự axit amin A không bằng độ dài của trình tự axit amin B, thì độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % của A với B sẽ không bằng độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % của B với A. Trừ khi được quy định cụ thể khác, tất cả các trị số về độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % được sử dụng trong bản mô tả này là thu được như được mô tả trong đoạn văn ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình máy vi tính ALIGN-2.

Trình tự axit amin được mô tả trong bản mô tả này là trình tự axit amin liên tiếp trừ khi được chỉ rõ khác.

Thuật ngữ "vật truyền", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển một axit nucleic khác mà nó đã được liên kết vào đó. Một loại vật truyền là "plasmit", thuật ngữ này được dùng để chỉ vòng ADN có dải kép dạng hình tròn mà các đoạn ADN phụ thêm có thể được thắt vào đó. Một loại vật truyền khác là vật truyền thể thực khuẩn. Một loại vật truyền khác là vật truyền virut, trong đó các đoạn ADN phụ thêm có thể được thắt vào hệ gen virut. Các vật truyền nhất định có khả năng sao chép tự chủ trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào đó (ví dụ, các vật truyền vi khuẩn có điểm khởi đầu sao chép vi khuẩn và các vật truyền động vật có vú episom). Các vật truyền khác (ví dụ, các vật truyền động vật có

vú không phải episom) có thể được tích hợp vào hệ gen của tế bào chủ sau khi đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được sao chép cùng với hệ gen vật chủ. Hơn nữa, các vật truyền nhất định có khả năng dẫn dắt quá trình biểu hiện của các gen mà chúng được liên kết theo kiểu có tính hoạt động vào đó. Trong bản mô tả này, các vật truyền như vậy được gọi là "vật truyền biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc một cách đơn giản là, "các vật truyền tái tổ hợp" hoặc "vật truyền biểu hiện"). Nhìn chung, vật truyền biểu hiện có tính hữu dụng trong các kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường là dưới dạng plasmit. Trong bản mô tả này, "plasmit" và "vật truyền" có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

II. Các chế phẩm và phương pháp

Theo một khía cạnh, sáng chế này dựa một phần vào các kháng thể mới mà liên kết vào tryptaza. Theo một khía cạnh khác, sáng chế này dựa một phần vào sự khám phá rằng các gốc cụ thể (ví dụ, các gốc HVR, như W100 HVR-H3, thuật ngữ này được dùng để chỉ W100 của miền VH của kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11) của các kháng thể kháng tryptaza có thể là dễ bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa. Sáng chế đề xuất các chế phẩm dược mà bao gồm chất chống oxy hóa (ví dụ, N-axetyltryptophan và/hoặc metionin) để làm giảm hoặc phòng ngừa việc oxy hóa các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza). Các tá dược chống oxy hóa thích hợp khác bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, tryptophan tự do, xyclodextrin, Trolox (axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-carboxylic), pyridoxin, polyol (ví dụ, manitol), và các chất tạo chelat kim loại (ví dụ, EDTA). Ví dụ, xem tài liệu: Ji et al., *Biotechnology* 98:4485-4500, 2009. Các kháng thể và các chế phẩm dược theo sáng chế là hữu ích, ví dụ, cho sự chẩn đoán và/hoặc điều trị các rối loạn (ví dụ, rối loạn phổi, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc, hoặc rối loạn gắn liền với tryptaza hoặc rối loạn do tryptaza làm trung gian. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các chế phẩm dược được đông khô để làm giảm hoặc loại bỏ việc

oxy hóa các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza).

A. Các kháng thể kháng tryptaza làm ví dụ

Sáng chế đề xuất các kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế liên kết vào tryptaza với K_D là khoảng 100nM trở xuống (ví dụ, 100nM trở xuống, 10nM trở xuống, 1nM trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là 10nM trở xuống (ví dụ, 10nM trở xuống, 1nM trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là 1nM trở xuống (ví dụ, 1nM trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là 0,5nM trở xuống (ví dụ, 0,5nM trở xuống, 400pM trở xuống, 300pM trở xuống, 200pM trở xuống, 100pM trở xuống, 50pM trở xuống, 25pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D từ khoảng 0,1nM đến khoảng 0,5nM (ví dụ, khoảng 0,1nM, khoảng 0,2nM, khoảng 0,3nM, khoảng 0,4nM, hoặc khoảng 0,5nM). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D từ khoảng 1pM đến khoảng 500pM, khoảng 1pM đến khoảng 400pM, khoảng 1pM đến khoảng 300pM, khoảng 1pM đến khoảng 200pM, khoảng 1pM đến khoảng 100pM, khoảng 1pM đến khoảng 50pM, khoảng 25pM đến khoảng 500pM, khoảng 25pM đến khoảng 400pM, khoảng 25pM đến khoảng 300pM, khoảng 25pM đến khoảng 100pM, khoảng 50pM đến khoảng 500pM, khoảng 50pM đến khoảng 450pM, khoảng 50pM đến khoảng 425pM, khoảng 50pM đến khoảng 400pM, khoảng 50pM đến khoảng 375pM, khoảng 50pM đến khoảng 350pM, khoảng 50pM đến khoảng 325pM, khoảng 50pM đến khoảng 300pM, khoảng 50pM đến khoảng 275pM, khoảng 50pM đến khoảng 250pM, khoảng 50pM đến khoảng 200pM, khoảng 50pM đến khoảng 180pM, khoảng 50pM đến khoảng 175pM, khoảng 50pM đến khoảng 150pM, khoảng 50pM đến khoảng 125pM, khoảng 50pM đến khoảng 100pM, khoảng 50pM đến khoảng 75pM, khoảng 100pM đến khoảng 500pM, khoảng 100pM đến khoảng 475pM, khoảng 100pM đến khoảng 450pM, khoảng 100pM đến

khoảng 425pM, khoảng 100pM đến khoảng 400pM, khoảng 100pM đến khoảng 375pM, khoảng 100pM đến khoảng 350pM, khoảng 100pM đến khoảng 325pM, khoảng 100pM đến khoảng 300pM, khoảng 100pM đến khoảng 275pM, khoảng 100pM đến khoảng 250pM, khoảng 100pM đến khoảng 225pM, khoảng 100pM đến khoảng 200pM, khoảng 100pM đến khoảng 180pM, khoảng 100pM đến khoảng 175pM, khoảng 100pM đến khoảng 150pM, khoảng 100pM đến khoảng 125pM, khoảng 150pM đến khoảng 500pM, khoảng 150pM đến khoảng 475pM, khoảng 150pM đến khoảng 450pM, khoảng 150pM đến khoảng 425pM, khoảng 150pM đến khoảng 400pM, khoảng 150pM đến khoảng 375pM, khoảng 150pM đến khoảng 350pM, khoảng 150pM đến khoảng 325pM, khoảng 150pM đến khoảng 300pM, khoảng 150pM đến khoảng 375pM, khoảng 150pM đến khoảng 350pM, khoảng 150pM đến khoảng 325pM, khoảng 150pM đến khoảng 300pM, khoảng 150pM đến khoảng 275pM, khoảng 150pM đến khoảng 225pM, khoảng 150pM đến khoảng 200pM, khoảng 175pM đến khoảng 500pM, khoảng 175pM đến khoảng 475pM, khoảng 175pM đến khoảng 450pM, khoảng 175pM đến khoảng 425pM, khoảng 175pM đến khoảng 400pM, khoảng 175pM đến khoảng 375pM, khoảng 175pM đến khoảng 350pM, khoảng 175pM đến khoảng 325pM, khoảng 175pM đến khoảng 300pM, hoặc khoảng 180pM đến khoảng 400pM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là khoảng 0,4nM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là khoảng 0,2nM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza với K_D là khoảng 0,18nM. Theo một số phương án, tryptaza này là tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người (ví dụ, tryptaza beta 1 của người, tryptaza beta 2 của người, và/hoặc tryptaza beta 3 của người). Theo một số phương án, K_D được xác định trong thử nghiệm SPR BIACORE®. Theo các phương án nhất định, tryptaza này là tryptaza alpha của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể này là kháng thể của người hoặc kháng thể được nhân tính hóa.

Trong một ví dụ khác, theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế (bao gồm cả kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza trên đây) có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza. Theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế có khả năng ức chế hoạt tính thủy phân protein của tryptaza, ví dụ, như được xác định trong thử nghiệm enzym tryptaza in vitro. Theo một số phương án, chất nền nhân tạo, ví dụ, peptit S-2288 tổng hợp có thể được sử dụng làm chất nền

trong thử nghiệm enzym tryptaza in vitro. Theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với nồng độ ức chế một nửa mức tối đa (IC50) là khoảng 100nM trở xuống (ví dụ, 100nM trở xuống, 10nM trở xuống, 5nM trở xuống, 2,5nM trở xuống, 1nM trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống) như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza in vitro, ví dụ, bằng cách sử dụng S-2288 làm chất nền. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 10nM trở xuống (ví dụ, 10nM trở xuống, 5nM trở xuống, 2,5nM trở xuống, 1nM trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống) như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza in vitro, ví dụ, bằng cách sử dụng S-2288 làm chất nền. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 2,5nM trở xuống (ví dụ, 2,5nM trở xuống, 1nM trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống) như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza in vitro, ví dụ, bằng cách sử dụng S-2288 làm chất nền. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 0,1nM đến khoảng 2nM (ví dụ, khoảng 0,1nM, khoảng 0,2nM, khoảng 0,3nM, khoảng 0,4nM, khoảng 0,5nM, khoảng 0,6nM, khoảng 0,7nM, khoảng 0,8nM, khoảng 0,9nM, khoảng 1,0nM, khoảng 1,1nM, khoảng 1,2nM, khoảng 1,3nM, khoảng 1,4nM, khoảng 1,5nM, khoảng 1,6nM, khoảng 1,7nM, khoảng 1,8nM, khoảng 1,9nM, hoặc khoảng 2,0nM). Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 0,5nM đến khoảng 2,5nM (ví dụ, khoảng 0,5nM, khoảng 0,6nM, khoảng 0,7nM, khoảng 0,8nM, khoảng 0,9nM, khoảng 1,0nM, khoảng 1,1nM, khoảng 1,2nM, khoảng 1,3nM, khoảng 1,4nM, khoảng 1,5nM, khoảng 1,6nM, khoảng 1,7nM, khoảng 1,8nM, khoảng 1,9nM, khoảng 2,0nM, khoảng 2,1nM, khoảng 2,2nM, khoảng 2,3nM, khoảng 2,4nM, hoặc khoảng 2,5nM). Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 1pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 25pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 50pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 75pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 100pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 125pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 150pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 175pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 200pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 225pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 250pM

đến khoảng 2,5nM, khoảng 300pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 325pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 325pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 350pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 375pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 400pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 425pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 450pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 500pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 450pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 500pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 550pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 600pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 650pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 700pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 750pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 800pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 850pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 900pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 950pM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,1nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,2nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,3nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,4nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,5nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,6nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,7nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,8nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 1,9nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 2,0nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 2,1nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 2,2nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 2,3nM đến khoảng 2,5nM, khoảng 500pM đến khoảng 1,9pM, khoảng 750pM đến khoảng 1,9pM, khoảng 1nM đến khoảng 1,9pM, khoảng 1,25nM đến khoảng 1,9pM, khoảng 1,5nM đến khoảng 1,9pM, khoảng 1nM đến khoảng 1,85nM, khoảng 1,25nM đến khoảng 1,85nM, khoảng 1,25nM đến khoảng 1,85nM, khoảng 1,5nM đến khoảng 1,85nM, khoảng 1nM đến khoảng 1,8nM, khoảng 1,25nM đến khoảng 1,8nM, khoảng 1,5nM đến khoảng 1,8nM, hoặc khoảng 1,6nM đến khoảng 1,8nM. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 1,8nM. Theo các phương án khác, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 0,5nM đến khoảng 1nM (ví dụ, khoảng 0,5nM, khoảng 0,6nM, khoảng 0,7nM, khoảng 0,8nM, khoảng 0,9nM, hoặc khoảng 1,0nM). Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 1pM đến khoảng 1nM, khoảng 25pM đến khoảng 1nM, khoảng 50pM đến khoảng 1nM, khoảng 75pM đến khoảng 1nM, khoảng 100pM đến khoảng 1nM, khoảng 125pM đến khoảng 1nM, khoảng 150pM đến khoảng 1nM, khoảng 175pM đến khoảng 1nM, khoảng 200pM đến khoảng 1nM, khoảng 225pM đến khoảng 1nM, khoảng 250pM đến khoảng 1nM, khoảng 300pM đến khoảng 1nM, khoảng 325pM đến khoảng 1nM, khoảng 350pM đến khoảng 1nM, khoảng

375pM đến khoảng 1nM, khoảng 400pM đến khoảng 1nM, khoảng 425pM đến khoảng 1nM, khoảng 450pM đến khoảng 1nM, khoảng 500pM đến khoảng 1nM, khoảng 450pM đến khoảng 1nM, khoảng 500pM đến khoảng 1nM, khoảng 550pM đến khoảng 1nM, khoảng 600pM đến khoảng 1nM, khoảng 650pM đến khoảng 1nM, khoảng 700pM đến khoảng 1nM, khoảng 750pM, khoảng 250pM đến khoảng 800pM, khoảng 300pM đến khoảng 800pM, khoảng 325pM đến khoảng 800pM, khoảng 325pM đến khoảng 800pM, khoảng 350pM đến khoảng 800pM, khoảng 375pM đến khoảng 800pM, khoảng 400pM đến khoảng 800pM, khoảng 425pM đến khoảng 800pM, khoảng 450pM đến khoảng 800pM, khoảng 500pM đến khoảng 800pM, khoảng 450pM đến khoảng 800pM, khoảng 500pM đến khoảng 800pM, khoảng 550pM đến khoảng 800pM, khoảng 600pM đến khoảng 800pM, khoảng 650pM đến khoảng 800pM, khoảng 700pM đến khoảng 800pM, khoảng 750pM đến khoảng 800pM, khoảng 1pM đến khoảng 600pM, khoảng 25pM đến khoảng 600pM, khoảng 50pM đến khoảng 600pM, khoảng 75pM đến khoảng 600pM, khoảng 100pM đến khoảng 600pM, khoảng 125pM đến khoảng 600pM, khoảng 150pM đến khoảng 600pM, khoảng 175pM đến khoảng 600pM, khoảng 200pM đến khoảng 600pM, khoảng 225pM đến khoảng 600pM, khoảng 250pM đến khoảng 600pM, khoảng 300pM đến khoảng 600pM, khoảng 325pM đến khoảng 600pM, khoảng 325pM đến khoảng 600pM, khoảng 350pM đến khoảng 600pM, khoảng 375pM đến khoảng 600pM, khoảng 400pM đến khoảng 600pM, khoảng 425pM đến khoảng 600pM, khoảng 450pM đến khoảng 600pM, khoảng 500pM đến khoảng 600pM, khoảng 450pM đến khoảng 600pM, khoảng 500pM đến khoảng 600pM, hoặc khoảng 550pM đến khoảng 600pM. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người với IC50 là khoảng 0,6nM. Theo một số phương án, tryptaza này là tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người (ví dụ, tryptaza beta 1 của người, tryptaza beta 2 của người, và/hoặc tryptaza beta 3 của người). Trong một số trường hợp, hoạt tính ức chế của kháng thể được xác định được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, ở phần các Ví dụ (ví dụ, Ví dụ 1, cụ thể là Mục (A)(viii)(a)), hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án nhất định, kháng thể này là kháng thể của người hoặc kháng thể được nhân tính hóa. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người trong vai trò là kháng thể có hóa trị một hoặc mảnh kháng thể liên kết kháng nguyên của nó (ví

dụ, Fab). Theo các phương án khác, kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính của tryptaza của người trong vai trò là kháng thể có hóa trị hai (ví dụ, kháng thể IgG (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc kháng thể IgG4) hoặc $F(ab')_2$).

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được mô tả trong bản mô tả này có thể ức chế tình trạng co do tryptaza kích thích của các tế bào cơ trơn khí đạo sơ cấp của người. Trong các trường hợp khác, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được mô tả trong bản mô tả này có thể ức chế tình trạng co do tryptaza kích thích của các tế bào cơ trơn khí đạo sơ cấp của người. Còn trong các trường hợp khác, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được mô tả trong bản mô tả này có thể ức chế quá trình giải phóng histamin và/hoặc hiện tượng thoát hạt dưỡng bào do tryptaza hoặc IgE kích thích. Trong các trường hợp khác nữa, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được mô tả trong bản mô tả này có thể làm giảm lượng của tryptaza có hoạt tính (ví dụ, trong mẫu như chất lưu súc rửa phế quản-phế nang hoặc mẫu hấp thụ qua màng nhầy mũi), ví dụ, sau khi cho đối tượng dùng. Ví dụ, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được mô tả trong bản mô tả này có thể làm giảm lượng của tryptaza có hoạt tính là khoảng 1%, khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 15%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99% trở lên. Mức giảm này có thể là so với lượng tham chiếu của tryptaza có hoạt tính, ví dụ, lượng của tryptaza có hoạt tính trong mẫu trước khi cho dùng kháng thể kháng tryptaza.

Trong một số trường hợp, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn lựa từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là $X_1X_2GMX_3$ (SEQ ID NO: 1), trong đó X_1 là Asp hoặc Ser, X_2 là Tyr hoặc Phe, và X_3 là Val hoặc His; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là $RX_1X_2X_3DWYFDV$ (SEQ ID NO: 3), trong đó X_1 là Asn hoặc Asp, X_2 là Tyr hoặc Asn, và X_3 là Asp hoặc Tyr; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID

NO: 6), hoặc dạng kết hợp của một hoặc nhiều vùng trong số các HVR trên đây và một hoặc nhiều biến thể của chúng có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% (ví dụ, độ đồng nhất 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-6.

Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn lựa từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), hoặc dạng kết hợp của một hoặc nhiều vùng trong số các HVR trên đây và một hoặc nhiều biến thể của chúng có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% (ví dụ, độ đồng nhất 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 2 hoặc 4-8.

Trong một ví dụ cụ thể, theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một

số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các vùng khung (FR) chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 11); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 12); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 13); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 15); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKSPKPWIY (SEQ ID NO: 16); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 17); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, như kháng thể hu31A.v11.

Trong một ví dụ cụ thể khác, theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RDNYDWYFDV (SEQ ID NO: 29); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm một,

hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các vùng khung (FR) chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 21); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 22); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCAR (SEQ ID NO: 23); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC (SEQ ID NO: 25); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO: 26); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC (SEQ ID NO: 27); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 28). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20, như kháng thể 31a.

Trong một số trường hợp, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 9, 101, 102, 103, và 104; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 10, 105, và 106; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 98 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 98 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 98 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 99 và miền VL bao gồm trình tự

axit amin là SEQ ID NO: 102. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 99 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 99 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 101 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 101 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10. Trong các trường hợp khác, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 101 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103.

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc tất cả bốn gốc được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc tất cả bốn gốc được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm His51 và ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Val 80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta

1 của người còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, hoặc tất cả mười hai gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO:71. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly cả mặt phân giới nhỏ của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người và mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người.

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza trên đây bao gồm paratop mà liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, hoặc 19 gốc axit amin) được chọn lựa từ nhóm gồm các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Val30; Thr31; Tyr32; Tyr34; Arg50; Tyr90; His92; Ser93; và Tyr94 và các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng Phe50; Ser52; Gly53; Ser54; Ser55; Thr56; Tyr58; Arg95; Tyr97; và Asp98.

Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza bao gồm paratop mà liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Val30, Thr31, Tyr32, Tyr34, Arg50, Tyr90, His92, Ser93, và Tyr94 hoặc các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng Phe50, Ser52, Gly53, Ser54, Ser55, Thr56, Tyr58, Arg95, Tyr97, và Asp98. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza bao gồm paratop mà liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Val30, Thr31, Tyr32, Tyr34, Arg50, Tyr90, His92, Ser93, và Tyr94 và các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng Phe50, Ser52, Gly53, Ser54, Ser55, Thr56, Tyr58, Arg95, Tyr97, và Asp98.

Trong một số trường hợp, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn lựa từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là ETSILTS (SEQ ID NO: 34); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35), hoặc dạng kết hợp của một hoặc nhiều vùng trong số các HVR trên đây và một hoặc nhiều biến thể của chúng có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% (ví dụ, độ đồng nhất 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 30-35.

Trong một số trường hợp, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51, và 52; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 37, 53, 58, hoặc 59; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b).

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các vùng khung (FR) chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của $WX_1RQPPGKGLEWIG$ (SEQ ID NO: 39), trong đó X_1 là Ile hoặc Val; (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ,

độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của $RX_1TISX_2DTSKNQX_3SLKLSSVTAADTAVYX_4CAR$ (SEQ ID NO: 40), trong đó X_1 là Val hoặc Ser, X_2 là Arg hoặc Val, X_3 là Val hoặc Phe, và X_4 là Tyr hoặc Phe; và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

Trong một ví dụ khác, trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLI (SEQ ID NO: 44); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 45); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 46); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

Trong một ví dụ khác, trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLI (SEQ ID NO: 44); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 45); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 46); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của $DX_1QX_2TQSPSSLSASVGDRVTITC$ (SEQ ID NO: 60), trong đó X_1 là Ile hoặc Ala, và X_2 là Met hoặc Leu; (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của $WYQQKPGKX_1PKLLIY$ (SEQ ID NO: 61), trong đó X_1 là Ala hoặc Pro; (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của $VPSRFSGSGSX_1TDFTLTISSLQPEDFATYX_2C$ (SEQ ID NO: 62), trong đó X_1 là Gly hoặc Glu, và X_2 là Tyr hoặc Phe; và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63).

Ví dụ, trong các trường hợp cụ thể, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63).

Theo một số phương án, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây (ví dụ, các kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISC (SEQ ID NO: 67); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 68); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là $GVPSRFKGSGSETQFTLTISDVQX_1DDAATYFC$ (SEQ ID NO: 69), trong

đó X_1 là Cys hoặc Ala; và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK FGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 70).

Trong một số trường hợp, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51, và 52; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin có một trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 37, 53, 58, và 59; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 49 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48 và miền

VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 49 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 58. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 58. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 58. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 49 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 58. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 58. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 58. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 59. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 59. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 59. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 49 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 59. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 59. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 59.

Trong một ví dụ cụ thể khác, theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza có thể bao gồm (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là ETSILTS (SEQ ID NO: 34); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). Theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các vùng khung (FR) chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). Theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). Theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37, như kháng thể kháng tryptaza huE104.v2.

Trong một ví dụ cụ thể khác, theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) có thể bao gồm (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là GYAIT (SEQ

ID NO: 30); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là ETSILTS (SEQ ID NO: 34); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các vùng khung (FR) chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là QXSLEESGGGLFKPTDTLTLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 54); (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là WVRQSPENGLEWIG (SEQ ID NO: 55); (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCAR (SEQ ID NO: 56); và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 57). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm một, hai, ba, hoặc bốn vùng trong số các FR chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISC (SEQ ID NO: 67); (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 68); (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là GVPSRFKGSGSETQFTLTISDVQX$_1$DDAATYFC (SEQ ID NO: 69), trong đó X$_1$ là Cys hoặc Ala; và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là FGQGTKVEIKFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 70). Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53, như kháng thể E104. Theo một số phương án, kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza) bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 59.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77. Theo một số phương án, chuỗi nặng còn bao gồm gốc lysin (K) ở đầu tận cùng C.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79. Theo một số phương án, chuỗi nặng còn bao gồm gốc lysin (K) ở đầu tận cùng C.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81. Theo một số phương án, chuỗi nặng còn bao gồm gốc lysin (K) ở đầu tận cùng C.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với (ví dụ, độ đồng nhất trình tự ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%), hoặc trình tự của, trình tự axit amin của trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83. Trong một số trường hợp, kháng thể này bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83. Theo một số phương án, chuỗi nặng còn bao gồm gốc lysin (K) ở đầu tận cùng C.

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây liên kết vào epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Gln100, Leu101, và Leu102 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza beta 1 của người bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, ít nhất mười hai, ít nhất mười ba, hoặc tất cả mười bốn gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop bao gồm Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129, và Arg216 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza beta 1 của người. Theo một số phương án, epitop này là so với tetrame tryptaza beta 1 của người, và epitop trên tryptaza beta 1 của người còn bao gồm một hoặc cả hai gốc trong số Gln35 và Arg216 của SEQ ID NO: 71. Theo một số phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly mặt phân giới nhỏ và/hoặc mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 của người.

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza trên đây bao gồm paratop mà liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, hoặc 16 19 gốc axit amin) được chọn lựa từ nhóm gồm các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Tyr29; Asn30; Arg32; và Arg94 và các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng Gly31; Tyr32; Ser52; Ser53; Ala54; Thr56; Phe58; Pro96; Arg97; Gly98; Tyr99; và Arg100e.

Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza bao gồm paratop mà liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Tyr29; Asn30; Arg32; và Arg94 hoặc các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng Gly31; Tyr32; Ser52; Ser53; Ala54; Thr56; Phe58; Pro96; Arg97; Gly98; Tyr99; và Arg100e. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza bao gồm paratop mà liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Tyr29; Asn30; Arg32; và Arg94 và các gốc axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng Gly31; Tyr32; Ser52; Ser53; Ala54; Thr56; Phe58; Pro96; Arg97; Gly98; Tyr99; và Arg100e.

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza trên đây liên kết tryptaza của người. Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây liên kết tryptaza của khỉ đuôi dài (cyno). Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết tryptaza alpha của người hoặc tryptaza beta của người. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết tryptaza beta 1 của người, tryptaza beta 2 của người, hoặc tryptaza beta 3 của người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng tryptaza mà liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 gốc axit amin) được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, và Ala85, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc tất cả bốn gốc được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số

phương án, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) bao gồm His51 và ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba gốc được chọn lựa từ nhóm gồm Val 80, Lys81, và Asp82 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, hoặc tất cả mười hai gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) bao gồm His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO:71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người). Theo một số phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly cả mặt phân giới nhỏ của tryptaza dạng tetrame và mặt phân giới lớn của tryptaza tryptaza dạng tetrame (ví dụ, tryptaza beta 1 của người).

Còn theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng tryptaza mà liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 gốc axit amin) được chọn lựa từ nhóm gồm Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, và Arg106, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta

1 của người) bao gồm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, ít nhất mười hai, ít nhất mười ba, hoặc tất cả mười bốn gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, và Glu129 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop bao gồm Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129, và Arg216 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop này là so với monome hoặc tetrame tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người). Theo một số phương án, epitop này là so với tetrame, và epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) còn bao gồm một hoặc cả hai gốc trong số Gln35 và Arg216 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án, epitop được xác định bằng mô hình tinh thể học tia X. Theo một số phương án, kháng thể này có khả năng làm phân ly mặt phân giới nhỏ và/hoặc mặt phân giới lớn của tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người).

Theo một số phương án, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc 11 gốc axit amin) được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, và Glu129, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ.

Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Gln67 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Asp82 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Leu83 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm

Ala84 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Arg87 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Pro103 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) bao gồm Val104 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Ser105 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Arg106 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Glu128 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Glu129 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ.

Theo một số phương án, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm hai gốc axit amin trở lên, ba gốc axit amin trở lên, bốn gốc axit amin trở lên, năm gốc axit amin trở lên, sáu gốc axit amin trở lên, bảy gốc axit amin trở lên, tám gốc axit amin trở lên, chín gốc axit amin trở lên, mười gốc axit amin trở lên, hoặc tất cả mười một gốc axit amin được chọn lựa từ nhóm gồm Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, và Glu129, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ.

Trong một số trường hợp, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin phụ thêm (ví dụ, 1, 2, 3, 4, hoặc 5 gốc axit amin phụ thêm) được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, Ala85, và Pro130, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein

tryptaza bất kỳ. Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm His51 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Val80 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Theo một số phương án kháng thể kháng tryptaza liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Lys81 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Ala85 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Pro130 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ.

Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm hai gốc axit amin phụ thêm trở lên, ba gốc axit amin phụ thêm trở lên, bốn gốc axit amin phụ thêm trở lên, hoặc năm gốc axit amin phụ thêm trở lên được chọn lựa từ nhóm gồm His51, Val80, Lys81, Ala85, và Pro130, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà gồm His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129, và Pro130 của SEQ ID NO: 71.

Trong các trường hợp khác, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza trên đây liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8) gốc axit amin phụ thêm

được chọn lựa từ nhóm gồm Gln35, Trp55, Gln100, Leu101, Leu102, Glu126, Leu127, và Arg216, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Gln35 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Trp55 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Gln100 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Leu101 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Leu102 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Glu126 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Leu127 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm Arg216 của SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể này liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà còn bao gồm hai gốc axit amin phụ thêm trở lên, ba gốc axit amin phụ thêm trở lên, bốn trở lên, năm gốc axit amin phụ thêm trở lên, sáu gốc axit amin phụ thêm trở lên, bảy gốc axit amin phụ thêm trở lên, hoặc tám gốc axit amin phụ thêm trở lên được chọn lựa từ nhóm gồm Gln35, Trp55, Gln100, Leu101, Leu102, Glu126, Leu127, và Arg216, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà bao gồm Gln35, Trp55, Gln67, Asp82,

Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129, và Arg216, các gốc này có thể liên quan đến trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71 hoặc một axit amin tương ứng của protein tryptaza bất kỳ. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza liên kết vào epitop trên tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) mà gồm Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129, và Arg216 của SEQ ID NO: 71.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà cạnh tranh để liên kết vào tryptaza (ví dụ, tryptaza beta 1 của người) với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết vào cùng một epitop hoặc epitop chồng lấn với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây.

Theo một số phương án, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây có thể có khả năng phá vỡ tryptaza có cấu trúc dạng tetrame (như tryptaza trưởng thành có mặt trong, hoặc được giải phóng từ, các hạt tiết dưỡng bào) để tạo thành loại có trọng lượng phân tử nhỏ hơn, ví dụ, monome, dime, và/hoặc trime.

Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây có thể sáp nhập đặc tính bất kỳ trong số các đặc tính này, một cách đơn lẻ hoặc ở dạng kết hợp, như được mô tả ở các Mục 1-7 dưới đây:

1. Ái lực kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này có hằng số phân ly (K_D) là ≤ 1 μM, ≤ 100nM, ≤ 10nM, ≤ 1nM, ≤ 0,1nM, ≤ 0,01nM, ≤ 1pM, hoặc ≤ 0,1pM (ví dụ, 10^{-6} M trở xuống, ví dụ, từ 10^{-6} M đến 10^{-9} M trở xuống, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M trở xuống). Theo một số phương án, kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế liên kết vào tryptaza (ví dụ, tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người) với K_D là khoảng 100nM trở xuống (ví dụ, 100nM trở xuống, 10nM trở xuống, 1nM trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người) với K_D là 10nM trở xuống (ví dụ, 10nM trở xuống, 1nM trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống).

Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người) với K_D là 1nM trở xuống (ví dụ, 1nm trở xuống, 100pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống). Theo một số phương án, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được mô tả trên đây hoặc trong bản mô tả này liên kết vào tryptaza (ví dụ, tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người) với K_D là khoảng 0,5nM trở xuống (ví dụ, 0,5nm trở xuống, 400pM trở xuống, 300pM trở xuống, 200pM trở xuống, 100pM trở xuống, 50pM trở xuống, 25pM trở xuống, 10pM trở xuống, 1pM trở xuống, hoặc 0,1pM trở xuống). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người) với K_D từ khoảng 0,1nM đến khoảng 0,5nM (ví dụ, khoảng 0,1nM, khoảng 0,2nM, khoảng 0,3nM, khoảng 0,4nM, hoặc khoảng 0,5nM). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người) với K_D là khoảng 0,4nM. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết tryptaza (ví dụ, tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người) với K_D là khoảng 0,18nM.

Theo một phương án, K_D được đo bằng thử nghiệm liên kết kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ (RIA). Theo một phương án, RIA được thực hiện với phiên bản Fab của kháng thể đang được quan tâm và kháng nguyên của nó. Ví dụ, ái lực liên kết dung dịch của các Fab đối với kháng nguyên được đo bằng cách làm cân bằng Fab bằng nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu bằng (^{125}I) khi có mặt dãy chuẩn độ của kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó, bắt kháng nguyên đã được liên kết bằng đĩa được phủ kháng thể kháng Fab (ví dụ, xem tài liệu: Chen et al. *J. Mol. Biol.* 293:865-881, 1999). Để thiết lập các điều kiện cho thử nghiệm, các đĩa đa lỗ MICROTITER® (Thermo Scientific) được phủ qua đêm bằng 5µg/ml của kháng thể kháng Fab bắt (Cappel Labs) trong natri carbonat 50mM (độ pH 9,6), và kế tiếp, được phong bế bằng 2% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò trong PBS trong hai đến năm giờ ở nhiệt độ trong phòng (xấp xỉ 23°C). Trong đĩa không hấp phụ (số hiệu Nunc:269620), kháng nguyên-[^{125}I] 100pM hoặc 26pM được trộn với các dung dịch pha loãng theo dãy nối tiếp của Fab đang được quan tâm (ví dụ, nhất quán với sự đánh giá về kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong tài liệu: Presta et al. *Cancer Res.* 57:4593-4599, 1997). Sau đó, Fab đang được quan tâm được ủ qua đêm; tuy nhiên, quá trình ủ có thể tiếp tục trong

một khoảng thời gian dài hơn (ví dụ, khoảng 65 giờ) để đảm bảo rằng đạt đến được trạng thái cân bằng. Sau đó, các hỗn hợp được chuyển sang đĩa bắt dùng cho việc ủ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, trong một giờ). Sau đó, dung dịch này được loại ra và đĩa được rửa tám lần bằng polysorbat 20 0,1% (TWEEN®-20) trong PBS. Khi các đĩa đã được làm khô, thì 150µl/lỗ của chất nhấp nháy (MICROSCINT-20™; Packard) được bổ sung, và các đĩa được đếm trên thiết bị đếm gamma TOPCOUNT™ (Packard) trong mười phút. Các mức nồng độ của mỗi Fab mà đem lại mức nhỏ hơn hoặc bằng 20% của mức liên kết tối đa được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm liên kết cạnh tranh.

Theo một phương án khác, K_D được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®. Ví dụ, một thử nghiệm có sử dụng BIACORE®-2000 hoặc BIACORE ®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) được thực hiện ở 25°C với các chip kháng nguyên CM5 bất động ở ~10 đơn vị đáp ứng (RU). Theo một phương án, các chip cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hóa bằng *N*-etyl-*N'*- (3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysuxinimit (NHS) theo các hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng bằng natri axetat 10mM, độ pH 4,8, đến 5µg/ml (~0,2µM) trước khi bơm ở tốc độ dòng chảy là 5µl/phút để đạt được xấp xỉ 10 đơn vị đáp ứng (RU) của protein được liên hợp. Sau khi bơm kháng nguyên, etanolamin 1M được bơm vào để phong bế các nhóm chưa phản ứng. Đối với các lần đo động học, các dung dịch pha loãng theo dãy nối tiếp hai lần của Fab (0,78nM đến 500nM) được bơm trong dung dịch muối được đệm phosphat (PBS) với chất hoạt động bề mặt polysorbat 20 0,05% (TWEEN®-20) (PBST) ở 25°C ở tốc độ dòng chảy là xấp xỉ 25µl/phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình liên kết Langmuir một-với-một đơn giản (BIACORE® Evaluation Software phiên bản 3.2) bằng cách khớp một cách đồng thời các biểu đồ cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính toán ở dạng tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Ví dụ, xem tài liệu: Chen et al. (*J. Mol. Biol.* 293:865-881, 1999). Nếu tỷ lệ kết hợp vượt quá 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ theo thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt trên đây, thì tỷ lệ kết hợp có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật dập tắt huỳnh quang mà đo mức tăng hoặc giảm về cường độ phát huỳnh quang (trạng thái kích thích = 295nm; phát xạ = 340nm, thông dải 16nm) ở 25°C của kháng thể kháng kháng nguyên 20nM (dạng Fab) trong PBS, độ pH 7,2, khi có mặt các mức

nồng độ tăng dần của kháng nguyên như được đo trong phổ kế, như quang phổ kế được trang bị bộ phận ngừng dòng chảy (Aviv Instruments) hoặc quang phổ kế 8000-series SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) với chậu thủy tinh có thiết bị khuấy.

Theo một số phương án, K_D được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm SPR BIACORE®, ví dụ, như được mô tả ở Ví dụ 1, Mục (A)(vii). Theo một số phương án, thử nghiệm SPR có thể sử dụng BIAcore® T200 hoặc một thiết bị tương đương. Theo một số phương án, chip cảm biến CM5 Series S BIAcore® (hoặc các chip cảm biến tương đương) được làm bất động bằng kháng thể IgG đơn dòng của chuột kháng của người (Fc) và các kháng thể kháng tryptaza được bắt một cách kế tiếp trên pin dòng chảy. Các dịch pha loãng 3 lần theo dãy nối tiếp của monome tryptaza beta 1 của người được gắn thẻ His (SEQ ID NO: 128) được bơm ở tốc độ dòng chảy là 30µl/phút. Mỗi mẫu được phân tích bằng thời gian kết hợp 3 phút và thời gian phân ly 10 phút. Thử nghiệm này được thực hiện ở 25°C. Sau mỗi lần bơm, chip được tái tạo bằng cách sử dụng $MgCl_2$ 3M. Mức đáp ứng liên kết được chỉnh sửa bằng cách lấy pin dòng chảy bắt IgG không liên quan ở mật độ tương tự trừ đi đơn vị đáp ứng (RU). Mô hình Languir 1:1 của phương pháp khớp đồng thời về k_{on} và k_{off} được sử dụng cho phép phân tích động học.

2. Các mảnh kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là mảnh kháng thể. Các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, và scFv, và các mảnh khác được mô tả dưới đây. Để tìm hiểu về các mảnh kháng thể nhất định, xem tài liệu: Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Để tìm hiểu về các mảnh scFv, ví dụ, xem tài liệu: Pluckthün, trong *Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); xem thêm tài liệu: WO 93/16185; và các Patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Để biết phần bàn luận về các mảnh Fab và $F(ab')_2$ bao gồm các gốc epitop liên kết thụ thể cứu trợ và có thời gian bán hủy in vivo tăng, xem tài liệu: Patent Mỹ số 5,869,046.

Các song thể là các mảnh kháng thể có hai vị trí liên kết kháng nguyên mà có thể là có hóa trị hai hoặc song đặc hiệu. Ví dụ, xem tài liệu: EP 404,097; WO 1993/01161;

Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134, 2003; và Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993. Các tam thể và các tứ thể cũng được mô tả trong tài liệu: Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134, 2003.

Các kháng thể miền đơn là các mảnh kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần của miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (ví dụ, xem tài liệu: Patent Mỹ số 6,248,516 B1).

Có thể tạo ra các mảnh kháng thể bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở quá trình tiêu hóa bằng thủy phân protein của kháng thể nguyên vẹn cũng như quá trình sản xuất bằng các tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ, *E. coli* hoặc thể thực khuẩn), như được mô tả trong bản mô tả này.

3. Các kháng thể được nhân tính hóa và thể khảm

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể thể khảm. Các kháng thể thể khảm nhất định được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855, 1984). Trong một ví dụ, kháng thể thể khảm bao gồm vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi được tạo ra từ chuột nhắt, chuột cống, chuột túi má, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải người, như khỉ) và vùng hằng định của người. Theo một ví dụ khác nữa, kháng thể thể khảm là kháng thể "được chuyển nhóm" mà trong đó nhóm hoặc phân nhóm này đã được thay đổi từ nhóm hoặc phân nhóm của kháng thể mẹ. Các kháng thể thể khảm bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng.

Theo các phương án nhất định, kháng thể thể khảm là kháng thể được nhân tính hóa. Thông thường, kháng thể không phải của người được nhân tính hóa để làm giảm tính sinh miễn dịch đối với con người, trong khi giữ lại tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể mẹ không phải của người. Nhìn chung, kháng thể được nhân tính hóa bao gồm một hoặc nhiều miền biến đổi mà trong đó các HVR (hoặc các phần của chúng) được tạo ra từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc các phần của chúng) được tạo ra từ trình tự kháng thể của người. Kháng thể được nhân tính hóa tùy ý sẽ còn bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được nhân tính hóa được thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải

của người (ví dụ, kháng thể mà các gốc HVR được tạo ra từ đó), ví dụ, để phục hồi hoặc cải thiện ái lực hoặc tính đặc hiệu của kháng thể.

Các kháng thể được nhân tính hóa và các phương pháp tạo ra chúng được tìm hiểu, ví dụ, trong tài liệu: Almagro et al. *Front. Biosci.* 13:1619-1633, 2008, và được mô tả thêm, ví dụ, trong tài liệu: Riechmann et al. *Nature* 332:323-329, 1988; Queen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989; các Patent Mỹ số 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Kashmiri et al. *Methods* 36:25-34, 2005 (mô tả phương pháp ghép vùng quyết định tính đặc hiệu (specificity determining region-SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498, 1991 (mô tả "phương pháp làm lại bề mặt"); Dall'Acqua et al. *Methods* 36:43-60, 2005 (mô tả "phương pháp làm xáo trộn FR"); và Osbourn et al. *Methods* 36:61-68, 2005 và Klimka et al. *Br. J. Cancer*, 83:252-260, 2000 (mô tả phương pháp "chọn lựa có hướng dẫn" đối với việc làm xáo trộn FR).

Vùng khung của người mà có thể được sử dụng cho quá trình nhân tính hóa bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: vùng khung được chọn lựa bằng cách sử dụng phương pháp "khớp nhất" (ví dụ, xem tài liệu: Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296, 1993); vùng khung được tạo ra từ trình tự liên ứng của các kháng thể của người của một phân nhóm cụ thể của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng (ví dụ, xem tài liệu: Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285, 1992; và Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623, 1993); vùng khung trưởng thành của người (được gây đột biến về tế bào cơ thể) hoặc vùng khung dòng mầm của người (ví dụ, xem tài liệu: Almagro et al. *Front. Biosci.* 13:1619-1633, 2008); và vùng khung được tạo ra từ các thư viện FR sàng lọc (ví dụ, xem tài liệu: Baca et al. *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684, 1997 và Rosok et al. *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618, 1996).

4. Các kháng thể của người

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể của người. Các kháng thể của người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhìn chung, các kháng thể của người được mô tả trong tài liệu: van Dijk et al. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74, 2001 và Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459, 2008.

Có thể điều chế các kháng thể của người bằng cách cho động vật chuyển gen mà đã được cải biến dùng chất sinh miễn dịch để tạo ra các kháng thể nguyên vẹn của người hoặc các kháng thể nguyên vẹn có các vùng biến đổi của người khi đáp ứng lại thử thách kháng nguyên. Các con vật như vậy thường chứa tất cả hoặc một phần của ổ gen globulin miễn dịch của người, ổ gen này thay thế ổ gen globulin miễn dịch nội sinh, hoặc ổ gen này có mặt theo kiểu ngoài nhiễm sắc thể hoặc được tích hợp một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của động vật. Ở chuột chuyển gen như vậy, ổ gen globulin miễn dịch nội sinh thường được làm bất hoạt. Để xem xét về các phương pháp dùng để thu được các kháng thể của người từ các động vật chuyển gen, xem tài liệu: Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Ví dụ, xem thêm tài liệu: các Patent Mỹ số 6,075,181 và 6,150,584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; Patent Mỹ số 5,770,429 mô tả công nghệ HUMAB®; Patent Mỹ số 7,041,870 mô tả công nghệ K-M MOUSE®, và Công bố Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2007/0061900, mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Các vùng biến đổi của người từ các kháng thể nguyên vẹn được tạo ra bằng các con vật như vậy có thể được cải biến thêm, ví dụ, bằng cách kết hợp với một vùng hằng định khác của người.

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp dựa trên tế bào lai. Dòng tế bào u tủy của người và dòng tế bào dị u tủy chuột-người dùng cho việc sản xuất các kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả. (ví dụ, xem tài liệu: Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001, 1984; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86, 1991). Các kháng thể của người được tạo ra thông qua công nghệ tế bào lai tế bào B của người cũng được mô tả trong tài liệu: Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562, 2006. Các phương pháp phụ thêm bao gồm những loại được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Patent Mỹ số 7,189,826 (mô tả việc sản xuất các kháng thể IgM đơn dòng của người từ các dòng tế bào tế bào lai) và Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268, 2006 (mô tả các tế bào lai người-người). Công nghệ tế bào lai của người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong tài liệu: Vollmers et al, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937, 2005 và Vollmers et al, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91, 2005.

Cũng có thể tạo ra các kháng thể của người bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi dòng vô tính Fv được chọn lựa từ các thư viện thể hiện thể thực khuẩn được tạo ra từ người. Sau đó, các trình tự miền biến đổi như vậy có thể được kết hợp với miền hằng định của người mong muốn. Các kỹ thuật dùng để chọn lựa các kháng thể của người từ các thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

5. Các kháng thể được tạo ra từ thư viện

Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp để có được các kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, một loạt phương pháp thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng để tạo các thư viện thể hiện thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện như vậy để có được các kháng thể sở hữu các đặc điểm liên kết mong muốn. Các phương pháp như vậy được tìm hiểu, ví dụ, trong tài liệu: Hoogenboom et al., trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và được mô tả thêm, ví dụ, trong tài liệu: McCafferty et al., *Nature* 348:552-554, 1990; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1992; Marks et al, trong *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310, 2004; Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093, 2004; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472, 2004; và Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132, 2004.

Theo các phương pháp thể hiện thể thực khuẩn nhất định, các kho của gen VH và gen VL được tạo dòng vô tính một cách tách biệt bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và được tái tổ hợp một cách ngẫu nhiên trong các thư viện thể thực khuẩn, sau đó, thư viện này có thể được sàng lọc để có được thể thực khuẩn liên kết kháng nguyên như được mô tả trong tài liệu: Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455, 1994. Thể thực khuẩn thường thể hiện các mảnh kháng thể, hoặc ở dạng mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) hoặc ở dạng mảnh Fab. Các thư viện từ các nguồn được gây miễn dịch đem lại các kháng thể ái lực cao đối với chất sinh miễn dịch mà không có yêu cầu về việc kiến tạo khối tế bào lai. Theo cách khác là, kho nguyên sơ có thể được tạo dòng vô tính (ví dụ, từ người) để đem lại nguồn kháng thể đơn lẻ cho một loạt rất nhiều kháng nguyên không tự thân và đồng thời kháng nguyên tự thân mà không có sự gây miễn dịch bất kỳ như được mô

tả bởi Griffiths et al., *EMBO J,* 12: 725-734, 1993. Cuối cùng, cũng có thể tạo ra các thư viện nguyên sơ bằng phương pháp tổng hợp bằng cách tạo dòng vô tính đoạn gen V không được sắp xếp lại từ các tế bào gốc, và bằng cách sử dụng các đoạn mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa các vùng HVR3 biến đổi ở mức cao và để thực hiện việc sắp xếp lại *in vitro*, như được mô tả bởi Hoogenboom et al, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388, 1992. Các công bố Patent mô tả các thư viện thể thực khuẩn kháng thể của người bao gồm, ví dụ: Patent Mỹ số 5,750,373, và các Công bố Patent Mỹ số 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, và 2009/0002360.

Các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể được phân lập từ các thư viện kháng thể của người được xem là các kháng thể của người hoặc các mảnh kháng thể của người trong bản mô tả này.

6. Các kháng thể đa đặc hiệu

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể song đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu là các kháng thể đơn dòng mà có các tính đặc hiệu liên kết đối với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo các phương án nhất định, các kháng thể song đặc hiệu có thể liên kết vào hai epitop khác nhau của tryptaza. Theo các phương án nhất định, một trong các tính đặc hiệu liên kết là đối với tryptaza và tính đặc hiệu liên kết kia là đối với kháng nguyên bất kỳ khác (ví dụ, phân tử sinh học thứ hai). Theo một số phương án, các kháng thể song đặc hiệu có thể liên kết vào hai epitop khác nhau của tryptaza. Theo các phương án khác, một trong các tính đặc hiệu liên kết là đối với tryptaza (ví dụ, tryptaza của người, ví dụ, tryptaza beta của người) và tính đặc hiệu liên kết kia là đối với kháng nguyên bất kỳ khác (ví dụ, phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, IL-13, IL-4, IL-5, IL-17, IL-33, IgE, mồi M1, CRTH2, hoặc TRPA). Do vậy, kháng thể song đặc hiệu có thể có tính đặc hiệu liên kết đối với tryptaza và IL-13; tryptaza và IL-4; tryptaza và IL-5; tryptaza và IL-17, hoặc tryptaza và IL-33. Cụ thể là, kháng thể song đặc hiệu có thể có tính đặc hiệu liên kết đối với tryptaza và IL-13 hoặc tryptaza và IL-33. Các kháng thể song đặc hiệu có thể được điều chế ở dạng kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc các mảnh kháng thể.

Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể song đặc hiệu bao gồm miền liên kết thứ nhất mà liên kết tryptaza và miền liên kết thứ hai mà liên kết IL-13. Theo một số phương án, miền liên kết thứ nhất mà liên kết tryptaza có thể bao gồm, ví dụ, ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn lựa từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là $X_1X_2GMX_3$ (SEQ ID NO: 1), trong đó X_1 là Asp hoặc Ser, X_2 là Tyr hoặc Phe, và X_3 là Val hoặc His; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là $RX_1X_2X_3DWYFDV$ (SEQ ID NO: 3), trong đó X_1 là Asn hoặc Asp, X_2 là Tyr hoặc Asn, và X_3 là Asp hoặc Tyr; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), hoặc dạng kết hợp của một hoặc nhiều vùng trong số các HVR trên đây và một hoặc nhiều biến thể của chúng có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% (ví dụ, độ đồng nhất 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-6. Trong một số trường hợp, ví dụ, miền liên kết thứ hai mà liên kết vào IL-13 có thể bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn lựa từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là AYSVN (SEQ ID NO: 84); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO: 85); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là DGYYPYAMDN (SEQ ID NO: 86); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO: 87); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là LASNLES (SEQ ID NO: 88); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 89), hoặc dạng kết hợp của một hoặc nhiều vùng trong số các HVR trên đây và một hoặc nhiều biến thể của chúng có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% (ví dụ, độ đồng nhất 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 84-89. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR của kháng thể kháng IL-13 lebrikizumab.

Ví dụ, trong một số trường hợp, miền liên kết thứ nhất mà liên kết tryptaza bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn lựa từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao

gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), như hu31a.v11. Trong một số trường hợp, ví dụ, miền liên kết thứ hai mà liên kết IL-13 có thể bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn lựa từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là AYSVN (SEQ ID NO: 84); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO: 85); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là DGYYPYAMDN (SEQ ID NO: 86); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO: 87); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là LASNLES (SEQ ID NO: 88); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 89). Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR của kháng thể kháng IL-13 lebrikizumab. Theo một số phương án, miền liên kết thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của VH và/hoặc VL của hu31a.v11 và miền liên kết thứ hai bao gồm trình tự axit amin của VH và/hoặc VL của kháng thể kháng IL-13 lebrikizumab.

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng IL-13/kháng thể kháng tryptaza song đặc hiệu trên đây có thể bao gồm miền liên kết thứ nhất mà liên kết tryptaza bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, độ đồng nhất trình tự 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự của, SEQ ID NO: 9; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, độ đồng nhất trình tự 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự của, SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng IL-13/kháng thể kháng tryptaza song đặc hiệu trên đây có thể bao gồm miền liên kết thứ hai mà liên kết vào IL-13 bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, độ đồng nhất trình tự 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự của, SEQ ID NO: 90 hoặc SEQ ID NO: 114; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví

dụ, độ đồng nhất trình tự 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự của, SEQ ID NO: 91 hoặc SEQ ID NO: 115; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH và/hoặc miền VL của lebrikizumab.

Trong một ví dụ khác, trong một số trường hợp, kháng thể song đặc hiệu bao gồm miền liên kết thứ nhất mà liên kết tryptaza và miền liên kết thứ hai mà liên kết IL-33. miền liên kết thứ hai mà liên kết IL-33 có thể bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng IL-33 được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2016/0168242, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, miền liên kết thứ nhất mà liên kết tryptaza có thể bao gồm, ví dụ, ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn lựa từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là $X_1X_2GMX_3$ (SEQ ID NO: 1), trong đó X_1 là Asp hoặc Ser, X_2 là Tyr hoặc Phe, và X_3 là Val hoặc His; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là $RX_1X_2X_3DWYFDV$ (SEQ ID NO: 3), trong đó X_1 là Asn hoặc Asp, X_2 là Tyr hoặc Asn, và X_3 là Asp hoặc Tyr; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), hoặc dạng kết hợp của một hoặc nhiều vùng trong số các HVR trên đây và một hoặc nhiều biến thể của chúng có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% (ví dụ, độ đồng nhất 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-6. Trong một số trường hợp, ví dụ, miền liên kết thứ hai mà liên kết vào IL-33 có thể bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn lựa từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SFSMS (SEQ ID NO: 120); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO: 121); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là ANYGNWFFEV (SEQ ID NO: 122); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO: 123); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là AASNRGS (SEQ ID NO: 124); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 125), hoặc dạng kết hợp của một hoặc nhiều vùng trong số

các HVR trên đây và một hoặc nhiều biến thể của chúng có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% (ví dụ, độ đồng nhất 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với một trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 120-125. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR của kháng thể kháng IL-33 10C12.38.H6.87Y.58I.

Ví dụ, trong một số trường hợp, miền liên kết thứ nhất mà liên kết tryptaza bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn lựa từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), như hu31a.v11. Trong một số trường hợp, ví dụ, miền liên kết thứ hai mà liên kết IL-33 có thể bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn lựa từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SFSMS (SEQ ID NO: 120); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO: 121); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là ANYGNWFFEV (SEQ ID NO: 122); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO: 123); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là AASNRGS (SEQ ID NO: 124); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 125). Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR của kháng thể kháng IL-33 10C12.38.H6.87Y.58I. Theo một số phương án, miền liên kết thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của VH và/hoặc VL của hu31a.v11 và miền liên kết thứ hai bao gồm trình tự axit amin của VH và/hoặc VL của kháng thể kháng IL-33 10C12.38.H6.87Y.58I.

Kháng thể bất kỳ trong số kháng thể kháng IL-33/kháng thể kháng tryptaza song đặc hiệu trên đây có thể bao gồm miền liên kết thứ nhất mà liên kết tryptaza bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, độ đồng nhất trình tự 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự của, SEQ ID NO:

9; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, độ đồng nhất trình tự 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự của, SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Kháng thể bất kỳ trong số kháng thể kháng IL-33/kháng thể kháng tryptaza song đặc hiệu trên đây có thể bao gồm miền liên kết thứ hai mà liên kết vào IL-33 bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, độ đồng nhất trình tự 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự của, SEQ ID NO: 126; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, độ đồng nhất trình tự 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự của, SEQ ID NO: 127; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b). Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH và/hoặc miền VL của 10C12.38.H6.87Y.58I.

Các kỹ thuật dùng để tạo ra các kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có các tính đặc hiệu khác nhau (xem tài liệu: Milstein et al. *Nature* 305: 537, 1983; WO 93/08829; và Traunecker et al. *EMBO J.* 10: 3655, 1991), và kỹ thuật xử lý bằng công nghệ "chốt-trong-lỗ" (ví dụ, xem tài liệu: Patent Mỹ số 5,731,168). Cũng có thể tạo ra các kháng thể đa đặc hiệu bằng kỹ thuật xử lý bằng công nghệ các hiệu ứng lái tĩnh điện để tạo ra các phân tử kháng thể heterodime Fc (WO 2009/089004A1); liên kết ngang hai mảnh hoặc hai kháng thể trở lên (ví dụ, xem tài liệu: Patent Mỹ số 4,676,980, và Brennan et al. *Science,* 229: 81, 1985); bằng cách sử dụng các khóa kéo leuxin để tạo ra các kháng thể song đặc hiệu (ví dụ, xem tài liệu: Kostelny et al. *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553, 1992); bằng cách sử dụng công nghệ "song thể" để tạo ra các mảnh kháng thể song đặc hiệu (ví dụ, xem tài liệu: Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993); và bằng cách sử dụng dime Fv chuỗi đơn (scFv) (ví dụ, xem tài liệu: Gruber et al. *J. Immunol.* 152:5368, 1994); và điều chế các kháng thể tam đặc hiệu như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60, 1991.

Các kháng thể đã được xử lý bằng công nghệ có ba vị trí liên kết kháng nguyên chức năng trở lên, bao gồm cả "các kháng thể Octopus", cũng được lấy vào bản mô tả này (ví dụ, xem tài liệu: US 2006/0025576A1).

Kháng thể hoặc mảnh trong bản mô tả này còn bao gồm "Fab tác động kép" hay "DAF" bao gồm vị trí liên kết kháng nguyên mà liên kết vào tryptaza cũng như một kháng nguyên khác nhau khác (ví dụ, xem tài liệu: US 2008/0069820).

Chốt-vào-lỗ

Cách sử dụng chốt-vào-lỗ làm phương pháp sản xuất các kháng thể đa đặc hiệu được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Patent Mỹ số 5,731,168, WO2009/089004, US2009/0182127, US2011/0287009, Marvin and Zhu, *Acta Pharmacol. Sin.* (2005) 26(6):649-658, và Kontermann (2005) *Acta Pharmacol. Sin.* 26:1-9. Phần bàn luận không giới hạn vắn gọn được đưa ra dưới đây.

"Chỗ lồi lên" được dùng để chỉ ít nhất một chuỗi bên axit amin mà nhô ra khỏi mặt phân giới của polypeptit thứ nhất và do đó, có thể đặt được vào khoang bù trừ ở mặt phân giới liền kề (tức là, mặt phân giới của polypeptit thứ hai) để làm ổn định heteromultime, và nhờ đó, ví dụ, hỗ trợ quá trình hình thành heteromultime so với quá trình hình thành homomultime. Chỗ lồi lên có thể tồn tại ở mặt phân giới ban đầu hoặc có thể được đưa vào bằng cách tổng hợp (ví dụ, bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa mặt phân giới). Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa mặt phân giới của polypeptit thứ nhất được thay đổi để mã hóa chỗ lồi lên. Để đạt được mục đích này, axit nucleic mã hóa ít nhất một gốc axit amin "ban đầu" ở mặt phân giới của polypeptit thứ nhất được thay thế bằng axit nucleic mã hóa ít nhất một gốc axit amin "nhập" mà có thể tích chuỗi bên lớn hơn so với gốc axit amin ban đầu. Sẽ đánh giá được rằng có thể có nhiều hơn một gốc ban đầu và gốc nhập tương ứng. Thể tích chuỗi bên của các gốc amin khác nhau được thể hiện, ví dụ, trong Bảng 1 của US 2011/0287009 hoặc Bảng 1 của Patent Mỹ số 7,642,228.

Theo một số phương án, các gốc nhập dùng cho việc tạo thành chỗ lồi lên là các gốc axit amin có trong tự nhiên được chọn lựa từ arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y) và tryptophan (W). Theo một số phương án, gốc nhập là tryptophan hoặc tyrosin. Theo một số phương án, gốc ban đầu dùng cho việc tạo thành chỗ lồi lên có thể tích

chuỗi bên nhỏ, như alanin, asparagin, axit aspartic, glyxin, serin, threonin, hoặc valin. Ví dụ, xem tài liệu: Patent Mỹ số 7,642,228.

"Khoang" được dùng để chỉ ít nhất một chuỗi bên axit amin mà lõm vào từ mặt phân giới của polypeptit thứ hai và do đó, chứa được chỗ lồi lên tương ứng ở mặt phân giới liền kề của polypeptit thứ nhất. Khoang có thể tồn tại ở mặt phân giới ban đầu hoặc có thể được đưa vào bằng cách tổng hợp (ví dụ, bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa mặt phân giới). Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa mặt phân giới của polypeptit thứ hai được thay đổi để mã hóa khoang. Để đạt được mục đích này, axit nucleic mã hóa ít nhất một gốc axit amin "ban đầu" ở mặt phân giới của polypeptit thứ hai được thay thế bằng ADN mã hóa ít nhất một gốc axit amin "nhập" mà có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn so với gốc axit amin ban đầu. Sẽ đánh giá được rằng có thể có nhiều hơn một gốc ban đầu và gốc nhập tương ứng. Theo một số phương án, các gốc nhập dùng cho việc tạo thành khoang là các gốc axit amin có trong tự nhiên được chọn lựa từ alanin (A), serin (S), threonin (T), và valin (V). Theo một số phương án, gốc nhập là serin, alanin, hoặc threonin. Theo một số phương án, gốc ban đầu dùng cho việc tạo thành khoang có thể tích chuỗi bên lớn, như tyrosin, arginin, phenylalanin, hoặc tryptophan.

Chỗ lồi lên là "có thể đặt được" vào khoang, điều này có nghĩa là vị trí theo không gian của chỗ lồi lên và khoang ở mặt phân giới lần lượt của polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai và kích cỡ của chỗ lồi lên và khoang là sao cho chỗ lồi lên có thể nằm được trong khoang mà không gây xáo trộn một cách đáng kể sự kết hợp bình thường của polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai ở mặt phân giới. Vì các chỗ lồi lên như Tyr, Phe và Trp thường không kéo dài theo kiểu vuông góc từ trục của mặt phân giới và có hình thể được ưu tiên, nên trong một số trường hợp, dạng xếp thẳng hàng của chỗ lồi lên với khoang tương ứng có thể dựa vào việc lập mô hình cặp chỗ lồi lên/khoang dựa trên cấu trúc không gian ba chiều như cấu trúc thu được bằng tinh thể học tia X hoặc cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance-NMR). Có thể đạt được mục đích này bằng cách sử dụng các kỹ thuật được chấp nhận rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, đột biến chốt trong vùng hằng định của IgG1 là T366W. Theo một số phương án, đột biến lỗ trong vùng hằng định của IgG1 bao gồm một hoặc

nhiều đột biến được chọn lựa từ T366S, L368A, và Y407V. Theo một số phương án, đột biến lỗ trong vùng hằng định của IgG1 bao gồm T366S, L368A, và Y407V.

Theo một số phương án, đột biến chốt trong vùng hằng định của IgG4 là T366W. Theo một số phương án, đột biến lỗ trong vùng hằng định của IgG4 bao gồm một hoặc nhiều đột biến được chọn lựa từ T366S, L368A, và Y407V. Theo một số phương án, đột biến lỗ trong vùng hằng định của IgG4 bao gồm T366S, L368A, và Y407V.

7. Các biến thể kháng thể

Theo các phương án nhất định, các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này được dự liệu. Ví dụ, có thể là thích hợp khi cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các thuộc tính sinh học khác của kháng thể, như hoạt tính ức chế. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được điều chế bằng cách đưa các dạng cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng phương pháp tổng hợp peptit. Các dạng cải biến như vậy bao gồm, ví dụ, các dạng xóa bỏ khỏi, và/hoặc các dạng chèn vào và/hoặc các dạng thay thế các gốc trong phạm vi trình tự axit amin của kháng thể. Có thể tạo ra dạng kết hợp bất kỳ của dạng xóa bỏ, dạng chèn, và dạng thay thế để đạt tới cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng này sở hữu các đặc điểm mong muốn, ví dụ, khả năng liên kết kháng nguyên.

a) Các biến thể dạng thay thế, chèn vào và xóa bỏ

Theo các phương án nhất định, các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều dạng thay thế axit amin được đề xuất. Các vị trí đang được quan tâm dùng cho quá trình gây đột biến dạng thay thế bao gồm các HVR và các FR. Các dạng thay thế có tính bảo toàn được thể hiện ở Bảng 1 dưới tiêu đề "các dạng thay thế được ưu tiên". Nhiều thay đổi đáng kể hơn được đề xuất ở Bảng 1 dưới tiêu đề "các dạng thay thế làm ví dụ", và như được mô tả thêm dưới đây liên quan đến các nhóm chuỗi bên axit amin. Dạng thay thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể đang được quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc để có được hoạt tính mong muốn, ví dụ, khả năng liên kết kháng nguyên được giữ lại/cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm, hoặc ADCC hoặc CDC được cải thiện.

Bảng 1

Gốc ban đầu	**Các dạng thay thế làm ví dụ**	**Các dạng thay thế được ưu tiên**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Axit amin có thể được chia nhóm theo các thuộc tính chuỗi bên chung:

(1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) có tính axit: Asp, Glu;

(4) có tính bazơ: His, Lys, Arg;

(5) các gốc ảnh hưởng đến hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các dạng thay thế không có tính bảo toàn sẽ dẫn đến sự trao đổi thành viên của một nhóm trong số các nhóm này cho một nhóm khác.

Một loại biến thể dạng thay thế liên quan đến việc thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể mẹ (ví dụ, kháng thể được nhân tính hóa hoặc kháng thể của người). Nhìn chung, (các) biến thể thu được được chọn lựa để nghiên cứu thêm sẽ có các dạng cải biến (ví dụ, dạng cải thiện) về các thuộc tính sinh học nhất định (ví dụ, ái lực tăng, tính sinh miễn dịch giảm) so với kháng thể mẹ và/hoặc sẽ có các thuộc tính sinh học nhất định về cơ bản được giữ lại của kháng thể mẹ. Một biến thể dạng thay thế làm ví dụ là kháng thể được làm trưởng thành về ái lực, kháng thể này có thể được tạo ra một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật làm trưởng thành về ái lực dựa vào sự thể hiện thể thực khuẩn như những loại được mô tả trong bản mô tả này. Nói một cách vắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và các kháng thể biến thể được thể hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc để có được một hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực liên kết).

Các dạng thay đổi (ví dụ, các dạng thay thế) có thể được tạo ra ở các HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực kháng thể. Các dạng thay đổi như vậy có thể được tạo ra ở "các điểm nóng" của HVR, tức là, các gốc được mã hóa bởi các codon mà trải qua quá trình đột biến ở tần suất cao trong suốt quy trình làm trưởng thành tế bào cơ thể (ví dụ, xem tài liệu: Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008), và/hoặc các gốc mà tiếp xúc kháng nguyên, với VH hoặc VL biến thể thu được được kiểm tra về ái lực liên kết. Quá trình làm trưởng thành ái lực bằng việc kiến tạo và tái chọn lựa từ các thư viện thứ cấp đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Hoogenboom et al. Trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al. ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Theo một số phương án về quá trình làm trưởng thành ái lực, tính đa dạng được đưa vào các gen biến đổi được chọn dùng cho quá trình làm trưởng thành bằng phương pháp bất kỳ trong số một loạt phương pháp (ví dụ, PCR dễ bị lỗi, xáo trộn chuỗi, hoặc quá trình gây đột biến định hướng bằng oligonucleotit). Sau đó, thư viện thứ cấp được tạo ra. Sau đó, thư viện này được sàng lọc để nhận diện các biến thể kháng thể bất kỳ có ái lực mong muốn. Một phương pháp khác để đưa tính đa dạng vào bao gồm các phương pháp định hướng bằng

HVR, mà trong đó một vài gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc một lần) được lấy ngẫu nhiên. Các gốc HVR liên can đến khả năng liên kết kháng nguyên có thể được nhận diện một cách cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng quá trình gây đột biến nhờ quét vào alanin hoặc lập mô hình. Cụ thể, HVR-H3 và HVR-L3 thường được hướng đích.

Theo các phương án nhất định, các dạng thay thế, các dạng chèn, hoặc các dạng xóa bỏ có thể xảy ra trong phạm vi một hoặc nhiều HVR với điều kiện là dạng thay đổi như vậy về cơ bản không làm giảm khả năng của kháng thể trong việc liên kết kháng nguyên. Ví dụ, các dạng thay đổi có tính bảo toàn (ví dụ, các dạng thay thế có tính bảo toàn như được đề xuất trong bản mô tả này) mà về cơ không bản làm giảm ái lực liên kết có thể được tạo ra trong các HVR. Ví dụ, các dạng thay đổi như vậy có thể nằm ngoài các gốc tiếp xúc kháng nguyên ở các HVR. Theo các phương án nhất định về trình tự VH và VL biến thể được đề xuất trên đây, mỗi HVR hoặc là không thay đổi, hoặc chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba dạng thay thế axit amin.

Một phương pháp hữu ích dùng cho việc nhận diện các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể được hướng đích để gây đột biến được gọi là "quá trình gây đột biến nhờ quét vào alanin" như được mô tả bởi tài liệu: Cunningham et al. *Science* 244:1081-1085, 1989. Theo phương pháp này, gốc hoặc nhóm gồm các gốc đích (ví dụ, các gốc mang điện tích như Arg, Asp, His, Lys, và Glu) được nhận diện và thay thế bằng một axit amin trung tính hoặc axit amin mang điện tích âm (ví dụ, Ala hoặc polyalanin) để xác định xem liệu sự tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng đến không. Các dạng thay thế khác nữa có thể được đưa vào ở các vị trí axit amin thể hiện tính nhạy cảm chức năng đối với các dạng thay thế ban đầu. Ngoài ra hoặc theo cách khác, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể được sử dụng để nhận diện các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc và các gốc lân cận như vậy có thể được hướng đích hoặc bị loại trừ trong vai trò là ứng viên đối với dạng thay thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem liệu chúng có chứa các thuộc tính mong muốn hay không.

Các dạng chèn trình tự axit amin bao gồm các dạng dung hợp đầu tận cùng amin và/hoặc đầu tận cùng carboxyl về độ dài nằm trong khoảng từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm gốc trở lên, cũng như các dạng chèn nội trình tự của một gốc axit amin đơn lẻ hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về dạng chèn đầu tận cùng bao gồm kháng

thể có gốc methionyl đầu tận cùng N. Các biến thể dạng chèn khác của phân tử kháng thể bao gồm dạng dung hợp vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của kháng thể đến enzym (ví dụ, đối với ADEPT) hoặc polypeptit mà làm tăng thời gian bán hủy huyết thanh của kháng thể.

b) Các biến thể glycosyl hóa

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này được thay đổi để làm tăng hoặc làm giảm mức độ mà kháng thể được glycosyl hóa thành. Việc xóa bỏ hoặc thêm các vị trí glycosyl hóa vào kháng thể có thể được hoàn tất một cách thuận tiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc loại bỏ.

Trong trường hợp kháng thể bao gồm vùng Fc, thì carbohydrat được gắn kết vào đó có thể được thay đổi. Các kháng thể nguyên thể được tạo ra bởi các tế bào động vật có vú thường bao gồm cấu trúc oligosacarit anten kép, mạch nhánh mà nhìn chung được gắn kết bởi một liên kết N vào Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Ví dụ, xem tài liệu: Wright *et al. TIBTECH* 15:26-32, 1997. Oligosacarit này có thể bao gồm các carbohydrat khác nhau, ví dụ, manoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn kết vào GlcNAc trong "thân" của cấu trúc oligosacarit anten kép. Theo một số phương án, có thể tạo ra các dạng cải biến của oligosacarit trong kháng thể theo sáng chế để tạo ra các biến thể kháng thể có các thuộc tính được cải thiện nhất định.

Theo một phương án, các biến thể kháng thể được đề xuất có cấu trúc carbohydrat mà thiếu fucoza được gắn kết (một cách trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể như vậy có thể là từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng của fucoza được xác định bằng cách tính toán lượng trung bình của fucoza trong chuỗi đường ở Asn297, so với tổng lượng của tất cả các cấu trúc glyco được gắn kết vào Asn 297 (ví dụ, các cấu trúc manoza phức hợp, lai và cao) như được đo bằng phép đo phổ khối MALDI-TOF, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: WO 2008/077546. Asn297 được dùng để chỉ gốc asparagin nằm ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (cách đánh số Châu Âu đối với các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể nằm tại khoảng ± 3 axit amin phía đầu nguồn hoặc phía cuối nguồn của vị

trí 297, tức là, nằm trong khoảng các vị trí 294 đến 300, do các dạng thay đổi trình tự phụ ở kháng thể. Các biến thể fucosyl hóa như vậy có thể có chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ, xem tài liệu: các Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2003/0157108 và 2004/0093621. Các ví dụ về các công bố liên quan đến các biến thể kháng thể "được khử fucosyl" hoặc "thiếu hụt fucoza" bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614, 2004. Các ví dụ về dòng tế bào có khả năng sản xuất các kháng thể được khử fucosyl bao gồm các tế bào Lec13 CHO thiếu hụt về khả năng fucosyl hóa protein (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545, 1986; US 2003/0157108; và WO 2004/056312 A1, đặc biệt là ở Ví dụ 11), và các dòng tế bào khuyết thiếu, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8,* các tế bào CHO khuyết thiếu (ví dụ, xem tài liệu: Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614, 2004; Kanda et al. *Biotechnol. Bioeng.* 94(4):680-688, 2006; và WO 2003/085107).

Các biến thể kháng thể còn được đề xuất với oligosacarit chia đôi, ví dụ, mà trong đó cấu trúc oligosacarit anten kép được gắn kết vào vùng Fc của kháng thể bị chia đôi bởi GlcNAc. Các biến thể kháng thể như vậy có thể có mức fucosyl hóa giảm và/hoặc chức năng ADCC được cải thiện. Các ví dụ về biến thể kháng thể như vậy được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: WO 2003/011878; Patent Mỹ số 6,602,684; và US 2005/0123546. Các biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit được gắn kết vào vùng Fc cũng được đề xuất. Các biến thể kháng thể như vậy có thể có chức năng CDC được cải thiện. Các biến thể kháng thể như vậy được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: WO 1997/30087; WO 1998/58964; và WO 1999/22764.

c) Các biến thể vùng Fc

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều dạng cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này, nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc của người (ví dụ,

vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người) bao gồm dạng cải biến axit amin (ví dụ, dạng thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án nhất định, sáng chế dự liệu biến thể kháng thể mà sở hữu một số nhưng không phải tất cả các chức năng tác động, mà những chức năng này làm cho biến thể đó trở thành ứng viên thích hợp cho các ứng dụng mà trong đó thời gian bán hủy của kháng thể *in vivo* là quan trọng, còn các chức năng tác động nhất định (như bổ thể và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Các thử nghiệm về tính gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được thực hiện để xác nhận mức giảm/mức tiêu tan của hoạt tính CDC và/hoặc hoạt tính ADCC. Ví dụ, các thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể này thiếu khả năng liên kết FcγR (do đó chắc chắn là thiếu hoạt tính ADCC), nhưng giữ lại khả năng liên kết FcRn. Các tế bào sơ cấp dùng để làm trung gian cho ADCC, các tế bào NK, biểu hiện chỉ FcγRIII, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân to biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện FcR trên các tế bào tạo huyết được tóm tắt trong bảng 3 ở trang 464 thuộc tài liệu: Ravetch et al. *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991. Các ví dụ không giới hạn về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang được quan tâm được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 5,500,362 (ví dụ, xem tài liệu: Hellstrom et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063, 1986 và Hellstrom et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502, 1985; Patent Mỹ số 5,821,337 (xem tài liệu: Bruggemann et al. *J. Exp. Med.* 166:1351-1361, 1987). Theo cách khác, các phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (ví dụ, xem tài liệu: thử nghiệm về tính gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTI™ dùng cho phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm về tính gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Các tế bào tác động hữu ích dùng cho các thử nghiệm như vậy bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cell-PBMC) và các tế bào tiêu diệt tự nhiên (Natural Killer-NK). Ngoài ra hoặc theo cách khác, hoạt tính ADCC của phân tử đang được quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, ở mô hình động vật như loại được bộc lộ trong tài liệu: Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656, 1998. Các thử nghiệm liên kết C1q cũng có thể được thực hiện để xác nhận rằng kháng thể không có khả năng liên kết C1q và do đó thiếu hoạt tính CDC. Ví dụ, xem phương pháp ELISA

liên kết C3c và C1q trong tài liệu: WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (ví dụ, xem tài liệu: Gazzano-Santoro et al. *J. Immunol. Methods* 202:163, 1996; Cragg et al. *Blood* 101:1045-1052, 2003; và Cragg et al. *Blood* 103:2738-2743, 2004). Các biện pháp xác định khả năng liên kết FcRn và mức thanh thải/thời gian bán hủy *in vivo* cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu: Petkova et al. *Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769, 2006).

Các kháng thể có chức năng tác động giảm bao gồm những loại có dạng thay thế của một hoặc nhiều gốc trong số các gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (Patent Mỹ số 6,737,056). Các thể đột biến Fc như vậy bao gồm các thể đột biến Fc có dạng thay thế ở hai vị trí axit amin trở lên trong số các vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm cả cái gọi là thể đột biến Fc "DANA" có dạng thay thế của các gốc 265 và 297 thành alanin (Patent Mỹ số 7,332,581).

Các biến thể kháng thể nhất định có khả năng liên kết được cải thiện hoặc giảm bớt vào các FcR được mô tả. (ví dụ, xem tài liệu: Patent Mỹ số 6,737,056; WO 2004/056312; và Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604, 2001).

Theo các phương án nhất định, biến thể kháng thể bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều dạng thay thế axit amin mà cải thiện ADCC, ví dụ, các dạng thay thế ở các vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (cách đánh số Châu Âu đối với các gốc).

Theo một số phương án, các dạng thay đổi được tạo ra ở vùng Fc mà đem lại khả năng liên kết C1q và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) được thay đổi (tức là, được cải thiện hoặc giảm bớt), ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 6,194,551, WO 99/51642, và Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184, 2000.

Các kháng thể có thời gian bán hủy tăng và khả năng liên kết vào thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) được cải thiện, mà thụ thể Fc sơ sinh này chịu trách nhiệm về việc chuyển các IgG của người mẹ sang bào thai (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587, 1976 và Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249, 1994), được mô tả trong tài liệu: US2005/0014934. Các kháng thể đó bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều dạng thay thế trong đó mà cải thiện khả năng liên kết vùng Fc vào FcRn. Các biến thể Fc như vậy bao gồm những loại có các dạng thay thế ở một hoặc nhiều gốc trong số các gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303,

305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, dạng thay thế của gốc 434 vùng Fc (Patent Mỹ số 7,371,826).

Xem thêm tài liệu: Duncan et al. *Nature* 322:738-40, 1988; các Patent Mỹ số 5,648,260 và 5,624,821; và WO 94/29351 liên quan đến các ví dụ khác về các biến thể vùng Fc.

d) Các biến thể kháng thể được xử lý bằng công nghệ xystein

Theo các phương án nhất định, có thể là thích hợp khi tạo ra các kháng thể được xử lý bằng công nghệ xystein, ví dụ, "thioMAb", mà trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thế bằng các gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thế xảy ra ở các vị trí của kháng thể mà sẵn có cho quá trình tiếp hợp. Bằng cách thay thế các gốc đó bằng xystein, các nhóm thiol có tính phản ứng nhờ đó được đặt ở các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để tiếp hợp kháng thể vào các gốc khác, như các gốc thuốc hoặc các gốc thuốc-gốc liên kết, để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch, như được mô tả thêm trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc dưới đây có thể được thế bằng xystein: V205 (cách đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (cách đánh số Châu Âu) của chuỗi nặng; và S400 (cách đánh số Châu Âu) của vùng Fc chuỗi nặng. Các kháng thể được xử lý bằng công nghệ xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Patent Mỹ số 7,521,541.

e) Các dẫn xuất kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này có thể được cải biến thêm để chứa các gốc không có protein phụ thêm mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và dễ tìm. Các gốc thích hợp cho quá trình tạo dẫn xuất kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme tan được trong nước. Các ví dụ không giới hạn về các polyme tan được trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, các axit polyamin (hoặc homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl

pyrolidon)polyetylen glycol, các homopolyme propropylen glycol, các co-polyme prolypropylen oxit/etylen oxit, các polyol được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có các ưu điểm trong việc sản xuất do tính ổn định của nó trong nước. Polyme có thể có trọng lượng phân tử bất kỳ, và có thể là phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số polyme được gắn kết vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn kết, thì chúng có thể là cùng một số phân tử hoặc các phân tử khác nhau. Nhìn chung, số polyme và/hoặc loại polyme được sử dụng cho quá trình tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các cân nhắc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thuộc tính hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, không phụ thuộc vào việc dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng trong liệu pháp trong các tình trạng đã được xác định và các tình trạng tương tự.

Theo một phương án khác, các thể tiếp hợp của kháng thể và gốc không có protein mà có thể được gia nhiệt một cách chọn lọc bằng tình trạng phơi nhiễm bức xạ được đề xuất. Theo một phương án, gốc không có protein là ống nano carbon (Kam et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605, 2005). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bước sóng mà không gây hại cho các tế bào thông thường, nhưng gia nhiệt gốc không có protein đến một nhiệt độ mà ở nhiệt độ này các tế bào gần với gốc không có protein-kháng thể bị tiêu diệt.

B. Các chế phẩm và phương pháp tái tổ hợp

Có thể tạo ra các kháng thể bằng cách sử dụng các chế phẩm và các phương pháp tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 4,816,567. Theo một phương án, axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng tryptaza được mô tả trong bản mô tả này được đề xuất. Axit nucleic như vậy có thể mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL và/hoặc trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo một phương án khác nữa, một hoặc nhiều vật truyền (ví dụ, vật truyền biểu hiện) bao gồm axit nucleic như vậy được đề xuất. Theo một phương án khác nữa, tế bào chủ chứa axit nucleic như vậy được đề xuất. Theo một phương án như vậy, tế bào chủ bao gồm (ví dụ, đã được biến nạp bằng): (1) vật truyền bao gồm axit nucleic mà mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và trình

tự axit amin bao gồm VH của kháng thể, hoặc (2) vật truyền thứ nhất bao gồm axit nucleic mà mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và vật truyền thứ hai bao gồm axit nucleic mà mã hóa trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào chủ là nhân thực, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (CHO), tế bào 293, hoặc tế bào bạch huyết (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, phương pháp tạo ra kháng thể kháng tryptaza được đề xuất, trong đó phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể, như được đề xuất trên đây, trong các điều kiện thích hợp cho quá trình biểu hiện kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Đối với quá trình sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng tryptaza, axit nucleic mã hóa kháng thể, ví dụ, như được mô tả trên đây, được phân lập và chèn vào một hoặc nhiều vật truyền dùng để tạo dòng vô tính thêm và/hoặc biểu hiện trong tế bào chủ. Axit nucleic như vậy có thể dễ dàng được phân lập và được giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng các mẫu dò oligonucleotit mà có khả năng liên kết đặc hiệu vào các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào chủ thích hợp để tạo dòng vô tính hoặc biểu hiện các vật truyền mã hóa kháng thể bao gồm tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thực được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, các kháng thể có thể được tạo ra ở vi khuẩn, cụ thể là khi quá trình glycosyl hóa và chức năng tác động của Fc là không cần thiết. Đối với quá trình biểu hiện các mảnh kháng thể và polypeptit ở vi khuẩn, ví dụ, xem tài liệu: các Patent Mỹ số 5,648,237, 5,789,199, và 5,840,523. Xem thêm tài liệu: Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, mô tả quá trình biểu hiện các mảnh kháng thể ở *E. coli*. Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ bột nhão chứa tế bào vi khuẩn trong phần tan được và có thể được tinh chế thêm.

Ngoài các sinh vật nhân sơ ra, các vi sinh vật nhân thực như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tạo dòng vô tính hoặc biểu hiện thích hợp cho các vật truyền mã hóa kháng thể, bao gồm cả các chủng nấm mốc và nấm men mà con đường glycosyl hóa của chúng đã "được nhân tính hóa", đem lại sự sản xuất kháng thể có mẫu hình glycosyl hóa của người một phần hoặc hoàn toàn. Xem tài liệu: Gerngross *Nat. Biotech.* 22:1409-1414, 2004 và Li et al. *Nat. Biotech.* 24:210-215, 2006.

Các tế bào chủ thích hợp cho quá trình biểu hiện kháng thể được glycosyl hóa cũng được tạo ra từ các sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về tế bào động vật không xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirut khác nhau đã được nhận diện mà có thể được sử dụng chung với các tế bào côn trùng, cụ thể là đối với quá trình chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các môi trường nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, xem tài liệu: các Patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ dùng để sản xuất các kháng thể ở các loài thực vật chuyển gen).

Các tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú mà được làm thích ứng để tăng trưởng trong huyền phù có thể là hữu ích. Các ví dụ khác về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích là dòng CV1 ở thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi thai của người (293 hoặc tế bào 293 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Graham *et al., J. Gen Virol.* 36:59, 1977); các tế bào thận chuột túi má sơ sinh (BHK); các tế bào Sertoli của chuột (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, 1980); các tế bào thận của khỉ (CV1); các tế bào thận của khỉ xanh ở Châu Phi (VERO-76); các tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung của người (HELA); các tế bào thận của chó (MDCK; các tế bào gan của chuột buffalo (BRL 3A); các tế bào phổi của người (W138); các tế bào gan của người (Hep G2); khối u vú của chuột (MMT 060562); các tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Mather *et al., Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68, 1982; các tế bào MRC 5; và các tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (CHO), bao gồm cả các tế bào DHFR- CHO (Urlaub *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216, 1980); và các dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để tìm hiểu về các dòng tế bào chủ của động vật có vú nhất định thích hợp cho quá trình sản xuất kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Yazaki et al. *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268, 2003.

C. Các thử nghiệm

Các kháng thể kháng tryptaza được đề xuất trong bản mô tả này có thể được nhận diện, được sàng lọc, hoặc xác định đặc tính về thuộc tính vật lý/thuộc tính hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của chúng bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

1. Các thử nghiệm liên kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế được kiểm tra về hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết như ELISA, phương pháp thấm tách phương Tây, cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), và các phương pháp tương tự.

Theo một khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận diện kháng thể mà cạnh tranh với kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế để liên kết vào tryptaza. Theo các phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh như vậy liên kết vào cùng một epitop (ví dụ, epitop tuyến tính hoặc epitop theo hình thể) mà được liên kết bởi kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh như vậy liên kết vào epitop chồng lấn (ví dụ, epitop tuyến tính hoặc epitop theo hình thể) mà được liên kết bởi kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế. Các phương pháp làm ví dụ chi tiết dùng để lập bản đồ epitop mà kháng thể liên kết vào đó được đưa ra trong tài liệu: Morris "Epitope Mapping Protocols", trong *Methods in Molecular Biology* Vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ), 1996.

Trong thử nghiệm cạnh tranh làm ví dụ, tryptaza bất động được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà liên kết vào tryptaza và kháng thể không được đánh dấu thứ hai mà đang được kiểm tra về khả năng của nó trong việc cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết vào tryptaza. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi ở trên chứa tế bào lai. Trong vai trò là đối chứng, tryptaza bất động được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất nhưng không chứa kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép liên kết kháng thể thứ nhất vào tryptaza, lượng dư kháng thể không được liên kết được loại bỏ, và lượng của chất đánh dấu gắn liền với tryptaza bất động được đo. Nếu lượng của chất đánh dấu gắn liền với tryptaza bất động về cơ bản được làm giảm trong mẫu xét nghiệm so với

mẫu đối chứng, thì điều đó biểu lộ rằng kháng thể thứ hai đang cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết vào tryptaza. Xem tài liệu: Harlow et al. *Antibodies: A Laboratory Manual* Ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), 1988.

Theo một phương án khác, quá trình cạnh tranh của hai kháng thể để liên kết vào cùng một epitop được xác định bằng phương pháp phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng. Ví dụ, kháng nguyên đã được đánh dấu được làm bất động trên bề mặt rắn, và cho phản ứng với lượng làm bão hòa của kháng thể thứ nhất. Sau đó, kháng thể cạnh tranh thứ hai được bổ sung. Hiện tượng liên kết phụ thêm bất kỳ bởi kháng thể thứ hai như được phát hiện bằng, ví dụ, OCTET® (ForteBio) hoặc các kỹ thuật đo giao thoa lớp sinh học (bio-layer interferometry-BLI) khác, biểu lộ rằng hai kháng thể này liên kết vào các epitop không chồng lấn khác biệt. Không có hiện tượng liên kết phụ thêm biểu lộ rằng hai kháng thể này liên kết vào cùng một epitop hoặc epitop chồng lấn. Một vài phương pháp khác, bao gồm cả ELISA, sắc ký loại trừ theo kích cỡ, tinh thể học, HDX-MS, quá trình gây đột biến, và các phương pháp SPR khác, cũng có thể được sử dụng để chứng minh rằng hai kháng thể liên kết vào cùng một epitop hoặc epitop chồng lấn. Có thể sử dụng các kỹ thuật tương tự để xác định xem liệu kháng thể có phong bế chéo, hoặc được phong bế chéo bởi, kháng thể theo sáng chế hay không.

2. Các thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được đề xuất cho việc nhận diện các kháng thể kháng tryptaza của chúng có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, khả năng liên kết vào tryptaza (ví dụ, tryptaza trong dòng máu hoặc trong khí đạo), hoặc mảnh peptit của nó, *in vivo*, *in vitro*, hoặc *ex vivo*. Theo các phương án khác, hoạt tính sinh học có thể bao gồm khả năng phong bế hoặc trung hòa tryptaza. Ví dụ, theo một số phương án, hoạt tính sinh học có thể bao gồm khả năng phong bế hoặc trung hòa hoạt tính thủy phân protein tryptaza. Các kháng thể có hoạt tính sinh học như vậy in vivo và/hoặc in vitro cũng được đề xuất. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về hoạt tính sinh học như vậy.

Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về khả năng ức chế hoạt tính tryptaza trong thử nghiệm enzym tryptaza, ví dụ, bằng cách sử

dụng chất nền peptit (ví dụ, peptit S-2288 tổng hợp), ví dụ, như được mô tả trong phần các Ví dụ (ví dụ, Ví dụ 1, cụ thể là Mục (A)(viii)(a)), hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu: Fukuoka et al. *J. Immunol.* 176:3165-3172, 2006). Theo một số phương án, khả năng ức chế hoạt tính tryptaza trong thử nghiệm enzym tryptaza được thực hiện ở hoặc quanh độ pH trung tính (ví dụ, quanh độ pH 7, ví dụ, khoảng độ pH 7, khoảng độ pH 7,4, hoặc khoảng độ pH 8). Theo các phương án khác, khả năng ức chế hoạt tính tryptaza trong thử nghiệm enzym tryptaza được thực hiện ở độ pH có tính axit (ví dụ, khoảng độ pH 6,0, ví dụ, khoảng độ pH 4,0, khoảng độ pH 5,0, khoảng độ pH 6,0, hoặc khoảng độ pH 6,5).

Theo các phương án khác, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về khả năng phá vỡ tryptaza có cấu trúc dạng tetrame (như tryptaza trưởng thành có mặt trong, hoặc được giải phóng từ, các hạt tiết dưỡng bào) để tạo thành monome, mà có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm cả sắc ký lọc trên gel (ví dụ, sắc ký lọc trên gel SUPEROSE® 12). Ví dụ, xem tài liệu: Fukuoka et al. *J. Immunol.* 176:3165-3172, 2006.

Theo các phương án khác nữa, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về khả năng ức chế quá trình tăng sinh và/hoặc tình trạng co của các tế bào cơ trơn khí đạo sơ cấp của người do tryptaza kích thích, như được mô tả, ví dụ, ở Ví dụ 1.

Còn theo các phương án khác, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin và/hoặc hiện tượng thoát hạt dưỡng bào, ví dụ, do tryptaza và/hoặc IgE kích thích. Các thử nghiệm như vậy được mô tả, ví dụ, ở Ví dụ 1.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về khả năng ức chế tryptaza có hoạt tính, ví dụ, trong thử nghiệm tryptaza có hoạt tính (ví dụ, xem Hình 15 và Ví dụ 6), ví dụ, trong mẫu (ví dụ, chất lưu súc rửa phế quản-phế nang) thu được từ đối tượng sau khi cho đối tượng này dùng kháng thể (ví dụ, bằng phương pháp tiêm trong tĩnh mạch hoặc dưới da).

Theo các phương án khác nữa, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về khả năng điều biến (ví dụ, làm tăng hoặc làm giảm) tổng mức tryptaza, ví dụ, trong thử nghiệm tryptaza tổng (ví dụ, xem Hình 15 và Ví dụ 6), ví dụ, trong mẫu (ví dụ, chất lưu súc rửa phế quản-phế nang) thu được từ đối tượng sau khi cho đối tượng này dùng kháng thể (ví dụ, bằng phương pháp tiêm trong tĩnh mạch hoặc dưới da).

D. Thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng tryptaza trong bản mô tả này được tiếp hợp vào một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như các thuốc hoặc các chất hóa trị liệu, chất ức chế sự tăng trưởng, các độc tố (ví dụ, các độc tố protein, các độc tố có hoạt tính theo kiểu enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ.

Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch là thể tiếp hợp kháng thể-thuốc (ADC) mà trong đó kháng thể được tiếp hợp vào một hoặc nhiều loại thuốc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở maytansinoit (xem các Patent Mỹ số 5,208,020, 5,416,064 và Patent Châu Âu EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc thuốc monometylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem các Patent Mỹ số 5,635,483 và 5,780,588, và 7,498,298); dolastatin; calicheamixin hoặc dẫn xuất của nó (xem các Patent Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296; Hinman et al. *Cancer Res.* 53:3336-3342, 1993; và Lode et al. *Cancer Res.* 58:2925-2928, 1998); một antraxyclin như daunomycin hoặc doxorubicin (xem tài liệu: Kratz et al. *Current Med. Chem.* 13:477-523, 2006; Jeffrey et al. *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362, 2006; Torgov et al. *Bioconj. Chem.* 16:717-721, 2005; Nagy et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834, 2000; Dubowchik et al. *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532, 2002; King et al. *J. Med. Chem.* 45:4336-4343, 2002; và Patent Mỹ số 6,630,579); metotrexat; vindesin; một taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; tricothexen; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp vào độc tố có hoạt tính theo kiểu enzym hoặc mảnh của nó, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chuỗi A của độc tố bệnh bạch hầu, các mảnh có hoạt tính không liên kết của độc tố bệnh bạch hầu, chuỗi A của ngoại độc tố (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A của rixin, chuỗi A của abrin, chuỗi A của modexin, alpha-sarxin, các protein của *cây Trẩu trơn*, các protein dianthin, các protein thương lục Mỹ (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế mướp đắng, curxin, crotin, chất ức chế tạo phì thảo, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, và tricothexen.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp vào nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để tạo thành thể tiếp hợp phóng xạ. Một loạt chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ sẵn có dùng cho việc sản xuất các thể tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu. Khi thể tiếp hợp phóng xạ được sử dụng cho việc phát hiện, thì nó có thể bao gồm nguyên tử có hoạt tính phóng xạ dùng cho các nghiên cứu xạ hình, ví dụ, tecneti-99m (tc99m) hoặc I^{123}, hoặc chất đánh dấu spin dùng cho phương pháp chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được gọi là chụp cộng hưởng từ, mri), như lại iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, carbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Có thể tạo ra các thể tiếp hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào bằng cách sử dụng một loạt chất liên hợp protein lưỡng chức năng như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimitmetyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất lưỡng chức năng của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este có hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), các diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất bis-flo có hoạt tính (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong tài liệu: Vitetta et al. *Science* 238:1098, 1987. Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminepentaaxetic được đánh dấu bằng carbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat làm ví dụ dùng cho quá trình tiếp hợp nucleotit phóng xạ vào kháng thể. Xem WO94/11026. Gốc liên kết này có thể là "gốc liên kết có thể phân cắt được" tạo thuận lợi cho quá trình giải phóng thuốc gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, gốc liên kết không bền đối với axit, gốc liên kết nhạy cảm với peptidaza, gốc liên kết không bền đối với ánh sáng, gốc liên kết dimetyl hoặc gốc liên kết chứa disulfua (ví dụ, xem tài liệu: Chari et al. *Cancer Res.* 52:127-131, 1992; Patent Mỹ số 5,208,020) có thể được sử dụng.

Các thể tiếp hợp miễn dịch hay ADC trong bản mô tả này rõ ràng được dự liệu, nhưng không chỉ giới hạn ở các thể tiếp hợp như vậy được điều chế bằng các chất phản ứng liên kết ngang bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS,

HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (suxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) mà có bán trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Các phương pháp và chế phẩm dùng cho ngành chẩn đoán và phát hiện

Theo các phương án nhất định, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được đề xuất trong bản mô tả này là hữu ích cho việc phát hiện sự có mặt của tryptaza trong mẫu sinh học. Thuật ngữ "phát hiện" như được sử dụng trong bản mô tả này bao quát quá trình phát hiện định lượng hoặc định tính. Theo các phương án nhất định, mẫu sinh học bao gồm tế bào hoặc mô, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các dưỡng bào, các bạch cầu ưa bazơ, các tế bào biểu mô, hoặc mô phổi (ví dụ, cơ trơn phế quản). Theo các phương án nhất định, mẫu sinh học bao gồm máu (ví dụ, máu toàn phần, huyết thanh, hoặc huyết tương), đờm, chất súc rửa phế quản-phế nang, hoặc mẫu hấp thụ qua màng nhầy mũi.

Theo một phương án, kháng thể kháng tryptaza để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện được đề xuất. Theo một khía cạnh khác nữa, phương pháp phát hiện sự có mặt của tryptaza trong mẫu sinh học được đề xuất. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm việc cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể kháng tryptaza như được mô tả trong bản mô tả này trong các điều kiện cho phép liên kết kháng thể kháng tryptaza vào tryptaza, và phát hiện xem liệu phức hợp có được tạo thành giữa kháng thể kháng tryptaza và tryptaza hay không. Phương pháp như vậy có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể kháng tryptaza được sử dụng để chọn lựa các đối tượng đủ điều kiện cho liệu pháp bằng kháng thể kháng tryptaza, ví dụ, trong đó tryptaza là dấu ấn sinh học dùng cho quá trình chọn lựa bệnh nhân.

Các rối loạn làm ví dụ mà có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế bao gồm các rối loạn phổi (ví dụ, hen suyễn (ví dụ, hen suyễn do mức Th2 cao hoặc hen suyễn do mức Th2 thấp), tình trạng tăng tính đáp ứng khí đạo, hoặc COPD), các rối loạn tự miễn dịch (ví dụ, viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, IBD, và bệnh Crohn), các rối loạn viêm (ví dụ, mày đay vô căn

mạn tính (CIU hoặc CSU), viêm da cơ địa, hoặc viêm mũi dị ứng), rối loạn xơ hóa (ví dụ, IPF), các rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), các rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, các rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc, và các rối loạn gắn liền với tryptaza hoặc rối loạn do tryptaza làm trung gian.

Ví dụ, trong một số trường hợp, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để chẩn đoán hoặc phát hiện hiện tượng phản vệ (ví dụ, hiện tượng phản vệ toàn thân cấp tính) hoặc bệnh thâm nhiễm dưỡng bào (ví dụ, bệnh thâm nhiễm dưỡng bào toàn thân không cấp tính), ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: Schwartz et al. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 26:451-463, 2006). Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, trong phương pháp ELISA để phát hiện các mức của tryptaza tổng, pro-tryptaza, và/hoặc tryptaza trưởng thành. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm kháng thể bắt trong phương pháp ELISA. Theo các phương án khác, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm kháng thể phát hiện trong phương pháp ELISA. Theo các phương án cụ thể, mức tham chiếu bình thường của tryptaza tổng trong huyết thanh hoặc huyết tương có thể là khoảng 1-15ng/ml (ví dụ, khoảng 1ng/ml, khoảng 2ng/ml, khoảng 3ng/ml, khoảng 4ng/ml, khoảng 5ng/ml, khoảng 6ng/ml, khoảng 7ng/ml, khoảng 8ng/ml, khoảng 9ng/ml, khoảng 10ng/ml, khoảng 11ng/ml, khoảng 12ng/ml, khoảng 13ng/ml, khoảng 14ng/ml, hoặc khoảng 15ng/ml). Trong một số trường hợp, mức tăng so với mức tham chiếu bình thường của tryptaza tổng được sử dụng làm chỉ báo chẩn đoán về rối loạn gắn liền với tryptaza. Theo một số phương án, mức tham chiếu bình thường của tryptaza trưởng thành trong huyết thanh hoặc huyết tương có thể là <1ng/ml. Theo một số phương án, mức tăng so với mức tham chiếu bình thường của tryptaza trưởng thành có thể được sử dụng làm chỉ báo chẩn đoán về rối loạn gắn liền với tryptaza.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng tryptaza được đánh dấu được đề xuất. Các chất đánh dấu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đánh dấu hoặc các gốc mà được phát hiện một cách trực tiếp (như các chất đánh dấu huỳnh quang, có nhóm mang màu, có mật độ ngăn chặn điện tử xâm nhập, phát quang hóa học, và có

hoạt tính phóng xạ), cũng như các gốc, như các enzym hoặc phối tử, mà được phát hiện một cách gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đồng vị phóng xạ ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, và ^{131}I, các hợp chất huỳnh quang như các chelat đất hiếm hoặc floresxein và các dẫn xuất của nó, rodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbeliferon, các luxiferaza, ví dụ, luxiferaza của đom đóm và luxiferaza của vi khuẩn (Patent Mỹ số 4,737,456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazindion, peroxidaza cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, β-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, các oxidaza dạng dị vòng như uricaza và xantin oxidaza, được liên hợp bằng enzym mà sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, chất đánh dấu spin, chất đánh dấu thể thực khuẩn, các gốc tự do ổn định, và các chất tương tự.

F. Dạng chế phẩm dược

Các dạng chế phẩm dược của kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế được điều chế bằng cách trộn kháng thể có mức độ tinh khiết mong muốn như vậy với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tùy ý (ví dụ, xem tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed., 1980), dưới dạng các dạng chế phẩm được đông khô hoặc dung dịch nước. Nhìn chung, các chất mang dược dụng là không độc hại đối với các đối tượng tiếp nhận ở các mức liều dùng và mức nồng độ được sử dụng, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các dung dịch đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm cả axit ascorbic và metionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzyl; các paraben alkyl như paraben propyl hoặc metyl; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit có trọng lượng phân tử thấp (nhỏ hơn khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, các disacarit, và các carbohydrat khác bao gồm cả glucoza, manoza, hoặc dextrin; các chất tạo chelat như EDTA; các loại đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion đối tạo muối như natri; các phức chất kim loại

(ví dụ, các phức hợp Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang dược dụng làm ví dụ trong bản mô tả này còn bao gồm các chất phân tán thuốc kẽ như các glycoprotein hyaluronidaza có hoạt tính-trung tính tan được (sHASEGP), ví dụ, các glycoprotein hyaluronidaza PH-20 tan được của người, như rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Các sHASEGP làm ví dụ nhất định và các phương pháp sử dụng, bao gồm cả rHuPH20, được mô tả trong tài liệu: các Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza phụ thêm như chondroitinaza.

Các dạng chế phẩm kháng thể được đông khô làm ví dụ được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 6,267,958. Các dạng chế phẩm kháng thể nước bao gồm những loại được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 6,171,586 và WO 2006/044908, các dạng chế phẩm nước bao gồm dung dịch đệm histidin-axetat.

Dạng chế phẩm trong bản mô tả này có thể còn chứa nhiều hơn một thành phần có hoạt tính khi cần thiết cho chỉ định cụ thể đang được điều trị, tốt hơn, nếu những hợp chất có hoạt tính này có các hoạt tính bổ trợ mà không gây ảnh hưởng bất lợi cho nhau. Ví dụ, có thể là thích hợp khi đề xuất thêm chất đối kháng liên kết interleukin-13 (IL-13), chất đối kháng liên kết trục interleukin-17 (IL-17), chất đối kháng liên kết trục interleukin-5 (IL-5), chất đối kháng liên kết trục IL-33, chất đối kháng mồi M1, chất đối kháng IgE, chất đối kháng TRPA1, chất đối kháng CRTH2, chất làm giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn, chất điều biến miễn dịch, corticosteroit, chất ức chế con đường Th2, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13, ví dụ, lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33. Trong một số trường hợp, chất đối kháng mồi M1 là quilizumab. Trong một số trường hợp, chất đối kháng IgE là omalizumab (XOLAIR®). Các thành phần có hoạt tính như vậy có mặt theo cách phù hợp ở dạng kết hợp theo các lượng mà hữu hiệu cho mục đích được dự định.

Các thành phần có hoạt tính có thể được kìm giữ trong các viên vi nang được điều chế, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng kỹ thuật polyme hóa bề mặt, ví dụ, lần lượt đối với các viên vi nang hydroxymetylxenluloza hoặc gelatin và các viên vi nang poly-(metylmetaxylat), trong các hệ phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, thể vi nhũ tương, hạt nano và viên nang nano) hoặc trong thể nhũ tương thô. Các kỹ thuật như vậy được bộc lộ trong tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. 1980.

Có thể điều chế các chế phẩm giải phóng duy trì. Các ví dụ thích hợp về các chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm cơ chất bán thấm của các polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, mà các cơ chất này là ở dạng vật dụng được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc viên vi nang.

Nhìn chung, các dạng chế phẩm sẽ được sử dụng cho phương thức cho dùng *in vivo* là vô trùng. Có thể dễ dàng thực hiện việc tiệt trùng, ví dụ, bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng.

Sáng chế đề xuất các chế phẩm dược mà bao gồm chất chống oxy hóa. Các chế phẩm như vậy có thể được sử dụng để làm giảm mức oxy hóa của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza, như hu31A.v11). Trong một số trường hợp, chất chống oxy hóa được lấy vào để làm giảm mức oxy hóa của gốc tryptophan, ví dụ, gốc tryptophan trong vùng HVR hoặc vùng FR của vùng biến đổi. Trong các trường hợp cụ thể, chất chống oxy hóa được lấy vào để làm giảm mức oxy hóa của gốc HVR-H3 của kháng thể kháng tryptaza, ví dụ, W100 ở hu31A.v11. Trong một số trường hợp, chất chống oxy hóa được lấy vào chế phẩm để làm giảm mức oxy hóa của gốc metionin, ví dụ, gốc metionin trong vùng Fc của kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng tryptaza), như các gốc Fc M251, M357, và/hoặc M427 (ví dụ, của hu31A.v11).

Trong một số trường hợp, chế phẩm dược bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và chất chống oxy hóa. Trong một số trường hợp, kháng thể này là dễ bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa (ví dụ, ở một hoặc nhiều gốc tryptophan hoặc metionin (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10)). Có thể sử dụng chất chống oxy hóa thích hợp bất kỳ. Ví dụ, trong một số trường hợp, chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều chất chống oxy hóa (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 chất chống oxy

hóa) được chọn lựa từ nhóm gồm N-axetyltryptophan (ví dụ, N-axetyl DL-tryptophan hoặc N-axetyl D-tryptophan), tryptophan, metionin (ví dụ, L-metionin), xystein, glutathion, thiosorbitol, axit ascorbic, monothioglyxerol, xyclodextrin, Trolox, pyridoxin, polyol (ví dụ, manitol), sucroza, chất tạo chelat kim loại (ví dụ, EDTA), và các dạng kết hợp của chúng (ví dụ, dạng kết hợp của N-axetyltryptophan và metionin). Trong một số trường hợp, chất chống oxy hóa là N-axetyltryptophan (ví dụ, N-axetyl DL-tryptophan hoặc N-axetyl D-tryptophan). Trong các trường hợp khác, chất chống oxy hóa là metionin (ví dụ, L-metionin hoặc D-metionin). Trong các trường hợp cụ thể, chế phẩm bao gồm N-axetyltryptophan (ví dụ, N-axetyl DL-tryptophan hoặc N-axetyl D-tryptophan) và metionin (ví dụ, L-metionin hoặc D-metionin). Trong một số trường hợp, N-axetyltryptophan làm giảm hoặc phòng ngừa mức oxy hóa của tryptophan ở kháng thể. Trong một số trường hợp, metionin làm giảm hoặc phòng ngừa sự oxy hóa của metionin ở kháng thể.

Chế phẩm dược có thể bao gồm nồng độ thích hợp bất kỳ của chất chống oxy hóa để làm giảm hoặc loại bỏ sự oxy hóa. Ví dụ, nồng độ của polyol (ví dụ, manitol) hoặc sucroza có thể là khoảng 1% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 25% (trọng lượng/thể tích), ví dụ, khoảng 1%, khoảng 2%, khoảng 3%, khoảng 4%, khoảng 5%, khoảng 6%, khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, khoảng 10%, khoảng 11%, khoảng 12%, khoảng 13%, khoảng 15%, khoảng 16%, khoảng 17%, khoảng 18%, khoảng 19%, khoảng 20%, hoặc khoảng 25% (trọng lượng/thể tích). Trong các trường hợp cụ thể, nồng độ của polyol (ví dụ, manitol) hoặc sucroza có thể là khoảng 15% (trọng lượng/thể tích). Trong một ví dụ khác, nồng độ của các chất tạo chelat kim loại (ví dụ, EDTA) có thể là khoảng 0,01% (trọng lượng/thể tích) đến khoảng 1% (trọng lượng/thể tích), ví dụ, khoảng 0,01%, khoảng 0,02%, khoảng 0,03%, khoảng 0,04%, khoảng 0,05%, khoảng 0,06%, khoảng 0,07%, khoảng 0,08%, khoảng 0,09%, khoảng 0,1%, khoảng 0,15%, khoảng 0,2%, khoảng 0,25%, khoảng 0,3%, khoảng 0,4%, khoảng 0,45%, khoảng 0,5%, khoảng 0,6%, khoảng 0,7%, khoảng 0,8%, khoảng 0,9%, hoặc khoảng 1% (trọng lượng/thể tích). Trong các trường hợp cụ thể, nồng độ của chất tạo chelat kim loại (ví dụ, EDTA) có thể là khoảng 0,4% (trọng lượng/thể tích). Trong một ví dụ khác nữa, nồng độ của metionin và/hoặc tryptophan có thể là khoảng 0,1mg/ml đến khoảng 10mg/ml, ví dụ, khoảng 0,1mg/ml, khoảng 0,5mg/ml, khoảng 1mg/ml, khoảng 2mg/ml, khoảng 3mg/ml,

khoảng 4mg/ml, khoảng 5mg/ml, khoảng 6mg/ml, khoảng 7mg/ml, khoảng 8mg/ml, khoảng 9mg/ml, hoặc khoảng 10mg/ml. Trong một số trường hợp, nồng độ của metionin và/hoặc tryptophan là khoảng 2mg/ml.

Ví dụ, trong một số trường hợp, sáng chế đề xuất chế phẩm dược mà bao gồm: (i) kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6); (ii) N-axetyltryptophan (ví dụ, N-axetyl DL-tryptophan hoặc N-axetyl D-tryptophan); và (iii) metionin (ví dụ, L-metionin hoặc D-metionin).

Nồng độ thích hợp bất kỳ của N-axetyltryptophan (ví dụ, N-axetyl DL-tryptophan hoặc N-axetyl D-tryptophan) có thể được sử dụng trong chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, nồng độ của N-axetyltryptophan (ví dụ, N-axetyl DL-tryptophan hoặc N-axetyl D-tryptophan) là khoảng 0,05mM đến khoảng 20mM (ví dụ, khoảng 0,05mM đến khoảng 20mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 19mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 18mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 17mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 16mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 15mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 14mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 12mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 11mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 10mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 9mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 8mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 7mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 6mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 5mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 4mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 3mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 2mM, khoảng 0,05mM đến khoảng 1mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 20mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 19mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 18mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 17mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 16mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 15mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 14mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,1mM

đến khoảng 13mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 12mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 11mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 10mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 9mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 8mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 7mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 6mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 5mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 4mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 3mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 2mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 1mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 0,9mM, khoảng 0,1 đến khoảng 0,8mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 0,7mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 0,6mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 0,5mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 0,4mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 0,3mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 20mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 19mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 18mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 17mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 16mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 15mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 14mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 12mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 11mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 10mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 9mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 8mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 7mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 6mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 5mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 4mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 3mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 2mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 1mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 0,9mM, khoảng 0,2 đến khoảng 0,8mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 0,7mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 0,6mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 0,5mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 0,4mM, khoảng 0,2mM đến khoảng 0,3mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 20mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 19mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 18mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 17mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 16mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 15mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 14mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 12mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 11mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 10mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 9mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 8mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 7mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 6mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 5mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 4mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 3mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 2mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 1mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 0,9mM, khoảng 0,3 đến khoảng 0,8mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 0,7mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 0,6mM, khoảng 0,3mM đến khoảng 0,5mM, hoặc khoảng 0,3mM đến khoảng 0,4 mM). Trong một số trường

hợp, N-axetyltryptophan là ở mức nồng độ là khoảng 0,1mM đến khoảng 1mM (ví dụ, khoảng 0,1mM, khoảng 0,2mM, khoảng 0,3mM, khoảng 0,4mM, khoảng 0,5mM, khoảng 0,6mM, khoảng 0,7mM, khoảng 0,8mM, khoảng 0,9mM, hoặc khoảng 1 mM). Trong các trường hợp cụ thể, nồng độ của N-axetyltryptophan (ví dụ, N-axetyl DL-tryptophan hoặc N-axetyl D-tryptophan) là khoảng 0,3mM. Trong các trường hợp cụ thể, N-axetyltryptophan là N-axetyl DL-tryptophan.

Nồng độ thích hợp bất kỳ của metionin (ví dụ, L-metionin hoặc D-metionin) có thể được sử dụng trong chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, trong một số trường hợp, nồng độ của metionin (ví dụ, L-metionin hoặc D-metionin) là khoảng 0,1mM đến khoảng 30mM (ví dụ, khoảng 0,1mM đến khoảng 30mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 25mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 20mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 19mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 18mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 17mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 16mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 15mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 14mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 13mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 12mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 11mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 10mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 9mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 8mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 7mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 6mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 5mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 4mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 3mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 2mM, khoảng 0,1mM đến khoảng 1mM, khoảng 1mM đến khoảng 20mM, khoảng 1mM đến khoảng 19mM, khoảng 1mM đến khoảng 18mM, khoảng 1mM đến khoảng 17mM, khoảng 1mM đến khoảng 16mM, khoảng 1mM đến khoảng 15mM, khoảng 1mM đến khoảng 14mM, khoảng 1mM đến khoảng 13mM, khoảng 1mM đến khoảng 13mM, khoảng 1mM đến khoảng 12mM, khoảng 1mM đến khoảng 11mM, khoảng 1mM đến khoảng 10mM, khoảng 1mM đến khoảng 9mM, khoảng 1mM đến khoảng 8mM, khoảng 1mM đến khoảng 7mM, khoảng 1mM đến khoảng 6mM, khoảng 1mM đến khoảng 5mM, khoảng 1mM đến khoảng 4mM, khoảng 1mM đến khoảng 3mM, khoảng 1mM đến khoảng 2mM, khoảng 2mM đến khoảng 20mM, khoảng 2mM đến khoảng 19mM, khoảng 2mM đến khoảng 18mM, khoảng 2mM đến khoảng 17mM, khoảng 2mM đến khoảng 16mM, khoảng 2mM đến khoảng 15mM, khoảng 2mM đến khoảng 14mM, khoảng 2mM đến khoảng 13mM, khoảng.2mM đến khoảng 13mM, khoảng 2mM đến khoảng 12mM,

khoảng 2mM đến khoảng 11mM, khoảng 2mM đến khoảng 10mM, khoảng 2mM đến khoảng 9mM, khoảng 2mM đến khoảng 8mM, khoảng 2mM đến khoảng 7mM, khoảng 2mM đến khoảng 6mM, khoảng 2mM đến khoảng 5mM, khoảng 2mM đến khoảng 4mM, khoảng 2mM đến khoảng 3mM, khoảng 5mM đến khoảng 20mM, khoảng 5mM đến khoảng 19mM, khoảng 5mM đến khoảng 18mM, khoảng 5mM đến khoảng 17mM, khoảng 5mM đến khoảng 16mM, khoảng 5mM đến khoảng 15mM, khoảng 5mM đến khoảng 14mM, khoảng 5mM đến khoảng 13mM, khoảng 5mM đến khoảng 13mM, khoảng 5mM đến khoảng 12mM, khoảng 5mM đến khoảng 11mM, khoảng 5mM đến khoảng 10mM, khoảng 5mM đến khoảng 9mM, khoảng 5mM đến khoảng 8mM, khoảng 5mM đến khoảng 7mM, hoặc khoảng 5mM đến khoảng 6 mM). Trong một số trường hợp, metionin (ví dụ, L-metionin hoặc D-metionin) là ở mức nồng độ là khoảng 1mM đến khoảng 10mM (ví dụ, khoảng 1mM, khoảng 2mM, khoảng 3mM, khoảng 4mM, khoảng 5mM, khoảng 6mM, khoảng 7mM, khoảng 8mM, khoảng 9mM, hoặc khoảng 10 mM). Trong các trường hợp cụ thể, nồng độ của metionin (ví dụ, L-metionin hoặc D-metionin) là khoảng 5mM. Trong các trường hợp khác, nồng độ của metionin là khoảng 10mM. Trong các trường hợp cụ thể, metionin này là L-metionin.

Trong một số trường hợp, sự có mặt của chất chống oxy hóa (ví dụ, N-axetyltryptophan (ví dụ, N-axetyl DL-tryptophan) và/hoặc metionin (ví dụ, L-metionin hoặc D-metionin)) làm giảm mức oxy hóa tính theo phần trăm của kháng thể kháng tryptaza ở một gốc cụ thể (ví dụ, gốc tryptophan hoặc gốc metionin, ví dụ, trong gốc HVR-H3 (ví dụ, W100 của miền VH của hu31A.v11) hoặc trong gốc Fc (ví dụ, các gốc Fc M251, M357, và/hoặc M427 (ví dụ, của hu31A.v11)) là khoảng 1%, khoảng 2%, khoảng 5%, khoảng 6%, khoảng 10%, khoảng 15%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 28%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, trở lên, ví dụ, so với mức oxy hóa tính theo phần trăm ở gốc này khi thiếu vắng chất chống oxy hóa.

Trong các trường hợp trong đó kháng thể này bao gồm gốc W100 miền VH trong HVR-H3 (ví dụ, hu31A.v11) mà dễ bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa, trong một số trường hợp, gốc W100 miền VH trong HVR-H3 có mức oxy hóa tính theo phần trăm là nhỏ

hơn khoảng 35% (ví dụ, nhỏ hơn 35%, nhỏ hơn 34%, nhỏ hơn 33%, nhỏ hơn 32%, nhỏ hơn 31%, nhỏ hơn 30%, nhỏ hơn 29%, nhỏ hơn 28%, nhỏ hơn 27%, nhỏ hơn 26%, nhỏ hơn 25%, nhỏ hơn 24%, nhỏ hơn 23%, nhỏ hơn 22%, nhỏ hơn 21%, nhỏ hơn 20%, nhỏ hơn 19%, nhỏ hơn 18%, nhỏ hơn 17%, nhỏ hơn 16%, nhỏ hơn 15%, nhỏ hơn 14%, nhỏ hơn 13%, nhỏ hơn 12%, nhỏ hơn 11%, nhỏ hơn 10%, nhỏ hơn 9%, nhỏ hơn 8%, nhỏ hơn 7%, nhỏ hơn 6%, nhỏ hơn 5%, nhỏ hơn 4%, nhỏ hơn 3%, nhỏ hơn 2%, nhỏ hơn 1%, trở xuống). Ví dụ, trong một số trường hợp, gốc W100 trong HVR-H3 có mức oxy hóa tính theo phần trăm là nhỏ hơn khoảng 35%. Trong các trường hợp khác, gốc W100 trong HVR-H3 có mức oxy hóa tính theo phần trăm là nhỏ hơn khoảng 25%. Còn trong các trường hợp khác, gốc W100 trong HVR-H3 có mức oxy hóa tính theo phần trăm là nhỏ hơn khoảng 15%. Trong các trường hợp khác nữa, gốc W100 trong HVR-H3 có mức oxy hóa tính theo phần trăm là nhỏ hơn khoảng 10%. Trong các trường hợp khác, gốc W100 trong HVR-H3 có mức oxy hóa tính theo phần trăm là nhỏ hơn khoảng 5%. Trong các trường hợp khác, gốc W100 trong HVR-H3 có mức oxy hóa tính theo phần trăm là nhỏ hơn khoảng 4%, khoảng 3%, khoảng 2%, hoặc khoảng 1%.

Lấy ví dụ, trong một số trường hợp trong đó kháng thể này bao gồm gốc W100 miền VH trong HVR-H3 mà dễ bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa, trong một số trường hợp, gốc W100 miền VH trong HVR-H3 có mức oxy hóa tính theo phần trăm là từ khoảng 1% đến khoảng 50%, từ khoảng 1% đến khoảng 45%, từ khoảng 1% đến khoảng 40%, từ khoảng 1% đến khoảng 35%, từ khoảng 1% đến khoảng 30%, từ khoảng 1% đến khoảng 25%, từ khoảng 1% đến khoảng 20%, từ khoảng 1% đến khoảng 15%, từ khoảng 1% đến khoảng 10%, từ khoảng 1% đến khoảng 5%, từ khoảng 1% đến khoảng 4%, từ khoảng 1% đến khoảng 3%, từ khoảng 1% đến khoảng 2%, từ khoảng 5% đến khoảng 50%, từ khoảng 5% đến khoảng 45%, từ khoảng 5% đến khoảng 50%, từ khoảng 5% đến khoảng 35%, từ khoảng 5% đến khoảng 30%, từ khoảng 5% đến khoảng 25%, từ khoảng 5% đến khoảng 20%, từ khoảng 5% đến khoảng 15%, từ khoảng 5% đến khoảng 10%, từ khoảng 10% đến khoảng 50%, từ khoảng 10% đến khoảng 45%, từ khoảng 10% đến khoảng 40%, từ khoảng 10% đến khoảng 35%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 10% đến khoảng 25%, từ khoảng 10% đến khoảng 20%, từ khoảng 10% đến khoảng 15%, từ khoảng 15% đến khoảng 50%, từ khoảng 15% đến khoảng 45%, từ khoảng 15% đến khoảng 40%, từ khoảng 15% đến khoảng 35%, từ khoảng 15% đến

khoảng 30%, từ khoảng 15% đến khoảng 25%, từ khoảng 15% đến khoảng 20%, từ khoảng 25% đến khoảng 50%, hoặc từ khoảng 30% đến khoảng 50%.

Mức oxy hóa tính theo phần trăm có thể được xác định, ví dụ, trong vòng khoảng 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng, 4 tháng, 5 tháng, 6 tháng, 7 tháng, 8 tháng 9 tháng, 10 tháng, 11 tháng, 12 tháng, 18 tháng, hai năm, trở lên từ thời điểm sản xuất ban đầu của kháng thể hoặc chế phẩm dược của nó. Trong một số trường hợp, mức oxy hóa tính theo phần trăm được xác định khoảng 9 tháng, khoảng 12 tháng, khoảng 18 tháng, hoặc hai năm từ thời điểm sản xuất ban đầu của kháng thể hoặc chế phẩm dược của nó.

Nồng độ của kháng thể trong chế phẩm theo sáng chế có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ khoảng 1mg/ml đến khoảng 350mg/ml (ví dụ, khoảng 1mg/ml đến khoảng 350mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 325mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 300mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 275mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 250mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 225mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 200mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 175mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 150mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 125mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 100mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 75mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 50mg/ml, khoảng 1mg/ml đến khoảng 25mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 350mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 325mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 300mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 275mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 250mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 225mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 200mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 175mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 150mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 125mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 100mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 75mg/ml, khoảng 25mg/ml đến khoảng 50mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 350mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 325mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 300mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 275mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 250mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 225mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 200mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 175mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 150mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 125mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 100mg/ml, khoảng 50mg/ml đến khoảng 75mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 350mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 325mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 300mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 275mg/ml, khoảng

75mg/ml đến khoảng 250mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 225mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 200mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 175mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 150mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 125mg/ml, khoảng 75mg/ml đến khoảng 100mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 350mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 325mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 300mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 275mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 250mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 225mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 200mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 175mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 150mg/ml, khoảng 100mg/ml đến khoảng 125mg/ml, hoặc khoảng 150mg/ml đến khoảng 175mg/ml. Trong một số trường hợp, kháng thể này là ở mức nồng độ là khoảng 50mg/ml đến khoảng 200mg/ml (ví dụ, khoảng 50mg/ml, khoảng 60mg/ml, khoảng 70mg/ml, khoảng 80mg/ml, khoảng 90mg/ml, khoảng 100mg/ml, khoảng 110mg/ml, khoảng 120mg/ml, khoảng 130mg/ml, khoảng 140mg/ml, khoảng 150mg/ml, khoảng 160mg/ml, khoảng 170mg/ml, khoảng 180mg/ml, khoảng 190mg/ml, hoặc khoảng 200mg/ml. Trong các trường hợp cụ thể, nồng độ kháng thể là khoảng 150mg/ml.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều tá dược bổ sung được chọn lựa từ nhóm gồm chất làm ổn định, dung dịch đệm, chất hoạt động bề mặt, và chất trương lực. Trong một số trường hợp, dung dịch đệm bao gồm arginin suxinat và/hoặc histidin suxinat. Trong một số trường hợp, dung dịch đệm bao gồm arginin suxinat và histidin suxinat.

Có thể sử dụng nồng độ thích hợp bất kỳ của arginin suxinat. Ví dụ, trong một số trường hợp, nồng độ của arginin suxinat là khoảng 10mM đến khoảng 500mM (ví dụ, khoảng 10mM, khoảng 20mM, khoảng 30mM, khoảng 40mM, khoảng 50mM, khoảng 75mM, khoảng 100mM, khoảng 125mM, khoảng 150mM, khoảng 175mM, khoảng 200mM, khoảng 225mM, khoảng 250mM, khoảng 275mM, khoảng 300mM, khoảng 325mM, khoảng 350mM, khoảng 375mM, khoảng 400mM, khoảng 425mM, khoảng 450mM, khoảng 475mM, hoặc khoảng 500 mM). Ví dụ, trong một số trường hợp, nồng độ của arginin suxinat là khoảng 100mM đến khoảng 300mM, khoảng 125mM đến khoảng 300mM, khoảng 150mM đến khoảng 300mM, khoảng 175mM đến khoảng 300mM, khoảng 200mM đến khoảng 300mM, khoảng 225mM đến khoảng 300mM, khoảng 250mM đến khoảng 300mM, khoảng 275mM đến khoảng 300mM, khoảng

100mM đến khoảng 250mM, khoảng 125mM đến khoảng 250mM, khoảng 150mM đến khoảng 250mM, khoảng 175mM đến khoảng 250mM, khoảng 200mM đến khoảng 250mM, khoảng 100mM đến khoảng 225mM, khoảng 125mM đến khoảng 225mM, khoảng 150mM đến khoảng 225mM, khoảng 175mM đến khoảng 225mM, khoảng 200mM đến khoảng 225mM, khoảng 100mM đến khoảng 200mM, khoảng 125mM đến khoảng 200mM, khoảng 150mM đến khoảng 200mM, hoặc khoảng 175mM đến khoảng 200mM. Trong các trường hợp cụ thể, nồng độ của arginin suxinat là khoảng 200mM.

Có thể sử dụng nồng độ thích hợp bất kỳ của histidin suxinat. Ví dụ, theo một số phương án, nồng độ của histidin suxinat là khoảng 1mM đến khoảng 100mM (ví dụ, khoảng 1mM, khoảng 5mM, khoảng 10mM, khoảng 15mM, khoảng 20mM, khoảng 25mM, khoảng 30mM, khoảng 35mM, khoảng 40mM, khoảng 45mM, khoảng 50mM, khoảng 55mM, khoảng 60mM, khoảng 65mM, khoảng 70mM, khoảng 75mM, khoảng 80mM, khoảng 85mM, khoảng 90mM, khoảng 95mM, hoặc khoảng 100 mM). Trong các trường hợp cụ thể, nồng độ của histidin suxinat là khoảng 20mM.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể có độ pH là khoảng 4,0 đến khoảng 7,0 (ví dụ, khoảng 4,0, khoảng 4,5, khoảng 5,0, khoảng 5,5, khoảng 6,0, khoảng 6,5, hoặc khoảng 7,0). Trong một số trường hợp, độ pH là từ khoảng 4,5 đến khoảng 7,0 (ví dụ, khoảng 4,5, khoảng 5,0, khoảng 5,5, khoảng 6,0, khoảng 6,5, hoặc khoảng 7,0). Trong một số trường hợp, độ pH là từ khoảng 4,5 đến khoảng 6,5 (ví dụ, khoảng 4,5, khoảng 4,6, khoảng 4,7, khoảng 4,8, khoảng 4,9, khoảng 5, khoảng 5,1, khoảng 5,2, khoảng 5,3, khoảng 5,4, khoảng 5,5 khoảng 5,6, khoảng 5,7, khoảng 5,8, khoảng 5,9, khoảng 6, khoảng 6,1, khoảng 6,2, khoảng 6,3, khoảng 6,4, hoặc khoảng 6,5). Trong một số trường hợp, độ pH là từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,0 (ví dụ, khoảng 5,0, khoảng 5,1, khoảng 5,2, khoảng 5,3, khoảng 5,4, khoảng 5,5, khoảng 5,6, khoảng 5,7, khoảng 5,8, khoảng 5,9, hoặc khoảng 6,0). Trong một số trường hợp, độ pH là khoảng 5,5.

Có thể sử dụng chất hoạt động bề mặt thích hợp bất kỳ trong các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, chất hoạt động bề mặt là poloxame 188 hoặc polysorbat 20. Có thể sử dụng nồng độ thích hợp bất kỳ của poloxame 188. Ví dụ, nồng độ của poloxame 188 có thể là khoảng 0,005% đến khoảng 0,5%, khoảng 0,005% đến khoảng 0,05%, hoặc khoảng 0,02%. Trong một số trường hợp, nồng độ của

poloxame 188 là khoảng 0,01%, khoảng 0,02%, khoảng 0,03%, khoảng 0,04%, khoảng 0,05%, khoảng 0,06%, khoảng 0,07%, khoảng 0,08%, khoảng 0,09%, hoặc khoảng 0,1%. Theo các phương án cụ thể, nồng độ của poloxame 188 là khoảng 0,02%. Có thể sử dụng nồng độ thích hợp bất kỳ của polysorbat 20. Ví dụ, nồng độ của polysorbat 20 có thể là khoảng 0,005% đến khoảng 0,5%, khoảng 0,005% đến khoảng 0,05%, hoặc khoảng 0,02%. Trong một số trường hợp, nồng độ của polysorbat 20 là khoảng 0,01%, khoảng 0,02%, khoảng 0,03%, khoảng 0,04%, khoảng 0,05%, khoảng 0,06%, khoảng 0,07%, khoảng 0,08%, khoảng 0,09%, hoặc khoảng 0,1%.

Trong các trường hợp cụ thể, chế phẩm bao gồm khoảng 150mg/ml của kháng thể kháng tryptaza được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, hu31A.v11), arginin suxinat khoảng 200mM, histidin suxinat khoảng 20mM, N-axetyl DL-tryptophan khoảng 0,3mM), L-metionin khoảng 5mM, poloxame 188 khoảng 0,02%, và có độ pH là khoảng 5,8.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được tạo dạng chế phẩm dùng cho phương thức cho dùng bằng đường dùng thích hợp bất kỳ. Trong các trường hợp cụ thể, chế phẩm được tạo dạng chế phẩm dùng cho phương thức dùng dưới da hoặc phương thức dùng trong tĩnh mạch. Trong một số trường hợp, chế phẩm được tạo dạng chế phẩm dùng cho phương thức dùng dưới da.

G. Các chế phẩm và phương pháp trị liệu

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza hoặc các chế phẩm dược theo sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng tryptaza, hoặc chế phẩm dược của nó, để sử dụng làm dược phẩm được đề xuất. Theo các khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng tryptaza, hoặc chế phẩm dược của nó, để sử dụng trong việc điều trị rối loạn được đề xuất. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng tryptaza, hoặc chế phẩm dược của nó, để sử dụng trong phương pháp điều trị được đề xuất. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng tryptaza, hoặc chế phẩm dược của nó, để sử dụng trong phương pháp điều trị đối tượng có rối loạn mà bao gồm việc cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng tryptaza. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất

trị liệu phụ thêm, ví dụ, như được mô tả dưới đây. Tốt hơn, nếu "đối tượng" theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây là con người.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất cách sử dụng kháng thể kháng tryptaza, hoặc chế phẩm dược của nó, trong việc sản xuất hoặc điều chế dược phẩm. Theo một phương án, dược phẩm này là dùng cho việc điều trị rối loạn. Theo một phương án khác nữa, dược phẩm này là để sử dụng trong phương pháp điều trị rối loạn bao gồm việc cho đối tượng có rối loạn dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm. Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm việc cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu phụ thêm, ví dụ, như được mô tả dưới đây. "Đối tượng" theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây có thể là con người.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn, bao gồm cả, ví dụ, rối loạn phổi (ví dụ, hen suyễn (ví dụ, hen suyễn do mức Th2 cao hoặc hen suyễn do mức Th2 thấp), tình trạng tăng tính đáp ứng khí đạo, hoặc COPD), rối loạn tự miễn dịch (ví dụ, viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, IBD, hoặc bệnh Crohn), rối loạn viêm (ví dụ, mày đay vô căn mạn tính (CIU hoặc CSU), hiện tượng phản vệ, viêm da cơ địa, hoặc viêm mũi dị ứng), rối loạn xơ hóa (ví dụ, IPF), rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc, và rối loạn gắn liền với tryptaza hoặc rối loạn do tryptaza làm trung gian. Theo một phương án, phương pháp bao gồm việc cho đối tượng có rối loạn dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng tryptaza, hoặc chế phẩm dược của nó. Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm việc cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu phụ thêm, như được mô tả dưới đây. "Đối tượng" theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây có thể là con người.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất các dạng chế phẩm dược bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được đề xuất trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp trị liệu trên đây. Theo một phương án, dạng chế phẩm dược bao gồm kháng thể bất kỳ trong số

các kháng thể kháng tryptaza được đề xuất trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dạng chế phẩm dược bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng tryptaza được đề xuất trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu phụ thêm, ví dụ, như được mô tả dưới đây. Dạng chế phẩm bất kỳ trong số các dạng chế phẩm dược được mô tả ở Mục F (ví dụ, những dạng chế phẩm mà bao gồm chất chống oxy hóa như N-axetyltryptophan và/hoặc metionin) trên đây có thể được sử dụng trong cách sử dụng bất kỳ trong số các cách sử dụng hoặc các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc). Theo một số phương án, rối loạn này là rối loạn phổi.

Theo một số phương án, rối loạn phổi này là gắn liền với bạch cầu hạt (bạch cầu ưa eosin và/hoặc bạch cầu trung tính) viêm phổi, các tình trạng phổi do tình trạng lây nhiễm kích thích (bao gồm cả những loại gắn liền với các tác nhân khởi động virut (ví dụ, bệnh cúm, bệnh phó cúm, virut mũi, virut metapneumo ở người, và virut hợp bào hô hấp), vi khuẩn, hoặc nấm (ví dụ, Aspergillus). Theo một số phương án, rối loạn là tình trạng phổi do dị ứng nguyên kích thích, tình trạng phổi do tác nhân gây ô nhiễm môi trường độc kích thích (ví dụ, bệnh nhiễm bụi amiăng phổi, bệnh nhiễm bụi silic phổi, hoặc bệnh nhiễm bụi beryli phổi), tình trạng phổi do phương pháp chọc hút dạ dày kích thích, hoặc gắn liền với tình trạng rối loạn điều tiết miễn dịch hoặc tình trạng viêm có tố bẩm di truyền như chứng xơ hóa nang. Theo một số phương án, rối loạn là tình trạng phổi do chấn thương thể lý kích thích (ví dụ, tổn thương do thở máy), bệnh tràn khí, bệnh tràn khí do thuốc lá kích thích, viêm phế quản, bệnh u hạt phần thịt, chứng tăng sinh mô bào, u cơ bạch huyết ở phổi, tổn thương phổi cấp tính, hội chứng suy hô hấp cấp tính, bệnh phổi mạn tính, loạn sản phế quản-phổi, viêm phổi (ví dụ, viêm phổi mắc phải trong cộng đồng, viêm phổi mắc phải trong bệnh viện, viêm phổi gắn liền với thở máy, viêm phổi virut, viêm phổi vi khuẩn, và viêm phổi trầm trọng), các đợt trầm trọng

khí đạo, và hội chứng suy hô hấp cấp tính (ARDS)). Theo một số phương án, rối loạn phổi này là COPD.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn phổi này là hen suyễn. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn trầm trọng mạn tính dai dẳng có các sự biến cấp tính của các triệu chứng trở nên tồi tệ hơn (các đợt trầm trọng hoặc các đợt trở nặng) mà có thể là đe dọa đến tính mạng. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn cơ địa dị ứng (còn được gọi là dị ứng), hen suyễn không dị ứng (ví dụ, thường được khởi động bởi tình trạng lây nhiễm virut hô hấp (ví dụ, bệnh cúm, bệnh phó cúm, virut mũi, virut metapneumo ở người, và virut hợp bào hô hấp) hoặc chất gây kích ứng hít vào (tác nhân gây ô nhiễm không khí, khói bụi, hạt diesel, hóa chất dễ bay hơi và các chất khí trong nhà hoặc ngoài trời, hoặc thậm chí bởi không khí khô lạnh).

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, bệnh hen suyễn này là hen suyễn ngắt quãng hoặc do tập thể dục kích thích do tình trạng phơi nhiễm "khói" sơ cấp hoặc thụ động cấp tính hoặc mạn tính (thường là điếu thuốc lá, điếu xì gà, tẩu thuốc), hít vào hoặc "hít hơi" (thuốc lá, cần sa hoặc các chất như vậy khác), hoặc hen suyễn được khởi động bởi quá trình uống aspirin hoặc NSAIDS có liên quan gần đây. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là nhẹ, hoặc hen suyễn nguyên sơ với corticosteroit, hen suyễn mới được chẩn đoán và chưa được điều trị, hoặc trước đó, không cần đến cách dùng kinh niên các steroit dùng toàn thân hoặc khu trú bên ngoài dạng xông hít để kiểm soát các triệu chứng (ho, thở khò khè, thở hụt hơi/khó thở, hoặc đau ngực). Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là mạn tính, hen suyễn kháng lại corticosteroit, hen suyễn chai lờn với corticosteroit, hen suyễn không kiểm soát được đối với corticosteroit hoặc các phương thuốc kiểm soát hen suyễn mạn tính khác.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, bệnh hen suyễn này là hen suyễn từ vừa phải đến trầm trọng. Theo các phương án nhất định, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 cao. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn trầm trọng. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn cơ địa dị ứng, hen suyễn dị ứng, hen suyễn không dị ứng (ví dụ, do tình trạng lây nhiễm và/hoặc virut hợp bào hô hấp (RSV)), hen suyễn do tập thể dục kích thích,

hen suyễn thêm trầm trọng/nhạy cảm với aspirin, hen suyễn nhẹ, hen suyễn từ vừa phải đến trầm trọng, hen suyễn nguyên sơ với corticosteroit, hen suyễn mạn tính, hen suyễn kháng lại corticosteroit, hen suyễn chai lờn với corticosteroit, hen suyễn mới được chẩn đoán và chưa được điều trị, hen suyễn do khói thuốc lá, hen suyễn không kiểm soát được đối với corticosteroit. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do bạch huyết bào T trợ giúp loại 2 (Th2) hoặc loại 2 (Th2) cao, hoặc hen suyễn do Loại 2 (T2) thúc đẩy. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn bạch cầu ưa eosin. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn dị ứng. Theo một số phương án, cá thể đã được xác định là Dương tính với chứng Viêm Bạch cầu ưa eosin (Eosinophilic Inflammation Positive-EIP). Xem tài liệu: WO2015/061441. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức periostin cao (ví dụ, có mức periostin ít nhất khoảng mức bất kỳ trong số 20ng/ml, 25ng/ml, hoặc 50ng/ml huyết thanh). Các phương pháp xác định các mức periostin huyết thanh được đề xuất, ví dụ, trong tài liệu: US2012/0156194. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức bạch cầu ưa eosin cao (ví dụ, ít nhất khoảng mức bất kỳ trong số 150, 200, 250, 300, 350, 400 bạch cầu ưa eosin/ml máu). Theo các phương án nhất định, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức Th2 thấp hoặc hen suyễn không do Th2 thúc đẩy. Theo một số phương án, cá thể đã được xác định là Âm tính với chứng Viêm Bạch cầu ưa eosin (Eosinophilic Inflammation Negative-EIN). Xem tài liệu: WO2015/061441. Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức periostin thấp (ví dụ, có mức periostin nhỏ hơn khoảng 20ng/ml huyết thanh). Theo một số phương án, bệnh hen suyễn này là hen suyễn do mức bạch cầu ưa eosin thấp (ví dụ, nhỏ hơn khoảng 150 bạch cầu ưa eosin/µl máu hoặc nhỏ hơn khoảng 100 bạch cầu ưa eosin/µl máu). Theo các phương án nhất định, cá thể này biểu hiện mức tăng cao của FeNO (axit nitric thở ra theo phân đoạn) và/hoặc mức tăng cao của IgE. Ví dụ, trong một số trường hợp, cá thể này biểu hiện mức FeNO cao hơn khoảng 250 phần tỷ (ppb), cao hơn khoảng 275 ppb, cao hơn khoảng 300 ppb, cao hơn khoảng 325 ppb, cao hơn khoảng 325 ppb, hoặc cao hơn khoảng 350 ppb. Trong một số trường hợp, cá thể này có mức IgE mà cao hơn 50 IU/ml. Theo một số phương án, cá thể này có thể tích thở ra gắng sức trong 1 giây (FEV1) là từ 40% đến 80% của trị số được dự đoán.

Theo các phương án khác về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin là chứng xơ hóa phổi. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF).

Theo các phương án khác nữa về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào là viêm thực quản (ví dụ, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin), viêm mũi dị ứng, viêm mũi không dị ứng, viêm mũi xoang có polyp, chứng polyp mũi, viêm phế quản, viêm phổi mạn tính, viêm phế quản phổi dị ứng do nhiễm nấm cúc, viêm khí đạo, viêm mũi dị ứng, bệnh giãn phế quản, và/hoặc viêm phế quản mạn tính.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào, là viêm khớp. Theo một số phương án, bệnh viêm khớp này là viêm khớp dạng thấp. Theo một số phương án, bệnh viêm khớp này là viêm khớp xương, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp tuổi thiếu niên, viêm khớp dạng thấp ở tuổi thiếu niên, viêm khớp sớm, viêm đa khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp khởi phát toàn thân, viêm khớp bệnh đường ruột, viêm khớp phản ứng, viêm khớp vảy nến, và/hoặc viêm khớp là kết quả của tổn thương.

Còn theo các phương án khác về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào là tình trạng viêm dạ dày-ruột. Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là IBD (bệnh viêm ruột), viêm loét kết tràng (UC), bệnh Crohn (CD), viêm kết tràng (ví dụ, viêm kết tràng do các tác nhân gây hại từ môi trường gây ra (ví dụ, do chế độ trị liệu gây ra hoặc gắn liền với chế độ trị liệu, như liệu pháp hóa học, liệu pháp phóng xạ, v.v.)), viêm kết tràng lây nhiễm, viêm kết tràng do thiếu máu cục bộ, viêm kết tràng colagen hoặc viêm kết tràng bạch huyết bào, viêm kết tràng-ruột non gây hoại tử, viêm kết tràng trong các tình trạng như bệnh u hạt mạn tính hoặc bệnh hệ tiêu hóa không hấp thụ dưỡng chất do gluten, di ứng thực phẩm, viêm dạ dày, viêm dạ dày-ruột,

viêm dạ dày lây nhiễm hoặc viêm kết tràng-ruột non (ví dụ,viêm dạ dày hoạt động mạn tính có nhiễm Helicobacter pylori), viêm thực quản, và các dạng khác của bệnh viêm dạ dày-ruột do tác nhân lây nhiễm gây ra, hoặc viêm kết tràng không xác định.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào là tình trạng viêm dạ dày-ruột. Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là IBD (bệnh viêm ruột). Theo một số phương án, bệnh viêm ruột này là viêm loét kết tràng (UC) hoặc bệnh Crohn (CD). Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là viêm kết tràng (ví dụ, viêm kết tràng do các tác nhân gây hại từ môi trường gây ra (ví dụ, do chế độ trị liệu gây ra hoặc gắn liền với chế độ trị liệu, như liệu pháp hóa học, liệu pháp phóng xạ, v.v.), viêm kết tràng lây nhiễm, viêm kết tràng do thiếu máu cục bộ, viêm kết tràng colagen hoặc viêm kết tràng bạch huyết bào, viêm kết tràng-ruột non gây hoại tử, viêm kết tràng trong các tình trạng như bệnh u hạt mạn tính hoặc bệnh hệ tiêu hóa không hấp thụ dưỡng chất do gluten, di ứng thực phẩm, viêm dạ dày, viêm dạ dày-ruột, viêm dạ dày lây nhiễm hoặc viêm kết tràng-ruột non (ví dụ,viêm dạ dày hoạt động mạn tính có nhiễm Helicobacter pylori), và các dạng khác của bệnh viêm dạ dày-ruột do tác nhân lây nhiễm gây ra, hoặc viêm kết tràng không xác định.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là viêm loét kết tràng (UC) hoặc bệnh Crohn (CD). Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là viêm loét kết tràng (UC). Theo một số phương án, bệnh viêm loét kết tràng này là viêm kết tràng xa từ nhẹ đến vừa phải. Theo một số phương án, bệnh viêm loét kết tràng này là viêm kết tràng lan rộng từ nhẹ đến vừa phải. Theo một số phương án, bệnh viêm loét kết tràng này là viêm kết tràng trầm trọng. Theo một số phương án, tình trạng viêm dạ dày-ruột này là bệnh Crohn (CD). Theo một số phương án, bệnh Crohn này là ở giai đoạn bệnh cấp tính. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là ở giai đoạn thuyên giảm lâm sàng có kích thích. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là ở giai đoạn thuyên giảm/đáp ứng duy trì. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là bệnh từ nhẹ đến vừa phải. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là bệnh từ vừa phải đến trầm trọng. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là

bệnh trầm trọng/kịch phát. Theo một số phương án, bệnh Crohn này là bệnh hồi tràng, hồi tràng-kết tràng, hoặc kết tràng.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu hạt (bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu ưa eosin), rối loạn bạch cầu đơn nhân to, hoặc rối loạn bạch huyết bào, hoặc rối loạn gắn liền với con số hoặc mức phân bố của các tế bào cư trú ở mô lệch lạc hoặc bình thường tăng (như các dưỡng bào, đại thực bào, hoặc bạch huyết bào) hoặc các tế bào mô đệm (như nguyên bào sợi, nguyên bào sợi-cơ trơn, các tế bào cơ trơn, biểu mô, hoặc nội mạc) là lupus hoặc Lupus ban đỏ toàn thân (SLE), hoặc một hoặc nhiều biểu hiện đặc trưng theo cơ quan cụ thể của lupus (ví dụ, lupus viêm thận (LN) ảnh hưởng đến thận, hoặc lupus ngoài thận (ERL) ảnh hưởng đến máu và/hoặc các cơ quan dạng bạch huyết (hạch bạch huyết, lá lách, tuyến ức, và các mạch bạch huyết gắn liền), và/hoặc khớp và/hoặc các cơ quan khác, nhưng không nhất thiết là thận).

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, hoặc rối loạn xơ hóa là liên quan đến nhiễm trùng máu và/hoặc chấn thương, tình trạng lây nhiễm HIV, hoặc vô căn (thuộc bệnh nguyên học chưa biết) như viêm mạch gắn liền với ANCA (AAV), bệnh tạo u hạt có viêm đa mạch (trước đây được gọi là bệnh tạo u hạt Wegener), bệnh Behcet, bệnh tim mạch, viêm phế quản bạch cầu ưa eosin, Hội chứng Reiter, Hội chứng SEA (Hội chứng của Tình trạng âm tính huyết thanh, Bệnh điểm bám tận, Bệnh khớp), viêm cột sống dính khớp, viêm da-cơ, xơ cứng bì, ví dụ, xơ cứng bì toàn thân còn được gọi là xơ cứng toàn thân, viêm mạch (ví dụ, Viêm động mạch Tế bào khổng lồ (GCA), còn được gọi là viêm động mạch thái dương, viêm động mạch sọ hoặc bệnh Horton), viêm cơ, viêm đa cơ, viêm da-cơ, viêm đa động mạch dạng nút, viêm động mạch, đau nhức đa cơ, bệnh u hạt phần thịt, xơ cứng đường mật nguyên phát, viêm đường mật xơ cứng hóa, hội chứng Sjogren, bệnh vảy nến, bệnh vảy nến mảng bám, bệnh vảy nến dạng chấm giọt, bệnh vảy nến thể uốn, bệnh vảy nến thể mủ, bệnh vảy nến thể đỏ toàn thân, viêm da, viêm da cơ địa, pemphigus, ví dụ, pemphigus thể thông thường, xơ vữa động mạch, lupus, bệnh Still, nhược cơ năng, bệnh hệ tiêu hóa không hấp thụ dưỡng chất do gluten, xơ cứng rải rác (MS) gồm các loại phụ xơ cứng rải rác tái phát-thuyên giảm (RRMS) hoặc xơ cứng rải rác nguyên phát ngày càng nặng (PPMS) hoặc xơ cứng rải rác thứ phát ngày càng

nặng (SPMS), bệnh Guillain-Barre, bệnh đái tháo đường loại I (T1DM) hoặc loại bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin (IDDM) hoặc loại DM khởi phát ở tuổi thiếu niên, viêm tuyến giáp (ví dụ, bệnh Graves), bệnh hệ tiêu hóa không hấp thụ dưỡng chất do gluten, hội chứng Churg-Strauss, hội chứng đau cơ, hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin, các phản ứng phù bao gồm cả chứng phù mạch từng hồi, tình trạng lây nhiễm giun sán, viêm da do bệnh giun chỉ, viêm thực quản bạch cầu ưa eosin, viêm ruột non bạch cầu ưa eosin, viêm kết tràng bạch cầu ưa eosin, chứng ngừng thở lúc ngủ do tắc nghẽn, chứng xơ hóa cơ tim-màng trong tim, bệnh Addison, hiện tượng hoặc bệnh Raynaud, viêm gan tự miễn dịch, bệnh mô ghép chống lại vật chủ (ghép versus host disease-GVHD), hoặc tình trạng đào thải miếng ghép cơ quan.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn này là rối loạn viêm ở da. Theo một số phương án, rối loạn này là viêm da cơ địa hoặc viêm da do bệnh giun chỉ. Theo một số phương án, rối loạn này là mày đay vô căn mạn tính (CIU hoặc CSU). Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng IL-13, chất đối kháng IL-33, chất đối kháng IgE, chất ức chế canxi, chất ức chế leukotrien, hoặc chất kháng histamin. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-13 là lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng IgE là omalizumab hoặc ligelizumab.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin này là rối loạn xơ hóa. Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa bao gồm chứng xơ hóa phổi, chứng xơ hóa gan (ví dụ, chứng xơ hóa gắn liền với xơ gan (ví dụ, xơ gan do rượu kích thích, xơ gan do virut kích thích, xơ gan sau viêm gan C, và xơ ống mật nguyên phát), bệnh nhiễm sán máng, viêm đường mật (ví dụ, viêm đường mật xơ cứng hóa), và viêm gan do bệnh tự miễn dịch kích thích), chứng xơ hóa thận (ví dụ, chứng xơ hóa ống-kẽ, xơ cứng bì, viêm thận do đái tháo đường, và viêm thận tiểu cầu thận), chứng xơ hóa da (ví dụ, xơ cứng bì, tình trạng hình thành sẹo phì đại và sẹo lồi, bệnh da xơ hóa do thận, và các vết bỏng), xơ tủy, bệnh u xơ thần kinh, u xơ, chứng xơ hóa ruột, và các dạng bám dính xơ hóa hình thành từ các quy trình phẫu thuật), chứng xơ hóa tim (ví dụ, chứng xơ hóa gắn liền với nhồi máu cơ tim), chứng xơ

hóa mạch (ví dụ, chứng xơ hóa gắn liền với chứng tái phát hẹp động mạch sau phẫu thuật tạo hình mạch máu và xơ vữa động mạch), chứng xơ hóa mắt (ví dụ, chứng xơ hóa gắn liền với phẫu thuật sau bệnh đục thể thủy tinh, bệnh võng mạc-dịch thủy tinh tăng sinh, và chứng xơ hóa sau hốc mắt), và chứng xơ hóa tủy xương (ví dụ, xơ tủy vô căn và xơ tủy do thuốc kích thích). Chứng xơ hóa có thể là đặc trưng theo cơ quan hoặc toàn thân (ví dụ, xơ cứng toàn thân và chứng xơ hóa gắn liền với GVHD). Theo một số phương án, rối loạn xơ hóa là chứng xơ hóa phổi. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là viêm phổi kẽ xơ hóa. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là chứng xơ hóa phổi vô căn (IPF), còn được gọi là viêm phế nang xơ hóa không rõ nguyên nhân. Theo một số phương án, IPF là theo giới tính, độ tuổi và sinh lý học (GAP)-giai đoạn I. Theo một số phương án, IPF là theo GAP-giai đoạn II. Theo một số phương án, IPF là theo GAP-giai đoạn III. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là IPF tản phát. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là chứng xơ hóa phổi có tính gia đình. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi là bệnh tràn khí và chứng xơ hóa phổi kết hợp. Theo một số phương án, chứng xơ hóa phổi này là gắn liền với một hoặc nhiều chứng bệnh trong số các chứng bệnh sau đây: viêm phổi kẽ thông thường; viêm phổi kẽ vô căn; viêm phổi kẽ bong vảy; viêm tiểu phế quản hô hấp-bệnh phổi kẽ; viêm phổi kẽ cấp tính; viêm phổi kẽ không đặc hiệu; bệnh u hạt phần thịt; viêm phổi tổ chức hóa không rõ nguyên nhân; viêm phổi bạch cầu ưa eosin; tình trạng lây nhiễm; tình trạng phơi nhiễm tác nhân môi trường và nghề nghiệp; tình trạng hút thuốc lá; bệnh phổi kẽ do thuốc hoặc bức xạ kích thích; bệnh phổi kẽ gắn liền với bệnh thấp khớp; viêm phổi kẽ dạng bạch huyết; bệnh xơ chun phổi-màng phổi; chứng tăng sinh mô bào tế bào Langerhans phổi; bệnh phổi kẽ-xơ cứng toàn thân; hội chứng Hermansky-Pudlak; và bệnh telomere.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin là bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Theo một số phương án, COPD là chủng loại A theo Chiến lược Toàn cầu về Bệnh Phổi Tắc nghẽn Mạn tính (GOLD). Theo một số phương án, COPD là chủng loại B theo GOLD. Theo một số phương án, COPD là chủng loại C theo GOLD. Theo một số phương án, COPD là chủng loại D theo GOLD. Theo một số phương án, COPD là viêm phế quản mạn tính. Theo một số phương án, COPD là bệnh tràn khí. Theo một số phương án, bệnh tràn khí này

là bệnh tràn khí tuyến nang gần, tất cả tuyến nang, hoặc tuyến nang xa. Theo một số phương án, bệnh tràn khí là bệnh tràn khí do thuốc lá kích thích. Theo một số phương án, COPD là gắn liền với tình trạng phơi nhiễm bụi dạng hạt, khói hóa học, và/hoặc tình trạng ô nhiễm không khí. Theo một số phương án, COPD là gắn liền với sự phát triển phổi bị sút kém. Theo một số phương án, COPD là hen suyễn tắc nghẽn mạn tính. Theo một số phương án, COPD là gắn liền với tình trạng thiếu hụt chất kháng trypsin alpha-1. Theo một số phương án, COPD là gắn liền với tình trạng phá vỡ chất ức chế proteaza serin nhánh E, thành viên 2 (SERPINE2). Theo một số phương án, COPD này là COPD có viêm toàn thân dai dẳng. Theo một số phương án, COPD này là COPD bạch cầu ưa eosin hoặc COPD do mức tế bào T-trợ giúp loại 2 (T_H2) cao. Theo một số phương án, COPD này là COPD có sự cư trú dai dẳng của vi khuẩn. Theo một số phương án, COPD này là COPD có các đợt trầm trọng thường xuyên. Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin là hội chứng chồng lấn hen suyễn-COPD (ACOS). Theo một số phương án, ACOS là ACOS nổi trội về bạch cầu ưa eosin, nổi trội về bạch cầu trung tính, mẫu hình hỗn hợp hoặc không có viêm (ít bạch cầu hạt). Theo một số phương án, rối loạn tự miễn dịch, rối loạn viêm, rối loạn xơ hóa, rối loạn bạch cầu trung tính, hoặc rối loạn bạch cầu ưa eosin là hội chứng chồng lấn COPD-chứng ngừng thở lúc ngủ do tắc nghẽn (OSA).

Các kháng thể theo sáng chế, hoặc các chế phẩm dược của chúng, có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp với các chất khác trong liệu pháp. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế, hoặc các chế phẩm dược của nó, có thể được cho dùng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu phụ thêm. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu phụ thêm là chất đối kháng liên kết interleukin-13 (IL-13), chất đối kháng liên kết trục interleukin-17 (IL-17), chất đối kháng liên kết trục interleukin-5 (IL-5), hoặc chất đối kháng liên kết trục IL-33. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-13 là kháng thể kháng IL-13, ví dụ, lebrikizumab. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-5 là chất đối kháng liên kết IL-5 hoặc chất đối kháng liên kết thụ thể IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục IL-33 là chất đối kháng liên kết IL-33 hoặc chất đối kháng liên kết ST2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết IL-33 là kháng thể kháng IL-33.

Theo một số phương án, chất trị liệu phụ thêm là liệu pháp trị hen, như được mô tả dưới đây. Hiện nay, hen suyễn vừa phải được điều trị bằng corticosteroit chống viêm xông hít hằng ngày hoặc chất ức chế dưỡng bào như cromolyn natri hoặc nedocromil cộng với chất chủ vận beta2 xông hít khi cần (3-4 lần mỗi ngày) để giảm nhẹ các triệu chứng mắc lại hoặc bệnh hen suyễn do dị ứng nguyên kích thích và bệnh hen suyễn do tập thể dục. Các corticosteroit xông hít làm ví dụ bao gồm QVAR®, PULMICORT®, SYMBICORT®, AEROBID®, FLOVENT®, FLONASE®, ADVAIR®, và AZMACORT®. Các liệu pháp trị hen suyễn phụ thêm bao gồm chất làm giãn phế quản tác dụng kéo dài (long acting bronchial dilator-LABD). Theo các phương án nhất định, LABD là chất chủ vận beta-2 tác dụng kéo dài (LABA), chất đối kháng thụ thể leukotrien (LTRA), chất đối kháng muscarin tác dụng kéo dài (LAMA), theophyllin hoặc các corticosteroit dùng qua đường miệng (OCS). Các LABD làm ví dụ bao gồm SYMBICORT®, ADVAIR®, BROVANA®, FORADIL®, PERFOROMIST™ và SEREVENT®.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát triệu chứng hen suyễn. Theo một số phương án, chất giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát hen suyễn là chất chủ vận tác động adrenalin β2, như chất chủ vận β2 tác dụng ngắn (SABA) (như albuterol), hoặc chất chủ vận tác động adrenalin β2 tác dụng kéo dài (LABA). Theo một số phương án, LABA là salmeterol, abediterol, indacaterol, vilanterol, và/hoặc formoterol (formoterol fumarat dehydrat). Theo một số phương án, phương thuốc kiểm soát hen suyễn là chất đối kháng thụ thể leukotrien (LTRA). Theo một số phương án, LTRA là montelukast, zafirlukast, và/hoặc zileuton. Theo một số phương án, chất giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát hen suyễn là chất đối kháng muscarin, như chất đối kháng (tác động cholin) thụ thể axetylcholin muscarin tác dụng kéo dài (LAMA). Theo một số phương án, LAMA là glycopyrronium. Theo một số phương án, chất giãn phế quản hoặc phương thuốc kiểm soát hen suyễn là chất chủ vận của một kênh ion như một thụ thể vị đắng (như TAS2R).

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất giãn phế quản. Theo một số phương án, chất giãn phế quản là chất giãn phế quản xông hít. Theo một số phương án, chất giãn

phế quản xông hít là chất chủ vận tác động adrenalin β2. Theo một số phương án, chất chủ vận tác động adrenalin β2 là chất chủ vận tác động adrenalin β2 tác dụng ngắn (SABA). Theo một số phương án, SABA là bitolterol, fenoterol, isoproterenol, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, procaterol, ritodrin, albuterol, và/hoặc terbutalin. Theo một số phương án, chất chủ vận tác động adrenalin β2 là chất chủ vận tác động adrenalin β2 tác dụng kéo dài (LABA). Theo một số phương án, LABA là arformoterol, bambuterol, clenbuterol, formoterol, salmeterol, abediterol, carmoterol, indacaterol, olodaterol, và/hoặc vilanterol. Theo một số phương án, chất giãn phế quản xông hít là chất đối kháng thụ thể muscarin. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể muscarin là chất đối kháng thụ thể muscarin tác dụng ngắn (SAMA). Theo một số phương án, SAMA là ipratropium bromua. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể muscarin là chất đối kháng thụ thể muscarin tác dụng kéo dài (LAMA). Theo một số phương án, LAMA là tiotropium bromua, glycopyrronium bromua, umeclidinium bromua, aclidinium bromua, và/hoặc revefenacin. Theo một số phương án, chất giãn phế quản xông hít là dạng kết hợp SABA/SAMA. Theo một số phương án, dạng kết hợp SABA/SAMA là albuterol/ipratropium. Theo một số phương án, chất giãn phế quản xông hít là dạng kết hợp LABA/LAMA. Theo một số phương án, dạng kết hợp LABA/LAMA là formoterol/aclidinium, formoterol/glycopyrronium, formoterol/tiotropium, indacaterol/glycopyrronium, indacaterol/tiotropium, olodaterol/tiotropium, salmeterol/tiotropium, và/hoặc vilanterol/umeclidinium. Theo một số phương án, chất giãn phế quản xông hít là chất giãn phế quản lưỡng chức năng. Theo một số phương án, chất giãn phế quản lưỡng chức năng là chất đối kháng muscarin/chất chủ vận β2 (MABA). Theo một số phương án, MABA là batefenterol, THRX 200495, AZD 2115, LAS 190792, TEI3252, PF-3429281 và/hoặc PF-4348235. Theo một số phương án, chất giãn phế quản xông hít là chất chủ vận của TAS2R. Theo một số phương án, chất giãn phế quản là SABA được khí dung hóa. Theo một số phương án, SABA được khí dung hóa là albuterol và/hoặc levalbuterol. Theo một số phương án, chất giãn phế quản là LABA được khí dung hóa. Theo một số phương án, LABA được khí dung hóa là arformoterol và/hoặc formoterol. Theo một số phương án, chất giãn phế quản là SAMA được khí dung hóa. Theo một số phương án, SAMA được khí dung hóa là ipratropium. Theo một số phương án, chất giãn phế quản là LAMA được khí dung

hóa. Theo một số phương án, LAMA được khí dung hóa là glycopyrronium và/hoặc revefenacin. Theo một số phương án, chất giãn phế quản là dạng kết hợp SABA/SAMA được khí dung hóa. Theo một số phương án, dạng kết hợp SABA/SAMA được khí dung hóa là albuterol/ipratropium. Theo một số phương án, chất giãn phế quản là chất đối kháng thụ thể leukotrien (LTRA). Theo một số phương án, LTRA là montelukast, zafirlukast, và/hoặc zileuton. Theo một số phương án, chất giãn phế quản là metylxantin. Theo một số phương án, metylxantin là theophylin.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất điều biến miễn dịch. Theo một số phương án, chất điều biến miễn dịch là kháng thể kháng lại globulin miễn dịch loại E (IgE) hoặc kháng thể kháng IgE (chất ức chế IgE). Theo một số phương án, kháng thể kháng IgE là omalizumab và/hoặc ligelizumab. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm cromolyn. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm metylxantin. Theo một số phương án, metylxantin là theophylin hoặc cafein.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng một hoặc nhiều corticosteroit, như corticosteroit xông hít (ICS) hoặc corticosteroit dùng qua đường miệng. Các corticosteroit làm ví dụ không giới hạn bao gồm corticosteroit xông hít, như beclometason dipropionat, budesonit, ciclesonit, flunisolit, fluticason propionat, fluticason furoat, mometason, và/hoặc triamcinolon axetonit và corticosteroit dùng qua đường miệng, như metylprednisolon, prednisolon, và prednison. Theo một số phương án, corticosteroit là ICS. Theo một số phương án, ICS là beclometason, budesonit, flunisolit, fluticason furoat, fluticason propionat, mometason, ciclesonit, và/hoặc triamcinolon. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng dạng kết hợp ICS/LABA và/hoặc LAMA. Theo một số phương án, dạng kết hợp ICS/LABA và/hoặc LAMA là fluticason propionat/salmeterol, budesonit/formoterol, mometason/formoterol, fluticason furoat/vilanterol, fluticason propionat/formoterol, beclometason/formoterol, fluticason furoat/umeclidinium, fluticason furoat/vilanterol/umeclidinium,

fluticason/salmeterol/tiotropium, beclometason/formoterol/glycopyrronium, budesonit/formoterol/glycopyrronium, và/hoặc budesonit/formoterol/tiotropium. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng corticosteroit được khí dung hóa. Theo một số phương án, corticosteroit được khí dung hóa là budesonit. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng corticosteroit dùng trong tĩnh mạch hoặc qua đường miệng. Theo một số phương án, corticosteroit dùng trong tĩnh mạch hoặc qua đường miệng là prednison, prednisolon, metylprednisolon, và/hoặc hydrocortison.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất ức chế con đường T2 hoặc TH2 mà ức chế một hoặc nhiều đích được chọn lựa từ ITK, BTK, JAK (JAK1, JAK2 và/hoặc JAK3), IL-9, IL-6, IL-5, IL-13, IL-4, IL-17 (ví dụ, IL-17A và IL-17F), OX40L, TSLP, IL-25, IL-33, IgE, thụ thể IL-9, thụ thể IL-5, thụ thể IL-4 α, thụ thể IL-13 (ví dụ, thụ thể IL-13 α1 và/hoặc α2), OX40, TSLP-R, thụ thể IL-7 (ví dụ, IL7Rα), thụ thể IL-17 (ví dụ, IL-17Rβ), ST2 (thụ thể IL-33), CCR3, CCR4, CRTH2, FcεRI, FcεRII/CD23, Flap, Syk kinaza; CCR4, TLR9, CCR3, chất đối kháng thụ thể chemokin, và GM-CSF. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng IL-5. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-5 là benralizumab, mepolizumab, và/hoặc reslizumab. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng IL-13. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-13 là lebrikizumab, dectrekumab, hoặc tralokinumab. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng IL-4 (bao gồm cả chất đối kháng IL-4/IL-13). Theo một số phương án, chất đối kháng IL-4 là dupilumab hoặc QBX-258 (Novartis). Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng TSLP. Theo một số phương án, chất đối kháng TSLP là AMG-157 (MEDI-9929). Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng ST2. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng IL-17. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17 là secukinumab, ixekizumab hoặc bimekizumab. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng fevipiprant. Theo một số phương án

về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng masitinib. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng hoặc chất ức chế phosphodiesteraza (PDE), như chất đối kháng PDE4 và/hoặc PDE3. Theo một số phương án, chất đối kháng PDE là Theo-24, daliresp, hoặc roflumilast.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính được chọn lựa từ aminsalixylat; steroit; một chất sinh học; thiopurin; metotrexat; chất ức chế canxineurin, ví dụ, xyclosporin hoặc tacrolimus; và kháng sinh. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này bao gồm việc cho dùng thành phần có hoạt tính thêm trong dạng chế phẩm khu trú bên ngoài hoặc dùng qua đường miệng. Các ví dụ về aminsalixylat bao gồm axit 4-aminsalixylic, sulfasalazin, balsalazit, olsalazin và mesalazin, dưới các dạng như mesalamin phụ thuộc độ pH được phủ bằng Eudragit-S, mesalamin được phủ bằng etylxenluloza, và mesalamin giải phóng đa cơ chất. Các ví dụ về steroit bao gồm các corticosteroit hoặc các glucocorticosteroit. Các ví dụ về corticosteroit bao gồm prednison và hydrocortison hoặc metylprednisolon, hoặc corticosteroit thế hệ thứ hai, ví dụ budesonit hoặc azathioprin; ví dụ, dưới các dạng như dung dịch thụt hydrocortison hoặc bọt hydrocortison. Các ví dụ về chất sinh học bao gồm etanercept; kháng thể kháng lại yếu tố hoại tử khối u alpha, ví dụ infliximab, adalimumab hoặc certolizumab; kháng thể kháng lại IL-12 và IL-23, ví dụ, ustekinumab; vedolizumab; etrolizumab, và natalizumab. Các ví dụ về thiopurin bao gồm azathioprin, 6-mercaptopurin và thioguanin. Các ví dụ về kháng sinh bao gồm vancomycin, rifaximin, metronidazol, trimethoprim, sulfamethoxazol, diaminodiphenyl sulfon và ciprofloxacin; và các chất kháng virut như ganciclovir.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất chống xơ hóa. Theo một số phương án, chất chống xơ hóa ức chế hiện tượng tổng hợp colagen do yếu tố tăng trưởng gây biến nạp beta (TGF-β) kích thích, làm giảm cơ chất ngoại bào, và/hoặc phong bế sự tăng sinh nguyên bào sợi. Theo một số phương án, chất chống xơ hóa là pirfenidon. Theo

một số phương án, chất chống xơ hóa là PBI-4050. Theo một số phương án, chất chống xơ hóa là tipelukast.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất ức chế tyrosin kinaza. Theo một số phương án, chất ức chế tyrosin kinaza ức chế tyrosin kinaza mà làm trung gian cho quá trình triển khai một hoặc nhiều yếu tố tăng trưởng sinh xơ. Theo một số phương án, yếu tố tăng trưởng sinh xơ là yếu tố tăng trưởng được tạo ra từ tiểu cầu, yếu tố tăng trưởng nội màng mạch, và/hoặc yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi. Theo một số phương án, chất ức chế tyrosin kinaza là imatinib và/hoặc nintedanib. Theo một số phương án, chất ức chế tyrosin kinaza là nintedanib. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất chống tiêu chảy. Theo một số phương án, chất chống tiêu chảy là loperamit.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể kháng interleukin (IL)-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-13 là tralokinumab. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể kháng IL-4/IL-13. Theo một số phương án, kháng thể kháng IL-4/IL-13 là SAR 156597. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể kháng yếu tố tăng trưởng mô liên kết (CTGF). Theo một số phương án, kháng thể kháng CTGF là FG-3019. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể kháng chất giống lysyl oxidaza 2 (LOXL2). Theo một số phương án, kháng thể kháng LOXL2 là simtuzumab. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể kháng thụ thể integrin αvβ6. Theo một số phương án, kháng thể kháng thụ thể integrin αvβ6 là STX-100. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng thụ thể axit lysophosphatidic-1 (LPA1). Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể LPA1 là BMS-986020. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất ức chế galectin 3. Theo một số phương án, chất ức chế galectin 3 là TD-139.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng liệu pháp xoa dịu. Theo một số phương án, liệu pháp xoa dịu bao gồm một hoặc nhiều chất trong số kháng sinh, chất giải lo âu, corticosteroit, và dạng như thuốc phiện. Theo một số phương án, kháng sinh này là kháng sinh phổ rộng. Theo một số phương án, kháng sinh là penixilin, chất ức chế β-lactamaza, và/hoặc cephalosporin. Theo một số phương án, kháng sinh là piperacillin/tazobactam, cefixime, ceftriaxon và/hoặc cefdinir. Theo một số phương án, chất giải lo âu là alprazolam, buspiron, chlorpromazin, diazepam, midazolam, lorazepam, và/hoặc promethazin. Theo một số phương án, corticosteroit là glucocorticosteroit. Theo một số phương án, glucocorticosteroit là prednison, prednisolon, metylprednisolon, và/hoặc hydrocortison. Theo một số phương án, dạng như thuốc phiện là morphin, codein, dihydrocodein, và/hoặc diamorphin.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng kháng sinh. Theo một số phương án, kháng sinh này là macrolit. Theo một số phương án, macrolit này là azithromycin, và/hoặc clarithromycin. Theo một số phương án, kháng sinh này là doxycyclin. Theo một số phương án, kháng sinh này là trimethoprim/sulfamethoxazol. Theo một số phương án, kháng sinh là cephalosporin. Theo một số phương án, cephalosporin là cefepime, cefixime, cefpodoxime, cefprozil, ceftazidime, và/hoặc cefuroxime. Theo một số phương án, kháng sinh là penixilin. Theo một số phương án, kháng sinh là amoxicillin, ampixilin, và/hoặc pivampixilin. Theo một số phương án, kháng sinh là dạng kết hợp penixilin/chất ức chế β-lactamaza. Theo một số phương án, dạng kết hợp penixilin/chất ức chế β-lactamaza là amoxicillin/clavulanate và/hoặc piperacillin/tazobactam. Theo một số phương án, kháng sinh là fluoroquinolon. Theo một số phương án, fluoroquinolon là ciprofloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, và/hoặc ofloxacin.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất ức chế phosphodiesteraza. Theo một số phương án, chất ức chế phosphodiesteraza là chất ức chế phosphodiesteraza loại 5. Theo một số phương án, chất ức chế phosphodiesteraza là avanafil, benzamidenafil, dasantafil, icariin, lodenafil, mirodenafil, sildenafil, tadalafil, udenafil, và/hoặc

vardenafil. Theo một số phương án, chất ức chế PDE là chất ức chế PDE-4. Theo một số phương án, chất ức chế PDE-4 là roflumilast, cilomilast, tetomilast, và/hoặc CHF6001. Theo một số phương án, chất ức chế PDE là chất ức chế PDE-3/PDE-4. Theo một số phương án, chất ức chế PDE-3/PDE-4 là RPL-554.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất gây độc tế bào và/hoặc chất ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, chất gây độc tế bào và/hoặc chất ức chế miễn dịch này là azathioprin, colchicin, xyclophosphamit, xyclosporin, metotrexat, penicillamin, và/hoặc talidomit. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng một chất mà phục hồi các mức glutathion đã bị tiêu tan ở phổi. Theo một số phương án, chất mà phục hồi các mức glutathion đã bị tiêu tan ở phổi này là *N*-axetylxystein. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất chống đông tụ. Theo một số phương án, chất chống đông tụ là warfarin, heparin, protein C được hoạt hóa, và/hoặc chất ức chế con đường yếu tố mô.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng thụ thể nội mạc. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể nội mạc theo phương pháp này là bosentan, macitentan, và/hoặc ambrisentan. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng TNF-α. Theo một số phương án, chất đối kháng TNF-α bao gồm một hoặc nhiều chất trong số etanercept, adalimumab, infliximab, certolizumab, và golimumab. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng interferon gamma-1b.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất ức chế interleukin (IL). Theo một số phương án, chất ức chế IL này là chất ức chế IL-5. Theo một số phương án, chất ức chế IL-5 là mepolizumab và/hoặc benralizumab. Theo một số phương án, chất ức chế IL này là chất ức chế IL-17A. Theo một số phương án, chất ức chế IL-17A là CNTO-6785.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất ức chế protein kinaza được hoạt hóa

bởi tác nhân gây nguyên phân (MAPK) p38. Theo một số phương án, chất ức chế MAPK p38 là losmapimod và/hoặc AZD-7624. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng chất đối kháng CXCR2. Theo một số phương án, chất đối kháng CXCR2 là danirixin.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm quá trình chủng ngừa. Theo một số phương án, quá trình chủng ngừa này là quá trình chủng ngừa chống lại các phế cầu khuẩn và/hoặc bệnh cúm. Theo một số phương án, quá trình chủng ngừa này là quá trình chủng ngừa chống lại *Phế cầu khuẩn* và/hoặc bệnh cúm. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng liệu pháp kháng virut. Theo một số phương án, liệu pháp kháng virut này là oseltamivir, peramivir, và/hoặc zanamivir.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc phòng ngừa chứng trào ngược dạ dày-thực quản và/hoặc tình trạng hít phải lượng dịch nhỏ tái phát.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm hỗ trợ thông khí. Theo một số phương án, hỗ trợ thông khí này là phương pháp thông khí cơ học. Theo một số phương án, hỗ trợ thông khí này là phương pháp thông khí không xâm lấn. Theo một số phương án, hỗ trợ thông khí là oxy bổ sung. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm sự phục hồi chức năng phổi.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm phương pháp ghép phổi. Theo một số phương án, phương pháp ghép phổi là phương pháp ghép phổi đơn lẻ. Theo một số phương án, phương pháp ghép phổi là phương pháp ghép phổi hai bên.

Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm sự can thiệp phi dược lý học. Theo một số phương án, sự can thiệp phi dược lý học là sự ngừng hút thuốc, chế độ ăn lành mạnh, và/hoặc tập thể dục thường xuyên. Theo một số phương án về phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này, phương pháp này còn bao gồm việc cho dùng sự trợ giúp dược lý học đối với sự ngừng hút thuốc. Theo một số phương án, sự trợ giúp dược lý học đối với sự

ngừng hút thuốc là liệu pháp thay thế nicotin, bupropion, và/hoặc vareniclin. Theo một số phương án, sự can thiệp phi dược lý học là liệu pháp dùng cho phổi. Theo một số phương án, liệu pháp dùng cho phổi là sự phục hồi chức năng phổi và/hoặc oxy bổ sung. Theo một số phương án, sự can thiệp phi dược lý học là phẫu thuật phổi. Theo một số phương án, phẫu thuật phổi là phẫu thuật giảm thể tích phổi, phương pháp ghép phổi đơn lẻ, phương pháp ghép phổi hai bên, hoặc phẫu thuật cắt bỏ túi khí phổi. Theo một số phương án, sự can thiệp phi dược lý học là sử dụng thiết bị. Theo một số phương án, thiết bị này là cuộn giảm thể tích phổi, stent khí đạo thở ra, và/hoặc hệ thống hỗ trợ thông khí đường mũi.

Các liệu pháp kết hợp như vậy được nêu trên đây bao quát phương thức cho dùng kết hợp (trong đó hai chất trị liệu trở lên được lấy vào cùng một dạng chế phẩm hoặc các dạng chế phẩm tách biệt), và phương thức cho dùng tách biệt, trong trường hợp này, quá trình cho dùng kháng thể kháng tryptaza, hoặc chế phẩm dược của nó, có thể xảy ra trước, đồng thời, và/hoặc sau, quá trình cho dùng (các) chất trị liệu phụ thêm. Theo một phương án, quá trình cho dùng kháng thể kháng tryptaza, hoặc chế phẩm dược của nó, và quá trình cho dùng chất trị liệu phụ thêm xảy ra trong vòng khoảng một tháng; hoặc trong vòng khoảng một, hai, hoặc ba tuần; hoặc trong vòng khoảng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày; hoặc trong vòng khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 giờ; hoặc trong vòng khoảng 1, 5, 10, 20, 30, 40, hoặc 50 phút, cách nhau. Đối với các phương án bao gồm phương thức cho dùng trình tự, kháng thể kháng tryptaza có thể được cho dùng trước hoặc sau quá trình cho dùng (các) chất trị liệu phụ thêm.

Kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế, hoặc các chế phẩm dược của chúng, (và chất trị liệu phụ thêm bất kỳ) có thể được cho dùng bằng phương tiện thích hợp bất kỳ, bao gồm cả phương thức cho dùng ngoài đường tiêu hóa, trong phổi, và trong mũi. Các phương pháp tiêm truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm phương thức dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dưới da. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng tryptaza theo sáng chế có thể được cho dùng theo kiểu trong dịch kính, theo kiểu trong cơ, theo kiểu trong tĩnh mạch, theo kiểu trong da, theo kiểu qua da, theo kiểu trong động mạch, theo kiểu trong màng bụng, theo kiểu trong tổn thương, theo kiểu trong sọ, theo kiểu trong khớp, theo kiểu trong tuyến tiền liệt, theo kiểu trong màng phổi, theo kiểu trong khí quản, theo kiểu trong khoang dịch não tủy, theo kiểu

trong mũi, theo kiểu trong âm đạo, theo kiểu trong trực tràng, theo kiểu khu trú, theo kiểu trong khối u, theo kiểu qua màng bụng, theo kiểu dưới da, theo kiểu dưới kết mạc, theo kiểu trong túi dịch biểu bì, theo kiểu qua màng nhầy, theo kiểu trong màng bao tim, theo kiểu trong rốn, theo kiểu trong mắt, theo kiểu trong hốc mắt, bằng đường miệng, theo kiểu khu trú, theo kiểu qua da, theo kiểu quanh mắt, theo kiểu qua kết mạc, theo kiểu dưới bao Tenon, theo kiểu trong buồng, theo kiểu dưới võng mạc, theo kiểu sau nhãn cầu, theo kiểu trong tiểu quản, bằng phương pháp xông hít, bằng phương pháp tiêm, bằng phương pháp cấy ghép, bằng phương pháp tiêm truyền, bằng phương pháp tiêm truyền liên tục, bằng cách rửa truyền khu trú trực tiếp các tế bào đích, bằng ống thông, bằng phương pháp súc rửa, dưới dạng các thuốc kem, hoặc trong các chế phẩm lipit. Trong các trường hợp cụ thể, kháng thể, hoặc chế phẩm dược của nó, có thể được cho dùng bằng phương thức dùng dưới da. Các chế phẩm được sử dụng trong các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được cho dùng theo kiểu toàn thân hoặc theo kiểu cục bộ. Việc cho dùng theo liều có thể là bằng đường dùng thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng các phương pháp tiêm, như phương pháp tiêm trong tĩnh mạch hoặc dưới da, tùy thuộc một phần vào thời gian cho dùng là ngắn hay kinh niên. Các lịch biểu dùng thuốc khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở một phương thức cho dùng đơn lẻ hoặc nhiều phương thức cho dùng qua các thời điểm khác nhau, phương thức cho dùng liều mạnh tức thời, và phương thức tiêm truyền theo mạch đập được dự liệu trong bản mô tả này.

Các kháng thể theo sáng chế, hoặc các chế phẩm dược của chúng, thường được bào chế, được cho dùng theo liều lượng và được cho dùng theo phương thức nhất quán với tiêu chuẩn thực hành y khoa tốt. Các yếu tố để cân nhắc trong bối cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể đang được điều trị, động vật có vú cụ thể đang được điều trị, tình trạng lâm sàng của bệnh nhân riêng biệt, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối chất điều trị, phương pháp dùng thuốc, lịch biểu dùng thuốc, và các yếu tố khác mà những người thực hành y khoa đã biết. Kháng thể, hoặc chế phẩm dược của nó không cần phải, nhưng là được tùy ý tạo dạng chế phẩm với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị rối loạn đang được xem xét. Lượng hữu hiệu của các chất khác như vậy phụ thuộc vào lượng của kháng thể có mặt trong dạng chế phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được bàn luận trên đây. Nhìn chung, các chất này được sử

dụng trong cùng một số liều lượng và bằng các đường dùng thuốc như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả này, hoặc với liều lượng bất kỳ và bằng đường dùng bất kỳ mà được xác định là thích hợp theo kinh nghiệm/về mặt lâm sàng.

Đối với việc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, liều dùng thích hợp của kháng thể theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu phụ thêm khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần được điều trị, loại kháng thể, mức độ trầm trọng và tiến trình của bệnh, cho dù là kháng thể được cho dùng vì mục đích phòng ngừa hay mục đích trị liệu, liệu pháp trước đó, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng đối với kháng thể, và sự thận trọng của bác sĩ điều trị. Cho bệnh nhân dùng kháng thể này một cách phù hợp trong một lần điều trị hoặc trong nhiều lần điều trị khác nhau. Tùy thuộc vào loại và mức độ trầm trọng của bệnh, khoảng 1 µg/kg đến 15mg/kg (ví dụ, 0,1mg/kg đến 10mg/kg) của kháng thể có thể là liều dùng ứng viên ban đầu cho phương thức cho bệnh nhân dùng, cho dù là, ví dụ, bằng một phương thức cho dùng hoặc nhiều phương thức cho dùng tách biệt, hoặc bằng phương pháp tiêm truyền liên tục. Một liều dùng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 µg/kg đến 200mg/kg trở lên, tùy thuộc vào các yếu tố được đề cập trên đây. Đối với phương thức cho dùng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào điều kiện, việc điều trị thường sẽ được duy trì cho đến khi hiện tượng ức chế mong muốn đối với các triệu chứng bệnh xảy ra. Một liều dùng làm ví dụ của kháng thể thường nằm trong khoảng từ khoảng 0,05mg/kg đến khoảng 10mg/kg. Vì vậy, có thể cho bệnh nhân dùng một hoặc nhiều liều lượng là khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg hoặc 10mg/kg (hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng). Các liều lượng như vậy có thể được cho dùng theo kiểu ngắt quãng, ví dụ, mỗi tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, hoặc bốn tuần một lần (ví dụ, sao cho bệnh nhân tiếp nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ, khoảng sáu liều lượng của kháng thể). Ví dụ, có thể cho dùng liều lượng một lần cho mỗi tháng, (ví dụ, bằng phương pháp tiêm dưới da). Có thể cho dùng liều lượng nạp ban đầu cao hơn, sau đó là một hoặc nhiều liều lượng thấp hơn. Tuy nhiên, các chế độ liều dùng khác thì cũng có thể là hữu ích. Sự tiến bộ của liệu pháp này được theo dõi một cách dễ dàng bằng các kỹ thuật và các thử nghiệm thông thường. Trong một số trường hợp, có thể cho dùng liều lượng là khoảng 50mg/ml đến khoảng 200mg/ml (ví dụ,

khoảng 50mg/ml, khoảng 60mg/ml, khoảng 70mg/ml, khoảng 80mg/ml, khoảng 90mg/ml, khoảng 100mg/ml, khoảng 110mg/ml, khoảng 120mg/ml, khoảng 130mg/ml, khoảng 140mg/ml, khoảng 150mg/ml, khoảng 160mg/ml, khoảng 170mg/ml, khoảng 180mg/ml, khoảng 190mg/ml, hoặc khoảng 200mg/ml của kháng thể, ví dụ, bằng phương pháp tiêm dưới da. Trong một số trường hợp, có thể cho dùng khoảng 150mg/ml của kháng thể bằng phương pháp tiêm dưới da.

Cần phải hiểu rằng dạng chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu bất kỳ trong số các dạng chế phẩm hoặc các phương pháp trị liệu trên đây có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc bổ sung cho kháng thể kháng tryptaza.

H. Các vật dụng do sản xuất

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, vật dụng do sản xuất chứa các chất liệu hữu ích cho việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả trên đây (ví dụ, các rối loạn gắn liền với tryptaza) được đề xuất. Vật dụng do sản xuất bao gồm vật chứa và nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng trên hoặc gắn liền với vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, bơm tiêm, túi dung dịch IV, v.v. Vật chứa có thể được tạo ra từ một loạt chất liệu như thủy tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa giữ chế phẩm là chỉ riêng chế phẩm này hoặc được kết hợp với một chế phẩm khác hữu hiệu cho việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh và có thể có cổng tiếp cận vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi chứa dung dịch tiêm trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút chặn có thể đâm xuyên được bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một chất có hoạt tính trong chế phẩm là kháng thể theo sáng chế, hoặc chế phẩm dược của nó. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm này được sử dụng cho việc điều trị tình trạng được chọn. Hơn nữa, vật dụng do sản xuất có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm này bao gồm chất trị liệu phụ thêm. Vật dụng do sản xuất theo phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng biểu lộ rằng các chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị một tình trạng cụ thể. Ngoài ra hoặc theo cách khác, vật dụng do sản xuất có thể còn bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm dung dịch đệm dược

dụng, như nước kìm hãm vi khuẩn dùng để tiêm (BWFI), dung dịch muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Vật dụng do sản xuất có thể còn bao gồm các chất liệu khác thích hợp theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm cả các dung dịch đệm khác, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm, và bơm tiêm.

Cần phải hiểu rằng vật dụng do sản xuất bất kỳ trong số các vật dụng do sản xuất trên đây có thể bao gồm thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc bổ sung cho kháng thể kháng tryptaza.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Cần phải hiểu rằng các phương án khác nhau khác có thể được thực hiện, giả định rằng phần mô tả tổng quát được đề xuất trên đây. Trừ khi được biểu lộ cụ thể, tryptaza beta 1 của người được sử dụng trong các nghiên cứu này.

Ví dụ 1: Tạo ra và nhân tính hóa các kháng thể kháng tryptaza

A. Các chất liệu và phương pháp

Số gốc là theo tài liệu: Kabat et al. *Sequences of proteins of immunological interest,* 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

(i) Quá trình biểu hiện tái tổ hợp và quá trình tinh chế tryptaza ở các tế bào côn trùng và các tế bào động vật có vú

Trình tự mã hóa tryptaza beta 1 loại hoang dại trưởng thành của người (cách đánh số chymotrypsinogen về Ile16 - Pro246, SEQ ID NO: 97) được tạo dòng vô tính vào vật truyền pAcGP67A được cải biến phía sau gen khởi đầu khối đa diện và trình tự tín hiệu tiết gp67. Trừ khi được nêu khác, ở mục này, tryptaza được dùng để chỉ tryptaza beta 1 của người (còn được gọi là tryptaza b1 của người). Cấu trúc này chứa thẻ His6 đầu tận cùng N, vị trí phân cắt kinaza ruột và, đối với một số cấu trúc, là thẻ FLAG đầu tận cùng C. Quá trình gây đột biến hướng vị trí được thực hiện bằng cách sử dụng các quy trình QuikChange™ tiêu chuẩn (Stratagene) để tạo ra các thể đột biến tryptaza. Tất cả các cấu trúc được xác nhận bằng phương pháp giải trình tự ADN. Các baculovirut tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng hệ thống BaculoGold™ (BD Biosciences) ở tế bào Sf9

theo các quy trình tiêu chuẩn. Các tế bào của *Trichoplusia ni* được gây nhiễm dùng cho quá trình sản xuất protein quy mô lớn và được thu hoạch 48 giờ sau quá trình gây nhiễm. Môi trường đã được thu hoạch được bổ sung $NiCl_2$ 1mM, $CaCl_2$ 5mM và Tris 20mM độ pH 8, được lắc trong 30 phút, và sau đó, được ly tâm trong 20 phút ở mức 8500 x g để loại bỏ các tế bào và chất kết tủa khỏi môi trường này. Môi trường dịch nổi ở trên được lọc thông qua bộ lọc polyetesulfon (PES) 0,22µM trước khi nạp lên trên cột ái lực axit nitrilotriaxetic-niken (Ni-NTA). Tryptaza beta 1 của người cũng được biểu hiện bằng quá trình chuyển nhiễm nhất thời ở dòng tế bào động vật có vú DP12 CHO. Các môi trường nuôi cấy tế bào được tiến hành cùng một quá trình tinh chế bắt đầu với quá trình tinh chế ái lực Ni-NTA như được mô tả dưới đây.

Môi trường tế bào côn trùng hoặc môi trường tế bào CHO chứa tryptaza tái tổ hợp được gắn thẻ His6 được tiết (loại hoang dại hoặc đột biến) được nạp lên trên cột Ni-NTA Superflow 10ml (Qiagen) ở tốc độ dòng chảy theo thể tích là 170cm/giờ. Cột được rửa bằng 10 CV (thể tích cột) của dung dịch đệm rửa (Tris 20mM độ pH 8, imidazol 10mM, NaCl 300mM) và được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải 8 CV (Tris 20mM độ pH 8, imidazol 300mM, NaCl 300mM). Các phân đoạn được thử nghiệm bằng phương pháp điện di gel polyacrylamit natri dodexyl sulfat (SDS-PAGE) chứa tryptaza được gộp, cô và nạp lên trên cột loại trừ theo kích cỡ S200 (GE Healthcare) dùng cho quá trình tinh chế thêm bằng cách sử dụng dung dịch đệm chạy (axit 3-(N-morpholino)propansulfonic (MOPS) 10mM độ pH 6,8, NaCl 2M) ở tốc độ dòng chảy được khuyến nghị bởi nhà sản xuất. Các phân đoạn chứa tryptaza tái tổ hợp được gắn thẻ His (dạng monome) được gộp và được cô. Sau đó, tryptaza tái tổ hợp được phân cắt qua đêm ở nhiệt độ trong phòng ở mức nồng độ là 2mg/ml trong dung dịch đệm (MOPS 10mM độ pH 6,8, NaCl 0,2M) chứa heparin 0,5mg/ml (Sigma Aldrich) và kinaza ruột 0,1mg/ml (New England Biolabs, Inc). Bước này loại bỏ thẻ His6 đầu tận cùng N và đem lại quá trình tetrame hóa và tryptaza có hoạt tính theo kiểu thủy phân protein, phần này có IVGG trong vai trò là trình tự đầu tận cùng N mới hình thành bắt đầu ở gốc 16 (cách đánh số chymotrypsinogen). Sau đó, tryptaza dạng tetrame được tiến hành sắc ký loại trừ theo kích cỡ bằng cách sử dụng cột S200 (GE Healthcare) trong dung dịch đệm

(MOPS 10mM độ pH 6,8 và NaCl 2M) để tinh chế tryptaza dạng tetrame bằng cách loại bỏ kinaza ruột và tryptaza tái tổ hợp chưa được phân cắt bất kỳ.

Các thể đột biến tryptaza Y75C và I99C, cũng như thể đột biến S195A không có hoạt tính theo kiểu xúc tác (cách đánh số chymotrypsinogen, tương ứng với dạng thay thế Ser224 thành Ala của trình tự tryptaza có chiều dài đầy đủ SEQ ID NO: 71) được tinh chế bằng sắc ký ái lực Ni như được mô tả trên đây. Sau đó, các thể đột biến dime tryptaza được liên kết bằng disulfua được tách từ các thể đột biến monome tryptaza không được liên kết bằng disulfua bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ S200. Các thể đột biến dime được liên kết bằng disulfua được chế biến thêm thành tetrame như được mô tả trên đây đối với tryptaza loại hoang dại.

(ii) Tạo ra kháng thể đơn dòng tryptaza của chuột và của thỏ kháng của người

Hai con thỏ được gây miễn dịch bằng tryptaza beta 1 của người được tạo ra từ CHO (tetrame) bằng Chất phụ trợ Freund Hoàn chỉnh (Freund's Complete Adjuvant-CFA). Các con thỏ này được tiêm nhắc lại tăng cường bằng cùng một protein, bằng Chất phụ trợ Freund Không Hoàn chỉnh (Freund's Incomplete Adjuvant-IFA), 2 tuần một lần. Sau 4 lần tiêm, các mẫu huyết thanh được tinh chế được đánh giá về khả năng liên kết bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và mức ức chế hoạt tính tryptaza của người bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính enzym. Các tế bào B từ lá lách được thu hoạch từ một con thỏ trong số các con thỏ này, phần này chứng minh mức ức chế hoạt tính tryptaza của người, sau đó, được dung hợp với đối tác dung hợp thỏ. Sau 10-14 ngày, dịch nổi ở trên được thu hoạch và được sàng lọc về khả năng liên kết protein bằng ELISA.

Quy trình ELISA là như sau. Các đĩa ELISA NUNC MAXISORB® 96 lỗ được phủ qua đêm bằng Protein Liên kết Biotin NeutrAvidin® (Thermo Scientific Số hiệu theo Danh mục: 31000, nguyên liệu gốc 10mg/ml) ở mức 5µg/ml, 100µl/lỗ. Các lỗ được rửa ba lần bằng Dung dịch đệm rửa (PBS có TWEEN®-20 0,05%) và được thấm tách khô. Sau đó, các lỗ được phong bế bằng 200µl/lỗ của Dung dịch đệm Phong bế (PBS có albumin huyết thanh bò (BSA) 0,5% và TWEEN®-20 0,05%) và được ủ trong khoảng thời gian lớn hơn hoặc bằng 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Protein tryptaza beta 1 của người được biotin hóa (được pha loãng trong Dung dịch đệm thử nghiệm; PBS có BSA

0,5%, TWEEN®-20 0,05%, và heparin 0,1mg/ml) được bổ sung vào các lỗ ở mức 1µg/ml và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ ±10 phút. Heparin được lấy vào để đảm bảo rằng tryptaza vẫn còn ở dạng tetrame. Các lỗ được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa (200µl/lỗ) và được thấm tách khô. Dịch nổi ở trên chứa tế bào lai (mẫu) hoặc các đối chứng (ví dụ, kháng thể đa dòng được tinh chế của thỏ đối chứng dương YZ4209 (nguyên liệu gốc 0,25mg/ml) được bổ sung vào các lỗ (được pha loãng trong Dung dịch đệm thử nghiệm, 100µl/lỗ) và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, các lỗ được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa (200µl/lỗ) và được thấm tách khô. Thể tiếp hợp peroxidaza cải ngựa (HRP) (IgG của dê kháng của thỏ (H+L) HRP; Số hiệu theo Danh mục của Thermo Scientific: 31460) được bổ sung (được pha loãng 1:10.000 trong Dung dịch đệm thử nghiệm, 100µl/lỗ) và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Các lỗ được rửa lần nữa ba lần bằng dung dịch đệm rửa (200µl/lỗ) và được thấm tách khô. Chất nền (Chất nền BioFX TMB, Sản phẩm số: TMBW-1000-01) được bổ sung (100µl/lỗ) và được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được ngừng lại bằng việc bổ sung 100µl/lỗ của dung dịch làm ngừng BioFX (Sản phẩm số: BSTP-0100-01), và các đĩa được đọc ở A_{650}.

Tất cả các dòng vô tính dương tính với ELISA được tinh chế bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn (MabSelect SuRe™; GE Healthcare) và sau đó, được sàng lọc về mức ức chế hoạt tính tryptaza của người trong thử nghiệm hoạt tính tryptaza tái tổ hợp. Nói một cách vắn gọn, các kháng thể được pha loãng từ 0,007 đến 100.000ng/ml (0,046pM đến 667nM) trong PBS, độ pH 7,4. Tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người được pha loãng đến 3nM trong dung dịch đệm TNH (Tris 200mM, NaCl 150mM, heparin 0,1mg/ml, TRITON™ X-100 0,01%, độ pH 8,0) và được kết hợp theo tỷ lệ 1:1 với các kháng thể kháng tryptaza trong các đĩa đen 384 lỗ (ViewPlate-384 F, Đen, Đáy trong suốt, Perkin Elmer, Số hiệu theo Danh mục: 6007470). Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ. Chất nền so màu S-2288 (Chromogenix, Số hiệu bộ phận: 82-0852-39) được pha loãng đến 900µM trong dung dịch đệm TNH và được bổ sung vào đĩa. Nồng độ trong lỗ cuối cùng là S-2288 300µM, tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người 1nM, và các kháng thể kháng tryptaza từ 0,015pM đến 222nM. Các đĩa được ủ trong 40 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ và sau đó, được đọc ở A_{405}. Nồng độ ức chế một nửa mức tối đa

(IC50) của các kháng thể kháng tryptaza được xác định từ đồ thị khớp bốn thông số của các đường cong tương ứng của chúng. Sau đó , các dòng vô tính thể hiện mức ức chế mong muốn được tái tạo dòng vô tính bằng dung dịch pha loãng giới hạn (một tế bào đơn lẻ/lỗ), được tái kiểm tra như được mô tả trên đây và được xác định đặc tính thêm.

Khối tế bào lai của chuột được tạo ra và được sàng lọc và các dòng vô tính dương tính được phân tích theo một phương thức tương tự. Ba con chuột A/J (Harlan, Indianapolis, Ind.) được gây miễn dịch bằng protein tryptaza được tinh chế ở dạng kháng nguyên (EPC, Inc. #TR913). Tryptaza có hoạt tính theo kiểu enzym được cho dùng ở 20µg/chuột cho mỗi lần gây miễn dịch theo kiểu dưới da và theo kiểu trong màng bụng sau khi trộn và nhũ hóa theo tỷ lệ 1:1 với Chất phụ trợ Freund Hoàn chỉnh (lần gây miễn dịch thứ nhất) hoặc Chất phụ trợ Freund Không Hoàn chỉnh (lần gây miễn dịch thứ hai, thứ ba, và thứ tư). Lần tiêm nhắc lại tăng cường (lần gây miễn dịch thứ năm) không có chất phụ trợ nào. Sau lần gây miễn dịch thứ tư, huyết thanh từ các con chuột đã được gây miễn dịch được kiểm tra bằng ELISA và chuột có độ chuẩn huyết thanh cao hơn OD_{450} >2,16 ở mức pha loãng là 1:1,28 x 10^4 được chọn lựa cho quá trình dung hợp tế bào lai. 107 x 10^6 tế bào lá lách đã được phân lập được trộn với 100 x 10^6 tế bào u tủy Sp2/0 (ATCC) dùng cho quá trình dung hợp khi có mặt polyetylen glycol (Sigma-Aldrich, Số hiệu theo Danh mục: P7777-5G). Hai mươi bốn dòng vô tính được sàng lọc về khả năng liên kết vào tryptaza và được thử nghiệm về mức ức chế các hoạt tính enzym tryptaza. Dòng vô tính T31a (trong bản mô tả này còn được gọi là "31A" và "mu.31A") được chọn lựa cho quá trình nhân tính hóa.

(iii) Tạo dòng vô tính phân tử và tái định dạng các dòng vô tính tế bào lai kháng tryptaza thỏ

ARN tổng được chiết từ các tế bào khối tế bào lai sản xuất các kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của thỏ (RNeasy® Mini Kit, Qiagen). Bằng cách sử dụng Kit Khuếch đại ADN bổ sung RACE SMARTer® (Clontech), trước tiên, ARN được phiên mã ngược, sau đó, được tiến hành quá trình tổng hợp ADN bổ sung dải thứ nhất và quá trình khuếch đại PCR RACE ở 5' của miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) và miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) với các đoạn mồi sau đây:

Đoạn mồi xuôi chuỗi nhẹ (LC):

Hỗn hợp Đoạn mồi Chung (Kit Khuếch đại ADN bổ sung RACE SMARTer®, Clontech, số hiệu theo danh mục:634858)

Đoạn mồi xuôi chuỗi nặng (HC):

Hỗn hợp Đoạn mồi Chung (Kit Khuếch đại ADN bổ sung RACE SMARTer®, Clontech, số hiệu theo danh mục: 634858)

Đoạn mồi ngược LC:

5'-GATGGTGACTGTTCCAGTTGC-3' (SEQ ID NO: 74)

Đoạn mồi ngược HC:

5'-CATTGGTGAGGGTGCCCGAGTTC-3' (SEQ ID NO: 75)

Các đoạn mồi ngược HC và LC được thiết kế để bắt cặp mồi vào vùng trong miền hằng định chuỗi nhẹ (CL) và miền hằng định chuỗi nặng 1 (CH1).

Các sản phẩm PCR đã được khuếch đại được giải trình tự một cách trực tiếp. Sau đó, các trình tự ADN của VL đã được nhận diện được tái tạo dòng vô tính vào vật truyền biểu hiện tế bào động vật có vú pRK chứa miền hằng định kappa của người. Trình tự ADN của VH được chèn vào các vật truyền pRK mã hóa miền hằng định γ1 có chiều dài đầy đủ của người.

(iv) Quá trình nhân tính hóa kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của thỏ E104

Miền VL (SEQ ID NO: 53) và miền VH (SEQ ID NO: 52) từ kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của thỏ E104 được xếp thẳng hàng với trình tự liên ứng kappa I của VL của người (VL_{KI}) và trình tự liên ứng của VH phân nhóm IV của người (VH_{IV}) (lần lượt là các SEQ ID NO: 92 và 93). Ví dụ, xem tài liệu: Dennis, Ch. 2 CDR Repair: A Novel Approach to Antibody Humanization trong *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, Eds. Shire et al. Springer, New York, NY. Các vùng siêu biến (HVR) được xử lý bằng công nghệ vào các khung nhận liên ứng VL_{KI} và VH_{IV} của người để tạo ra các biến thể ghép CDR. Từ miền VL của E104, các vị trí 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) được ghép vào VL_{KI}. Từ miền VH, các vị trí 26-35b (H1), 50-65 (H2) và 93-102 (H3) được ghép vào VH_{IV}. Để đánh giá các vị trí vernier khung mà có thể là quan trọng, các vị trí vernier đã được chọn lựa được gây đột biến trở lại trình

tự của thỏ. Các vị trí vernier mà đã được gây đột biến trở lại trình tự của thỏ bao gồm các vị trí 2, 4, 43, 68, và 87 ở VL và 37, 67, 71, 78, và 91 ở VH.

Miền VL và miền VH từ kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của thỏ E104 cũng được xếp thẳng hàng với trình tự liên ứng VL kappa I của người (VL_{KI}) và trình tự liên ứng VH phân nhóm III của người (VH_{III}) (lần lượt là các SEQ ID NO: 92 và 94). Xem tài liệu: Dennis, trên đây. Các vùng siêu biến (HVR) được xử lý bằng công nghệ vào các khung nhận liên ứng VL_{KI} và VH_{III} của người để tạo ra các biến thể ghép CDR. Từ miền VL của E104 của thỏ, các vị trí 24-34 (L1), 50-56 (L2), và 89-97 (L3) được ghép vào VL_{KI}. Từ miền VH, các vị trí 26-35 (H1), 50-65 (H2), và 93-102 (H3) được ghép vào VH_{III}.

Tổng cộng là, hai phiên bản khác nhau của trình tự VL được nhân tính hóa và sáu phiên bản khác nhau của trình tự VH được nhân tính hóa được tổng hợp và kế tiếp, được tái tạo dòng vô tính vào vật truyền biểu hiện động vật có vú pRK. Bằng cách kết hợp các phiên bản khác nhau của LC và HC, tổng cộng mười hai biến thể E104 được nhân tính hóa khác nhau (v1 đến v12) được tạo ra (Bảng 3). Tất cả các biến thể kháng tryptaza được nhân tính hóa được biểu hiện ở dạng kháng thể IgG1 hoặc kháng thể IgG4 ở các tế bào động vật có vú. Các kháng thể được tinh chế bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn (MabSelect SuRe™; GE Healthcare). Tất cả các kháng thể IgG4 được sử dụng ở mục các Ví dụ bao gồm đột biến S228P (cách đánh số Châu Âu) ở vùng hằng định chuỗi nặng; tuy nhiên, sáng chế được mô tả trong bản mô tả này không bị giới hạn ở biến thể IgG4 có đột biến S228P.

Trình tự ADN mã hóa miền VH của huE104.v2 được thể hiện ở SEQ ID NO: 109. Trình tự ADN mã hóa miền VL của huE104.v2 được thể hiện ở SEQ ID NO: 110. Trình tự ADN mã hóa chuỗi nặng (IgG1) được thể hiện ở SEQ ID NO: 111. Trình tự ADN mã hóa chuỗi nặng (IgG4.S228P) được thể hiện ở SEQ ID NO: 113. Trình tự ADN mã hóa chuỗi nhẹ (IgG1 và IgG4) được thể hiện ở SEQ ID NO: 112. Trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của IgG1 huE104.v2 được thể hiện ở SEQ ID NO: 80. Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của huE104.v2 (IgG1 hoặc IgG4) được thể hiện ở SEQ ID NO: 81. Trình tự axit amin của HC của IgG4 huE104.v2 S228P được thể hiện ở SEQ ID NO: 82.

(v) Quá trình nhân tính hóa kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của chuột 31A

Miền VL (SEQ ID NO: 20) và miền VH (SEQ ID NO: 19) từ kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của chuột 31A ("mu.31A") được xếp thẳng hàng với trình tự liên ứng VL kappa I của người (VL_{KI}) và trình tự liên ứng VH phân nhóm III của người (VH_{III}) (lần lượt là các SEQ ID NO: 92 và 93). Các vùng siêu biến (HVR) được xử lý bằng công nghệ vào các khung nhận liên ứng VL_{KI} và VH_{III} của người để tạo ra các biến thể ghép CDR. Từ miền VL của mu.31A, các vị trí 24-34 (L1), 50-56 (L2), và 89-97 (L3) được ghép vào VL_{KI}. Từ miền VH của mu.31A, các vị trí 26-35 (H1), 50-65 (H2), và 93-102 (H3) được ghép vào VH_{III}. Để đánh giá sự quan trọng của các vị trí vernier khung, các vị trí vernier đã được chọn lựa được gây đột biến trở lại trình tự của chuột. Các vị trí vernier mà đã được gây đột biến trở lại trình tự của chuột bao gồm các vị trí 4, 43, 46, 47, và 71 ở VL và vị trí 49 ở VH.

Nói tóm lại, ba LC được nhân tính hóa và năm HC được nhân tính hóa được tổng hợp và kế tiếp, được tái tạo dòng vô tính vào vật truyền biểu hiện động vật có vú pRK. Bằng cách kết hợp các phiên bản khác nhau của LC và HC, tổng cộng mười lăm biến thể được nhân tính hóa khác nhau (v1 đến v15) của 31A ("hu31A") được tạo ra (Bảng 4).

Tất cả các biến thể kháng tryptaza được nhân tính hóa được biểu hiện ở dạng kháng thể IgG1 hoặc kháng thể IgG4 ở các tế bào động vật có vú. Các kháng thể được tinh chế bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn (MabSelect SuRe™; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Trình tự ADN mã hóa miền VH của hu31A.v11 được thể hiện ở SEQ ID NO: 104. Trình tự ADN mã hóa miền VL của hu31A.v11 được thể hiện ở SEQ ID NO: 105. Trình tự ADN mã hóa chuỗi nặng (IgG1) được thể hiện ở SEQ ID NO: 106. Trình tự ADN mã hóa chuỗi nặng (IgG4.S228P) được thể hiện ở SEQ ID NO: 108. Trình tự ADN mã hóa chuỗi nhẹ (IgG1 và IgG4) được thể hiện ở SEQ ID NO: 107. Trình tự axit amin của HC của IgG1 hu31A.v11 được thể hiện ở SEQ ID NO: 76. Trình tự axit amin của LC của IgG1 hu31A.v11 được thể hiện ở SEQ ID NO: 77. Trình tự axit amin của HC của IgG4 hu31A.v11 S228P được thể hiện ở SEQ ID NO: 78. Trình tự axit amin của LC của IgG4 hu31A.v11 S228P được thể hiện ở SEQ ID NO: 79.

(vi) Tạo dòng vô tính,biểu hiện, và tinh chế mảnh Fab

Các Fab được tạo dòng vô tính và được biểu hiện ở *E. coli* như được mô tả trên đây (xem tài liệu: Simmons et al. *J. Immunol. Methods* 263:133-147, 2002; Lombana et al. *Sci. Rep.* 5:17488, 2015). Bột nhão tế bào *E. coli* chứa Fab đã được biểu hiện được thu hoạch từ các quá trình lên men biểu hiện các Fab và được hòa tan vào dung dịch đệm PBS chứa EDTA 25mM và phenylmetylsulfonyl florua (PMSF) 1mM. Hỗn hợp được làm thuần nhất và sau đó, được di chuyển hai lần qua thiết bị tạo chất lưu hiển vi. Sau đó, huyền phù được ly tâm ở 21.500 x g trong 60 phút. Sau đó, dịch nổi ở trên được nạp lên trên cột Protein G được làm cân bằng bằng PBS ở mức 5ml/phút. Cột này được rửa bằng dung dịch đệm PBS đến mức đường chuẩn và sau đó, các protein được rửa giải bằng axit axetic 0,6%. Các phân đoạn chứa các Fab như được thử nghiệm bằng SDS-PAGE được gộp và sau đó, được nạp lên trên cột SP SEPHAROSE® 50ml được làm cân bằng trong MES 20mM (độ pH 5,5). Cột này được rửa bằng dung dịch đệm MES 20mM (độ pH 5,5) đối với 2 thể tích cột và sau đó, được rửa giải bằng gradien tuyến tính đến NaCl 0,5M trong dung dịch đệm MES 20mM (độ pH 5,5). Đối với quá trình tinh chế cuối cùng, các phân đoạn chứa Fab từ sắc ký trao đổi ion được cô và được chạy trên cột loại trừ theo kích cỡ S75 trong dung dịch đệm PBS. Cùng một quy trình được sử dụng cho tất cả các Fab được sử dụng trong các thử nghiệm.

(vii) Phép phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) BIACORE® các biến thể kháng tryptaza được nhân tính hóa

Trong thử nghiệm này, tất cả các biến thể được nhân tính hóa được biểu hiện ở dạng IgG bằng quá trình chuyển nhiễm nhất thời tế bào 293. IgG được tinh chế bằng sắc ký ái lực protein G. Ái lực của mỗi biến thể đối với monome tryptaza beta 1 tái tổ hợp được gắn thẻ His của người (SEQ ID NO: 128) được xác định bằng phép phân tích SPR bằng cách sử dụng BIACORE® T200. Chip cảm biến CM5 Series S BIACORE® được làm bất động bằng kháng thể IgG đơn dòng của chuột kháng của người (Fc) (Kit bắt kháng thể của người từ GE Healthcare) và kế tiếp, các biến thể kháng tryptaza được bắt trên mỗi pin dòng chảy. Các dịch pha loãng 3 lần theo dãy nối tiếp của monome tryptaza beta 1 của người được bơm ở tốc độ dòng chảy là 30µl/phút. Mỗi mẫu được phân tích bằng thời gian kết hợp 3 phút và thời gian phân ly 10 phút. Sau mỗi lần tiêm, chip được

tái tạo bằng cách sử dụng $MgCl_2$ 3M. Mức đáp ứng liên kết được chỉnh sửa bằng cách lấy pin dòng chảy bắt IgG không liên quan ở mật độ tương tự trừ đi đơn vị đáp ứng (RU). Mô hình Languir 1:1 của phương pháp khớp đồng thời của k_{on} và k_{off} được sử dụng cho phép phân tích động học.

(viii) Phép phân tích hoạt tính ức chế các biến thể kháng tryptaza được nhân tính hóa

a. Thử nghiệm enzym tryptaza

Mức ức chế hoạt tính tryptaza của người bởi các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính tryptaza tái tổ hợp. Kháng thể IgG4 hu31A.v11 và IgG1 hu31A.v11 được pha loãng từ 0,05 đến 100µg/ml (0,30 đến 667nM) trong PBS, độ pH 7,4, và IgG4 huE104.v2 và IgG1 huE104.v2 được pha loãng từ 0,02 đến 50µg/ml (0,15 đến 333nM) trong PBS độ pH 7,4. Enzym có hoạt tính tetrame tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người được pha loãng đến 0,75nM trong dung dịch đệm TNH (Tris 200mM, NaCl 150mM, heparin 0,1mg/ml, TRITON™ X-100 0,01%, độ pH 8,0), và được kết hợp theo tỷ lệ 1:1 với các kháng thể kháng tryptaza trong các đĩa đen 384 lỗ (ViewPlate-384 F, Đen, Đáy trong suốt, Perkin Elmer, Số hiệu theo Danh mục: 6007470). Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ. Chất nền so màu S-2288 (Chromogenix, Số hiệu bộ phận: 82-0852-39) được pha loãng đến 1200µM trong dung dịch đệm TNH và được bổ sung vào đĩa. Nồng độ trong lỗ cuối cùng là S-2288 400µM, tetrame tryptaza beta 1 tái tổ hợp của người 0,25nM, heparin 66µg/ml, và các kháng thể kháng tryptaza 0,10 đến 222nM đối với hu31A.v11 và 0,05 đến 111nM đối với huE104.v2. Các đĩa được ủ trong 40 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi vẫn lắc nhẹ và sau đó, được đọc ở A_{405}. IC50 của các kháng thể kháng tryptaza được xác định từ đồ thị khớp bốn thông số của các đường cong tương ứng của chúng.

b. Thử nghiệm tăng sinh tế bào cơ trơn phế quản và thử nghiệm co trên cơ sở colagen

Các tế bào cơ trơn phế quản của người (BSMC; Số hiệu theo Danh mục: CC-2576, Lonza Minneapolis, MN) được nuôi cấy trong thiết bị ủ được làm ẩm ở 37°C bằng CO_2 5% trong các môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh SmGM-2 (Số hiệu theo Danh mục:

CC-3182, Lonza). Môi trường thử nghiệm là môi trường nuôi cấy SmGm-2 mà không có huyết thanh của người hoặc các chất bổ sung được bổ sung (Số hiệu theo Danh mục: CC-3181, Lonza). Tetrame tryptaza loại hoang dại của người hoặc enzym tryptaza không có hoạt tính theo kiểu xúc tác S195A của người (cách đánh số chymotrypsinogen) được sử dụng ở các mức nồng độ được chỉ rõ. Các kháng thể kháng tryptaza của người IgG4 hu31A.v11 và IgG4 E104.v2 được sử dụng ở các mức nồng độ được chỉ rõ.

Đối với thử nghiệm về sự tăng sinh, 1 ngày trước khi thực hiện thử nghiệm, các BSMC được dàn đĩa ở mức $2x10^5$ tế bào/ml trong đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ (Số hiệu theo Danh mục: 353072, Falcon BD) trong các môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh. Sau 24 giờ, các môi trường nuôi cấy được thay thế bằng môi trường thử nghiệm và các tế bào được ủ trong một khoảng thời gian 24 giờ nữa. Các kháng thể kháng tryptaza của người được pha loãng 3,3-lần theo dãy nối tiếp trong môi trường thử nghiệm trong đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ (Số hiệu theo Danh mục: 353072, Falcon BD). 100µl của IgG4 hu31A.v11 đã được pha loãng được chuyển sang đĩa 96 lỗ chứa 100µl của tryptaza của người 200nM. Tryptaza có hoạt tính và các kháng thể kháng tryptaza của người được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Vào thời điểm này, môi trường thử nghiệm được loại bỏ khỏi các tế bào đã được dàn đĩa và được thay thế bằng 100µl của các kháng thể được pha loãng cộng với tryptaza. Nồng độ cuối của các kháng thể nằm trong khoảng từ 2,0µM đến 4pM. Nồng độ cuối của tryptaza là 100nM (mà không có heparin). Nồng độ muối cuối cùng là khoảng 130mM. Các lỗ có chỉ một mình tryptaza được lấy vào làm đối chứng kích thích. Các lỗ có chỉ một mình môi trường thử nghiệm được lấy vào làm đối chứng không được kích thích. Các đĩa được ủ trong 24 giờ ở 37°C trước khi bổ sung 1µCi của H^3-thymidin cho mỗi lỗ. Sau quá trình ủ thêm 6 giờ, mức tăng sinh được đo bằng phương pháp sáp nhập H^3-thymidin. Hoạt tính phóng xạ gắn liền với tế bào được định lượng bằng phương pháp đếm nhấp nháy. Các kết quả được biểu hiện ở dạng giá trị trung bình của các mẫu ba lần như nhau. Các biểu đồ được tạo ra và phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng KaleidaGraph (Synergy Software).

Đối với thử nghiệm co trên cơ sở colagen, 1 ngày trước khi thực hiện thử nghiệm, các BSMC được dàn đĩa trong colagen ở mức $9x10^6$ tế bào/ml trong đĩa 24 lỗ (Số hiệu theo Danh mục: 353047, Falcon BD) tuân theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất (Số hiệu theo Danh mục: CBA-201, Cell BioLabs Inc.). Sau quá trình ủ 1 giờ ở 37°C, các tế bào

được phủ thêm lớp bằng 1ml của môi trường thử nghiệm. Sau quá trình ủ 24 giờ ở 37°C, môi trường được thay thế bằng 250µl của môi trường thử nghiệm tươi mới. Tryptaza được pha loãng trong môi trường thử nghiệm 250µl đến 660nM khi có mặt hoặc khi thiếu vắng 4µM của các kháng thể kháng tryptaza của người và được ủ trong 30 phút ở 37°C trước khi bổ sung vào các lỗ được chỉ rõ chứa tế bào:cơ chất colagen. Nồng độ cuối cùng là tryptaza 330nM và kháng thể 2µM (mà không có heparin). Nồng độ muối cuối cùng là khoảng 130mM. Tình trạng co tế bào được khởi đầu bằng quá trình giải phóng tế bào:cơ chất colagen từ thành đĩa bằng cách sử dụng mũi ống hút vô trùng. Chỉ một mình môi trường thử nghiệm được sử dụng làm đối chứng không được kích thích. Vào lúc bắt đầu tình trạng co tế bào (t=0), tế bào:cơ chất colagen được làm hiển thị, được tạo hình ảnh, và được ghi lại bằng cách sử dụng ProteinSimple AlphaImager®. Các tế bào được ủ ở 37° trong khoảng thời gian 3 giờ nữa và tế bào:cơ chất colagen được tái tạo hình ảnh và được ghi lại (t=3). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm NIH Image J. Dữ liệu được biểu diễn ở dạng mức thay đổi tính theo phần trăm về đường kính tế bào:cơ chất colagen từ lúc bắt đầu tình trạng co (t=0) cho đến thời điểm 3 giờ (t=3). Các kết quả được biểu hiện ở dạng giá trị trung bình của các mẫu ba lần như nhau.

c. Thử nghiệm giải phóng histamin dưỡng bào

Dòng dưỡng bào LAD2 của người được sử dụng. Tế bào LAD2 được nuôi cấy trong thiết bị ủ được làm ẩm ở 37°C bằng CO_2 5% trong môi trường tăng trưởng không có huyết thanh, StemPro®-34, chứa chất bổ sung dinh dưỡng StemPro®-34 (Số hiệu theo Danh mục: 10640-019, Gibco/Life Technologies), 1x penixilin-streptomyxin-glutamin (Số hiệu theo Danh mục: 10378-016, Gibco/Life Technologies) và yếu tố tế bào gốc (SCF) tái tổ hợp của người 100ng/ml (Số hiệu theo Danh mục: 573908, BioLegend). Xem tài liệu: Kirshenbaum et al. *Leukemia Research* 27:677-682, 2003. Tryptaza loại hoang dại của người hoặc thể đột biến S195A tryptaza của người được sử dụng ở các mức nồng độ được chỉ rõ. IgE kháng NP của người (JW8.5.13; see Jackman et al. *J. Biol Chem.* 285(27):20850-20859, 2010) là thu được từ Serotec Inc. NP-BSA (Số hiệu theo Danh mục: N5050H-10, Biosearch Technologies, Petaluma, CA) được sử dụng ở nồng độ được chỉ rõ dùng để khởi động quá trình giải phóng histamin. Các kháng

thể kháng tryptaza của người IgG4 hu31A.v11 và IgG4 E104.v2 được sử dụng ở các mức nồng độ được chỉ rõ. Chất ức chế phân tử nhỏ G02849855 được sử dụng ở nồng độ được chỉ rõ. Các lần kích thích tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng Muối của Tyrode (Số hiệu theo Danh mục: T-2397, Sigma). Histamin được đo bằng cách sử dụng kit ELISA histamin (GenWay. Số hiệu theo Danh mục: 40-371-25010).

Đối với thử nghiệm giải phóng histamin do IgE của người khởi động, tế bào LAD2 được dàn đĩa ở mức $4x10^6$ tế bào/4ml trong 2 lỗ của đĩa 6 lỗ. IgE kháng NP (100ng/ml) được bổ sung vào một lỗ và các tế bào được ủ qua đêm ở 37°C để mồi các tế bào. Trong lỗ kia, các tế bào được nuôi cấy trong chỉ môi trường mà thôi mà không có việc bổ sung IgE kháng NP để làm đối chứng âm. Sau quá trình ủ qua đêm, các tế bào được rửa 3 lần bằng các môi trường nuôi cấy tế bào để loại bỏ IgE chưa được liên kết. Các tế bào được tái tạo huyền phù trong 4ml Muối của Tyrodes (mật độ tế bào $1x10^6$ tế bào/ml) và được chia phân ước vào các ống Eppendorf® (300.000 tế bào/ống). Mẫu được ủ bằng IgG4 hu31A.v11 100µg/ml hoặc G02849855 10µM, được trộn một cách kỹ lưỡng, và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau quá trình ủ này, NP-BSA được bổ sung vào mẫu ở mức nồng độ cuối là 0,1µg/ml để khởi động hiện tượng thoát hạt tế bào. Mẫu được trộn một cách kỹ lưỡng và được ủ ở 37°C trong thiết bị ủ CO_2 trong 1 giờ. Sau đó, các tế bào được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, và dịch nổi ở trên được thu gom dùng cho phép đo histamin. Histamin trong dịch nổi ở trên của hiện tượng thoát hạt được định lượng bằng cách sử dụng kit ELISA histamin. Dữ liệu được biểu diễn ở dạng giá trị trung bình của các mẫu hai lần như nhau.

Đối với thử nghiệm giải phóng histamin do tryptaza của người khởi động, tế bào LAD2 được tái tạo huyền phù trong Muối của Tyrodes ở mức nồng độ là 10^6 tế bào/ml và được chia phân ước vào các ống Eppendorf® (300.000 tế bào/ống). Để thúc đẩy hiện tượng thoát hạt tế bào, các tế bào được điều trị bằng tryptaza 3µg/ml (loại hoang dại hoặc thể đột biến S195A) hoặc tryptaza 3µg/ml mà đã được ủ trước bằng 100µg/ml hu31A.v11 trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng. PBS được sử dụng làm đối chứng không kích thích. Mẫu được trộn một cách kỹ lưỡng và được ủ ở 37°C trong thiết bị ủ CO_2 trong 1 giờ. Nồng độ muối cuối cùng là khoảng 140mM. Sau đó, các tế bào được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, và dịch nổi ở trên được

thu gom dùng cho phép đo histamin. Histamin trong dịch nổi ở trên của hiện tượng thoát hạt được định lượng bằng cách sử dụng kit ELISA histamin. Dữ liệu được biểu diễn ở dạng giá trị trung bình của các mẫu hai lần như nhau.

(ix) Tinh chế các tetrame và monome tryptaza tái tổ hợp

Tryptaza của người mà không có peptit tín hiệu nội sinh (các gốc axit amin 1-15 của SEQ ID NO:71) và pro-peptit (các gốc axit amin 16-30 của SEQ ID NO:71) được biểu hiện ở các tế bào CHO động vật có vú ở dạng protein tái tổ hợp được gắn thẻ His có vị trí phân cắt kinaza ruột được xử lý bằng công nghệ và trải qua 5 lần siêu lọc qua màng bằng áp suất thủy tĩnh sau đó là mức pha loãng 5 lần vào PBS. Sau đó, môi trường được nạp trên cột Ni-NTA và được rửa giải bằng imidazol 250mM. Nước rửa giải được thẩm tách vào dung dịch đệm MOPS 10mM, NaCl 0,2M, độ pH 6,8 thu được tryptaza dạng monome. Các monome tryptaza được gắn thẻ His6 chưa được phân cắt vẫn còn dạng monome và không tạo thành tetrame.

Để tạo ra tryptaza dạng tetrame, tryptaza dạng monome chứa thẻ His được tiêu hóa bằng cách sử dụng 0,1mg/ml của enzym kinaza ruột và được làm ổn định bằng muối dextran sulfat-10 natri ở mức 0,5mg/ml trong 16-20 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Protein được di chuyển trên cột 200 SUPERDEX™ vào dung dịch đệm cuối cùng gồm MOPS 10mM, NaCl 2M, độ pH 6,8 để tách tetrame khỏi các monome và khỏi proteaza gây bẩn tồn dư bất kỳ. Tetrame được tinh chế làm ví dụ được thể hiện ở Hình 3A, đỉnh 1. Tryptaza dạng tetrame đã được gộp được sử dụng cho thử nghiệm gây miễn dịch và thử nghiệm hoạt tính.

B. Các kết quả

(i) Tạo dòng vô tính tế bào lai

Quá trình tạo dòng vô tính phân tử năm kháng thể kháng tryptaza của thỏ từ các dòng vô tính tế bào lai dương tính với ELISA đã biểu lộ bốn dòng vô tính kháng tryptaza độc nhất. Trong số này, dòng vô tính E104 đã thể hiện hoạt tính ức chế chắc khỏe hơn cả trong thử nghiệm enzym, và được chọn lựa cho kỹ thuật xử lý bằng công nghệ thêm. Đồng thời, dòng vô tính kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của chuột 31A mà thể hiện

hoạt tính ức chế trong thử nghiệm enzym cũng được chọn lựa cho kỹ thuật xử lý bằng công nghệ thêm.

(ii) Tạo ra các biến thể E104 (chE104) thể khảm

Chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của thỏ E104 là chuỗi nhẹ kappa của thỏ, chuỗi này chứa liên kết cầu disulfua giữa Cys80 ở FR3 của miền biến đổi (VL) và Cys170 ở miền hằng định (CL). Để đánh giá sự quan trọng của Cys80 ở VL, biến thể E104 thể khảm có xystein ở vị trí 80 được gây đột biến thành alanin (Cys80Ala) được tạo ra. Như được thể hiện trong Bảng 2, không có sự chênh lệch nào giữa hai biến thể này về phương diện năng suất hoặc mức kết tụ, như được minh chứng bằng monome tính theo % cao ở cả biến thể thể khảm Cys80 và biến thể thể khảm Cys80Ala được xác định bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Vì vậy, đã được xác định rằng gốc Cys80 là không quan trọng và ở phiên bản được nhân tính hóa, Cys80 được thay đổi thành gốc prolin như trong dạng ghép VH4. Ngoài ra, các kháng thể E104 thể khảm có đột biến Cys80Ala ở miền biến đổi FR3, hoặc được dung hợp vào các miền hằng định IgG1 hoặc IgG4 của người, thể hiện các hoạt tính ức chế tương tự như kháng thể đơn dòng của thỏ có xystein ở vị trí 80 (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 2: Tác dụng của gốc Cys80 của kháng thể kháng tryptaza E104 đối với năng suất và mức kết tụ

Dòng vô tính kháng tryptaza	**Các biến thể chuỗi nhẹ (gốc vị trí 80)**	**Năng suất (mg)**	**Monome tính theo %**
E104	chE104.C	3,01	95,45
	chE104.A	3,14	95,2

(iii) Nhân tính hóa dòng vô tính kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của thỏ E104 và dòng vô tính kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của chuột 31A

Tất cả các biến thể được nhân tính hóa được biểu hiện ở dạng IgG và các ái lực liên kết của chúng được đánh giá trong thử nghiệm SPR BIACORE®. Nhìn chung, tất cả các biến thể E104 được nhân tính hóa (huE104) đã thể hiện các ái lực liên kết tương

tự về phía monome tryptaza beta 1 của người (Bảng 3). Bảng 3 liệt kê các biến thể huE104 cũng như ái lực liên kết (về phương diện K_D) như được xác định bằng phép phân tích SPR BIACORE®. Bảng 3 cũng đưa ra các SEQ ID NO của miền VH và miền VL đối với mỗi biến thể. Mỗi dòng vô tính trong Bảng 3 được kiểm tra ở dạng thức IgG1. Một cách nhất quán, các trị số IC50 rất tương tự được quan sát đối với các kháng thể này trong thử nghiệm hoạt tính enzym được mô tả trên đây, chỉ có điều các dòng vô tính huE104.v1 và huE104.v5, và đến một mức độ ít hơn, huE104.v11 và huE104.v12, đã thể hiện một số "hiệu ứng mẫu" (mà trong đó sự tăng của hoạt tính enzym, tức là, sự giảm về hoạt tính ức chế kháng thể, được quan sát ở mức nồng độ kháng thể cao) trong thử nghiệm enzym. Các dạng cải biến trong vùng FR3 chuỗi nặng từ V71 của kháng thể được nhân tính hóa đến gốc Arg ban đầu của kháng thể đơn dòng của thỏ (V71R) và F78 của kháng thể được nhân tính hóa đến gốc Val ban đầu của kháng thể đơn dòng của thỏ (F78V) đã loại bỏ hiệu ứng mẫu được nhìn thấy ở E104.v1, v5, v11 và v12. Dòng vô tính thể khảm E104.v9 chứa R71 và V78 như trong Ab đơn dòng mẹ của thỏ E104. Xem Bảng 3. Như được thể hiện ở Hình 12B, gốc arginin (R) ở vị trí 71 và gốc valin (V) ở vị trí 78 (cả hai theo cách đánh số Kabat) có thể đóng một vai trò quan trọng ở hình thể của HVR-H2, và vì vậy, đối với khả năng liên kết kháng thể vào tryptaza. Kết quả là, các dạng cải biến V71R và F78V ở huE104.v2 có thể đã ảnh hưởng đến hình thể của vòng 80 của tryptaza mà quan trọng trong việc kết hợp hai protome mà tạo thành mặt phân giới nhỏ. Xem Ví dụ 3 dưới đây. Vì vậy, hu104.v2, chất này có các dạng hồi biến V71R và F78V, có khả năng liên kết và hoạt tính ức chế được cải thiện so với v1, chất này có V ở vị trí 71 và F ở vị trí 78. Tất cả các biến thể ngoại trừ v1, v5, v11, và v12 đã thể hiện khả năng ức chế hoạt tính tryptaza hoàn chỉnh như được đo bằng thử nghiệm enzym được mô tả trên đây. Dòng vô tính được nhân tính hóa huE104.v2 được chọn lựa cho việc đánh giá thêm. Trình tự axit amin của miền biến đổi của chuỗi nặng và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của huE104.v2 được thể hiện ở Hình 1.

Bảng 3: Các ái lực liên kết của các biến thể E104 được nhân tính hóa (huE104) (ái lực liên kết vào monome tryptaza b1 của người trong dấu ngoặc đơn)

		Chuỗi nhẹ		
		Dạng ghép K1 (SEQ ID NO: 37)	**Dạng ghép K1 +A2 +L4 +P43 +E68 +F87 (SEQ ID NO: 58)**	**LC Thể khảm (SEQ ID NO: 59)**
Chuỗi nặng	**Dạng ghép VH4 (SEQ ID NO: 47)**	v1 (0,43nM)	v5 (0,18nM)	--
	Dạng ghép VH4 +R71 +V78 (SEQ ID NO: 36)	v2 (0,18nM)	v6 (0,14nM)	v10 (0,26nM)
	Dạng ghép VH4 +V37 +S67 +R71 +V78 +F91 (SEQ ID NO: 48)	v3 (0,21nM)	v7 (0,25nM)	--
	Dạng ghép VH3 +I48 +S67 +T73 +V78 (SEQ ID NO: 51)	v4 (0,44nM)	v8 (0,24nM)	--
	HC Thể khảm (SEQ ID NO: 52)	v9 (0,24nM)	--	--
	Dạng ghép VH4 +V78 (SEQ ID NO: 49)	v11 (0,32nM)	--	--
	Dạng ghép VH4 +R71 (SEQ ID NO: 50)	v12 (0,12nM)	--	--

Bảng 4 liệt kê các biến thể hu31A cũng như ái lực liên kết (về phương diện K_D, nanomol) như được đo bằng phép phân tích SPR BIACORE®. Bảng 4 cũng thể hiện

các SEQ ID NO của VH và VL của mỗi kháng thể. Tất cả các biến thể đều thể hiện khả năng ức chế hoạt tính tryptaza hoàn chỉnh như được đo bằng thử nghiệm enzym (dữ liệu không được thể hiện). Mỗi dòng vô tính trong Bảng 4 được kiểm tra ở dạng thức IgG1. Dòng vô tính hu31A.v11 đã thể hiện ái lực tốt nhất và hoạt tính ức chế tốt nhất trong thử nghiệm enzym và do đó, được chọn lựa cho việc đánh giá thêm. Trình tự axit amin của miền biến đổi của chuỗi nặng và miền biến đổi của chuỗi nhẹ của hu31A.v11 được thể hiện ở Hình 1.

Bảng 4: Các ái lực liên kết của các biến thể 31A được nhân tính hóa (hu31A) (ái lực liên kết vào monome tryptaza b1 của người trong dấu ngoặc đơn)

		Chuỗi nhẹ		
		Dạng ghép K1 (SEQ ID NO: 102)	**Dạng ghép K1 +S43 +P46 +W47 (SEQ ID NO: 10)**	**Dạng ghép K1 + L4 +S43 +P46 +W47 +Y71 (SEQ ID NO: 103)**
Chuỗi nặng	**Dạng ghép VH3 (SEQ ID NO: 98)**	v1 (4,04nM)	v2 (0,74nM)	v3 (0,79nM)
	Dạng ghép VH3 +A49 (SEQ ID NO: 99)	v4 (11,8nM)	v5 (1,68nM)	v6 (1,65nM)
	Dạng ghép VH3 +S31 +F32 +H35 +A49 (SEQ ID NO: 100)	v7 (2,06nM)	v8 (0,94nM)	v9 (0,94nM)
	Dạng ghép VH3 +A49 +T93 +N96 +Y97 +D98 (SEQ ID NO: 9)	v10 (1,19nM)	v11 (0,40nM)	v12 (0,43nM)
	Dạng ghép VH3 +A49 +T93 (SEQ ID NO: 101)	v13 (9,65nM)	v14 (1,34nM)	v15 (1,32nM)

Hoạt tính ức chế của các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa cũng được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính enzym tryptaza tái tổ hợp được mô tả trên đây. Cả h31A.v11 và huE104.v2, IgG1 và IgG4, đã ức chế hoàn toàn hoạt tính tryptaza trong thử nghiệm enzym (xem Hình 2A). Các trị số IC50 được thể hiện dưới đây (Bảng 5).

Bảng 5: Hoạt tính ức chế (IC50) của các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa

Kháng thể	**IgG1**	**IgG4**
hu31A.v11	1,82nM ± 0,09	3,9nM ± 0,65
huE104.v2	0,91nM ± 0,35	0,59nM ± 0,11

Cả hu31A.v11 và huE104.v2 liên kết và ức chế tryptaza beta 2 và beta 3 của người, ngoài tryptaza beta 1 ra. Dữ liệu tiêu biểu được thể hiện dưới đây trong Bảng 6 dựa trên các quy trình được mô tả trên đây dùng cho phép phân tích ái lực và thử nghiệm enzym bằng cách sử dụng tryptaza beta 1 của người làm đích. Cả hu31A.v11 và huE104.v2 cũng liên kết và ức chế tryptaza D1 của cyno.

Bảng 6: Ái lực và IC50 của các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa

Kháng thể	**Tryptaza của người**	**K_D (nM)**	**IC50 (nM)**
IgG4 hu31A.v11	Tryptaza beta 1	0,27	3,16
	Tryptaza beta 2	0,12	1,46
	Tryptaza beta 3	0,10	2,47
IgG4 huE104.v2	Tryptaza beta 1	0,3	0,42
	Tryptaza beta 2	0,18	0,95
	Tryptaza beta 3	0,13	2,80

Hoạt tính ức chế của IgG4 hu31A.v11 hoặc IgG4 huE104.v2 được đánh giá ở một vài mô hình *ex vivo* về chức năng tế bào cơ trơn (SMC) khí đạo sơ cấp của người. Việc bổ sung tryptaza beta 1 vào môi trường nuôi cấy đem lại sự tăng về mức tăng sinh của các SMC khí đạo sơ cấp của người (Hình 2B), cũng như tình trạng co của các tế bào này (Hình 2C). Việc bổ sung hu31A.v11 hoặc huE104.v2 đã đem lại hiện tượng giảm phụ thuộc liều lượng về mức tăng sinh, và ở mức 300µg/ml đã ức chế sự tăng sinh trở về mức đường chuẩn (Hình 2B). Theo cách tương tự, việc bổ sung hu31A.v11 hoặc

huE104.v2 đã làm giảm tình trạng co trở về mức đường chuẩn (Hình 2C). Các dữ liệu này chứng minh rằng các kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 và huE104.v2 đã ức chế chức năng tryptaza.

Việc bổ sung tryptaza hoặc IgE vào các dưỡng bào đem lại hiện tượng thoát hạt và giải phóng của histamin (các Hình 2D-2E). Khả năng của hu31A.v11 trong việc ức chế quá trình giải phóng histamin được đánh giá. Tryptaza beta 1 có dạng thay thế S195A là không có hoạt tính theo kiểu xúc tác. Việc bổ sung hu31A.v11 đã phong bế khả năng của tryptaza trong việc thúc đẩy quá trình giải phóng histimin (các Hình 2D-2E). Mức độ ức chế (30-50%) là tương tự với chất ức chế phân tử nhỏ đối với hoạt tính tryptaza beta 1, G02849855 (Hình 2E). Các kết quả này còn thể hiện rằng kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 ức chế chức năng tryptaza.

Ví dụ 2: IgG hu31A.v11 và IgG huE104.v2 làm phân ly tetrame tryptaza beta của người

Cấu trúc tinh thể của tryptaza dạng tetrame có hoạt tính thể hiện rằng vị trí xúc tác của mỗi protome (được biểu diễn bằng S195, H57, và D102 của mỗi protome, cách đánh số chymotrypsinogen) là nằm bên trong lỗ của tetrame, và tiếp cận với các vị trí có hoạt tính bị giới hạn sao cho chỉ các chất nền peptit và các phân tử nhỏ hơn có thể có được sự tiếp cận (Pereira et al. *Nature* 392:306-11, 1999). Cho đến nay, không có chất ức chế proteaza serin động vật có vú nào được biết là ức chế hoạt tính thủy phân protein của tryptaza. Các chất ức chế proteaza serin của người của kiểu kiến trúc loại miền Kunitz là quá lớn nên không tiếp cận được các vị trí có hoạt tính. Không có chất ức chế tự nhiên đã biết của tryptaza nào ở con người. Các chất ức chế đại phân tử tự nhiên đã biết của tryptaza duy nhất cho đến nay là chất ức chế tryptaza được tạo ra từ đỉa (LDTI) (Sommerhoff et al. *Biol. Chem.* 373:685-94, 1997) và chất ức chế proteaza được tạo ra từ ve bét (TdPI) (Paesen et al. *J. Mol. Biol.* 368:1172-86, 2007). LDTI (4,7 kDa) và TdPI (11,1 kDa) lần lượt có khả năng phong bế hai hoặc ba vị trí trong số bốn vị trí có hoạt tính của tetrame tryptaza. LDTI và TdPI không làm phân ly tetrame tryptaza. Cả IgG và Fab của hu31A.v11 đều lớn hơn nhiều so với LDTI hoặc TdPI, và chúng vẫn ức chế hoàn toàn tryptaza.

Chúng tôi đã xác định hệ số tỷ lượng của Fab hu31A.v11 liên kết vào tryptaza dạng tetrame trong dung dịch. Tryptaza beta 1 dạng tetrame có hoạt tính được trộn với

lượng dư mol 2 lần của Fab hu31A.v11 vào mỗi protome và sự hình thành phức hợp được phép đạt đến trạng thái cân bằng. Bởi vì tetrame được lắp ráp không theo kiểu cộng hóa trị, tác dụng làm phân ly của mỗi kháng thể đối với cấu trúc dạng tetrame được phân tích bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) và thời gian lưu/thể tích và trọng lượng phân tử của các đỉnh protein riêng biệt được xác định. Các phân đoạn chứa protein được xác định đặc tính bằng SDS-PAGE để xác định các hợp phần protein (Hình 3A). Thời gian lưu của chỉ một mình tryptaza dạng tetrame là ngắn hơn một cách đáng kể (t_r = 26 phút, lần chạy 1, đỉnh 1) so với khi trong phức hợp với Fab hu31A.v11 (t_r = 28,1 phút, lần chạy 3, đỉnh 3). Phép phân tích SEC phụ thêm ở dạng kết hợp với tán xạ ánh sáng đa góc (MALS) được thực hiện để xác định trọng lượng phân tử của các phức hợp protein được rửa giải. Tryptaza dạng tetrame đã có trọng lượng phân tử là 120 kDa ± 0,2% theo MALS, mức này là nhất quán với trọng lượng phân tử theo lý thuyết là 109.537 kDa dựa trên trình tự axit amin (loại trừ quá trình glycosyl hóa). Đỉnh protein chứa tryptaza trong phức hợp với Fab hu31A.v11 được đo là 67,7 kDa ± 3% bằng MALS (đỉnh 3), mà phản ánh phức hợp bao gồm 1 monome tryptaza đã được liên kết vào 1 Fab. Điều này biểu lộ rằng tetrame tryptaza phân ly thành các monome sau khi liên kết vào Fab hu31A.v11, điều này còn được xác nhận bằng cấu trúc tinh thể (xem Ví dụ 3) và hoạt tính ức chế của Fab hu31A.v11.

Khi cùng một phức hợp Fab hu31A.v11/tryptaza dạng tetrame được phân tích bằng SEC trong dung dịch đệm thử nghiệm enzym mà chứa một mức nồng độ cao của heparin, ví dụ, heparin 100µg/ml (lần chạy 2), thời gian lưu của phức hợp tryptaza-Fab chỉ hơi được làm giảm từ 28,1 phút (lần chạy 3, đỉnh 3) xuống 27,6 phút (lần chạy 2, đỉnh 2), chắc chắn là do heparin liên kết vào phức hợp protein của monome tryptaza và Fab. Heparin từ niêm mạc ruột lợn là hỗn hợp của các chuỗi polyanion có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 6 đến 30 kDa, có hầu hết các chuỗi nằm trong khoảng là 17 đến 19 kDa. Kết quả này biểu lộ rằng tác dụng làm ổn định của heparin đối với tryptaza dạng tetrame cũng được trung hòa hoặc phá vỡ bởi Fab hu31A.v11; thậm chí là nồng độ cao 100µg/ml của heparin không thể phòng ngừa Fab hu31A.v11 khỏi làm phân ly hoàn toàn tetrame. Xem Hình 3A.

Hệ số tỷ lượng liên kết của các Fab huE104.v1 và huE104.v2 vào tryptaza dạng tetrame trong dung dịch cũng được xác định. Tryptaza dạng tetrame có hoạt tính được

trộn với lượng dư mol 2 lần của Fab vào mỗi protome và sự hình thành phức hợp được phép đạt đến trạng thái cân bằng. Hỗn hợp phức hợp thu được được tách bằng SEC có dung dịch đệm SEC tryptaza mà không có heparin và thời gian lưu/thể tích và trọng lượng phân tử của các đỉnh protein riêng biệt được xác định). Các phân đoạn chứa protein được xác định đặc tính bằng SDS-PAGE để xác định các hợp phần protein (dữ liệu không được thể hiện). tryptaza dạng tetrame WT đã có thời gian lưu là t_r = 26 phút (ví dụ, xem đỉnh 1 của Hình 3A) và trọng lượng phân tử là 120kDa ± 0,2% theo MALS, mức này là nhất quán với trọng lượng phân tử theo lý thuyết là 109.537kDa dựa trên trình tự axit amin (loại trừ quá trình glycosyl hóa).

Các Fab huE104.v1 đã tạo thành một phức hợp thuần nhất với tryptaza dạng tetrame WT với thời gian lưu là t_r= 21,6ml và trọng lượng phân tử là 276,1kDa, như được xác định bằng SEC-MALS (dữ liệu không được thể hiện). Điều này thường biểu diễn phức hợp của tetrame tryptaza có 4 Fab đã được liên kết vào nó. Phép phân tích SDS-PAGE về các phân đoạn từ đỉnh này đã xác nhận sự có mặt của các Fab và các protome tryptaza. Vì vậy, các Fab huE104.v1 đã tạo thành một phức hợp ổn định với tryptaza dạng tetrame và đã không ảnh hưởng đến tính ổn định tetrame (dữ liệu không được thể hiện).

Tryptaza được gắn thẻ His6 dạng monome (Hình 3B, lần chạy 1) hoặc tryptaza dạng tetrame WT (Hình 3B, lần chạy 2) được trộn với lượng dư mol 2 lần của Fab huE104.v2 và mỗi hỗn hợp phức hợp được phân tích một cách riêng biệt bằng SEC. Đỉnh protein thứ nhất của mỗi phổ sắc ký lần lượt đã có thời gian lưu t_r= 25,8 phút (Hình 2B, lần chạy 1, đỉnh 2) và t_r= 26 phút (Hình 2B, lần chạy 2, đỉnh 3). Phép phân tích SDS-PAGE về các phân đoạn từ hai đỉnh thứ nhất này đã thể hiện rằng cả tryptaza và Fab E104.v2, là có mặt ở đỉnh này. Cả hai đỉnh protein cũng được phân tích bằng MALS và trọng lượng phân tử là 68kDa ± 3% được xác định, mà phản ánh phức hợp bao gồm 1 monome tryptaza đã được liên kết vào 1 Fab. Đỉnh thứ hai của mỗi lần chạy lần lượt đã có thời gian lưu là t_r=31,6 phút (lần chạy 1, đỉnh 6) và t_r=31,8 (lần chạy 2, đỉnh 7), và chứa chỉ Fab huE104.v2 mà thôi, như được xác định bằng SDS-PAGE. Trên thực tế, các phổ sắc ký của cả hai lần chạy SEC xếp chồng, biểu lộ rằng khả năng liên kết Fab huE104.v2 làm phân ly tryptaza dạng tetrame WT thành monome, trên thực tế, vì thời

gian lưu là đồng nhất, không phụ thuộc vào việc liệu tryptaza dạng tetrame hoặc tryptaza dạng monome được gắn thẻ His có được sử dụng cho sự hình thành phức hợp hay không.

Khi tryptaza dạng tetrame được trộn lần nữa với Fab huE104.v2 dư khi có mặt heparin 100µg/ml và được phân tích bằng SEC trong dung dịch đệm TNH trong vai trò là dung dịch đệm chạy (lần chạy 3), 3 đỉnh protein được quan sát: đỉnh thứ nhất có thời gian lưu ngắn hơn nhiều (t_r= 21 phút, Hình 3B, lần chạy 3, đỉnh 1) so với chỉ một mình tryptaza dạng tetrame WT (t_r= 26 phút, ví dụ, Hình 3A, đỉnh 1). Đỉnh thứ hai có thời gian lưu là t_r= 27,2 phút (Hình 3B, lần chạy 3, đỉnh 4) và đỉnh sau cùng có thời gian lưu là t_r= 31,2 phút (Hình 3B, lần chạy 3, đỉnh 5), điều này là có tính chỉ báo về chỉ một mình Fab. Phép phân tích SDS-PAGE đã thể hiện rằng cả tryptaza và Fab đều có mặt ở các đỉnh 1 và 4, trong đó đỉnh 1 chứa tetrame có hoạt tính được liên kết bởi các Fab huE104.v2, và đỉnh 4 chứa monome tryptaza được liên kết bởi Fab huE104.v2 (dữ liệu không được thể hiện). Điều này dẫn chúng tôi đến kết luận rằng khi có mặt nồng độ cao của heparin 100µg/ml, thì chỉ phân đoạn của tryptaza dạng tetrame được làm phân ly bởi Fab huE104.v2 như trong đỉnh 4, trong khi đa số tryptaza vẫn còn là tryptaza dạng tetrame đã được liên kết vào các Fab của hu104.v2 ở đỉnh 1. Nói tóm lại, Fab huE104.v1 đã không thể hiện hoạt tính ức chế có thể phát hiện được nào, trong khi Fab huE104.v2 đã làm phân ly hoàn toàn tetrame tryptaza. Tuy nhiên, không giống với Fab hu31A.v11 hoặc IgG huE104.v2, khả năng của Fab huE104.v2 trong việc làm phân ly tetrame được trung hòa một phần bởi nồng độ cao của heparin. Vì vậy, dựa trên các dữ liệu này, chúng tôi kết luận rằng Fab hu31A.v11 có khả năng làm phân ly tetrame tryptaza có hoặc không có nồng độ cao của heparin, và Fab huE104.v2 có khả năng làm phân ly tetrame tryptaza khi thiếu vắng nồng độ cao của heparin.

Mỗi monome tryptaza có một tập hợp đồng nhất gồm bộ ba xúc tác, và bốn monome lắp ráp để tạo thành tetrame với bốn vị trí xúc tác hướng vào lỗ giữa mà chất nền đi vào đó. Xem tài liệu: Pereira *et al.*, trên đây. Pereira *et al.* bàn luận kiểu thiết kế của các chất ức chế tryptaza phân tử nhỏ bằng cách phong bế các vị trí có hoạt tính. Một vài chất ức chế tryptaza phân tử nhỏ đang trong quá trình phát triển đã bị ngừng do tính chọn lọc kém hoặc độ sinh khả dụng kém. Ví dụ, xem tài liệu: Cairns, J.A., 2005, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 18:55-66

Tryptaza dạng tetrame loại hoang dại không được giữ cùng nhau theo kiểu cộng hóa trị và có thể phân ly thành các monome trong các điều kiện sinh lý (Schwartz et al. *J. Biol. Chem.* 261:7372-7370, 1986; Alter et al. *Biochem. J.* 248:821-827, 1987; Schwartz et al. *J. Immunol.* 144:2304-2311, 1990). Đã có ghi nhận rằng tryptaza trưởng thành chứng minh hoạt tính enzym cao ở dạng tetrame, và không có hoạt tính ở dạng monome trong các điều kiện phù hợp về mặt sinh lý (Schwartz et al., *J. Biol. Chem.* 261:7372-7379, 1986). Dữ liệu được thể hiện trong bản mô tả này chứng minh rằng cả hu31.v11 và huE104.v2 đều liên kết vào monome tryptaza, làm phân ly tetrame thành các monome ít nhất ở mức nồng độ thấp của heparin, và sau khi phân ly, vẫn còn được liên kết vào monome. Cũng đã được ghi nhận rằng tryptaza dạng monome có thể là có hoạt tính theo kiểu enzym trong các điều kiện nhất định (Fukuoka et al. *J. Immunol.* 176:3165, 2006; Fajardo et al., 2003, Biochem. J. 369:603-610). Các quan sát này đặt ra câu hỏi là liệu kháng thể kháng tryptaza làm phân ly có thấp kém hơn chất ức chế phong bế vị trí có hoạt tính như kháng thể phong bế vị trí có hoạt tính, làm ổn định tetrame hay không, bởi vì monome không có hoạt tính huyết thanh có thể đóng vai trò là liên kết chính cho các kháng thể làm phân ly mà liên kết vào monome. Và kháng thể phong bế vị trí có hoạt tính, làm ổn định tetrame có thể là có lợi hơn trong vai trò là chất trị liệu nếu các monome có thể là có hoạt tính theo kiểu enzym trong các điều kiện nhất định.

Trước tiên, chúng tôi đã nghiên cứu độ hiệu nghiệm của kháng thể làm phân ly tetrame so với kháng thể trung hòa, làm ổn định tetrame trong thử nghiệm *in silico* bằng cách sử dụng mô hình dược động-dược lực (PKPD). Mô hình này được phát triển trong phần mềm Simbiology ® (Mathworks Inc, Cambridge MA) để mô phỏng hiện tượng tạo, hiện tượng phân ly, và thanh thải tryptaza dạng tetrame trong hệ tuần hoàn và ở mô phổi, cũng như tác dụng liên kết và tác dụng PK của các kháng thể kháng tryptaza. Hai loại kháng thể được xem là: (1) kháng thể làm phân ly có tác dụng làm phân ly tetrame một cách nhanh chóng sau khi liên kết, nhưng cũng liên kết monome; và (2) kháng thể làm ổn định đặc hiệu với tetrame, mà chỉ liên kết tetrame có hoạt tính mà thôi và trung hòa hoạt tính của nó bằng cách phong bế quá trình tiếp cận với các chất nền của nó, nhưng cũng kéo dài thời gian bán hủy của tetrame. Kháng thể làm phân ly tetrame có K_D là 0,2nM được mô phỏng theo chế độ liều lượng theo giả thuyết là 300mg được cho

dùng theo kiểu dưới da bốn tuần một lần. Chúng tôi đã giả thiết hệ số phân vùng phổi 10% của kháng thể. Đối với kịch bản đường chuẩn, chúng tôi đã giả thiết tryptaza tổng 4ng/ml trong huyết thanh và tryptaza tổng 10ng/ml trong ngăn mô, và đối với kịch bản tryptaza cao, chúng tôi đã giả thiết tryptaza huyết thanh 10ng/ml và các mức tryptaza mô 40ng/ml. Các hằng số tốc độ tương đối của hiện tượng phân ly tetrame sinh lý thành monome và mức thanh thải của mỗi loại đem lại tỷ lệ 8:1 giữa monome và tetrame trong các phần gộp tryptaza tổng.

Đối với chế độ liều lượng được mô phỏng là 300mg 4 tuần một lần theo kiểu dưới da của kháng thể làm phân ly hoặc kháng thể làm ổn định, các ô trái của Hình 4A thể hiện nồng độ kháng thể của cả kháng thể tổng và kháng thể không được liên kết/tự do ở phổi theo kịch bản đường chuẩn, và các ô phải thể hiện các mức tryptaza phổi (tự do) tương ứng so với các mức trước điều trị của cả monome và tetrame. Các kết quả cho thấy rằng đối với kháng thể làm phân ly có K_D=0,2nM (các ô trên cùng), hầu hết kháng thể ở phổi vẫn còn tự do (ô trên cùng bên trái) biểu lộ độ khả dụng thuốc thích hợp mặc cho khả năng liên kết vào monome và tetrame; các kết quả còn biểu lộ rằng kháng thể làm phân ly thường đạt được hiện tượng giảm được duy trì là trên 90% về tryptaza dạng tetrame (có hoạt tính) (ô trên cùng bên phải). Đối với kháng thể làm ổn định (các ô dưới cùng), gần như tất cả kháng thể là tự do (ô dưới cùng bên trái); tuy nhiên, sự giảm về mức tetrame chỉ được duy trì ở mức hoặc cao hơn 80%.

Bởi vì tính đặc hiệu với tetrame của kháng thể làm ổn định có thể được xem là có lợi trong điều kiện tryptaza tổng cao, các mô phỏng này được lặp lại theo kịch bản tryptaza cao hơn (Hình 4B). Trong các điều kiện này, càng nhiều kháng thể làm phân ly được liên kết bởi tryptaza dạng monome không có hoạt tính, thì càng đem lại kháng thể tự do thấp hơn (so sánh ô trên cùng bên trái của Hình 4B với ô trên cùng bên trái của Hình 4A) và dẫn đến mức trung hòa tetrame ít hơn nhưng vẫn tốt (tối thiểu ~80%) bởi kháng thể làm phân ly (Hình 4B, ô trên cùng bên phải). Bằng việc so sánh, đối với kháng thể làm ổn định tetrame, mặc cho kháng thể tự do lớn hơn do sự thiếu vắng khả năng liên kết vào monome (Hình 4B, ô dưới cùng bên trái), kháng thể này đạt được mức trung hòa ít hơn (tối thiểu ~70%) so với kháng thể làm phân ly trong cùng điều kiện, mặc cho ái lực cao hơn 10 lần được giả thiết đối với kháng thể làm ổn định (K_D=0,02nM) trong các mô phỏng (Hình 4B, ô dưới cùng bên phải). Mức trung hòa ít hơn là do tính ổn định

cao hơn (thời gian bán hủy) của đích đã được liên kết làm "bể chứa" cho tetrame. Vì vậy, các mô phỏng của chúng tôi dự đoán rằng kháng thể làm phân ly là đầy hứa hẹn và thường thể hiện tốt hơn so với kháng thể làm ổn định đặc hiệu với tetrame theo các kịch bản khác nhau được kiểm tra.

Tiếp theo, chúng tôi đã kiểm tra kháng thể làm phân ly so sánh với kháng thể làm ổn định đặc hiệu với tetrame ở các liều lượng kháng thể khác nhau như thế nào. Hình 4C thể hiện mức trung hòa tetrame của cả hai loại kháng thể, ở cả kịch bản đường chuẩn và kịch bản tryptaza cao, ở dạng hàm số của mức liều lượng kháng thể (30, 100, 300mg 4 tuần một lần theo kiểu dưới da). Trong kịch bản đường chuẩn (Hình 4C, các ô trái), kháng thể làm phân ly làm giảm một cách nhất quán hoạt tính tetrame nhiều hơn kháng thể làm ổn định, xuyên suốt tất cả các liều lượng được xem xét. Trong kịch bản tryptaza cao (Hình 4C, các ô phải), kháng thể làm phân ly vượt trội hơn kháng thể làm ổn định liên quan đến mức trung hòa tetrame ở tất cả các liều lượng nhưng ở liều lượng thấp nhất (30mg), mà ở điểm đó hai kháng thể này thể hiện theo kiểu có thể so sánh được. Mức trung hòa nhìn chung ít hơn đạt được bằng cách sử dụng kháng thể làm ổn định mặc cho ái lực lớn hơn 10 lần (K_D=0,02nM) so với kháng thể làm phân ly (K_D=0,2nM), biểu lộ yêu cầu ái lực cao hơn nhiều (>10x) đối với mức trung hòa tetrame có thể so sánh được bằng cách sử dụng kháng thể làm ổn định so với kháng thể làm phân ly. Đối với cả hai kịch bản, liều lượng tối ưu đối với mức trung hòa tetrame (90%) là thấp hơn đối với kháng thể làm phân ly so với đối với kháng thể làm ổn định (các kết quả không được thể hiện), mặc cho ái lực lớn hơn 10 lần được giả thiết đối với kháng thể làm ổn định. Vì vậy, theo mô hình này, kháng thể làm phân ly thường vượt trội hơn hoặc ít nhất trùng khớp kháng thể làm ổn định mà có ái lực cao hơn 10 lần, xuyên suốt khoảng liều lượng và các mức nồng độ tryptaza phổi và huyết thanh được kiểm tra. Ngoài ra, chúng tôi đã chứng minh trong bản mô tả này rằng IgG hu31A.v11 và IgG huE104.v2 đã ức chế hoàn toàn tất cả hoạt tính tryptaza. Xem Hình 2A và Bảng 5.

Theo hiểu biết của chúng tôi, đã không có ví dụ bất kỳ nào về kháng thể làm phân ly tetrame tryptaza được phát triển cho các cách dùng trị liệu. Được biết rằng ổ gen viêm của mô bệnh bao gồm cả phổi hen suyễn cấp tính là có tính axit so với các đối tượng đối chứng; ví dụ, xem tài liệu: Hunt et al. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:694-699, 2000; Steen et al. *J. Neuroscience* 15:3982, 1995; Bellocq et al. *J. Biol. Chem.*

273:5086, 1998; và Lardner *J. Leukocyte Biol.* 69:522, 2001). Dữ liệu đã được công bố đã thể hiện rằng kháng thể kháng tryptaza đơn dòng của chuột B12 trung hòa tryptaza beta của người ở độ pH trung tính nhưng không có khả năng trung hòa hoạt tính tryptaza beta của người trong thử nghiệm enzym ở độ pH có tính axit là 6 (xem tài liệu: Fukuoka et al. *J. Immunol.* 176:3165, 2006). Do đó, chúng tôi đã kiểm tra các kháng thể hu31a.v11 và huE104.v2 về khả năng của chúng trong việc ức chế hoạt tính của tryptaza beta của người trong việc phân cắt fibrinogen ở cả độ pH trung tính và ở độ pH có tính axit.

Nói một cách vắn gọn, tetrame tryptaza beta của người (1,0µg/ml) được ủ trước bằng kháng thể được kiểm tra trong 30 phút trong dung dịch đệm TNH ở độ pH 6,0 hoặc 7,5 (Tris 50mM, NaCl 150mM, heparin 0,1mg/ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp được ủ bằng 5µg chất nền fibrinogen của người (Haematologic Technologies, Inc., Số hiệu theo Danh mục: HIC-0150R) trong 2,5 giờ ở 37°C. Mỗi Fab hu31A.v11, Fab huE104.v2, và mIgG1 B12 được kiểm tra ở mức 200µg/ml. Các sản phẩm phân cắt được phân tích bằng SDS-PAGE và phương pháp nhuộm phẩm xanh lam Coomassie.

Như được thể hiện ở các Hình 5A và 5B, tryptaza beta 1 của người đã phân cắt các chuỗi fibrinogen alpha và beta ở cả độ pH 6 và 7,5 (so sánh làn 1, chỉ fibrinogen mà thôi, với làn 2, fibrinogen cộng với tryptaza beta 1). Kháng thể Fab hu31A.v11 đã ức chế tryptaza beta của người ở cả độ pH 6 và độ pH 7,5 (làn 3), trong khi Fab huE104.v2, trong điều kiện thử nghiệm là 0,1mg/ml của nồng độ cao của heparin, thì không (làn 5). Làn 6 là chỉ một mình mIgG1 B12. Sự giảm về chuỗi fibrinogen alpha là có tính chỉ báo về hoạt tính thủy phân protein tryptaza. Chuỗi fibrinogen beta cũng được phân cắt, nhưng sự phân cắt chuỗi beta có xu hướng bị làm lu mờ trên gel. Vì vậy, cường độ của chuỗi alpha được định lượng và được thể hiện trong các ô dưới cùng của các Hình 5A và 5B. Vì vậy, Fab hu31A.v11 đã ức chế hoạt tính tryptaza ở độ pH 6 và 7,5, trong khi Fab huE104.v2 trong điều kiện thử nghiệm là nồng độ heparin cao, thì không có tính ức chế.

Hoạt tính ức chế của các kháng thể dạng thức IgG (IgG4 hu31A.v11 và IgG4 huE104.v2) cũng được đánh giá bằng cách sử dụng peptit S-2288 làm chất nền trong thử nghiệm ức chế khi có mặt tryptaza 1nM và S-2288 tạo màu 400µM trong dung dịch đệm TNH ở độ pH 6, 7, hoặc 8. Nồng độ cuối của heparin trong thử nghiệm này là

khoảng 95µg/ml. Cả hu31A.v11 và huE104.v2 ở dạng thức IgG đã ức chế hoàn toàn hoạt tính tryptaza ở độ pH 6, 7, và 8 (dữ liệu không được thể hiện).

Do đó, IgG hu31A.v11 và IgG huE104.v2 đều liên kết vào tryptaza với ái lực cao và ức chế một cách có hiệu quả hoạt tính tryptaza trong các điều kiện phù hợp về mặt sinh lý đối với các rối loạn gắn liền với tryptaza như hen suyễn. Thú vị là, trong các điều kiện thử nghiệm của chúng tôi, kháng thể đơn dòng kháng tryptaza của chuột kháng của người IgG1 B12 cũng đã thể hiện hiện tượng ức chế tryptaza beta của người ở độ pH 6 (Hình 5A, làn 4), trái ngược với các kết quả được công bố. Sự sai biệt này có thể được quy cho hoạt tính proteaza không tryptaza tồn dư bất kỳ có mặt trong chất liệu được sử dụng cho thử nghiệm ở dữ liệu đã được công bố mà được hoạt hóa bằng độ pH có tính axit và kháng lại hiện tượng ức chế B12.

Ví dụ 3: Phép phân tích cấu trúc về các kháng thể kháng tryptaza

A. Các kháng thể họ 31A

(i). Tinh thể học tia X

Tryptaza dạng tetrame loại hoang dại được trộn với Fab hu31A.v11 lượng dư mol 1,5 lần và chất ức chế trypsin đậu tương (STI) lượng dư mol 2 lần (Roche) và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. STI được bổ sung để tạo thuận lợi cho quá trình kết tinh. Sau đó, hỗn hợp được tiến hành SEC bằng cách sử dụng cột S200 (GE Healthcare) trong MOPS 10mM (độ pH 6,8), NaCl 0,5M. Các phân đoạn chứa phức hợp bậc ba của tryptaza, STI, và Fab hu31A.v11 được gộp và được cô đến 40mg/ml.

Các tinh thể của tryptaza/Fab hu31A.v11/STI được làm tăng trưởng ở 19°C bằng cách sử dụng phương pháp khuếch tán hơi trong các giọt treo. Dung dịch đệm kết tinh chứa Tris 0,1M (độ pH 7,5), lithi sulfat 0,2M, và polyetylen glycol 5% (PEG) 4000 được trộn trong thể tích ngang bằng với dung dịch protein. Các tinh thể được nhúng trong nước cái nhân tạo chứa etylen glycol 25% và được thủy tinh hóa trong nitơ lỏng.

Bảng 7 thể hiện thông tin về phương pháp tinh chỉnh và thu thập dữ liệu tia X của cấu trúc của Fab hu31A.v11/tryptaza/STI. Dữ liệu nhiễu xạ kéo dài đến 2,15 Å được thu thập trong mạng lục giác ở mức dòng chùm tia ALS 5.0.2. Phương pháp chỉnh theo tỷ lệ và thu giảm dữ liệu cho phép gán nhóm Laue vào 6/mmm (Otwinowski, *Methods in Enzymol.* 276, 307-326, 1997; Winn et al. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.*

67, 235-242, 2011). Dựa trên thể tích tế bào đơn vị và hàm lượng protein được đề xuất, một phức hợp Fab hu31A.v11/tryptaza/STI đơn lẻ được kỳ vọng ở đơn vị không đối xứng tinh thể học. Cấu trúc được giải quyết bằng cách sử dụng dạng thay thế phân tử (McCoy et al. *J. Appl. Crystallogr.* 40:658-674, 2007) trong nhóm không gian $P6_222$. Các mẫu dò tìm kiếm sau đây được sử dụng, mỗi mẫu dò trong vai trò là thể tách biệt: protome tryptaza được xác định trước được tạo ra từ số truy cập theo PDB: 4A6L (Liang et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22:1049-1054, 2012), STI từ PDB 1AVU (Song et al. *J. Mol. Biol.* 275:347-363, 1998), mảnh Fv bị cắt tách các vòng CDR từ PDB 1FVC (Eigenbrot et al. *J. Mol. Biol.* 229:969-995, 1993), và vùng hằng định từ PDB 1FVD. Sau một số phương pháp tinh chỉnh được khống chế (Murshudov et al. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 67:355-367, 2011), các bản đồ mật độ điện tử cho phép chỉnh sửa trình tự protein Fab và làm khớp các gốc bị mất và các chuỗi bên vào mật độ rõ ràng (Emsley et al. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 66:486-501, 2010). Nước được bổ sung một cách tự động (Adams et al. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 66:213-221, 2010). Nhiều vòng tinh chỉnh và điều chỉnh mô hình hơn (phần mềm BUSTER; Global Phasing Ltd., 2011) đã dẫn đến mô hình cuối cùng. Mô hình này là liên tục đối với các gốc tryptaza Ile16 - Lys244 (cách đánh số chymotrypsinogen), các gốc STI Asp1 - Asp177, các gốc chuỗi nhẹ Fab Asp1 - Cys214 (cách đánh số Kabat) (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* Bethesda, MD, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1991). Chuỗi nặng Fab là liên tục ngoại trừ khoảng trống năm gốc axit amin ở miền hằng định. Trị số của thống kê về tính bổ trợ hình dạng (Sc) (Lawrence et al. *J. Mol. Biol.* 234:946-950, 1993) là 0,73, nhất quán với các phức hợp kháng nguyên/Fab liên kết chặt khác. Vùng tiếp xúc liên protein lớn nhất là vùng tiếp xúc liên protein giữa tryptaza và STI, khi mà mỗi chất trong số chúng mất bề mặt có thể tiếp cận được bởi dung môi 1260 $Å^2$ (Broger C, xsae, F. Hoffman-La Roche, Basel, Thụy Sĩ, 2000) ở mặt phân giới của chúng. Ngược lại, tiếp xúc Fab/tryptaza chỉ là 760 $Å^2$ ở mỗi bên, được phân bố đều giữa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của Fab. Các tiếp xúc đóng gói tinh thể 4 Å trở xuống được phân bố đều quanh STI, tryptaza, và tất cả bốn miền Fab, và bao gồm nhiều liên kết hydro khác nhau cũng như các tiếp xúc kỵ nước.

Bảng 7: Việc thu thập dữ liệu tia X và tinh chỉnh Fab hu31A.v11/Tryptaza/STI

Thu giảm dữ liệu	
Nguồn tia X	ALS 5.0.2
Bước sóng (Å)	0,97395
Khoảng độ phân giải (Å)	31,48-2,15 (2,226-2,149)
Nhóm không gian	P_6222
Mép tế bào đơn vị (Å)	128,52 128,52 245,88
Góc tế bào đơn vị (°)	90 90 120
Tổng phản xạ	308799
Phản xạ độc nhất	65702 (6404)
Độ bội	4,7 (4,8)
Mức hoàn thành (%)	99,8 (100)
Giá trị trung bình I/sigma(I)	14,2 (2,3)
Nhân tử B Wilson ($Å^2$)	37,02
R-symm	0,086 (0,681)
Phương pháp tinh chỉnh	
Các phần tham chiếu dùng cho R-tự do	1996
Trị số R	0,190
R-tự do	0,233
Số nguyên tử không phải H	7057
các đại phân tử	6608
etylen glycol	8
nước	441
Các gốc protein	850
RMS(liên kết)	0,010
RMS(góc)	1,1

Được hỗ trợ bằng Rama (%)	97
Nhân tử B trung bình ($Å^2$)	45,7
các đại phân tử	45,6
etylen glycol	59,7
dung môi	47,1

(ii) Quá trình lập bản đồ epitop các kháng thể kháng tryptaza được phân tích bằng phương pháp trao đổi hydro-dơteri (HDX) và được đo bằng MS

Các tốc độ hấp thụ dơteri của tryptaza dạng monome khi có mặt và thiếu vắng kháng thể được đo để xác định các vùng cấu trúc mà được cải biến sau quá trình liên kết kháng thể. Mẫu đã được liên kết chứa hỗn hợp có tỷ lệ 1:1 của tryptaza và kháng thể tương ứng, được điều chế và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Nồng độ tryptaza trước quá trình đánh dấu dơteri là 30µM ở mẫu đã được liên kết kháng thể và mẫu chưa được liên kết kháng thể. Các thử nghiệm HDX bao gồm việc pha loãng mẫu 15-lần thành dung dịch đệm được đánh dấu dơteri chứa histidin axetat 20mM ở mức pD 7,0. Sáu lần đánh dấu, được lấy mẫu theo hàm lôgarit từ 30 giây đến 1000 phút, được lấy ba lần như nhau, được dập tắt bằng cách hạ thấp độ pH xuống độ pH 2,5 và bổ sung guanidinium clorua 2M (GdmCl) và tris(2-carboxyetyl)phosphin 0,25M (TCEP), và được bơm vào hệ thống trực tuyến lạnh, như được mô tả trên đây (Mayne et al., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 22:1898-1905, 2011).

Nói một cách vắn gọn, trước tiên, mẫu được di chuyển qua cột pepsin bất động (2,1 x 30mM, Applied Biosystems) và được nạp lên trên cột Trap (Acquity Vanguard C_8) để khử muối. Sau đó, các mảnh peptit được tách bằng sắc ký có pha đảo bằng cách sử dụng cột Acquity UPLC™ BEH C_{18} (kích cỡ hạt 1,7µm, 1,0 x 50mm) và được đưa vào phổ khối kế (Thermo Orbitrap Elite™, độ phân giải 120kHz ở m/z 400) dùng cho phép phân tích khối lượng. Các pha động sắc ký được điều chế như được mô tả trên đây để giảm thiểu mức trao đổi trở lại dơteri (Walters et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23: 2132-2139, 2012). Chương trình ExMS (Kan et al. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 22:1906-1915, 2011) được sử dụng để nhận diện các peptit đã được đơteri hóa và chuẩn bị các phổ sắc ký ion được trích xuất, sau đó, các phổ sắc ký ion được trích xuất này

được phân tích bằng các tập lệnh Python nội bộ (Walters et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:18898-18903, 2013). Các tập lệnh này kết hợp các trạng thái điện tích suy biến, làm khớp các dạng phân phối chất đồng vị với các nhị thức, và trích xuất số dơteri được mang, tính trung bình, bởi mỗi peptit.

(iii) Khối lượng nguyên vẹn theo sắc ký lỏng/phép đo phổ khối (LC/MS)

Các protein đã được tinh chế (bao gồm cả tryptaza và các thể đột biến của nó) được axit hóa bằng axit trifloaxetic (TFA) 0,1% (Thermo, Rockford, IL) và được pha loãng đến nồng độ cuối là 10µM. Mẫu được phân tích trên thiết bị thời gian bay tứ cực Khối lượng-Chuẩn xác Agilent 6520 (Q-TOF) được liên hợp bằng sắc ký lỏng hiệu suất cao Vô tận Agilent 1260 (HPLC)-Mặt phân giới Khối lập phương Chip (Agilent, Santa Clara, CA). Các protein được tách bằng HPLC pha đảo trên cột PLRP-S 150mm x 75µm ở tốc độ dòng chảy 40nl/phút bằng gradien 5-80%, 10 phút của dung môi nước A (H2O 97%, axetonitril 3%, axit formic 0,1%) thành dung môi hữu cơ B (axetonitril 98%, axit formic 0,1%). Dữ liệu được thu thập bằng MassHunter® Workstation (Agilent, Santa Clara, CA) và phổ khối thô được giải chập để tạo ra dữ liệu về khối lượng nguyên vẹn. Đã quan sát thấy các đỉnh chính ở mức 61764,4 Da và 63152,9 Da. Cũng quan sát thấy hiện tượng bổ sung nhiều khối lượng GlcNAc (203Da).

(iv) Các kết quả

Cấu trúc tinh thể của tryptaza của người thể hiện rằng mỗi monome của tetrame tiếp xúc đối tượng lân cận của nó ở hai mặt phân giới khác nhau thông qua sáu đoạn vòng: mặt phân giới lớn (giữa các protome A/D và B/C) hoặc mặt phân giới nhỏ (giữa protome A/B và C/D) theo danh pháp protome được mô tả bởi tài liệu: Pereira et al. *Nature* 392:306-11, 1998, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Sáu vòng bề mặt của mỗi protome bao quanh vị trí có hoạt tính và gài vào các điểm tiếp xúc liên monome (Pereira, *trên đây*). Trong số đó, vòng 147, vòng 70-80 và vòng 37 gài vào điểm tương tác của mặt phân giới nhỏ, và vạt 173, vòng 97 và vòng 60 là quan trọng trong sự tương tác mặt phân giới lớn. Trong khi mặt phân giới nhỏ chỉ bao gồm các tương tác kỵ nước, thì mặt phân giới lớn bao gồm một vài tương tác mang điện tích, phân cực ngoài các tương tác kỵ nước ra. Heparin còn làm ổn định các mặt phân giới

nhỏ, đây được cho là các điểm xén của tetrame, bằng cách liên kết không theo kiểu cộng hóa trị vào các gốc mang điện tích dương trải dài qua hai protome A/B và C/D liền kề. Xem tài liệu: Pereira *trên đây.* Về mặt tự nhiên, các mặt phân giới nhỏ là các điểm xén của tetrame, sau đó là điểm phân ly của dime được giữ bởi các mặt phân giới lớn. Thời gian bán hủy của tryptaza là khoảng 2-3 giờ trong hệ tuần hoàn trong máu của người sau quá trình phát triển của hiện tượng phản vệ toàn thân (ví dụ, xem tài liệu: Schwartz et al. *J. Clin. Invest.* 83:1551-1555,1989). Thời gian bán hủy bình thường của tetrame là khoảng 30 phút.

Chúng tôi đã xác định xem liệu mặt phân giới protein nhỏ hoặc mặt phân giới protein lớn mà giữ tetrame tryptaza cùng nhau có bị làm mất ổn định sau khi hu31A.v11 hoặc huE104.v2 liên kết vào tryptaza hay không. Hai thể đột biến tryptaza được tạo ra mà đã đem lại sự liên kết cộng hóa trị của hai protome lân cận trong tetrame thông qua liên kết disulfua liên phân tử ở mặt phân giới lớn (giữa các protome A/D và B/C) hoặc mặt phân giới nhỏ (giữa protome A/B và C/D) theo danh pháp protome được mô tả bởi Pereira et al. *trên đây.* Vì vậy, khi hiện tượng phân ly của mặt phân giới nhỏ được phòng ngừa do sự hình thành dime được liên kết disulfua cộng hóa trị, thì hiện tượng phân ly của mặt phân giới lớn vẫn được cho phép. Ngược lại, khi hiện tượng phân ly của mặt phân giới lớn được phòng ngừa do sự hình thành dime được liên kết disulfua cộng hóa trị, thì hiện tượng phân ly của mặt phân giới nhỏ vẫn được cho phép.

Tyr75 ở mặt phân giới nhỏ và Ile99 ở mặt phân giới lớn (cách đánh số chymotrypsinogen, Hình 7) được gây đột biến một cách riêng biệt thành xystein. Các vị trí này được chọn lựa bởi vì chúng hướng vào chính mình ở các mặt phân giới này do tính đối xứng hầu như 2 lần của tetrame (Sommerhoff et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10984-91, 1999). Sự thay thế Tyr75 hoặc Ile99 thành xystein *in silico* bằng cách sử dụng phần mềm PyMOL đã thể hiện các khoảng cách tương ứng là 2,4 Å và 3,2 Å giữa các thiol của mỗi xystein đối bên, mức này là lớn hơn chút ít so với chiều dài liên kết disulfua điển hình là 2,05 Å. Dù sao, hai thể đột biến tetrame thu được được biểu hiện và được tinh chế và chứa liên kết disulfua mà đã hình thành giữa các mặt phân giới tương ứng như được xác định bằng phép phân tích MS về peptit trypsin. Hơn nữa, cả hai thể đột biến cũng là có hoạt tính theo kiểu enzym, nhưng với khoảng một nửa hiệu quả xúc tác (k_{cat}/K_M) khi so với tryptaza dạng tetrame loại hoang dại (Bảng 8).

Bảng 8: Hoạt tính enzym của tryptaza đột biến và loại hoang dại

Tryptaza	**K_M (µM)**	**V_{max} (nM/giây)**	**k_{cat} (1/s)**	**k_{cat}/K_M (1/(M*s)**	**Hiệu quả xúc tác (Đột biến/WT)**
WT	554	400	100	180505,42	1
Được khóa ở Mặt phân giới nhỏ Y75C	320	133	33,25	103906,25	0,57
Được khóa ở Mặt phân giới lớn I99C	798	235	58,75	73621,55	0,41

Kích cỡ của các thể đột biến được tạo phức hợp với Fab hu31A.v11 hoặc Fab huE104.v1 này được phân tích. Các thể đột biến tryptaza Y75C và I99C thì mỗi thể đột biến được trộn với lượng dư mol 2 lần của Fab hu31A.v11 dùng cho sự hình thành phức hợp, như được mô tả trên đây đối với tryptaza loại hoang dại, và được phân tích bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Trong vai trò là chuẩn tham chiếu dùng để so sánh, tryptaza dạng tetrame loại hoang dại được tạo phức hợp với Fab từ kháng thể huE104.v1, mà liên kết đặc hiệu vào tryptaza, nhưng không làm phân ly tetrame, và phức hợp này mất hoạt tính ức chế ở tỷ lệ giữa kháng thể và tetrame cao. Tryptaza dạng tetrame loại hoang dại được tạo phức hợp với Fab huE104.v1 đã có thời gian lưu là 21,6 phút (Hình 6A, đỉnh tham chiếu). Phép phân tích SEC-MALS về phức hợp này đã xác định trọng lượng phân tử là 276,1kDa, có tính chỉ báo về phức hợp bao gồm một tetrame tryptaza có bốn Fab được liên kết.

Fab hu31A.v11 đã tạo các phức hợp với các thể đột biến tryptaza dạng tetrame Y75C và I99C lần lượt có thời gian lưu là 25,6 phút (Hình 6A, lần chạy 2, đỉnh 1) và 23,9 phút (Hình 6A, lần chạy 3, đỉnh 2) (Hình 6A). Cả hai thời gian lưu là dài hơn so với thời gian lưu của phức hợp tham chiếu, biểu lộ rằng cả hai thể đột biến tetrame phân

ly thành các dime được liên kết theo kiểu cộng hóa trị tương ứng của chúng sau khi hình thành phức hợp với Fab hu31A.v11. Mẫu từ mỗi đỉnh được thu gom và được phân tích bằng SDS-PAGE để xác nhận các loại ở mỗi đỉnh (Hình 6B). Phép phân tích SDS-PAGE về các đỉnh protein được rửa giải này thể hiện rằng cả Fab hu31A.v11 và dime tryptaza tương ứng đều có mặt trong cùng một phân đoạn (Hình 6B). Đỉnh 3 (T_r là 28,1 phút) và đỉnh 4 (T_r là 31,6 phút) của lần chạy 4 lần lượt biểu diễn monome WT được tạo phức hợp với Fab hu31A.v11, và Fab dư. Một lượng nhỏ của mẫu đỉnh 3 được kết chuyển sang mẫu đỉnh 4 trong SDS PAGE. Cả hai thể đột biến tryptaza trong phức hợp với Fab hu31A.v11 chạy với thời gian lưu dài hơn so với đỉnh tham chiếu, biểu lộ rằng cả mặt phân giới lớn và mặt phân giới nhỏ đều bị làm mất ổn định sau khi liên kết Fab hu31A.v11. Sự mất ổn định này đem lại hiện tượng phân ly tetrame, như được quan sát đối với tetrame tryptaza loại hoang dại, hiện tượng này cuối cùng làm bất hoạt hoạt tính thủy phân protein của tryptaza. Fab B12 cũng làm mất ổn định cả hai tetrame đột biến (dữ liệu không được thể hiện).

Khả năng liên kết của kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa hu31A.v11 vào tryptaza beta 1 trưởng thành của người được nghiên cứu bằng cách sử dụng tinh thể học tia X để xác định cấu trúc của phức hợp phân tử giữa tryptaza và mảnh Fab hu31A.v11 ở độ phân giải 2,15 Å. Kết quả là một đơn vị không đối xứng tinh thể học chứa một phức hợp tryptaza/STI (chất ức chế trypsin đậu tương) tương tác với một Fab hu31A.v11. STI được lấy vào vì mục đích của quá trình kết tinh.

Một định nghĩa về epitop là tập hợp gồm axit amin tryptaza mà trong phạm vi 4 Å của nguyên tử bất kỳ của Fab hu31A.v11. Chương trình PyMOL được sử dụng để tìm ra các epitop. Các gốc axit amin ở các chuỗi polypeptit tryptaza có thể được đánh số theo một quy ước (cách đánh số chymotrypsinogen) mà đi lệch khỏi cách đánh số trình tự để cho phép đối với những so sánh xuyên suốt các protein tương đồng. Một bảng chuyển đổi giữa sơ đồ đánh số về gốc tryptaza này và sơ đồ trình tự đơn giản được đề xuất (Hình 7). Các gốc tryptaza dưới đây được đặt tên theo quy ước này, có sơ đồ đánh số trình tự gen trong dấu ngoặc đơn.

Epitop của hu31A.v11 trên tryptaza bao gồm các gốc sau đây: H36, Q50, V60c, K60d, D60e, L61, A62, A63, R65, P84, V85, S86, R87, E109, E110, P111 (cách đánh số chymotrypsinogen, lần lượt tương ứng với H51, Q67, V80, K81, D82, L83, A84,

A85, R87, P103, V104, S105, R106, E128, E129, và P130 của SEQ ID NO: 71). Xem Hình 8. Các gốc của các vòng 60s, 80s, và 100s của tryptaza là ở trạng thái tiếp xúc gần với Fab hu31A.v11, trong khi gốc His36 và Gln50 là ở phần ngoại vi nhiều hơn của quá trình tương tác với Fab. Xem thêm tài liệu: Pereira et al. *trên đây.* Tiếp xúc Fab-tryptaza loại trừ 760 $Å^2$ khỏi dung môi (mỗi bên), có những đóng góp ngang bằng từ chuỗi nhẹ Fab (Val30, Thr31, Tyr32, Tyr34, Arg50, Tyr90, His92, Ser93, Tyr94) và chuỗi nặng (Phe50, Ser52, Gly53, Ser54, Ser55, Thr56, Tyr58, Arg95, Tyr97, Asp98). Cần phải xem xét rằng các gốc epitop được mô tả trên đây cũng thường áp dụng cho các kháng thể được tạo ra từ 31A khác.

Khi dime tryptaza/Fab từ phức hợp bậc ba được xếp chồng lên trên các protome tryptaza A và D từ tetrame loại hoang dại (Pereira et al. *trên đây*), chúng tôi đã phát hiện ra rằng hai Fab nằm trên cùng một bên của tetrame, hầu như vuông góc với mặt phẳng tetrame (Hình 9). Việc lặp lại quy trình này đối với các protome B và C đặt hai Fab ở phía đối bên của tetrame. Đáng chú ý là, các kết quả này làm nổi bật các điểm đối nghịch không gian giữa các chuỗi nhẹ Fab, nhất quán với sự việc thực tế là Fab rửa giải ở dạng phức hợp 1:1 với tryptaza dạng monome trên SEC và không phải ở dạng phức hợp với tryptaza dạng tetrame (Hình 9).

Tryptaza dạng tetrame không được giữ cùng nhau theo kiểu cộng hóa trị và có thể phân ly thành các monome trong các điều kiện sinh lý, như được theo dõi bằng hiện tượng suy yếu về hoạt tính enzym qua thời gian và những thay đổi về phổ lưỡng hướng sắc có hình tròn (CD) trong dung dịch (Schwartz et al. *J. Biol. Chem.* 261:7372-7379, 1986; Schwartz et al. *J. Immunol.* 144:2304-11, 1990). Khả năng liên kết hu31A.v11 (Fab hoặc IgG) vào mỗi protome của tetrame thường thúc đẩy và tăng tốc hiện tượng phân ly của tetrame và phòng ngừa hiện tượng tái kết hợp tetrame bất kỳ do các điểm đối nghịch không gian của các Fab khi được liên kết vào tryptaza. Vì vậy, tryptaza phân ly và trở thành monome không có hoạt tính theo kiểu enzym theo một phương thức nhanh hơn do những thay đổi dị lập thể trên mỗi protome do quá trình liên kết hu31A.v11 gây ra. Bởi vì tính đối xứng giả 2 lần ở tetrame, hầu như tất cả các tương tác mà cấu thành mặt phân giới nhỏ và mặt phân giới lớn tồn tại hai lần. Điều này cũng có nghĩa là mỗi thay đổi tinh tế về cấu trúc tryptaza do quá trình liên kết hu31A.v11 gây ra xảy ra hai lần ở mỗi mặt phân giới, nhờ đó tăng cường quá trình làm mất ổn định.

Cấu trúc phức hợp của Fab hu31A.v11 với tryptaza thể hiện những thay đổi đáng kể về vòng 60s, vòng này ở mặt phân giới lớn. Cụ thể là, khi được liên kết bởi Fab hu31A.v11, gốc Val60c (tương ứng với Val80 của SEQ ID NO: 71) có sự chuyển dịch đáng kể ở chuỗi bên khi so với vị trí của nó được tìm thấy ở cấu trúc tryptaza chưa đươc liên kết. Ở tetrame tryptaza chưa được liên kết, Tyr173d từ protome lân cận nằm trong túi kỵ nước do các gốc Val60c và Val90 tạo ra (Hình 10, cả hai đều bằng cách đánh số chymotrypsinogen, xem thêm Hình 7). Ở phức hợp kháng thể, sự thay đổi hình thể của Val60c tạo ra sự cản trở không gian mà phòng ngừa Tyr173d liên kết vào túi đó. Vì quá trình liên kết hu31A.v11 vào tryptaza bao gồm các tương tác với các phần của vòng 60s và các gốc gần kề, nên quá trình liên kết này có thể chịu trách nhiệm về sự thay đổi hình thể này ở Val60c. Điều này có thể dẫn đến quá trình làm mất ổn định mặt phân giới lớn và vì vậy, thường tăng cường hiện tượng phân ly của tetrame tryptaza thành monome không có hoạt tính.

Vòng imidazol của His36 (cách đánh số chymotrypsinogen; tương ứng với His51 của SEQ ID NO: 71) ở tryptaza tạo ra các tương tác kỵ nước với Fab hu31A.v11, đem lại những thay đổi về dấu vết C_α ở vòng 30s của các gốc tryptaza His36, Pro37a, và Tyr37b khi so với các protome tryptaza ở cấu trúc tetrame chưa được liên kết. Điều này ảnh hưởng đến hình thể của chuỗi bên Tyr37b, sao cho quá trình tương tác kỵ nước cốt yếu với protome lân cận bao gồm Pro152 và Pro152a ở mặt phân giới nhỏ có thể được làm suy yếu (Hình 11, tất cả đều bằng cách đánh số chymotrypsinogen, xem thêm Hình 7).

Các nghiên cứu về sự hình thành phức hợp của hai biến thể tryptaza được khóa bằng disulfua khác nhau Y75C và I99C với Fab hu31A.v11 thể hiện rằng cả mặt phân giới lớn và mặt phân giới nhỏ của tryptaza dạng tetrame đều bị làm mất ổn định bằng kháng thể. Cả các điểm đối nghịch không gian của các Fab đã được liên kết vào tetrame và những thay đổi hình thể của các gốc tương tác cốt yếu của mặt phân giới lớn và mặt phân giới nhỏ chắc chắn là quan trọng trong việc đóng góp vào hiện tượng phân ly tetrame. Hai yếu tố này là không có tính loại trừ lẫn nhau. Sự cản trở không gian bắt nguồn từ các Fab hu31A.v11 khi được liên kết vào mỗi protome của tetrame được chứng minh *in silico* biểu lộ rằng hai Fab từ một IgG đơn lẻ thường không bao giờ có thể liên kết một cách đồng thời vào một tetrame (Hình 9). Quan sát này là nhất quán với sự phát

hiện ra rằng cả Fab và IgG của hu31A.v11 đều có khả năng làm phân ly tetrame, nhờ đó ức chế hoạt tính enzym. Quan sát này cũng biểu lộ rằng các monome đã phân ly được liên kết bởi kháng thể chắc chắn là không tái lắp ráp để tạo thành tetrame.

Tiếp theo, các thử nghiệm HDX về tryptaza dạng monome đã được liên kết vào Fab hu31A.v11 được thực hiện để nghiên cứu các tương tác liên kết trong dung dịch. Mức độ của HDX qua thời gian được theo dõi bằng phép đo phổ khối. Trong khi phương pháp này đưa ra thông tin có tính chỉ báo về epitop liên kết của hu31A.v11, thì phương pháp này cũng phát hiện những thay đổi dị lập thể về tính ổn định hình thể mà có thể xảy ra cách xa với epitop liên kết kháng thể. Các liên kết amit mà thể hiện mức trao đổi chậm hơn ở tryptaza khi hu31A.v11 được liên kết là nằm ở các vùng của các gốc 25-29, 40-41, 57-59, 60-61, 66-67, 83-88, 108-110, và 231-233 (cách đánh số chymotrypsinogen). Khi so sánh các vùng này với các gốc tryptaza trong phạm vi 4 Å của Fab hu31A.v11 như được nhìn thấy ở cấu trúc tinh thể, mức độ chồng lấn cao giữa cả hai phương pháp nhận diện các gốc epitop liên kết ở vòng 60s, 80s và 100s được quan sát (Hình 8). Các vùng khác được nhận diện bằng HDX như các vị trí trong các vùng 20s, 40s, 50s, và 230s của trình tự tryptaza sơ cấp là không ở trong trạng thái tiếp xúc trực tiếp với kháng thể theo cấu trúc tinh thể, nhưng thể hiện hiện tượng giảm về động lực học hình thể khi có mặt hu31A.v11. Thú vị là, các gốc 57-59 dường như bị ảnh hưởng theo kiểu dị lập thể bởi quá trình liên kết hu31A.v11. Vòng xoắn α ngắn này chứa gốc His57 (cách đánh số chymotrypsinogen) là một phần của bộ ba xúc tác ở các proteaza serin và thiết yếu cho hoạt tính xúc tác. Mặc dù các gốc 40 và 41 được nhận diện bằng HDX là không ở trong trạng thái tiếp xúc trực tiếp với hu31A.v11, nhưng chúng ở vị trí cấu trúc hấp dẫn trong vai trò là một phần của tấm beta đối song song thể hiện Tyr37b (chymotrypsin cách đánh số) trong vòng dạng kẹp tóc của chúng, đây là gốc tiếp xúc quan trọng đối với mặt phân giới nhỏ như được bàn luận trên đây (Hình 11). Các dạng thay đổi cấu trúc của vùng này có thể ảnh hưởng đến tính ổn định của mặt phân giới nhỏ và về tiềm năng dẫn đến hiện tượng phân ly tetrame.

Các liên kết peptit ở vòng 20s (tất cả các gốc ở vòng chưa được kiến tạo) và vùng 230s (còn được gọi là vòng xoắn 230s), phần này cũng trải qua những thay đổi về động lực học cấu trúc của chúng theo HDX, cách ra xa với vị trí liên kết của hu31A.v11. Các thử nghiệm HDX theo dõi những thay đổi về động lực học cấu trúc, và không phân biệt

giữa những thay đổi về hình thể khổ lớn so với những thay đổi về tính ổn định năng lượng của một hình thể cụ thể. Về tổng thể, chúng tôi đã phát hiện ra mức độ nhất quán cao giữa thông tin về cấu trúc thu được bằng HDX và tinh thể học tia X và đã nhận diện các gốc phụ thêm mà bị ảnh hưởng theo kiểu dị lập thể bởi quá trình liên kết hu31A.v11.

B. Phép phân tích cấu trúc của các kháng thể kháng tryptaza được tạo ra từ E104

(i) Các chất liệu và phương pháp

Fab của huE104.v1 được sử dụng để tạo ra cấu trúc tinh thể với tetrame tryptaza bởi vì khả năng liên kết huE104.v1 không làm phân ly tetrame. Các tinh thể tryptaza/huE104.v1 được làm tăng trưởng ở 19°C bằng cách sử dụng phương pháp khuếch tán hơi bằng cách trộn protein theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích) với dung dịch bể chứa chứa Tris 0,1M (độ pH 8,5), canxi clorua 0,2M, polyetylen glycol (PEG) 4000 20% và pentaerytritol ethoxylate 8%. Các tinh thể được bảo vệ lạnh trong nước cái nhân tạo chứa Tris 0,1M (độ pH 8,5), canxi clorua 0,2M, PEG 3350 35% và được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Dữ liệu nhiễu xạ được thu thập ở dòng chùm tia SSRL 12-2 trong mạng đơn tà kéo dài đến độ phân giải 3Å bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện mảng điểm ảnh 6M Pilatus và tia X bước sóng 0,9795Å. Dữ liệu được thu giảm (Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66:125-132, 2010; Vonrhein et al. *Acta. Crystallogr.* D67:293-302, 2011) và được chỉnh theo tỷ lệ (Winn et al. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67:235-242, 2011), và cấu trúc được giải quyết bằng dạng thay thế phân tử (McCoy et al. *J. Appl. Crystallogr.* 40:658-674, 2007) trong nhóm không gian P21 biểu lộ tetrame tryptaza được liên kết bởi bốn Fab. Các mẫu dò tìm kiếm dạng thay thế phân tử là protome tryptaza từ số truy cập theo PDB: 4A6L và mảnh Fab kháng thể được tạo ra từ số truy cập theo PDB: 1FVD bằng cách quét các phiên bản được cải biến với một khoảng góc khuỷu bằng cách sử dụng chỉ chức năng quay mà thôi. Sau khi tinh chỉnh có giới hạn, một vùng hằng định Fab được thay thế trong phương pháp tìm kiếm dạng thay thế phân tử bằng cách sử dụng chỉ vùng hằng định từ 1FVD. Cách đánh số về gốc tryptaza được thay đổi thành sơ đồ chymotrypsinogen và cách đánh số về gốc Fab-E104v1 thành sơ đồ Kabat. Việc khảo sát bản đồ mật độ điện tử và mô hình và các phương pháp điều chỉnh được thực hiện bằng cách sử dụng Coot (Emsley et al. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66:486-501, 2010) và cấu trúc được tinh chỉnh bằng

cách sử dụng REFMAC5 (Murshudov et al. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67: 355-367, 2011) và Phenix.refine (Adams et al. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 213-221, 2010). Việc thu thập dữ liệu và các chuẩn đo tinh chỉnh xuất hiện trong Bảng 9. Các thử nghiệm HDX được thực hiện như được mô tả trên đây.

Bảng 9: Bảng về các chuẩn đo tia X của Fab-tryptaza beta của huE104.v1

Dữ liệu	
Nguồn tia X	SSRL 12-2
Bước sóng (Å)	0,9795
Khoảng phân giải (Å)	50 - 3,0 (3,112 - 3,005)
Nhóm không gian	P21
tế bào ***a, b, c*** (Å)	89,573 168,811 114,652
tế bào α,β, γ (˚)	90 109,97 90
Tổng phản xạ	214206
Phản xạ độc nhất	62353
Độ bội	3,4 (3,5)
Mức hoàn thành (%)	97,8 (99,7)
Giá trị trung bình I/σ(I)	11,3 (2,1)
B Wilson ($Å^2$)	72,2
R-symm	0,098 (0,577)
Phương pháp tinh chỉnh	
Các phản xạ dùng cho R-tự do	1266
Trị số R	0,187 (0,278)
R-tự do	0,232 (0,340)
Số nguyên tử không phải H	20794
các đại phân tử	20689
các phối tử	100
Các ion	3
nước	2
Các gốc protein	2702

RMS(liên kết) (Å)	0,01
RMS(góc) (°)	1,2
Được hỗ trợ bằng Ramachandran(%)	94
Nhân tử B trung bình ($Å^2$)	71,5
đại phân tử	71,6
các phối tử	48,4
các ion, nước	71,6

(ii) Các kết quả

Để xác định xem liệu mặt phân giới protein nhỏ hoặc mặt phân giới protein lớn mà giữ tetrame tryptaza cùng nhau có bị mất ổn định sau khi liên kết Fab huE104.v2, thể đột biến tryptaza dạng tetrame Y75C hoặc I99C (xem trên đây) được trộn với lượng dư mol 2 lần của Fab huE104.v2 dùng cho sự hình thành phức hợp và được phân tích bằng SEC (Hình 6C). Fab huE104.v2 đã tạo các phức hợp với thể đột biến tryptaza dạng tetrame Y75C và phổ sắc ký thể hiện hai đỉnh với thời gian lưu là t_r=21,6 phút (Hình 6C, lần chạy 1, đỉnh 1) và t_r=31 phút (đỉnh 4) bao gồm Fab dư. Fab huE104.v2 đã tạo các phức hợp với thể đột biến tryptaza dạng tetrame I99C và phổ sắc ký thể hiện hai đỉnh với thời gian lưu là t_r=23,8 phút (Hình 6C, lần chạy 2, đỉnh 2) và t_r=31 phút (lần chạy 2, đỉnh 5) bao gồm Fab dư. Phép phân tích SDS-PAGE đã thể hiện rằng cả Fab huE104.v2 và thể đột biến dime tryptaza đều có mặt ở các đỉnh 1 và 2 và Fab dư có mặt ở các đỉnh 4 và 5 (dữ liệu không được thể hiện). Đối với việc so sánh, Fab huE104.v2 trong phức hợp với tetrame tryptaza WT đã có thời gian lưu là t_r= 26 phút (Hình 6C, lần chạy 3, đỉnh 3), bao gồm monome được liên kết bởi Fab huE104.v, mà nhỏ hơn thể đột biến tetrame tryptaza I99C trong phức hợp với huE104.v2 (t_r = 23,8 phút, lần chạy 2, đỉnh 2). Thể đột biến tryptaza Y75C (tetrame đột biến được khóa bằng mặt phân giới nhỏ) trong phức hợp với Fab huE104.v2 đã có thời gian lưu tương tự với phức hợp nguyên vẹn, ổn định của tetrame tryptaza WT đã được liên kết vào bốn Fab huE104.v1 (xem Hình 6A, lần chạy 1, đỉnh tham chiếu). Mặt khác, thể đột biến tryptaza I99C (tetrame đột biến được khóa bằng mặt phân giới lớn) trong phức hợp với huE104.v2 đã có thời gian lưu dài hơn có tính chỉ báo về một phức hợp nhỏ hơn so với đỉnh thứ nhất trong lần chạy 1. Các kết quả này biểu lộ rằng Fab huE104.v2 chỉ có khả năng phân ly

mặt phân giới nhỏ, chứ không phải mặt phân giới lớn của tetrame. Vì vậy, khi liên kết vào tetrame tryptaza loại hoang dại, khả năng liên kết Fab huE104.v2 chỉ phân ly mặt phân giới nhỏ mà thôi. Trong các điều kiện thử nghiệm, mặt phân giới nhỏ đã được phân ly có thể được phục hồi một cách nhanh chóng bằng heparin có mặt ở nồng độ cục bộ cao (ví dụ, 0,1mg/ml), điều này thường dẫn đến hiện tượng tái lắp ráp của tetrame. Nồng độ heparin này là về cơ bản cao hơn nồng độ heparin sinh lý, mức này đã được ghi nhận là khoảng 1,5 µg/ml của huyết thanh (ví dụ, xem tài liệu: Engelberg et al., *Circulation* 23:578-581, 1961 và Davids et al. *S. Afr. Med. J.* 100:307-307, 2010). Ở mức nồng độ heparin thấp, Fab huE104.v2 có khả năng phân ly hoàn toàn tetrame tryptaza WT và hoạt tính trung hòa tryptaza, mặc dù kém công hiệu hơn so với huE104.v2 ở dạng thức IgG.

Để có được sự thấu hiểu thêm nữa về epitop liên kết chính xác của huE104.v2 trên tryptaza, chúng tôi đã cố gắng kết tinh phức hợp Fab huE104.v2/tryptaza. Vì chúng tôi không thể thu được các tinh thể thích hợp bất kỳ, nên phức hợp của tryptaza dạng tetrame WT đã được liên kết vào bốn Fab E104.v1 được phân lập bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ được sử dụng cho quá trình kết tinh. huE104.v1 và huE104.v2 khác biệt chỉ ở hai vị trí khung vernier, trong khi các HVR là đồng nhất. Vì vậy, huE104.v1 là vật thay thế tốt để làm sáng tỏ epitop liên kết của huE104.v2. Khả năng liên kết kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa huE104.v1 (xem Ví dụ 1) vào tryptaza beta 1 trưởng thành của người được nghiên cứu bằng cách sử dụng tinh thể học tia X để xác định cấu trúc của phức hợp phân tử giữa tryptaza và mảnh Fab huE104.v1 ở độ phân giải 3,0 angstrom (Å). Kết quả là một đơn vị không đối xứng tinh thể học chứa một tetrame tryptaza, được làm ổn định bằng cách tạo phức hợp với EGR-clometylketon tương tác với bốn Fab huE104.v1 theo cách mà mỗi Fab tương tác hầu như theo kiểu loại trừ với chỉ một protome tryptaza trong số các protome tryptaza (Hình 12A). Môi trường đóng gói tinh thể liên phân tử không bao gồm các khoảng trống lớn, và có số điểm tiếp xúc đóng gói tinh thể vừa phải là ít hơn 4Å. Ví dụ, hai miền VL của Fab huE104.v1 trải qua mức tiếp xúc 2 lần phi tinh thể học ở mặt dải β ABDE của chúng, bao gồm các liên kết H từ chuỗi Thr và chuỗi Ser và các phần tương tự. Một vùng nhỏ hơn có một vài điểm tiếp xúc liên phân tử tồn tại giữa miền hằng định chuỗi nặng (gần liên kết peptit vào miền biến đổi của cùng một chuỗi) và "đáy" của miền hằng định chuỗi nhẹ liền kề. Có

nhiều gốc hơn ở các điểm tiếp xúc đóng gói dùng cho các Fab (trung bình 12) so với dùng cho các protome tryptaza (trung bình 3,5), mặc cho các protome tryptaza có nhiều gốc hơn (243 so với xấp xỉ 215). Theo nghĩa này, các tinh thể được tạo thành ít nhất một phần thông qua điểm tiếp xúc liên phân tử Fab-Fab.

Ba bản sao của Fab huE104.v1 đã thể hiện các góc khuỷu tương tự ở mức sát sao (các góc giữa các miền biến đổi (VH và VL) và các miền hằng định (CH và CL) là 140°, 138° và 141°. Bản sao thứ tư của Fab huE104.v1 được xác định đặc tính bằng mật độ điện tử kém tương đối đối với vùng hằng định của nó và đã thể hiện góc khuỷu là 152°. Diện tích bề mặt liên kết kháng nguyên kháng thể (paratop), được tính toán ở dạng diện tích bề mặt có thể tiếp cận được bởi dung môi bị mất (Adams et al. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66:213-221, 2010) cho điểm tiếp xúc với protome tryptaza, trung bình 682 $Å^2$ và bị áp đảo bởi chuỗi nặng, 71% so với 29% của chuỗi nhẹ. Thống kê về tính bổ trợ hình dạng (Lawrence et al. *J. Mol. Biol.* 234:946-950, 1993), Sc, được tính trung bình là 0,76, phần này là ở trên đầu mút cao của các kháng thể có các kháng nguyên protein. Độ phân giải của kết quả của chúng tôi thì quá thấp nên không nhận ra cấu trúc nước được, nhưng các trị số Sc cho thấy chắc chắn là có rất ít nước mặt phân giới. Cách sử dụng các dạng khống chế tính đối xứng phi tinh thể học (NCS) đã tạo ra các phương pháp tinh chỉnh ưu việt theo trị số của R-tự do. Căn bậc hai của độ lệch bình phương trung bình (root-mean-squared deviation-RMSD) của mức xếp chồng của các nguyên tử Cα của miền Fab (VL, CL, VH hoặc CH1) là khoảng một phần mười của angstrom.

Các gốc kháng thể trong phạm vi 4Å của tryptaza đối tác của chúng là tương tự ở mức sát sao đối với bốn bản sao và bao gồm: các gốc chuỗi nhẹ Y29, N30, R32 (HVR-L1), R94 (HVR-L3) và các gốc chuỗi nặng G31, Y32 (HVR-H1), S52, S53, A54, T56, F58 (HVR-H2) và P96, R97, G98, Y99, R100e (HVR-H3).

Mỗi Fab huE104.v1 tiếp xúc vùng tương tự ở mức sát sao của protome tryptaza đối tác. Epitop này là xấp xỉ 90° cách xa với rãnh liên kết chất nền vị trí có hoạt tính, và đặt mỗi Fab nhô ra vuông góc từ mặt phẳng của tetrame tryptaza phẳng gần như vuông. Vì các protome tryptaza kết hợp theo phương thức lên/xuống/lên/xuống quanh vòng tryptaza, có hai Fab nhô "lên" khỏi tetrame và hai Fab nhô "xuống" (Hình 12A).

Đơn vị không đối xứng tinh thể học (asu) bao gồm 4 protome tryptaza được tổ chức thành tetrame gần như đối xứng. Bốn protome tryptaza thì mỗi protome tryptaza

được cải biến theo kiểu cộng hóa trị ở vị trí có hoạt tính (từ phương pháp điều trị bằng cách sử dụng Glu-Gly-Arg-clometyl keton) và xếp chồng bằng rmsd theo từng cặp dựa trên các nguyên tử Cα là khoảng 0,1Å. Nếu mỗi protome là trong phạm vi 4Å của chỉ một Fab trong số bốn Fab theo asu, thì sẽ có thể xác định bốn epitop của huE104.v1, một đối với mỗi protome tryptaza, và, thiếu tính đối xứng nghiêm ngặt, bốn epitop này có thể hơi khác biệt. Có một ít gốc tryptaza mà trong phạm vi 4Å của Fab mà không đem lại phần lớn tương tác với nó, trong bản mô tả này được gọi là "Fab không đối tác". Vì điều này là đúng, nên cũng có thể xác định epitop huE104.v1 đối với tetrame tryptaza.

Chương trình PyMOL được sử dụng để nhận diện epitop, trong Ví dụ này, đây là tập hợp gồm axit amin tryptaza mà trong phạm vi 4Å của nguyên tử bất kỳ của Fab huE104.v1. Các gốc axit amin ở các chuỗi polypeptit tryptaza có thể được đánh số theo sơ đồ đánh số chymotrypsinogen, như được mô tả trên đây (Hình 7). Các gốc tryptaza dưới đây được đặt tên theo sơ đồ đánh số chymotrypsinogen, có sơ đồ đánh số trình tự gen trong dấu ngoặc đơn.

Có 4 epitop được xác định giữa protome tryptaza và Fab đối tác của nó. Tất cả bốn epitop chứa một tập hợp gần như đồng nhất gồm các gốc axit amin tryptaza. Các gốc đó là: W38, Q50, D60e, L61, A62, R65, Q81, L82, L83, P84, V85, S86, R87, E107, L108, E109, và E110 (cách đánh số chymotrypsinogen, lần lượt tương ứng với các gốc W55, Q67, D82, L83, A84, R87, Q100, L101, L102, P103, V104, S105, R106, E126, L127, E128, và E129, bằng cách sử dụng sơ đồ đánh số trình tự gen, có các gốc tương ứng với các vị trí của SEQ ID NO: 71). Gốc L61 (L83 của SEQ ID NO: 71) là thiếu vắng đối với hai epitop trong số bốn epitop, nhưng chỉ vừa vượt quá tiêu chí 4Å. Gốc Q81 (Q100 của SEQ ID NO: 71) là thiếu vắng đối với một epitop trong số bốn epitop. Nếu điều này không phải vậy, thì tất cả bốn epitop sẽ là đồng nhất theo tiêu chí xác định.

Đồng thời, các Fab không đối tác tạo ra một số nhỏ các tiếp xúc 4Å ở tetrame. Chính các gốc tryptaza này phân biệt epitop tetrame với epitop protome. Các gốc tryptaza đã tiếp xúc là: Q20 và R187 (lần lượt là Q35 và R216 của SEQ ID NO: 71).

Vì vậy, epitop của huE104.v1 trên tetrame tryptaza là tổng của: 4 ví dụ về mỗi gốc trong số các gốc sau đây: W38, Q50, D60e, L61, A62, R65, L82, L83, P84, V85, S86, R87, E107, L108, E109 và E110 (cách đánh số chymotrypsinogen, lần lượt tương ứng với các gốc W55, Q67, D82, L83, A84, R87, L101, L102, P103, V104, S105, R106,

E126, L127, E128, và E129 của SEQ ID NO: 71), cộng với ba ví dụ về Q81 (Q100 của SEQ ID NO: 71), cộng với 1 ví dụ về Q20 (Q35 của SEQ ID NO: 71), cộng với ba ví dụ về R187 (R216 của SEQ ID NO: 71). Cần phải xem xét rằng các gốc epitop được mô tả trên đây cũng thường áp dụng cho các kháng thể được tạo ra từ E104 khác, bao gồm cả huE104.v2.

Mặc dù huE104.v1 và v2 có cùng trình tự CDR, và thường liên kết vào cùng một epitop, hai biến thể thể hiện một cách khác biệt ở Fab cũng như ở IgG: Fab huE104.v2 làm phân ly tetrame và cụ thể hơn là ở mặt phân giới nhỏ, trong khi Fab huE104.v1 thì không; và ở IgG, huE104.v2 làm phân ly và làm bất hoạt tetrame, trong khi huE104.v1 mất hoạt tính ức chế ở tỷ lệ giữa kháng thể và tryptaza cao. Chúng tôi đã giả thuyết rằng mặc dù huE104.v1 và huE104.v2 liên kết vào cùng gốc tiếp xúc trên tryptaza, nhưng những khác biệt tinh tế vẫn tồn tại giữa cách chúng tương tác với tryptaza. Để nhận diện những chênh lệch về mức tương tác giữa Fab huE104.v1 và Fab huE104.v2 với tryptaza trong dung dịch, các thử nghiệm HDX được thực hiện với chỉ một mình tryptaza dạng monome hoặc đã được liên kết vào huE104.v1 hoặc huE104.v2, và mức độ trao đổi hydro-dơteri qua thời gian được theo dõi bằng phép đo phổ khối. Trong khi phương pháp này đưa ra thông tin có tính chỉ báo về epitop liên kết của huE104.v1 và huE104.v2, thì về tổng thể, phương pháp này cũng theo dõi những thay đổi về động lực học cấu trúc mà có thể xảy ra cách xa với epitop liên kết kháng thể. Các lần đo này không phân biệt giữa những thay đổi về hình thể khổ lớn so với những thay đổi về tính ổn định năng lượng của một hình thể cụ thể.

Các liên kết amit mà thể hiện mức trao đổi chậm hơn ở tryptaza khi huE104.v1 hoặc huE104.v2 được liên kết là nằm về phía các vùng của các gốc 25-27, 60-61, 66-68, 88 và 108-110 (cách đánh số chymotrypsinogen; Bảng 10), nhưng các liên kết amit mà thể hiện mức trao đổi chậm hơn mà đặc hiệu chỉ với huE104.v1 hoặc huE104.v2 mà thôi cũng đã được phát hiện ra. Ví dụ, các liên kết amit của các gốc tryptaza 47-50, 54-55, 85-87, 119-122, 179, 230-231, và 244-245 (cách đánh số chymotrypsinogen) đã thể hiện mức trao đổi chậm hơn chỉ khi huE104.v1 được liên kết. Mặt khác, các liên kết amit của các gốc tryptaza 25, 41-43, 81-81, và 160-162 đã thể hiện mức trao đổi chậm hơn chỉ khi huE104.v2 được liên kết (Bảng 10). Những chênh lệch lý thú hơn cả về mức trao đổi hydro chậm hơn là các liên kết amit của các gốc 81-83 (Q81, L82, và L83 theo

cách đánh số chymotrypsinogen, tương ứng với Q100, L101, và L102 của SEQ ID NO: 71) ở tryptaza, phần này chỉ thể hiện mức trao đổi chậm hơn khi huE104.v2 được liên kết. Vùng này là đặc biệt thú vị vì nó là một phần của vòng mà trong đó hai gốc tiếp xúc quan trọng (Y74 và Y75) của mặt phân giới nhỏ cư trú. Các gốc tryptaza 81-83 cũng ở trạng thái tiếp xúc trực tiếp với HVR-H2 của huE104.v1, như được nhìn thấy ở phức hợp cấu trúc tinh thể với tryptaza dạng tetrame, nhưng theo các kết quả HDX, cần phải xem xét rằng vùng này phải tạo ra quá trình tương tác mạnh hơn và có lẽ khác với huE104.v2 so với đối với quá trình tương tác của huE104.v1 với tryptaza. Những thay đổi hình thể của khung chính-Cα vòng 80s và các chuỗi bên có thể ảnh hưởng đến hình thể của Y74 và Y75, điều này là cốt yếu đối với mặt phân giới nhỏ kỵ nước giữa hai protome tryptaza trong phức hợp tetrame. Vì mặt phân giới này là đối xứng, nên các gốc Y74 và Y75 từ cả hai protome tương tác đều bị ảnh hưởng khi huE104.v2 được liên kết vào mỗi protome, hiện tượng này thường khuếch đại những thay đổi bất kỳ và tính không ổn định của mặt phân giới này.

Như được đề cập trên đây, những chênh lệch giữa huE104.v1 và huE104.v2 là các gốc khung vernier V71R và F78V. Trước đó, đã được ghi nhận rằng những thay đổi gốc khung ở vị trí 71 trong chuỗi nặng của các kháng thể ảnh hưởng đến hình thể của HVR-H2. Các thử nghiệm lập mô hình về HVR-H2 ở huE104.v1 và huE104.v2 xác nhận điều này là đúng như vậy (dữ liệu không được thể hiện). Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, những thay đổi ở cả hai gốc vernier có thể ảnh hưởng đến hình thể của HVR-H2 sao cho quá trình tương tác với các gốc tryptaza 81 đến 83 khác biệt và chuyển đổi thành những thay đổi của mặt phân giới nhỏ của tetrame. Ngoài ra, các liên kết amit tryptaza của các gốc R69 và E70 (cách đánh số chymotrypsinogen), phần này là ở trạng thái ở gần sát sao về mặt cấu trúc, cũng thể hiện HDX chậm hơn chỉ khi huE104.v2 được liên kết. Phát hiện này sẽ tạo ra những thay đổi cho vòng 70s, phần này cấu thành một phần đáng kể của mặt phân giới nhỏ, thậm chí là chắc chắn hơn.

Khi so sánh các vùng của HDX chậm hơn do quá trình liên kết Fab với các gốc tryptaza trong phạm vi 4Å của Fab E104.v1 như được nhìn thấy ở cấu trúc tinh thể, đã quan sát thấy mức độ chồng lấn cao giữa cả hai phương pháp, nhận diện các gốc epitop liên kết ở vòng 20s, 40s, 60s, 80s và 100 (Bảng 10). Các vùng khác được nhận diện bằng HDX, như các vị trí trong 110s, 160s, 179, 230s và vùng 245 của trình tự tryptaza sơ

cấp, là không ở trong trạng thái tiếp xúc trực tiếp với kháng thể theo cấu trúc tinh thể, nhưng thể hiện hiện tượng giảm về động lực học hình thể khi có mặt huE104.v1 và huE104.v2.

Bảng 10: Các liên kết amit của các gốc tryptaza mà thể hiện HDX chậm hơn khi đã được liên kết vào huE104.v1 hoặc huE104.v2

Các gốc tryptaza bị ảnh hưởng (cách đánh số chymotrypsinogen)		
huE104.v1	**huE104.v2**	**Các gốc tiếp xúc trong cấu trúc tinh thể**
26-27	25-27	25-29
-	-	38
-	41-43	40-41
47-50	-	50
54-55	-	-
-	-	-
60-61	60-61	60-62
66-68	66-70	65
-	81-83	81-87
85-88	88	-
108-110	108-110	107-110
119-122	-	-
-	160-162	-
179	-	-
230-231	-	-
-	-	-
244-245	-	-

Để tổng kết các dữ liệu này, huE104.v1 và huE104.v2 có cùng trình tự HVR và cùng gốc tiếp xúc trên tryptaza beta 1 của người. Tuy nhiên, dựa trên các nghiên cứu HDX, những khác biệt tinh tế về cách hai kháng thể này liên kết vào đích được phát

hiện. V71 và F78 trong vùng FR3 chuỗi nặng của huE104.v1 được thể hiện ở Hình 12B. Như được thể hiện ở hình này, V71R và F78V trong vùng FR3 của chuỗi nặng ở huE104.v2 có thể đã ảnh hưởng đến vị trí của HVR-H2 và khả năng liên kết của HVR-H2 vào tryptaza, được minh chứng bằng HDX chậm hơn trong vùng Q81, L82, và L83 (cách đánh số chymotrypsinogen) khi huE104.v2 được liên kết. Các gốc Q81, L82 và L83 đã thể hiện HDX chậm hơn khi huE104.v2 được liên kết vào tryptaza so với tryptaza chưa được liên kết. Kết quả là, quá trình tương tác kỵ nước của Y75 với protome lân cận được làm suy yếu. Kháng thể huE104.v1 có V ở vị trí 71 và F ở vị trí 78 (như trong dạng ghép VH_{IV}). Trong ngữ cảnh này, HVR-H2 được trình bày một cách hơi khác biệt, và tác dụng của quá trình liên kết E104.v1 vào tryptaza, mặc dù ở cùng gốc tiếp xúc, hơi khác biệt về hiện tượng phân ly của mặt phân giới nhỏ, so với E104.v2.

Nói tóm lại, IgG và Fab của hu31A.v11 đều làm phân ly tetrame tryptaza. Cả IgG và Fab huE104.v2 cũng đều làm phân ly tetrame tryptaza. IgG huE104.v1, nhưng không phải Fab, có khả năng làm phân ly tetrame tryptaza. Tuy nhiên, IgG huE104.v1 ở tỷ lệ giữa kháng thể và tetrame cao mất hoạt tính ức chế. Nhiều hơn một Fab hu31A.v11 liên kết vào cùng một tetrame thường gây ra điểm đối nghịch không gian, trong khi các Fab huE104.v2 liên kết vào cùng một tetrame thì không. Vì vậy, vùng bản lề của IgG1 hoặc IgG4 có thể đóng một vai trò nào đó trong việc định hướng hai Fab của IgG huE104.v1 và tạo ra đủ sức căng mà đem lại hiện tượng phân ly của tetrame (dữ liệu không được thể hiện). Tuy nhiên, ở tỷ lệ giữa kháng thể và tetrame cao, IgG huE104.v1 càng chắc chắn là liên kết vào tetrame trong vai trò là chất kết dính có hóa trị một, tức là, Fab, và mất hoạt tính ức chế.

C. hu31A.v11 và huE104.v2 cạnh tranh để liên kết vào tryptaza beta 1 của người

Epitop của hu31A.v11 được xác định bằng tinh thể học tia X về cơ bản chồng lấn với epitop của huE104.v1 và huE104.v2. Tiếp theo, chúng tôi đã xác định xem liệu hu31A.v11 và huE104.v2 có cạnh tranh để liên kết vào tryptaza beta 1 của người hay không bằng phương pháp phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng. Phương pháp phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng được thực hiện bằng cách sử dụng Hệ thống RED384 OCTET® (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA, Mỹ). Nói một cách vắn gọn, protein monome tryptaza βbeta 1 của người được biotin

hóa ở gốc Lys bằng cách phản ứng với NHS-PEG4-biotin. Monome đã được biotin hóa được pha loãng đến 5µg/ml trong dung dịch đệm động học (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA, Mỹ) và được làm bất động lên trên các mũi cảm biến streptavidin (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA, Mỹ). Sau bước làm bất động, thiết bị cảm biến đã được làm bất động vào tryptaza beta 1 của người được làm bão hòa bằng kháng thể thứ nhất, được pha loãng ở mức 10-20µg/ml, sau đó là quá trình liên kết với kháng thể thứ hai được pha loãng ở mức 2,5µg/ml. Tín hiệu liên kết bởi kháng thể thứ hai nói lên rằng hai kháng thể này có thể liên kết kháng nguyên một cách đồng thời ở các epitop không chồng lấn khác biệt, trong khi đó không có tín hiệu liên kết nói lên rằng chúng chia sẻ một epitop chung. Phần mềm phân tích dữ liệu Forte Bio 8.1 được sử dụng để tạo ra cơ chất phân loại kháng thể theo khả năng liên kết epitop theo thùng.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 11 dưới đây chứng minh rằng đã không phát hiện ra tín hiệu liên kết phụ thêm nào bằng cách sử dụng huE104.v2 làm kháng thể thứ nhất và hu31A.v11 làm kháng thể thứ hai hoặc ngược lại. Một trong hai kháng thể được bổ sung sau dung dịch đệm đã đem lại hiện tượng liên kết phụ thêm. Vì vậy, hai kháng thể cạnh tranh để liên kết vào tryptaza beta 1 của người.

Bảng 11: hu31A.v11 và huE104.v2 cạnh tranh để liên kết vào tryptaza beta 1 của người

Kháng thể thứ 1	Kháng thể thứ 2	
	IgG4 hu31A.v11	IgG4 huE104.v2
IgG4 huE104.v2	-0,0086	-0,0083
IgG4 hu31A.v11	-0,0205	0,011
Dung dịch đệm	0,423	0,514

Ví dụ 4: Phép phân tích dược động (PK) về các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa

Để đánh giá các đặc điểm dược lực học (PK) của các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa, các kháng thể IgG4 huE104.v2 hoặc IgG4 hu31A.v11 được cho dùng bằng phương pháp tiêm trong tĩnh mạch (IV) ở mức 1 hoặc 10mg/kg đối với các

con chuột C57BL/6, n = 3. Nồng độ của IgG4 kháng gD, IgG4 hu31A.v11 kháng tryptaza, hoặc IgG4 huE104.v2 kháng tryptaza trong huyết thanh chuột C57-BL6 được xác định bằng ELISA dược động globulin miễn dịch chung bằng cách sử dụng IgG của cừu kháng của người (The Binding Site; San Diego, CA) dùng cho quá trình bắt và IgG của cừu kháng của người được tiếp hợp vào HRP (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), dùng cho quá trình phát hiện. Tính nhạy cảm thử nghiệm là 15,6ng/ml trong huyết thanh. Các kháng thể IgG4 huE104.v2 và hu31A.v11 đã biểu hiện PK tương tự, đặc trưng bởi PK tuyến tính và tỷ lệ với liều lượng xuyên suốt khoảng liều lượng được kiểm tra (Hình 13 và Bảng 12). Ngoài ra, cả hai kháng thể đã có mức thanh thải tương đối thấp (~5ml/ngày/kg), cho thấy rằng cả hai kháng thể thể hiện tốt sau khi cho dùng liều lượng đơn lẻ và tốt trong phạm vi khoảng được chấp nhận. Trong các thử nghiệm khác, IgG1 huE104.v2 đã thể hiện theo cách tương tự với Kháng thể IgG4 huE104.v2 và kháng thể IgG4 hu31A.v11 (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 12: Phép phân tích PK về các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa ở chuột

IgG4 kháng Tryptaza	**Liều lượng**	**AUC_{last} (ngày •µg/ml)**	**Mức thanh thải (ml/ngày/kg)**	**C_{max} (µg/ml)**
huE104.v2	1mg/kg	127	5,00	21,6
huE104.v2	10mg/kg	1400	5,12	242
hu31A.v11	1mg/kg	155	4,74	25,8
hu31A.v11	10mg/kg	1750	4,54	251

Các đặc điểm PK của các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa cũng được đánh giá ở khỉ đuôi dài (cyno) đực, n=3. Kháng thể đối chứng (kháng gD), IgG4 huE104.v2, hoặc IgG4 hu31A.v11 được cho dùng bằng phương pháp tiêm trong tĩnh mạch (IV) ở 30mg/kg (Hình 14 và Bảng 13). Nồng độ của IgG4 kháng gD, IgG4 hu31A.v11 kháng tryptaza, hoặc IgG4 huE104.v2 kháng tryptaza trong huyết thanh khỉ đuôi dài được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch XP Gyrolab gồm quá trình bắt IgG của dê kháng của người được tiếp hợp vào biotin (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) và quá trình phát hiện Fc của chuột kháng của người được tiếp hợp vào Fluor 647

Alexa® (R10Z8E9). Tính nhạy cảm thử nghiệm là 41ng/ml trong huyết thanh. Bảng 13 thể hiện diện tích dưới đường cong (AUC), mức thanh thải (CL), C_{max}, và thời gian bán hủy ($T_{1/2}$). hu31A.v11 đã biểu hiện dược động học tương tự với kháng thể kháng gD đối chứng. Mức thanh thải (CL) thấp là xấp xỉ 3ml/ngày/kg và $T_{1/2}$ là khoảng 15 ngày là tốt trong phạm vi khoảng có thể chấp nhận được.

Bảng 13: Phép phân tích PK về các kháng thể kháng tryptaza được nhân tính hóa ở cyno (n=3)

Nhóm	**AUC (ngày •µg/ml)**	**CL (ml/ngày/kg)**	**C_{max} (µg/ml)**	**$T_{1/2}$ (ngày)**
Kháng gD	11100 ± 1220	2,73 ± 0,285	972 ± 68,8	14,1 ± 1,37
hu31A.v11	10700 ± 3530	2,99 ± 0,855	805 ± 72,3	14,9 ± 5,95
huE104.v2	7910 ± 2270	3,98 ± 1,00	808 ± 48,9	11,5 ± 4,43

Ví dụ 5: Tạo dạng chế phẩm kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 để làm giảm mức oxy hóa Trp100 của HVR-H3 (W100)

Trong khi đánh giá cả kháng thể hu31A.v11 và kháng thể huE104.v2, đã khám phá ra được một cách đầy bất ngờ rằng gốc Trp100 của VH có mặt trong vùng HVR-H3 của hu31A.v11 (Hình 1) là dễ bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa, ví dụ, sau tình trạng phơi nhiễm 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydroclorua (AAPH) (còn được gọi là "tình trạng căng thẳng AAPH") hoặc ánh sáng môi trường xung quanh ("tình trạng căng thẳng ánh sáng môi trường xung quanh"). Sự oxy hóa này có thể được xem là không thích hợp trong ngữ cảnh về kháng thể trị liệu. Tuy nhiên, gốc Trp100 được phát hiện là quan trọng đối với quá trình liên kết hu31A.v11 vào tryptaza, cũng như đối với hoạt tính ức chế. Ví dụ, như được mô tả dưới đây, quá trình gây đột biến Trp100 để giảm nhẹ mức oxy hóa đã đem lại các biến thể có ái lực liên kết và hoạt tính ức chế giảm. Do đó, mức oxy hóa hu31A.v11, cụ thể là ở W100 HVR-H3, được giảm nhẹ bằng cách sử dụng các

dạng chế phẩm chứa tá dược chống oxy hóa, ví dụ, N-axetyltryptophan và/hoặc metionin.

Tác dụng của tình trạng căng thẳng AAPH và sự oxy hóa W100 HVR-H3 của hu31A.v11 (tức là, gốc tryptophan ở vị trí 100 của miền VH, xem Hình1) đối với khả năng liên kết tryptaza và hoạt tính ức chế được đánh giá. Mẫu được tạo dạng chế phẩm trong AAPH 1mM trong 16 giờ ở 40°C. Trong các điều kiện này, đã có mức tăng 75% về mức oxy hóa W100 (mức oxy hóa tính theo phần trăm). Kháng thể đã được gây căng thẳng được tiêu hóa bằng trypsin và các peptit đã được tiêu hóa được tiến hành UHPLC-HRMS (sắc ký lỏng hiệu suất siêu cao-phép đo phổ khối độ phân giải cao) để xác định tỷ lệ phần trăm của mức oxy hóa tryptophan. Nói một cách vắn gọn, mẫu 250µg của hu31A.v11 được khử bằng DTT 20mM trong guanidin hydroclorua 6M, Tris 360mM, và EDTA 2mM ở độ pH 8,6 trong 1 giờ. Mẫu đã được khử được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và được alkyl hóa bằng cách sử dụng axit iotaxetic 1M (nồng độ cuối, 50mM) trong 15 phút trong bóng tối. Sau đó, mẫu này được trao đổi dung dịch đệm vào dung dịch đệm tiêu hóa (Tris 25mM, $CaCl_2$ 2mM, độ pH 8,2). Mẫu đã được trao đổi dung dịch đệm được tiêu hóa bằng trypsin trong 4 giờ ở 37°C bằng cách sử dụng tỷ lệ giữa enzym và kháng thể là 1:40 (trọng lượng/trọng lượng). Quá trình tiêu hóa được ngừng lại bằng việc bổ sung axit formic 100% đến nồng độ cuối là 3,0%.

10µg của các peptit trypsin được bơm vào Nước 2,1 x 150mM, cột Acquity UPLC® CSH C18 có hạt 1,7µm, 130Å, chạy ở tốc độ dòng chảy là 0,2ml/phút ở 77°C được liên hợp với hệ thống phổ khối kế Q Exactive có gradien sau đây: B 1% (axit formic 0,1% trong axetonitril) ở thời điểm 0-2 phút; B 13% ở thời điểm 7 phút; B 35% ở thời điểm 42 phút; B 85% 44-46 phút; B 1% 46,1 phút. Q Exactive được vận hành theo chế độ phụ thuộc dữ liệu, thu gom mức quét MS đầy đủ từ 200–2000 *m/z* ở độ phân giải 35.000, và đích kiểm soát độ lợi tự động (AGC) là $1x10^6$. 8 ion dồi dào hơn cả cho mỗi lần quét được chọn lựa cho MS nối tiếp ở độ phân giải 17.500 và đích AGC là $1x10^5$. Sự định lượng tương đối về mức oxy hóa W100 được tạo ra như sau: (1) Diện tích đỉnh được tính toán bằng cách tính tích phân các phổ sắc ký ion được trích xuất của ba chất đồng vị dồi dào hơn cả hàng đầu từ các trạng thái điện tích có độ phong phú tương đối là 10% trở lên của peptit trypsin nguyên thể và các loại tương đương được oxy hóa của nó. (2) Lấy tổng diện tích đỉnh đã được oxy hóa chia cho tổng lượng của

diện tích đỉnh được oxy hóa và diện tích đỉnh nguyên thể và nhân với 100 để thu được mức oxy hóa tính theo phần trăm.

Các kết quả trong Bảng 14 thể hiện rằng tình trạng căng thẳng AAPH đã làm giảm khả năng liên kết hu31A.v11 vào monome tryptaza như được đo bằng phép phân tích SPR BIACORE® (Bảng 14). Cũng đã quan sát thấy hiện tượng liên kết giảm đối với khả năng liên kết vào tetrame tryptaza. Ngược lại, khả năng liên kết huE104.v2 vào tetrame và monome tryptaza không bị ảnh hưởng bởi tình trạng căng thẳng AAPH (Bảng 14). Ngoài ra, tình trạng căng thẳng AAPH đã làm giảm hoạt tính của hu31A.v11 trong thử nghiệm hoạt tính enzym tryptaza in vitro là khoảng 5 lần, trong khi đó hoạt tính ức chế của huE104.v2 không bị ảnh hưởng (dữ liệu không được thể hiện). Nói tóm lại, sau tình trạng căng thẳng AAPH, IgG4 hu31A.v11, kháng thể này đã có mức oxy hóa 75% ở W100 HVR-H3, đã thể hiện K_D cao hơn xấp xỉ 6 lần (tức là, ái lực giảm) (có Rmax 35%), và mức tăng 5 lần về IC50 (tức là, giảm về độ công hiệu). Rmax biểu lộ đáp ứng tối đa trong thử nghiệm SPR BIACORE®, và sự giảm về Rmax phản ánh sự việc thực tế là ít kháng thể đã được gây căng thẳng bằng AAPH hơn đã được liên kết vào tryptaza. Ngược lại, tình trạng căng thẳng AAPH có tác dụng tối thiểu, nếu có, đối với khả năng liên kết và độ công hiệu của IgG4 huE104.v2.

Bảng 14: Tình trạng căng thẳng AAPH làm giảm khả năng liên kết hu31A.v11 vào tryptaza

Mẫu	**Tryptaza Beta 1**	**K_{on} (1/Ms)**	**K_{off} (1/s)**	**K_D (M)**
đối chứng hu31A.v11	Monome	5,976E5	1,328E-4	2,222E-10
hu31A.v11 AAPH	Monome	6,076E5	7,978E-4	1,313E-9
đối chứng huE104.v2	Monome	5,846E5	1,861E-4	3,183E-10
huE104.v2 AAPH	Monome	6,795E5	1,535E-4	2,260E-10

Theo một phương pháp để làm giảm mức oxy hóa HVR-H3, các kháng thể biến thể có các dạng thay thế ở W100 HVR-H3 được sản xuất, và khả năng liên kết của các biến thể này vào monome tryptaza beta 1 được đánh giá (Bảng 15). Gốc W100 của hu31A.v11 được gây đột biến thành phenylalanin (F), tyrosin (Y), valin (V), leuxin (L), hoặc arginin (R). Đáng ngạc nhiên là, tất cả các biến thể đã thể hiện khả năng liên kết giảm vào monome tryptaza beta 1. Biến thể W100F của hu31A.v11 đã có ái lực cao nhất đối với monome tryptaza beta 1 so với các biến thể khác, nhưng đã biểu hiện tỷ lệ phân ly (K_{off}) nhanh hơn xấp xỉ 100 lần so với hu31A.v11 loại hoang dại, có tỷ lệ kết hợp tương tự (K_{on}) (Bảng 15). Hơn nữa, các biến thể này là thấp kém so với hu31A.v11 WT về phương diện hoạt tính ức chế (Bảng 15). Đối với một số biến thể trong số các biến thể này, hoạt tính ức chế về cơ bản bị mất (ví dụ, đối với W100R, W100L, và W100V). Các biến thể W100Y và W100F của hu31A.v11 đã ức chế tryptaza beta 1 của người, nhưng có các trị số IC50 được làm tăng xấp xỉ 2 lần đến 3 lần (tức là, hoạt tính giảm) so với hu31A.v11 WT. Trong Bảng 15, "nd" biểu lộ là không thể phát hiện được hoặc trên 1μM.

Bảng 15: Tác dụng của các biến thể W100 của hu31A.v11 đối với ái lực liên kết vào monome tryptaza beta 1 và IC50 so với hu31A.v11 loại hoang dại (ở dạng mức tăng gấp mấy lần)

	hu31A.v11 (W100)	hu31A.v11 W100F	hu31A.v11 W100Y	hu31A.v11 W100V	huE104.v2 W100L	huE104.v2 W100R
K_D	1	80	234	821	2411	54
IC50	1	2,5	3,46	nd	nd	nd

Như được mô tả trên đây, các nghiên cứu cấu trúc đã biểu lộ rằng W100 HVR-H3 tạo ra nhiều tương tác với tryptaza, bao gồm cả quá trình tương tác với R65 của tryptaza (cách đánh số chymotrypsinogen), phần này được xác định là một phần của các gốc tiếp xúc của hu31A.v11 (xem Hình 8). Trp ở vị trí 100 được xem là tương tác với

tryptaza đến một mức độ lớn hơn so với Phe ở thể đột biến W100F, đem lại ái lực liên kết cao hơn và hoạt tính ức chế công hiệu hơn.

Xem xét đến ái lực và hoạt tính ức chế giảm của hu31A.v11 có sự oxy hóa ở W100 HVR-H3, cũng như sự quan trọng của W100 trong việc ức chế tryptaza, như được thể hiện trên đây, chúng tôi theo đuổi một chiến lược thay thế khác để giảm nhẹ mức oxy hóa ở W100. Khả năng của các tá dược chống oxy hóa trong việc làm giảm mức oxy hóa W100 được xác định. Trong một ví dụ, mẫu được tiến hành phương pháp AAPH 5mM trong 24 giờ ở 40°C, có hoặc không có các tá dược chống oxy hóa làm ví dụ, tức là, N-axetyltryptophan (NAT) 0,3mM và metionin (Met) 5mM trong dạng chế phẩm chứa polysorbat 20 0,02%, arginin suxinat 200mM (độ pH 5,5), và 150mg/ml của kháng thể hu31A.v11. Mức oxy hóa của W100 CDR H3 và độ công hiệu của kháng thể được đo dựa trên thử nghiệm enzym S-2288 tạo màu. Dữ liệu trong Bảng 16 dưới đây thể hiện rằng trong thử nghiệm này, tình trạng căng thẳng AAPH đã đem lại mức oxy hóa 38% ở W100 của IgG4 hu31A.v11, điều này dẫn đến hiện tượng mất độ công hiệu là 32% so với mẫu kháng thể không được gây căng thẳng, đối chứng (n=2). Chế phẩm kháng thể trong dạng chế phẩm chứa NAT 0,3mM và Met 5mM đã thể hiện mức oxy hóa giảm từ 38% xuống 26 %, và hiện tượng mất độ công hiệu giảm từ 32% xuống 21% (n=2). Vì vậy, dạng chế phẩm chứa các tá dược chống oxy hóa như NAT và Met đã làm giảm mức oxy hóa do AAPH kích thích ở W100 và đã phục hồi độ công hiệu của kháng thể. Trong một ví dụ tách biệt, mẫu được tiến hành bằng điều kiện căng thẳng ánh sáng môi trường xung quanh (60 giờ ở mức 5000 Lux/giờ, đây là điều kiện căng thẳng nhẹ hơn so với AAPH) trong cùng một dạng chế phẩm có hoặc không có các tá dược chống oxy hóa. Điều kiện căng thẳng ánh sáng môi trường xung quanh nhẹ này đã đem lại mức oxy hóa 6% ở W100, và sự có mặt của các tá dược còn làm giảm mức oxy hóa (Bảng 16). Mức oxy hóa được kích thích bởi quá trình căng thẳng do ánh sáng môi trường xung quanh kích thích đã không ảnh hưởng đến độ công hiệu của kháng thể.

Bảng 16: Tác dụng của dạng chế phẩm chất chống oxy hóa đối với sự oxy hóa hu31A.v11

Mô tả về mẫu	Độ công hiệu tương đối trung bình, (hiện tượng mất độ công hiệu) (n=2)	Mức oxy hóa W100 HVR-H3
mẫu AAPH 5mM, không có NAT/MET	68% (32%)	38%
mẫu AAPH 5mM, NAT 0,3mM/MET 5mM	79% (21%)	26%
Mẫu được gây căng thẳng bằng ánh sáng, không có NAT/MET	100% (0%)	6%

Nói tóm lại, các kết quả này thể hiện rằng W100 HVR-H3 của hu31A.v11 thì dễ bị ảnh hưởng bởi sự oxy hóa một cách đầy bất ngờ. Dữ liệu về quá trình gây đột biến đã thể hiện rằng W100 là quan trọng đối với ái lực liên kết và hoạt tính ức chế của kháng thể hu31A.v11, và không có biến thể nào trong số các biến thể được kiểm tra ở gốc này có ái lực hoặc hoạt tính ức chế có thể so sánh được với hu31A.v11 loại hoang dại. Các chất chống oxy hóa như NAT và Met có thể được sử dụng để giảm nhẹ mức oxy hóa bất ngờ được quan sát ở W100 HVR-H3 của hu31A.v11, ví dụ, trong các dạng chế phẩm kháng thể dược dùng cho việc điều trị các rối loạn (ví dụ, hen suyễn).

Ví dụ 6: Kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 ức chế hoạt tính tryptaza in vivo

A. Các chất liệu và phương pháp

(i) Thử nghiệm ELISA tryptaza có hoạt tính ở cyno

Nồng độ của tryptaza (tetrame) có hoạt tính của khỉ đuôi dài (cyno) trong mẫu sinh học, ví dụ, chất lưu súc rửa phế quản-phế nang (BAL), được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Kháng thể đơn dòng nhận biết tryptaza D1 của cyno được sử dụng làm kháng thể bắt. Tryptaza D1 tái tổ hợp có hoạt tính của cyno được sử dụng làm chất liệu nguồn dùng cho việc chuẩn bị các tiêu chuẩn thử nghiệm. Các tiêu chuẩn thử nghiệm, đối chứng, và mẫu đã được pha loãng được ủ bằng chất ức chế trypsin đậu tương

500µg/ml (SBTI; Số hiệu theo Danh mục Sigma: 10109886001) trong 10 phút và sau đó, được đánh dấu bằng mẫu dò trên cơ sở hoạt tính (ABP; G0353816) trong 1 giờ. Xem tài liệu: Pan et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:2882-85, 2006. SBTI được sử dụng để liên kết vào vị trí có hoạt tính ở monome, điều này làm giảm mức nền tảng bất kỳ do monome có hoạt tính gây ra, một loại mà có thể hình thành trong các điều kiện in vitro cụ thể. SBTI không có khả năng liên kết vào vị trí có hoạt tính khi tryptaza này ở hình thể tetrame. Chất ức chế phân tử nhỏ tryptaza (G02849855) được bổ sung trong 20 phút để làm ngừng quá trình đánh dấu ABP. Kháng thể làm phân ly tetrame (ví dụ, IgG4 hu31A.v11) được bổ sung trong 10 phút để làm phân ly cả tetrame được đánh dấu bằng ABP và tetrame không được đánh dấu. Hỗn hợp này được bổ sung vào đĩa ELISA có kháng thể bắt trong 1 giờ, được rửa bằng 1x PBST, và được ủ bằng chất phản ứng SA-HRP (peroxidaza cải ngựa được tiếp hợp vào streptavidin, số hiệu theo danh mục General Electric (GE): RPN4401V) trong 2 giờ. Tín hiệu so màu được tạo ra bằng cách áp dụng chất nền HRP, tetrametylbenzidin (TMB), và phản ứng được ngừng lại bằng cách bổ sung axit phosphoric. Các đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa SpectraMax® M5 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA) bằng cách sử dụng 450nm dùng cho độ hấp thụ phát hiện và 650nm dùng cho độ hấp thụ tham chiếu. Thử nghiệm đã có khoảng có thể ghi nhận được là 20-0,04ng/ml (trong lỗ), và nồng độ có thể định lượng được tối thiểu của thử nghiệm (MQC) được xác định là 0,08ng/ml trong dịch pha loãng với tỷ lệ 1:2 của BAL của cyno. Mỗi mẫu cyno riêng biệt được sàng lọc ở một mức pha loãng đơn lẻ hai lần như nhau. Mẫu được thử nghiệm ở mức pha loãng tối thiểu mà rơi vào mức thấp hơn MQC được báo cáo là nhỏ hơn mức có thể ghi nhận được (LTR).

(ii) Thử nghiệm ELISA tryptaza tổng ở cyno

Nồng độ của tryptaza tổng của khỉ đuôi dài (cyno) trong mẫu sinh học, ví dụ, BAL, được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Kháng thể nhận biết tryptaza D1 của cyno được sử dụng làm kháng thể bắt. Kháng thể nhận biết tryptaza D1 của cyno mà không cạnh tranh với kháng thể làm phân ly tetrame để liên kết vào tryptaza D1 của cyno được sử dụng làm kháng thể phát hiện. Tryptaza D1 tái tổ hợp có hoạt tính của cyno được sử dụng làm chất liệu nguồn dùng cho việc chuẩn bị các tiêu chuẩn thử nghiệm. Kháng thể làm phân ly tetrame (ví dụ, hu31A.v11, IgG4) được bổ sung trong 10 phút vào các tiêu

chuẩn thử nghiệm, đối chứng, và mẫu được pha loãng để làm phân ly tetrame bất kỳ có mặt. Hỗn hợp này được bổ sung vào đĩa ELISA có kháng thể bắt trong 2 giờ và sau đó, được rửa bằng 1x PBST. Kháng thể phát hiện đã được biotin hóa được bổ sung trong 1 giờ. Tiếp theo, chất phản ứng SA-HRP được bổ sung trong 1 giờ. Tín hiệu so màu được tạo ra bằng TMB, và phản ứng được ngừng lại bằng cách bổ sung axit phosphoric. Các đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa SpectraMax® M5 bằng cách sử dụng 450nm dùng cho độ hấp thụ phát hiện và 650nm dùng cho độ hấp thụ tham chiếu. Thử nghiệm đã có khoảng có thể ghi nhận được là 20-0,02ng/ml (trong lỗ), và MQC thử nghiệm được xác định là 0,08ng/ml trong dịch pha loãng với tỷ lệ 1:2 của BAL của cyno. Mỗi mẫu cyno riêng biệt được sàng lọc ở một mức pha loãng đơn lẻ hai lần như nhau. Mẫu được thử nghiệm ở mức pha loãng tối thiểu mà rơi vào mức thấp hơn MQC được báo cáo là nhỏ hơn mức có thể ghi nhận được (LTR).

(iii) Thử nghiệm ELISA tryptaza có hoạt tính của người

Nồng độ của tryptaza (tetrame) có hoạt tính của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Dòng vô tính kháng thể đơn dòng của chuột B12 nhận biết tryptaza của người và có khả năng làm phân ly tetrame tryptaza được sử dụng làm kháng thể bắt (Fukuoka et al. *trên đây*). Các kháng thể khác mà liên kết tryptaza của người cũng có thể được sử dụng. Tryptaza 1 tái tổ hợp có hoạt tính của người được tinh chế và được sử dụng làm chất liệu nguồn dùng cho việc chuẩn bị các tiêu chuẩn thử nghiệm. Các tiêu chuẩn thử nghiệm, đối chứng, và mẫu đã được pha loãng được ủ bằng SBTI 500µg/ml trong 10 phút và sau đó, được đánh dấu bằng ABP (G0353816) trong 1 giờ. Chất ức chế phân tử nhỏ tryptaza (G02849855) được bổ sung trong 20 phút để làm ngừng quá trình đánh dấu ABP. Hỗn hợp này được bổ sung vào đĩa ELISA có kháng thể bắt trong 1 giờ, được rửa bằng 1x PBST, và được ủ bằng chất phản ứng SA-HRP trong 2 giờ. Tín hiệu so màu được tạo ra bằng cách áp dụng TMB, và phản ứng được ngừng lại bằng cách bổ sung axit phosphoric. Các đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa SpectraMax® M5 bằng cách sử dụng 450nm dùng cho độ hấp thụ phát hiện và 650nm dùng cho độ hấp thụ tham chiếu.

(iv) Thử nghiệm ELISA tryptaza tổng ở người

Nồng độ của tryptaza tổng của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Kháng thể (dòng vô tính B12) nhận biết tryptaza của người và có khả năng làm phân ly tetrame tryptaza được sử dụng làm kháng thể bắt. Kháng thể đơn dòng nhận biết tryptaza của người được sử dụng làm kháng thể phát hiện. Tryptaza 1 tái tổ hợp có hoạt tính của người được tinh chế và được sử dụng làm chất liệu nguồn dùng cho việc chuẩn bị các tiêu chuẩn thử nghiệm. Mẫu được bổ sung vào đĩa ELISA có kháng thể bắt trong 2 giờ và sau đó, được rửa bằng 1x PBST. Kháng thể phát hiện đã được biotin hóa được bổ sung trong 1 giờ. Tiếp theo, chất phản ứng SA-HRP được bổ sung trong 1 giờ. Tín hiệu so màu được tạo ra bằng cách áp dụng TMB, và phản ứng được ngừng lại bằng cách bổ sung axit phosphoric. Các đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa SpectraMax® M5 bằng cách sử dụng 450nm dùng cho độ hấp thụ phát hiện và 650nm dùng cho độ hấp thụ tham chiếu.

B. Các kết quả

Để đánh giá xem liệu các kháng thể kháng tryptaza như hu31A.v11 có hướng đích tryptaza *in vivo* và ức chế hoạt tính tryptaza có hoạt tính hay không, một thử nghiệm đã được phát triển để đo lượng của tryptaza có hoạt tính có mặt trong mẫu như chất lưu súc rửa phế quản-phế nang (BAL) (ví dụ, từ cyno) hoặc được lấy bằng một phương pháp ít xâm lấn hơn như sự hấp thụ qua màng nhầy mũi. Mẫu dò trên cơ sở hoạt tính, mẫu này bao gồm một chất đánh dấu (ví dụ, biotin), gốc liên kết, và nhóm có tính phản ứng mà phản ứng với tryptaza có hoạt tính được phát triển. Mẫu dò này liên kết một cách chọn lọc và theo kiểu cộng hóa trị vào tryptaza có hoạt tính. Xem tài liệu: Pan et al. *trên đây.* Dụng cụ này có thể được sử dụng để đo lượng của tryptaza có hoạt tính trong mẫu (Hình 15). Quy trình thu gom BAL bao gồm việc nhỏ dung dịch đệm vào khí đạo và việc thu hồi kế tiếp chất lưu đó (quy trình này có thể là có thể thay đổi được) và do đó, cần đến một nhân tử chuẩn hóa để so sánh mẫu xuyên suốt các thời điểm và các con vật. Bởi vì ure là phân tử nhỏ có quá trình khuếch tán thụ động giữa các ngăn khí đạo và mạch, nên tỷ lệ của ure trong BAL/ure trong huyết thanh có thể được sử dụng để chuẩn

hóa xuyên suốt các thời điểm và xuyên suốt các con vật. Xem tài liệu: Pinheiro de Oliveira et al. 2010, *Critical Care* 14:R39.

Để xác định xem liệu quá trình cho dùng hu31A.v11 có hướng đích tryptaza in vivo hay không, liều lượng 30mg/kg được cho dùng bằng phương pháp tiêm trong tĩnh mạch đối với khỉ cyno chưa được thử thách, khỏe mạnh, và lượng của tryptaza có hoạt tính trong BAL được xác định. Ở đường chuẩn, mức tryptaza có hoạt tính là tương đối thấp và có thể thay đổi xuyên suốt các con vật. Đã quan sát thấy xu hướng về mức giảm của tryptaza có hoạt tính trong BAL sau khi cho dùng hu31A.v11 ở các con vật có tryptaza có hoạt tính có thể phát hiện được ở đường chuẩn (Hình 16).

Tác dụng của quá trình cho dùng hu31A.v11 cũng được đánh giá ở mô hình thử thách dị ứng nguyên mà trong đó khỉ cyno được làm nhạy cảm đối với giun tròn ký sinh *Ascaris* bằng phương thức cho dùng được lặp lại bằng một loạt đường dùng (Hình 17). Pha làm nhạy cảm bao gồm quá trình cho dùng *Ascaris* theo kiểu trong màng bụng và theo kiểu trong cơ vào ngày 0, 7, 15, 71, 78, và 85; bằng phương pháp xông hít vào ngày 29, 50, 120, 184, và 198-205; và theo kiểu trong cơ vào ngày 34 (Hình 17). Ban đỏ nốt sưng được đánh giá vào ngày -7, 57, và 140 sau phương thức cho dùng trong da vào những ngày đó. Mỗi con vật tiếp nhận một liều lượng tối ưu của *Ascaris* như được xác định bằng ORD (Liều lượng Đáp ứng Tối ưu), phương pháp này được thực hiện để xác định đặc tính các mức liều lượng thích hợp của *Ascaris* để tạo ra đáp ứng mong muốn ở mỗi con vật (được thực hiện trong suốt pha làm nhạy cảm). Các liều lượng bao gồm 4, 400, và 4000µg/ml. Pha thử nghiệm này bao gồm pha chất dẫn, mà trong đó chất dẫn được cho dùng vào ngày 1, sau đó là quá trình cho dùng *Ascaris* bằng phương pháp xông hít vào ngày 2, sau đó là quá trình lấy mẫu BAL và sự hấp thụ qua màng nhầy mũi 30 phút sau đó để đánh giá lượng của tryptaza tổng và tryptaza có hoạt tính (Hình 17). Bốn tuần sau đó, pha thuốc bao gồm quá trình cho dùng hu31A.v11 vào ngày 1, sau đó là quá trình cho dùng *Ascaris* vào ngày 2, và quá trình lấy mẫu BAL và sự hấp thụ qua màng nhầy mũi 30 phút sau đó để đánh giá lượng của tryptaza tổng và tryptaza có hoạt tính (Hình 17).

Ở mô hình làm nhạy cảm Ascaris, quá trình cho dùng kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 đã dẫn đến mức giảm đáng kể về tryptaza có hoạt tính trong BAL ở 5 con vật mà đã có mức tryptaza có hoạt tính có thể phát hiện được ở đường chuẩn (Hình

18A), biểu lộ rằng kháng thể này ức chế hoạt tính tryptaza *in vivo*. Ngoài ra, quá trình cho dùng kháng thể kháng tryptaza cũng đã dẫn đến sự tăng về lượng của tryptaza tổng trong BAL ở tất cả các con vật (Hình 18B). Các thử nghiệm khác đã thể hiện rằng mức của tryptaza tổng trong chất lưu lớp niêm mạc mũi (MLF) được làm tăng sau khi dùng theo liều kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11, như được đánh giá bằng mức của tryptaza tổng trong mẫu hấp thụ qua màng nhầy mũi (Hình 18C). Trong thử nghiệm này, MLF được thu gom bằng cách sử dụng cơ chất hấp thụ tổng hợp (SAM; Hunt Developments (UK), Ltd, West Sussex, Anh). Mức tăng của tryptaza tổng sau khi dùng theo liều là có tính chỉ báo về độ gắn kết với đích. Tryptaza có hoạt tính là không thể phát hiện được trong mẫu hấp thụ qua màng nhầy mũi trước và sau khi dùng theo liều. Ký hiệu * trong các Hình 18A và 18C biểu lộ các mức dưới mức phát hiện.

Tiếp theo, chứng cứ *in vivo* về hoạt tính cũng được kiểm tra ở chuột NOD-SCID-3/GM/SF khuyết thiếu IL2Rg được nhận ghép của người. Mô hình chuột được nhân tính hóa dùng cho dạng nhận ghép dưỡng bào của người và các đáp ứng dị ứng phụ thuộc vào IgE của người được phát triển trước đó. Nói một cách vắn gọn, chuột NSG-SGM3 (Jackson Laboratory, số hiệu nguyên liệu gốc: 013062) được phát triển từ loại nền tảng NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), và như cha mẹ NSG của chúng, chuột NSG-SGM3 thiếu các tế bào B, các tế bào NK chức năng và các tế bào T trưởng thành, và thiếu hụt về quá trình truyền tín hiệu xytokin của chuột. Các con chuột này chứa ba gen được chuyển được tiêm đồng thời, mỗi gen được thúc đẩy bởi trình tự gen tăng cường/gen khởi đầu virut cự bào ở người. Chuột NSG-SGM3 chuyển gen ba gen tạo ra theo kiểu cơ hữu các mức của SCF, GM-CSF, và IL-3 của người trong huyết thanh là 2-4ng/ml, đem lại sự tăng sinh tế bào và tín hiệu về mức sống sót (ví dụ, xem tài liệu: Bryce et al. *J. Allergy Clin Immunol.* 138(3):769-779, 2016). Các con chuột NSG-SGM3 BLT phát triển các dưỡng bào của người mà chiếm cứ mô dạng bạch huyết ngoại vi, mô niêm mạc, và khoang màng bụng. Các dưỡng bào của người ở các con chuột NSG-SGM3 BLT biểu hiện CD117, tryptaza, và thụ thể IgE, và có thể trải qua luồng canxi và thoát hạt theo phương thức đặc hiệu với kháng nguyên phụ thuộc vào IgE. Sau thử thách, các con chuột NSG-SGM3-BLT phát triển đáp ứng phản vệ toàn thân thụ động do IgE

đặc hiệu với kháng nguyên làm trung gian, phụ thuộc vào dưỡng bào của người mà có thể được phân tích bằng cách đo những thay đổi về thân nhiệt.

Thử nghiệm này được thiết kế để kiểm tra khả năng của các kháng thể kháng tryptaza trong việc ức chế hiện tượng phản vệ toàn thân thụ động do IgE làm trung gian ở chuột được nhận ghép. Chuột NSG-SGM3 10-12 tuần tuổi (Số hiệu nguyên liệu gốc Jackson Laboratory: 013062) được chia thành ba nhóm: Nhóm 1: chuột NSG-SGM3 được điều trị theo kiểu trong màng bụng (i.p.) bằng kháng thể kiểu tương đương (500µg/con chuột); Nhóm 2: chuột NSG-SGM3 được điều trị bằng kháng thể kháng tryptaza của người (IgG4 hu31A.v11, 13,3mg/ml) i.p. (500µg/con chuột); và Nhóm 3: chuột NSG-SGM3 được điều trị bằng chất ức chế phân tử nhỏ tryptaza G02849855 (30mg/kg) i.p. Vào ngày -1, tất cả các con chuột được cạo sạch lông bụng để tạo thuận lợi cho quá trình đo thân nhiệt. Vào ngày 0, các con vật được tiêm bằng kháng thể kiểu tương đương đối chứng hoặc kháng thể kháng tryptaza. Thể tích liều lượng được tạo dạng chế phẩm thành 100µl. Kháng thể kháng tryptaza được hòa tan trong dung dịch muối 200µl dùng để tiêm. 15 phút sau khi điều trị, các con chuột từ các Nhóm 1-3 được làm nhạy cảm theo kiểu trong tĩnh mạch bằng IgE kháng NP (4-Hydroxy-3-nitrophenylaxetyl hapten) JW8.5.13 (Số hiệu theo Danh mục Sigma: 87080706-1VL; xem thêm tài liệu: US20070253948 và Jackman et al. *J. Biol. Chem.* 285(27):20850-20859, 2010),1,6µg trong 200µl của dung dịch muối. Vào ngày 1 (24 giờ sau khi điều trị), thân nhiệt được đo bằng cách khống chế bằng tay các con chuột và đặt Braun ThermoScan® Pro 4000 một cách vững chắc lên da bụng đã được cạo chỉ dưới xương ức. Ngay sau quá trình đo thân nhiệt đường chuẩn, các con chuột được thử thách i.v. bằng 500µg kháng nguyên NP được tiếp hợp vào chất mang protein BSA (NP-BSA) trong dung dịch muối 200µl. Cứ mỗi 15 phút sau khi thử thách, thân nhiệt sẽ được đo trong ít nhất 60 phút.

Như được thể hiện ở Hình 19, các con chuột được điều trị bằng kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 đã thể hiện mức duy trì thân nhiệt được cải thiện so với các con chuột được điều trị bằng kháng thể kháng gD đối chứng, sau thử thách IgE.

Các dữ liệu này thể hiện rằng kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11 là có hoạt tính và có thể liên kết và ức chế hoạt tính tryptaza *in vivo*. Các dữ liệu này đưa ra bằng chứng thêm rằng các kháng thể kháng tryptaza như hu31A.v11 có thể được sử dụng làm

chất trị liệu dùng cho việc điều trị các rối loạn gắn liền với tryptaza như hen suyễn.

Các phương án khác

Mặc dù sáng chế trên đây đã được mô tả ở một số chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ vì mục đích là sự rõ ràng để hiểu được, nhưng không nên hiểu các phần mô tả và ví dụ này là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các phần bộc lộ về tất cả các patent và tài liệu chuyên ngành khoa học được trích dẫn trong bản mô tả này rõ ràng được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

IV. Danh mục trình tự

Bảng 17 thể hiện trình tự mà được sử dụng xuyên suốt đơn này.

Bảng 17: Danh mục trình tự

SEQ ID NO :	**Trình tự**
1	$X_1X_2GMX_3$, trong đó X_1 là Asp hoặc Ser, X_2 là Tyr hoặc Phe, và X_3 là Val hoặc His
2	FISSGSSTVYYADTMKG
3	$RX_1X_2X_3DWYFDV$, trong đó X_1 là Asn hoặc Asp, X_2 là Tyr hoặc Asn, và X_3 là Asp hoặc Tyr
4	SASSSVTYMY
5	RTSDLAS
6	QHYHSYPLT
7	DYGMV
8	RNYDDWYFDV
9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEW VAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CTRRNYDDWYFDVWGQGTLVTVSS

10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYR TSDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQ GTKVEIK
11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
12	WVRQAPGKGLEWVA
13	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR
14	WGQGTLVTVSS
15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
16	WYQQKPGKSPKPWIY
17	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
18	FGQGTKVEIK
19	EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEW VAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYC ARRDNYDWYFDVWGTGTTVTVSS
20	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPKPWIYR TSDLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQHYHSYPLTFG AGTKLELK
21	EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS
22	WVRQAPGKGLEWVA
23	RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCAR
24	WGTGTTVTVSS
25	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC
26	WYQQKPGSSPKPWIY
27	GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC
28	FGAGTKLELK
29	RDNYDWYFDV
30	GYAIT
31	GISSAATTFYSSWAKS
32	DPRGYGAALDRLDL
33	QSIKSVYNNRLG

34	ETSILTS
35	AGGFDRSGDTT
36	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGI SSAATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDP RGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS
37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLI YETSILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFDRSGDTT FGQGTKVEIK
38	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI
39	WX_1RQPPGKGLEWIG, trong đó X_1 là Ile hoặc Val
40	RX_1TISX_2DTSKNQX_3SLKLSSVTAADTAVYX_4CAR, trong đó X_1 là Val hoặc Ser, X_2 là Arg hoặc Val, X_3 là Val hoặc Phe, và X_4 là Tyr hoặc Phe
41	WGQGTLVTVSS
42	WIRQPPGKGLEWIG
43	RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLI
45	WVRQAPGKGLEWIG
46	RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR
47	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGI SSAATTFYSSWAKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPR GYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS
48	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWVRQPPGKGLEWIGG ISSAATTFYSSWAKSRSTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCARDP RGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS
49	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGI SSAATTFYSSWAKSRVTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDP RGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS
50	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGI SSAATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPR GYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS

51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLIGYAITWVRQAPGKGLEWIG GISSAATTFYSSWAKSRSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARD PRGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS
52	QSLEESGGGLFKPTDTLTLTCTVSRFSLIGYAITWVRQSPENGLEWIGGI SSAATTFYSSWAKSRSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCARDPR GYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS
53	AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGQPPKLLI YETSILTSGVPSRFKGSGSETQFTLTISDVQCDDAATYFCAGGFDRSGDT TFGGGTEVVVK
54	QSLEESGGGLFKPTDTLTLTCTVSRFSLI
55	WVRQSPENGLEWIG
56	RSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCAR
57	WGQGTLVTVSS
58	DAQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKPPKLLI YETSILTSGVPSRFSGSGSETDFTLTISSLQPEDFATYFCAGGFDRSGDTT FGQGTKVEIK
59	AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGQPPKLLI YETSILTSGVPSRFKGSGSETQFTLTISDVQADDAATYFCAGGFDRSGDT TFGGGTEVVVK
60	$DX_1QX_2TQSPSSLSASVGDRVTITC$, trong đó X_1 là Ile hoặc Ala, và X_2 là Met hoặc Leu
61	$WYQQKPGKX_1PKLLIY$, trong đó X_1 là Ala hoặc Pro
62	$GVPSRFSGSGSX_1TDFTLTISSLQPEDFATYX_2C$, trong đó X_1 là Gly hoặc Glu, và X_2 là Tyr hoặc Phe
63	FGQGTKVEIK
64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
65	WYQQKPGKAPKLLIY
66	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
67	AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISC
68	WYQQKPGQPPKLLIY

69	GVPSRFKGSGSETQFTLTISDVQX$_1$DDAATYFC, trong đó X$_1$ là Cys hoặc Ala
70	FGGGTEVVVK
71	MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVS LRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQ HLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLP PASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAK YHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWL QAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP
72	MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVS LRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQ HLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVKVSSHVHTVTLP PASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAK YHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWL QAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP
73	MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVS LRVRDRYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQ HLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLP PASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAK YHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQVATAPHTFPAPS
74	GATGGTGACTGTTCCAGTTGC
75	CATTGGTGAGGGTGCCCGAGTTC
76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEW VAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CTRRNYDDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

	GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
77	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYR TSDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
78	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEW VAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CTRRNYDDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG
79	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYR TSDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
80	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGI SSAATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDP RGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

	GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
81	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLI YETSILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFDRSGDTT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
82	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGI SSAATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDP RGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG
83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLI YETSILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFDRSGDTT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
84	AYSVN
85	MIWGDGKIVYNSALKS
86	DGYYPYAMDN
87	RASKSVDSYGNSFMH
88	LASNLES
89	QQNNEDPRT

90	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCA GDGYYPYAMDNWGQGSLVTVSS
91	DIVMTQSPDSLSVSLGERATINCRASKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPP KLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNE DPRTFGGGTKVEIK
92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSYPFTFG QGTKVEIK
93	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQPPGKGLEW IGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RFDYWGQFTLVTVSS
94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VGAISSSGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARFDYWGQGTLVTVSS
95	TLTISSLQPEDFATYYCQQYYSYPFTFGQGTKVEIK
96	TLTISDVQCDDAATYFCAGGFDRSGDTTFGGGTEVVVK
97	IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCV GPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALL ELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPF PLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSC QGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWI HHYVPKKP
98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEW VGFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVY CARRDNYDWYFDVWGQGTLVTVSS
99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEW VAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVY CARRDNYDWYFDVWGQGTLVTVSS

100	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEW VAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVY CARRDNYDWYFDVWGQGTLVTVSS
101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEW VAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVY CTRRDNYDWYFDVWGQGTLVTVSS
102	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKAPKLLIYR TSDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQ GTKVEIK
103	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYR TSDLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQ GTKVEIK
104	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGC GGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCG ATTATGGCATGGTGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGA ATGGGTGGCCTTCATCAGCAGCGGCAGCAGCACCGTGTATTATGCC GATACCATGAAAGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGATAACAGCAAAA ACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGC CGTGTATTATTGCACCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTCGATG TGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGT
105	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGATCGCGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGACCTA TATGTATTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAAGCCCAAAACCATGG ATCTATCGCACCAGCGATCTGGCCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCA GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCACCCTGACCATCAGCAGCCT GCAGCCAGAAGATTTCGCCACCTATTATTGCCAGCACTATCACAGCT ATCCACTGACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA
106	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGC GGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCG ATTATGGCATGGTGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGA

	ATGGGTGGCCTTCATCAGCAGCGGCAGCAGCACCGTGTATTATGCC GATACCATGAAAGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGATAACAGCAAAA ACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGC CGTGTATTATTGCACCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTCGATG TGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
107	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGATCGCGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGACCTA TATGTATTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAAGCCCAAAACCATGG ATCTATCGCACCAGCGATCTGGCCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCA

	GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCACCCTGACCATCAGCAGCCT GCAGCCAGAAGATTTCGCCACCTATTATTGCCAGCACTATCACAGCT ATCCACTGACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAAC TGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACA GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
108	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGC GGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCG ATTATGGCATGGTGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGA ATGGGTGGCCTTCATCAGCAGCGGCAGCAGCACCGTGTATTATGCC GATACCATGAAAGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGATAACAGCAAAA ACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGC CGTGTATTATTGCACCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTCGATG TGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTGCTCCCGCAGTACTTCTG AGTCCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCAAGACCTAC ACGTGCAACGTGGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAC GCGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCT GAGTTCCTGGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAA GGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA

	CAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
109	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAACCAAGC GAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCG GCTATGCCATCACCTGGATCCGCCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGA ATGGATCGGCGGCATCAGCAGCGCCGCCACCACCTTCTATAGCAGC TGGGCCAAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGATACCAGCAAAAACC AGGTGAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATACCGCCGT GTATTATTGCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATC GCCTGGATCTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGT
110	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGATCGCGTGACCATCACCTGCCAGAGCATCAAAAGCGTGTATAA CAACCGCCTGGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAGCCCCAAAA CTGCTGATCTATGAAACCAGCATCCTGACCAGCGGCGTGCCAAGCC GCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCACCCTGACCATCAG CAGCCTGCAGCCAGAAGATTTCGCCACCTATTATTGCGCCGGCGGCT TCGATCGCAGCGGCGATACCACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGA GATCAAA
111	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAACCAAGC GAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCG GCTATGCCATCACCTGGATCCGCCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGA ATGGATCGGCGGCATCAGCAGCGCCGCCACCACCTTCTATAGCAGC TGGGCCAAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGATACCAGCAAAAACC AGGTGAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATACCGCCGT GTATTATTGCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATC

	GCCTGGATCTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGTGC CTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA
112	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGATCGCGTGACCATCACCTGCCAGAGCATCAAAAGCGTGTATAA CAACCGCCTGGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAGCCCCAAAA CTGCTGATCTATGAAACCAGCATCCTGACCAGCGGCGTGCCAAGCC GCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCACCCTGACCATCAG CAGCCTGCAGCCAGAAGATTTCGCCACCTATTATTGCGCCGGCGGCT TCGATCGCAGCGGCGATACCACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGA GATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT

	CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTG AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGA CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
113	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAACCAAGC GAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCG GCTATGCCATCACCTGGATCCGCCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGA ATGGATCGGCGGCATCAGCAGCGCCGCCACCACCTTCTATAGCAGC TGGGCCAAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGATACCAGCAAAAACC AGGTGAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATACCGCCGT GTATTATTGCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATC GCCTGGATCTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGTGC CTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTGCTCCCGCA GTACTTCTGAGTCCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCAA GACCTACACGTGCAACGTGGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAACGCGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCC CAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG

	GTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGG GTAAA
114	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLA MIWGDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCA GDGYYPYAMDNWGQGSLVTVSS
115	DIVLTQSPDSLSVSLGERATINCRASKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPK LLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNED PRTFGGGTKVEIK
116	IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCV GPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALL ELEEPVKVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPF PLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSC QGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWI HHYVPKKPGNSDYKDDDDK
117	IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVRDRYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCV GPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALL ELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPF PLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSC QGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWI HHYVPKKPGNSDYKDDDDK
118	IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVRDRYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCL GPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYIIQTGADIALLE LEEPVNISSRVHTVMLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDEPLSPPFPL KQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIIRDDMLCAGNSQRDSCKG DSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWDEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHH YVPKKPGNSDYKDDDDK

119	ALPVLVSPAHAAPAPGQALQRVGIVGGKEAPRSKWPWQVSLRLHGQY WMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLADLRVQLREQHLYYQDQ LLPVSRIIVHPQFYAVQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPALETFPP GTPCWVTGWGDVDNDVRLPPPYPLKEVEVPIVENQLCDAEYHTGLHT GDSFRIVRDDMLCAGSEKHDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSW GEGCALPNRPGIYTRVTYYLDWIHRYVPEKP
120	SFSMS
121	TISGGKTFTDYVDSVKG
122	ANYGNWFFEV
123	RASESVAKYGLSLLN
124	AASNRGS
125	QQSKEVPFT
126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWV ATISGGKTFTDYVDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC TRANYGNWFFEVWGQGTLVTVSS
127	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVAKYGLSLLNWFQQKPGQPPRL LIFAASNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPFT FGQGTKVEIK
128	AGSTHHHHHHDDDDKIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGG SLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIV HPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVT GWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVR DDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPN RPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP

Tham chiếu chéo đến các đơn liên quan

Đơn này yêu cầu hưởng lợi ích đến Đơn tạm thời Mỹ số 62/457,722, được nộp vào ngày 10 tháng 2 năm 2017, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Danh mục trình tự

Đơn này chứa Danh mục trình tự mà đã được nộp bằng hình thức điện tử theo dạng thức ASCII và được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Bản sao ASCII đã nêu, tạo ra vào ngày 9 tháng 2 năm 2018, được đặt tên là 50474-112WO2_Sequence_Listing_2.9.18_ST25 và có kích cỡ là 108.967 bai.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây:

(a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7);

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2);

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8);

(d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4);

(e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và

(f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6).

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm (a) miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90% so với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b).

3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9.

4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10.

5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính enzym của tryptaza beta 1 của người.

6. Kháng thể theo điểm 5, trong đó kháng thể này liên kết với tryptaza với K_D là khoảng 120pM và khoảng 0,5nM.

7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó kháng thể này liên kết với tryptaza với K_D là khoảng 400pM.

8. Kháng thể theo điểm 5, trong đó kháng thể này ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là khoảng 2,5nM trở xuống như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza beta của người bằng cách sử dụng cơ chất peptit tổng hợp so màu.

9. Kháng thể theo điểm 5, trong đó:

(i) kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính enzym của tryptaza beta 1 của người ở độ pH=6;

(ii) kháng thể này có khả năng ức chế quá trình kích thích sự tăng sinh tế bào cơ trơn phế quản và/hoặc tình trạng co trên cơ sở colagen do tryptaza làm trung gian;

(iii) kháng thể này có khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin dưỡng bào;

(iv) kháng thể này có khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin do IgE khởi động và/hoặc quá trình giải phóng histamin do tryptaza khởi động;

(v) kháng thể này có khả năng ức chế hoạt tính tryptaza trong chất súc rửa phế quản-phế nang (BAL) của khỉ đuôi dài hoặc mẫu hấp thụ qua màng nhầy mũi;

(vi) kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người;

(vii) kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người khi ở dạng thức có hóa trị một; và/hoặc

(viii) kháng thể này có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người khi có mặt heparin.

10. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này có khả năng làm phân ly cả mặt phân giới nhỏ của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người và mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người.

11. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này còn liên kết với tryptaza của khỉ đuôi dài, tryptaza alpha của người, tryptaza beta 2 của người và/hoặc tryptaza beta 3 của người.

12. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này được làm giống như của người.

13. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG.

14. Kháng thể theo điểm 13, trong đó kháng thể IgG là kháng thể IgG1 hoặc kháng thể IgG4.

15. Kháng thể theo điểm 14, trong đó kháng thể IgG bao gồm đột biến S228P trong vùng ở vùng hằng định chuỗi nặng theo cách đánh số Châu Âu.

16. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn đặc hiệu.

17. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu.

18. Kháng thể theo điểm 17, trong đó kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đặc hiệu kép.

19. Kháng thể theo điểm 18, trong đó kháng thể này bao gồm miền liên kết thứ nhất mà liên kết vào tryptaza beta 1 của người và miền liên kết thứ hai mà liên kết vào một phân tử sinh học thứ hai, trong đó phân tử sinh học thứ hai này được chọn lựa từ nhóm gồm interleukin-13 (IL-13), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-17 (IL-17), IgE, và interleukin-33 (IL-33).

20. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 1 và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

21. Dược phẩm theo điểm 20, trong đó tá dược là chất chống oxy hóa.

22. Dược phẩm theo điểm 21, trong đó tá dược bao gồm N-axetyltryptophan ở mức nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1mM đến khoảng 1mM và metionin ở mức nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 1mM đến khoảng 10mM.

23. Dược phẩm theo điểm 21, trong đó dược phẩm này là ở trong vật chứa chắn sáng hoặc bơm tiêm được làm đầy trước.

24. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 5 và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

25. Kháng thể được phân lập bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 hoặc SEQ ID NO: 78 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77.

26. Kháng thể theo điểm 25, trong đó chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78.

27. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10.

28. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 27 và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

29. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, mã hóa kháng thể liên kết với tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây:

(a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là DYGMV (SEQ ID NO: 7);

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2);

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8);

(d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4);

(e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); và

(f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6).

30. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b).

31. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 30, trong đó kháng thể bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b).

32. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 31, trong đó kháng thể bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 99% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; hoặc (c) miền VH như ở (a) và miền VL như ở (b).

33. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9.

34. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10.

35. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể này có khả năng làm phân ly cả mặt phân giới nhỏ của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người và mặt phân giới lớn của tryptaza beta 1 dạng tetrame của người.

36. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể này còn liên kết với tryptaza của khỉ đuôi dài, tryptaza alpha của người, tryptaza beta 2 của người và/hoặc tryptaza beta 3 của người.

37. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể liên kết với tryptaza với K_D là khoảng 1nM hoặc thấp hơn.

38. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 37, trong đó kháng thể liên kết với tryptaza với K_D nằm trong khoảng từ khoảng 120pM đến khoảng 0,5nM.

39. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 38, trong đó kháng thể liên kết với tryptaza với K_D là khoảng 400pM.

40. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể có khả năng ức chế hoạt tính enzym của tryptaza beta 1 của người.

41. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 40, trong đó kháng thể này ức chế hoạt tính của tryptaza với IC50 là khoảng 2,5nM trở xuống như được xác định bằng thử nghiệm enzym tryptaza beta của người bằng cách sử dụng cơ chất peptit tổng hợp so màu.

42. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó:

(i) kháng thể có khả năng ức chế hoạt tính enzym của tryptaza beta 1 của người ở độ pH=6;

(ii) kháng thể có khả năng ức chế quá trình kích thích sự tăng sinh tế bào cơ trơn phế quản và/hoặc tình trạng co trên cơ sở colagen do tryptaza làm trung gian;

(iii) kháng thể có khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin dưỡng bào;

(iv) kháng thể có khả năng ức chế quá trình giải phóng histamin do IgE khởi động và/hoặc quá trình giải phóng histamin do tryptaza khởi động;

(v) kháng thể có khả năng ức chế hoạt tính tryptaza trong chất súc rửa phế quản-phế nang (BAL) của khỉ đuôi dài hoặc mẫu hấp thụ qua màng nhầy mũi;

(vi) kháng thể có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người;

(vii) kháng thể có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người khi ở dạng thức có hóa trị một; và/hoặc

(viii) kháng thể có khả năng làm phân ly tryptaza beta 1 dạng tetrame của người khi có mặt heparin.

43. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể là kháng thể đơn dòng hoặc được làm giống như của người.

44. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể là kháng thể IgG.

45. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 44, trong đó kháng thể IgG là kháng thể IgG1 hoặc kháng thể IgG4.

46. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 45, trong đó kháng thể IgG4 bao gồm đột biến S228P trong vùng hằng định chuỗi nặng theo cách đánh số Châu Âu.

47. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 29, trong đó kháng thể là kháng thể đơn đặc hiệu hoặc kháng thể đa đặc hiệu.

48. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 47, trong đó kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đặc hiệu kép.

49. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 48, trong đó kháng thể bao gồm miền liên kết thứ nhất mà liên kết vào tryptaza beta 1

của người và miền liên kết thứ hai mà liên kết vào một phân tử sinh học thứ hai, trong đó phân tử sinh học thứ hai này được chọn lựa từ nhóm gồm interleukin-13 (IL-13), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-17 (IL-17), IgE, và interleukin-33 (IL-33).

50. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, mã hóa kháng thể mà liên kết với tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, trong đó axit nucleic hoặc tập hợp các axit nucleic bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự là SEQ ID NO: 104 và/hoặc SEQ ID NO: 105.

51. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 50, bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự là SEQ ID NO: 104 và/hoặc SEQ ID NO: 105.

52. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 51, bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự là SEQ ID NO: 104 và/hoặc SEQ ID NO: 105.

53. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 52, bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 104 và/hoặc SEQ ID NO: 105.

54. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 53, bao gồm trình tự là SEQ ID NO: 104 và/hoặc SEQ ID NO: 105.

55. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 50, trong đó kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77, và trong

đó axit nucleic hoặc tập hợp các axit nucleic bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự là SEQ ID NO: 106 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

56. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 55, bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự là SEQ ID NO: 106 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

57. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 56, bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 95% với trình tự là SEQ ID NO: 106 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

58. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 57, bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 106 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

59. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 58, bao gồm trình tự SEQ ID NO: 106 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

60. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 50, trong đó kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và/hoặc (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77 và trong đó axit nucleic hoặc tập hợp các axit nucleic bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự là SEQ ID NO: 108; và/hoặc SEQ ID NO: 107.

61. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 60, bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự là SEQ ID NO: 108 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

62. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 61, bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 95% với trình tự là SEQ ID NO: 108 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

63. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 62, bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 99% với trình tự là SEQ ID NO: 108 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

64. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 63, bao gồm trình tự SEQ ID NO: 108 và/hoặc SEQ ID NO: 107.

65. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, mã hóa kháng thể liên kết với tryptaza beta 1 của người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10.

66. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, mã hóa kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 hoặc SEQ ID NO: 78 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77.

67. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 66, trong đó kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77.

68. Axit nucleic được phân lập, hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập, theo điểm 66, trong đó kháng thể bao gồm (a) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78 và (b) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77.

69. Vật truyền hoặc tập hợp các vật truyền bao gồm axit nucleic được phân lập hoặc tập hợp các axit nucleic được phân lập theo điểm 29.

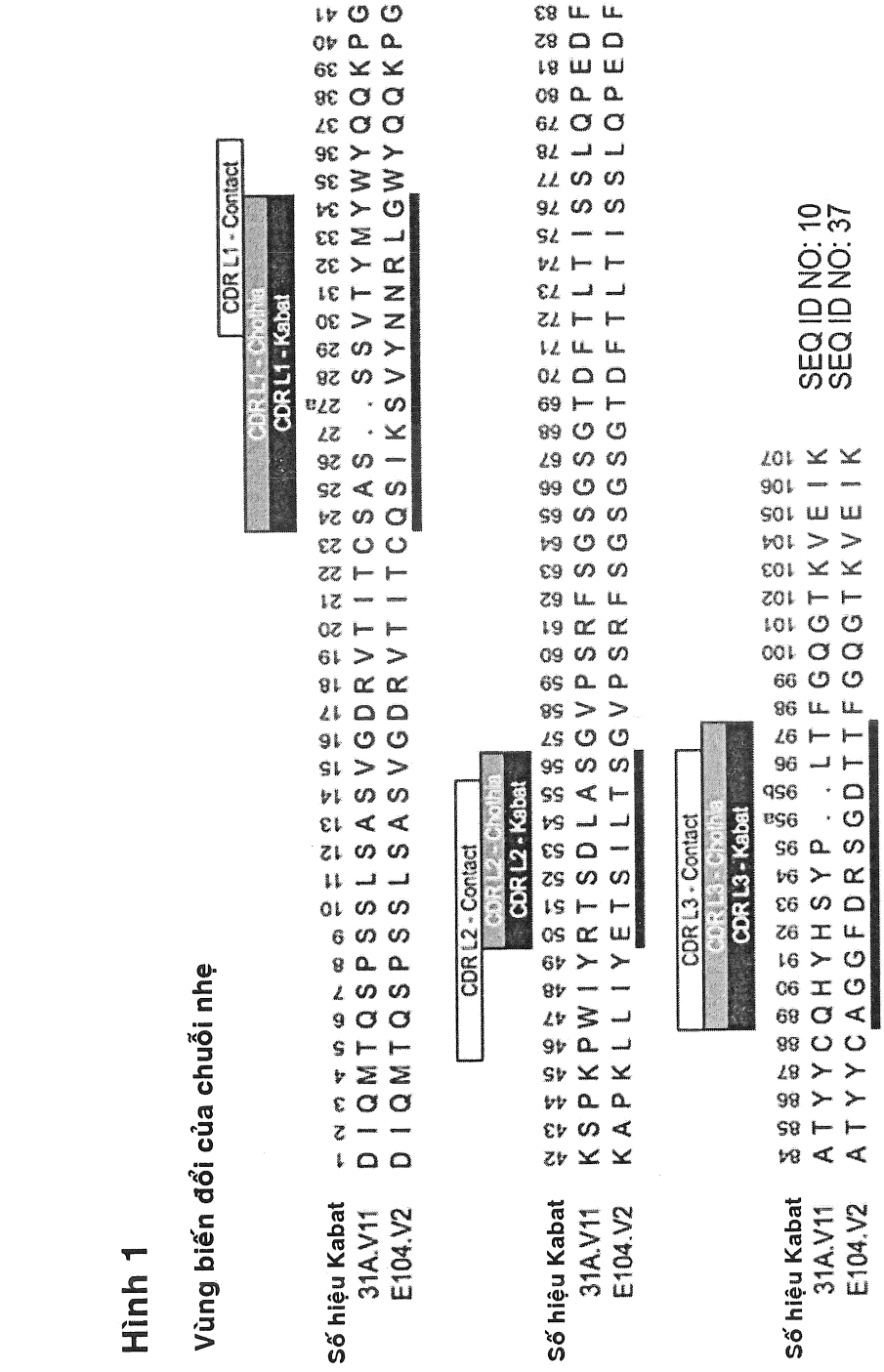
70. Tế bào chủ được phân lập bao gồm vật truyền hoặc tập hợp các vật truyền theo điểm 69.

71. Tế bào chủ được phân lập theo điểm 70, trong đó tế bào chủ là tế bào động vật có vú hoặc tế bào nhân sơ.

72. Phương pháp sản xuất kháng thể liên kết vào tryptaza beta 1 của người, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được phân lập theo điểm 70 trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp mà cho phép sản xuất kháng thể.

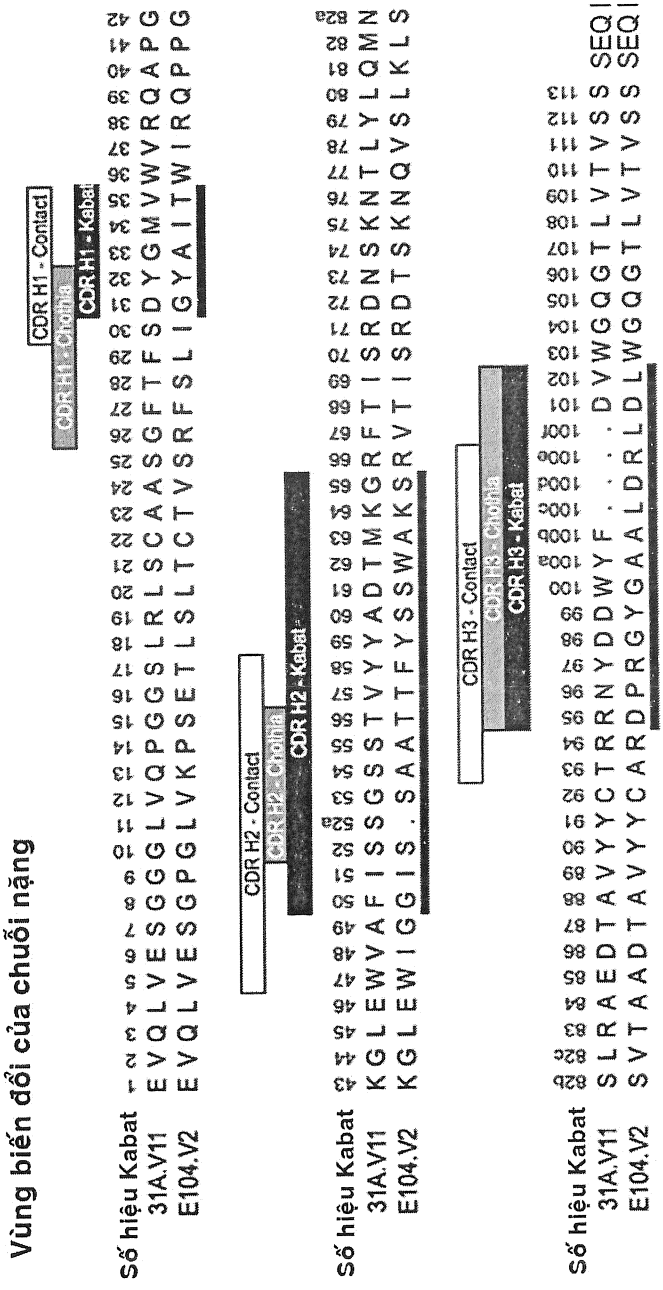
Hình 1

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ

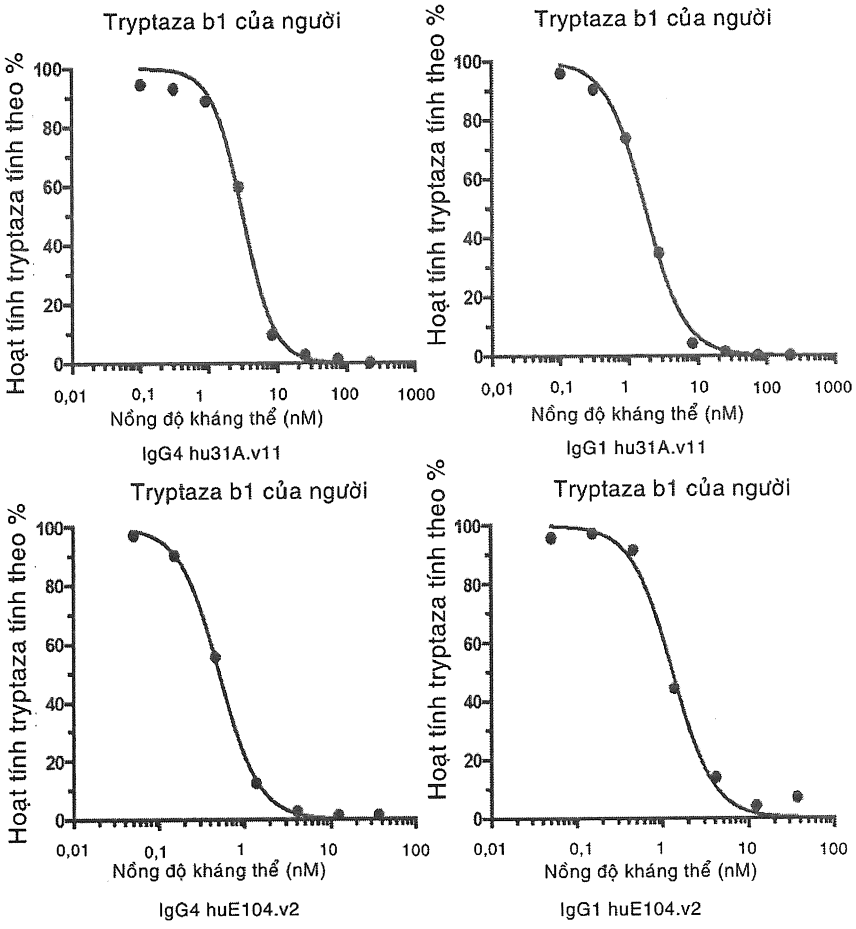


Hình 1 (tiếp)

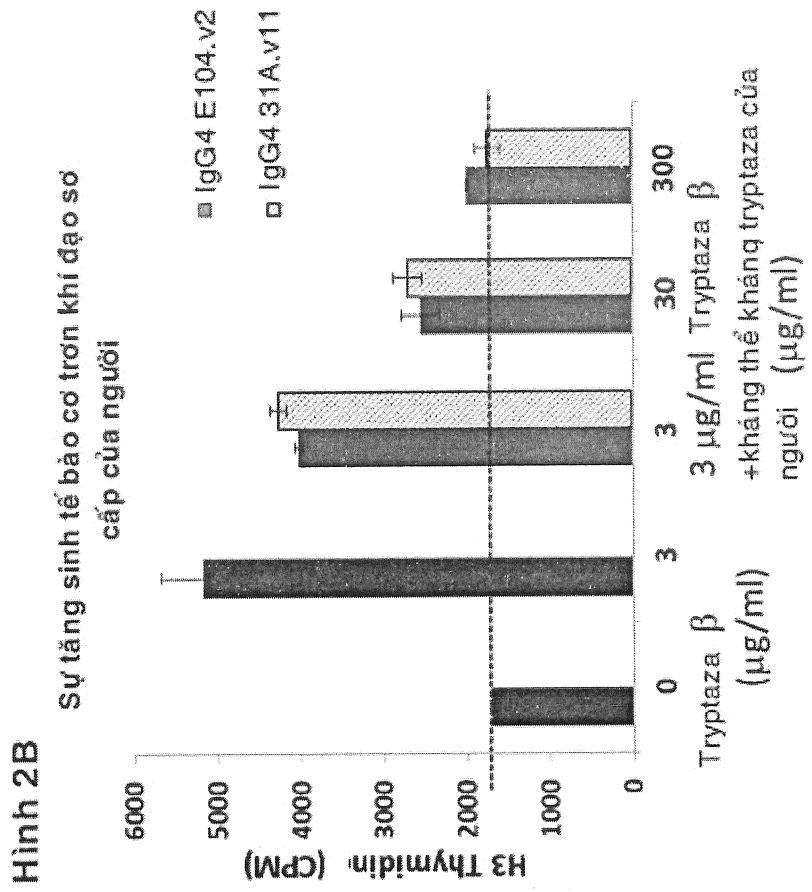
Vùng biến đổi của chuỗi nặng



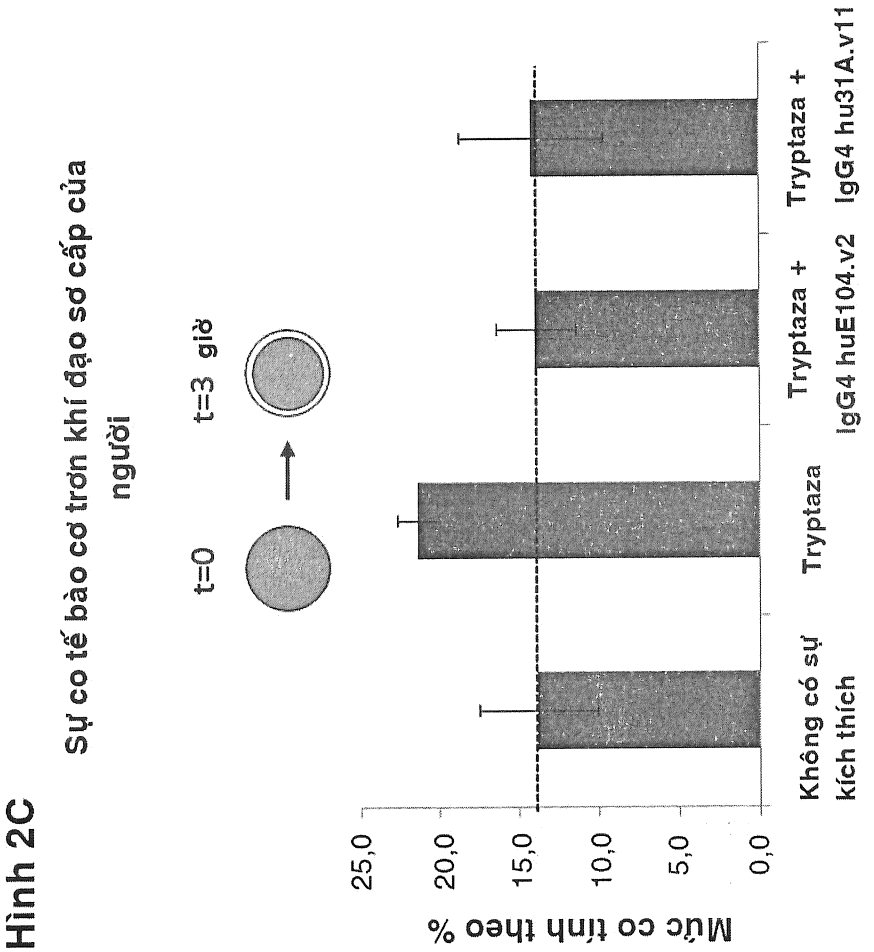
Hình 2A

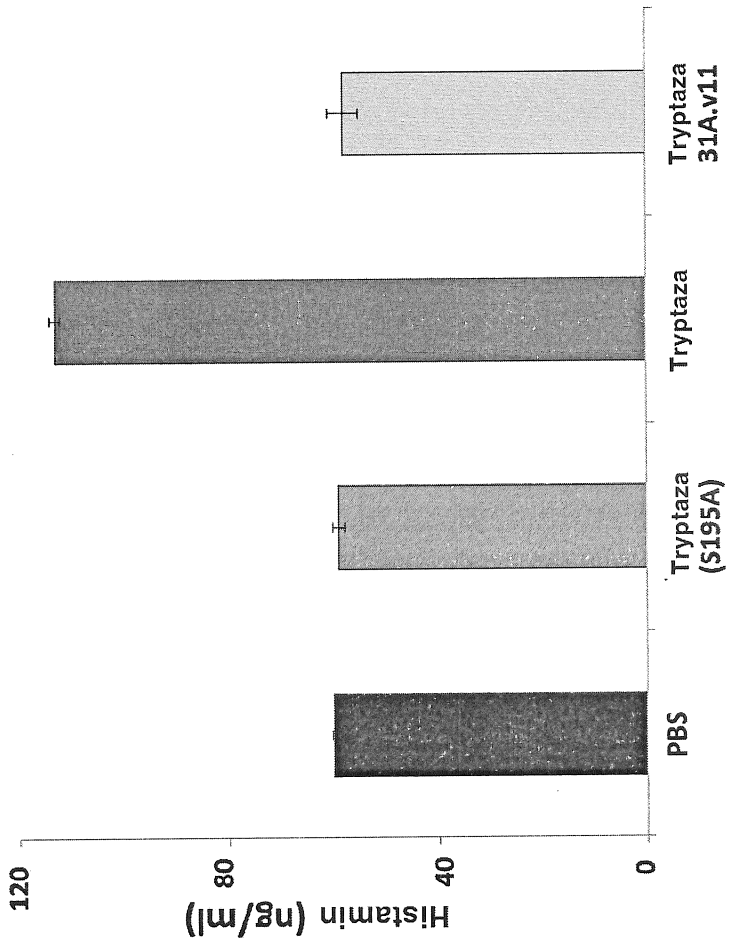

Tryptaza b1 của người
Hoạt tính tryptaza tính theo %
100
80
60
40
20
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể (nM)
IgG4 hu31A.v11
Tryptaza b1 của người
Hoạt tính tryptaza tính theo %
Nồng độ kháng thể (nM)
IgG1 hu31A.v11
Tryptaza b1 của người
Hoạt tính tryptaza tính theo %
Nồng độ kháng thể (nM)
IgG4 huE104.v2
Tryptaza b1 của người
Hoạt tính tryptaza tính theo %
Nồng độ kháng thể (nM)
IgG1 huE104.v2

Hình 2B

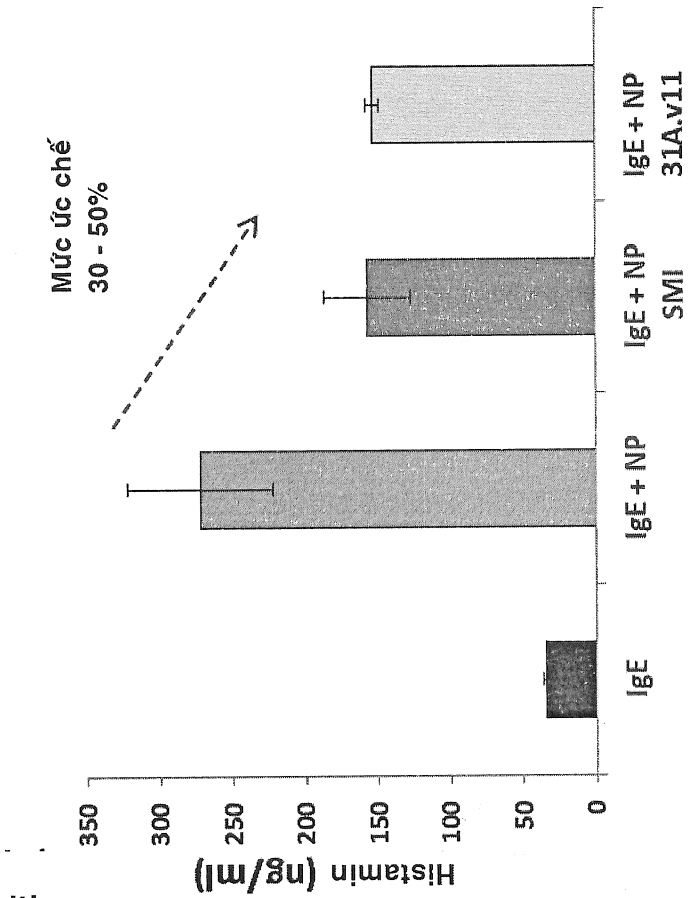

Sự tăng sinh tế bào cơ trơn khí đạo sơ cấp của người
IgG4 E104.v2
IgG4 31A.v11
H3 Thymidin (CPM)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
3
3
30
300
Tryptaza β (µg/ml)
3 µg/ml Tryptaza β
+kháng thể kháng tryptaza của người (µg/ml)

Hình 2C


Sự co tế bào cơ trơn khí đạo sơ cấp của người
t=0
t=3 giờ
Mức co tính theo %
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
Không có sự kích thích
Tryptaza
Tryptaza + IgG4 huE104.v2
Tryptaza + IgG4 hu31A.v11

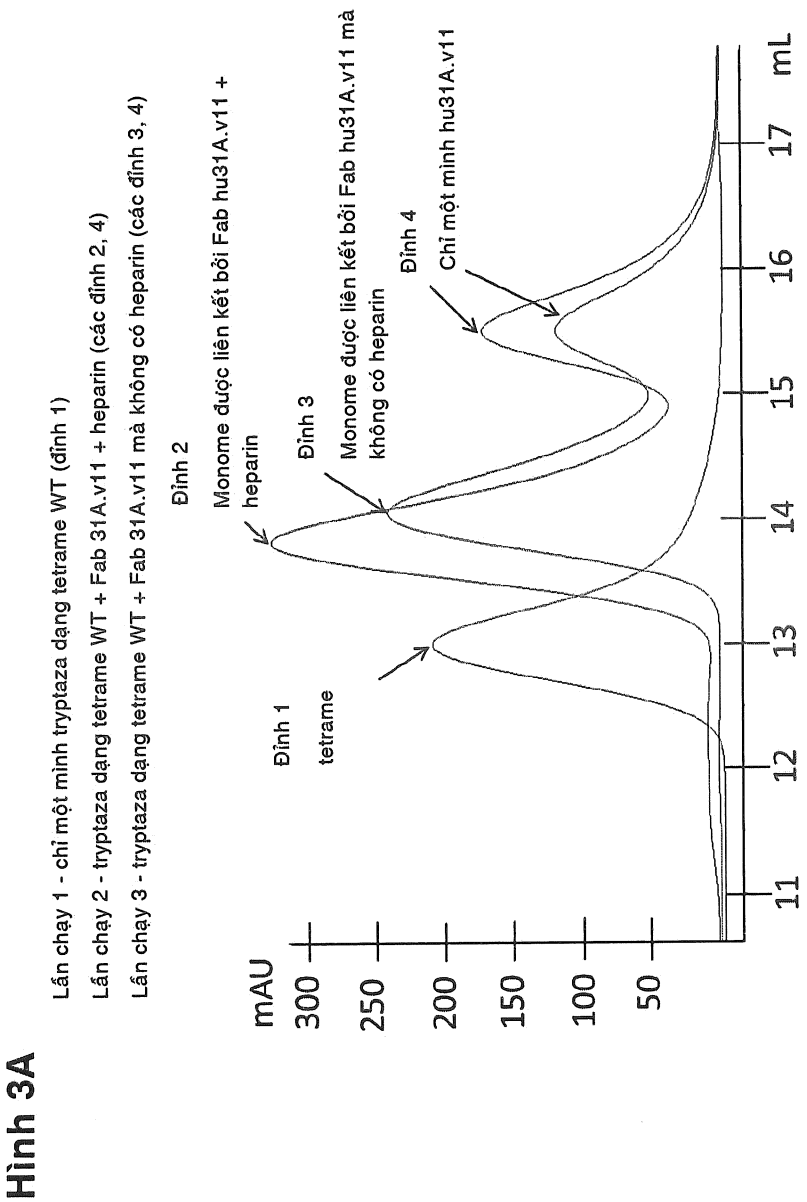

Histamin (ng/ml)
120
80
40
0
PBS
Tryptaza (S195A)
Tryptaza
Tryptaza 31A.v11

Hình 2D

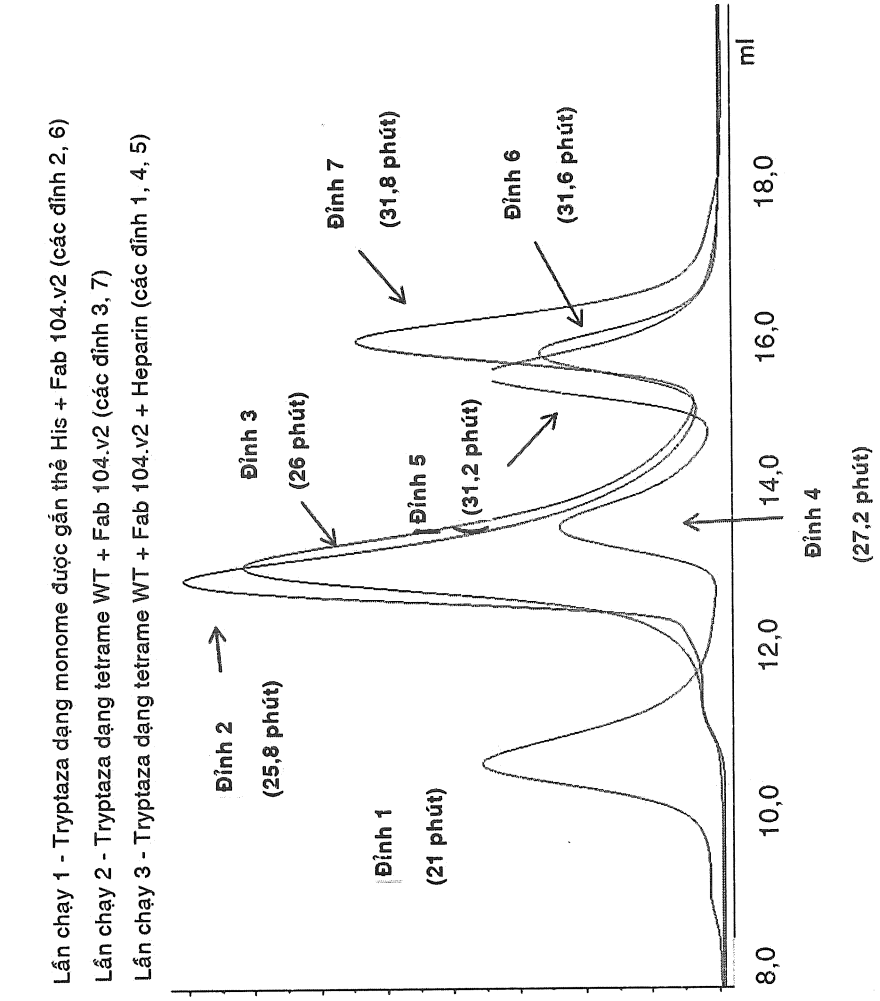

Histamin (ng/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
IgE
IgE + NP
IgE + NP SMI
IgE + NP 31A.v11
Mức ức chế 30 - 50%

Hình 2E

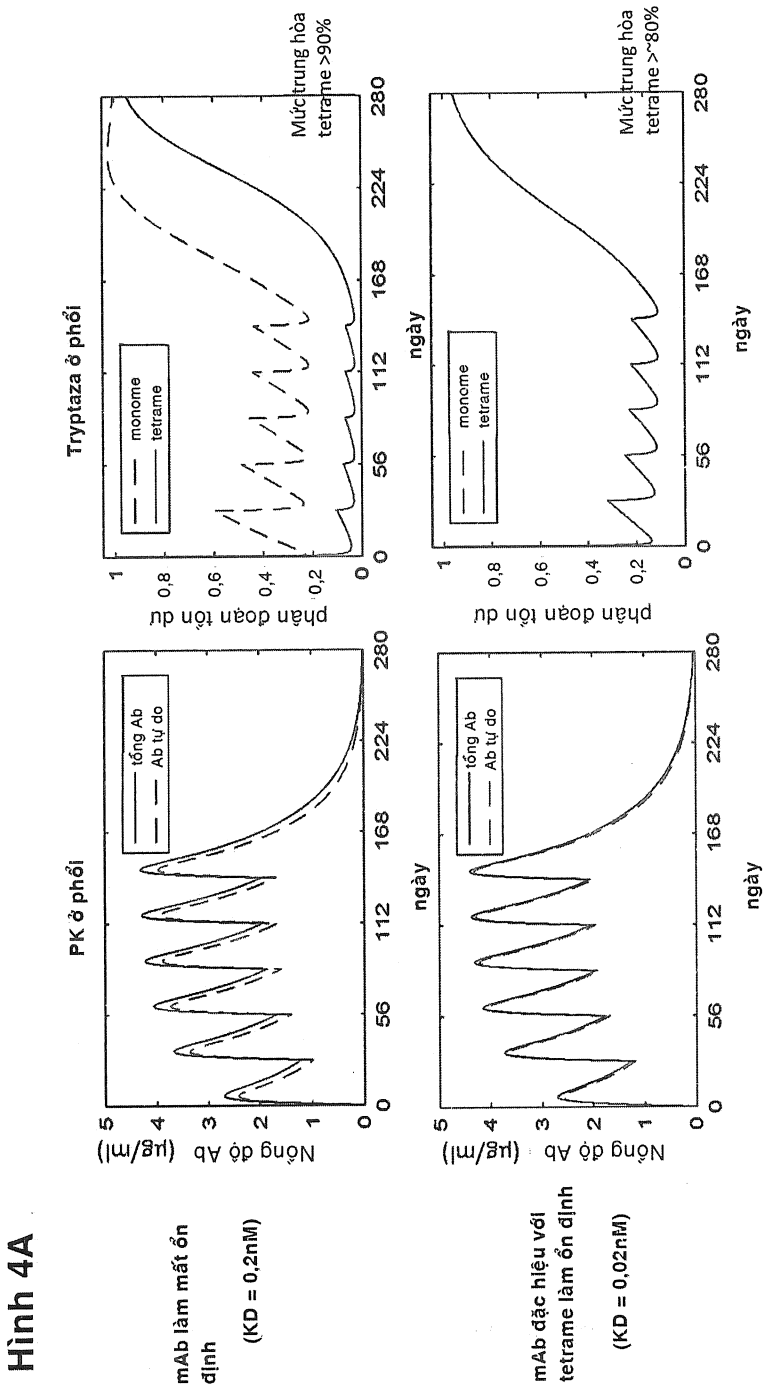
Hình 3A


Lần chạy 1 - chỉ một mình tryptaza dạng tetrame WT (đỉnh 1)
Lần chạy 2 - tryptaza dạng tetrame WT + Fab 31A.v11 + heparin (các đỉnh 2, 4)
Lần chạy 3 - tryptaza dạng tetrame WT + Fab 31A.v11 mà không có heparin (các đỉnh 3, 4)
Đỉnh 2
Monome được liên kết bởi Fab hu31A.v11 + heparin
Đỉnh 3
Monome được liên kết bởi Fab hu31A.v11 mà không có heparin
Đỉnh 4
Chỉ một mình hu31A.v11
Đỉnh 1
tetrame
mAU
300
250
200
150
100
50
11
12
13
14
15
16
17
mL

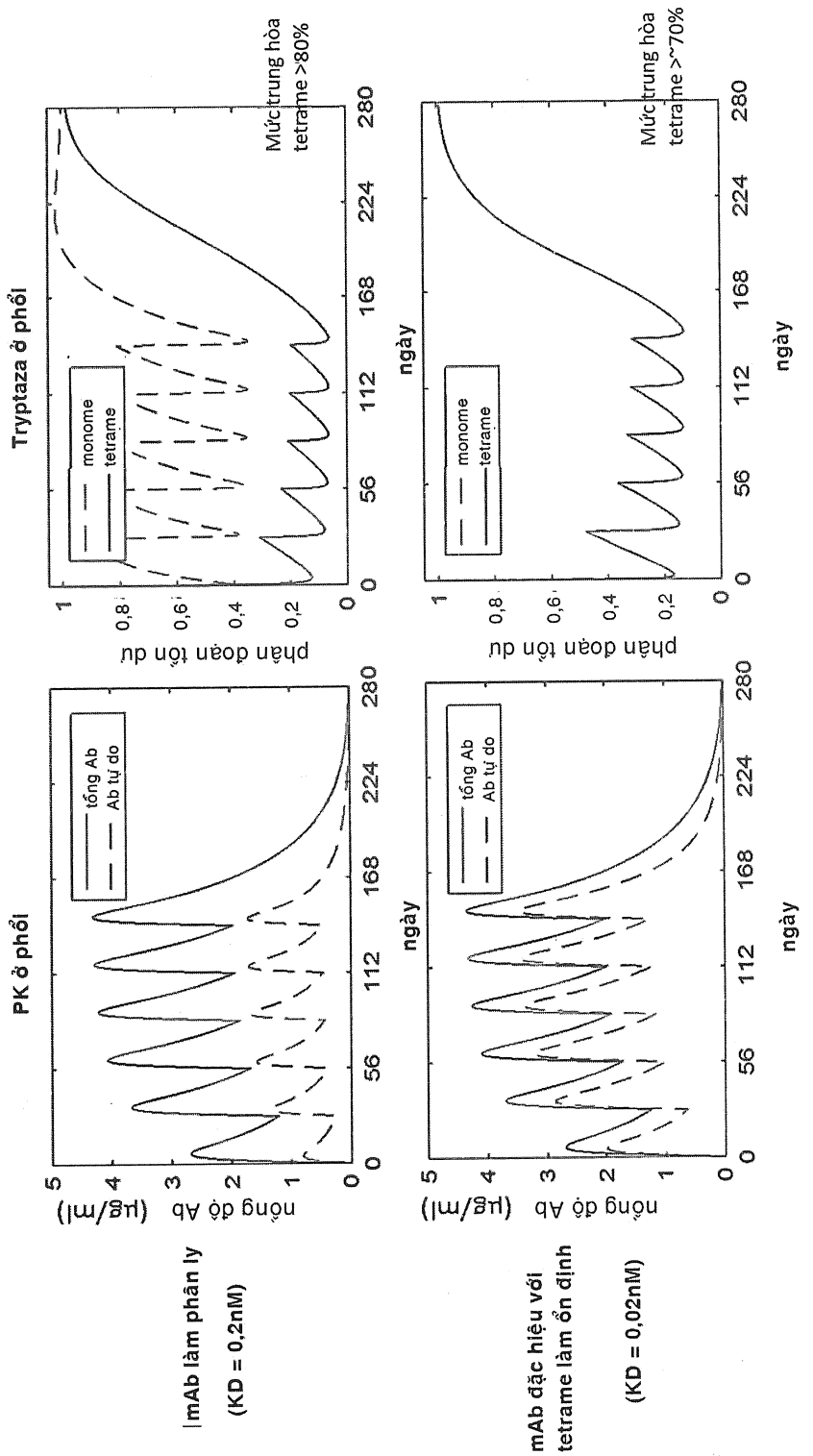
Hình 3B


Lần chạy 1 - Tryptaza dạng monome được gắn thẻ His + Fab 104.v2 (các đỉnh 2, 6)
Lần chạy 2 - Tryptaza dạng tetrame WT + Fab 104.v2 (các đỉnh 3, 7)
Lần chạy 3 - Tryptaza dạng tetrame WT + Fab 104.v2 + Heparin (các đỉnh 1, 4, 5)
Đỉnh 1
(21 phút)
Đỉnh 2
(25,8 phút)
Đỉnh 3
(26 phút)
Đỉnh 4
(27,2 phút)
Đỉnh 5
(31,2 phút)
Đỉnh 6
(31,6 phút)
Đỉnh 7
(31,8 phút)
350
300
250
200
150
100
50
0
8,0
10,0
12,0
14,0
16,0
18,0
ml

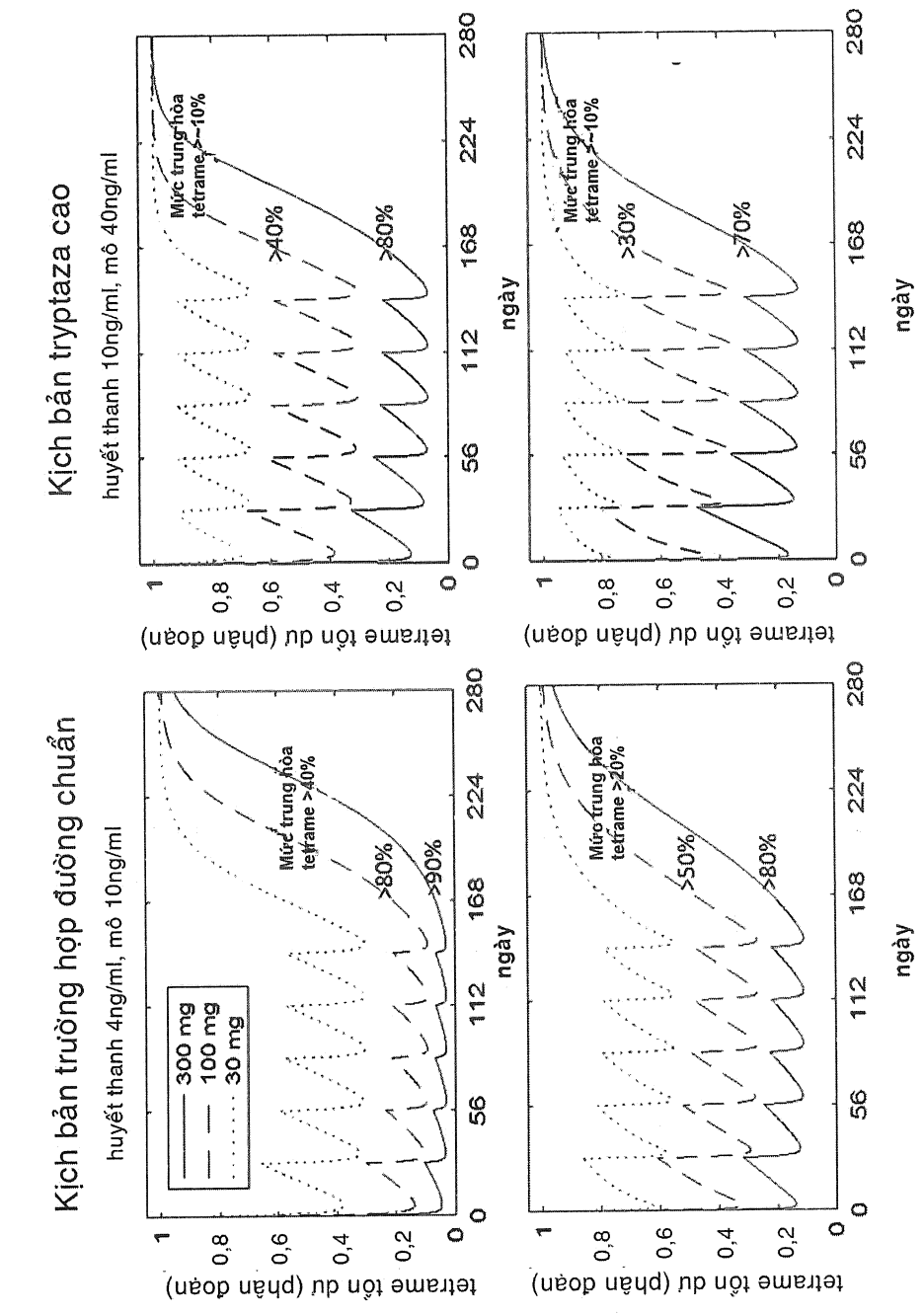
Hình 4A


mAb làm mất ổn định
(KD = 0,2nM)
mAb đặc hiệu với tetrame làm ổn định
(KD = 0,02nM)
PK ở phổi
Tryptaza ở phổi
Nồng độ Ab (µg/ml)
tổng Ab
Ab tự do
monome
tetrame
phần đoạn tồn dư
Mức trung hòa tetrame >90%
Mức trung hòa tetrame >~80%
ngày
0
56
112
168
224
280
1
2
3
4
5
0,2
0,4
0,6
0,8

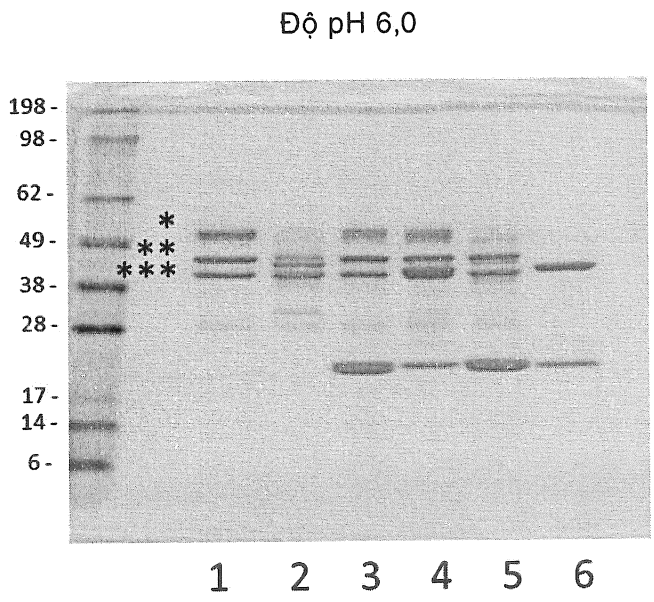
Hình 4B

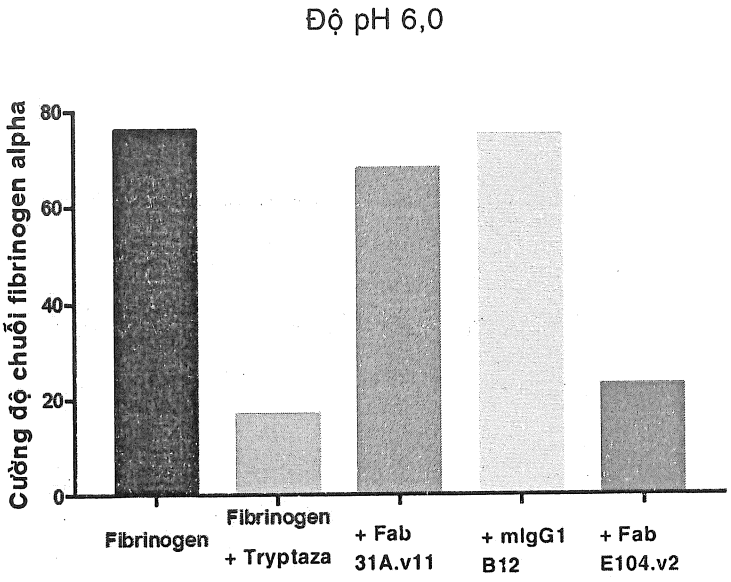

PK ở phổi
Tryptaza ở phổi
nồng độ Ab (µg/ml)
phần đoạn tồn dư
ngày
tổng Ab
Ab tự do
monome
tetrame
Mức trung hòa tetrame >80%
Mức trung hòa tetrame >~70%
mAb làm phân ly
(KD = 0,2nM)
mAb đặc hiệu với tetrame làm ổn định
(KD = 0,02nM)

Hình 4C


Kịch bản trường hợp đường chuẩn
huyết thanh 4ng/ml, mô 10ng/ml
Kịch bản tryptaza cao
huyết thanh 10ng/ml, mô 40ng/ml
300 mg
100 mg
30 mg
Mức trung hòa tetrame >40%
>80%
>90%
Mức trung hòa tetrame >10%
>40%
>80%
Mức trung hòa tetrame >20%
>50%
>80%
Mức trung hòa tetrame >10%
>30%
>70%
tetrame tồn dư (phân đoạn)
ngày
mAb làm phân ly
(KD = 0,2nM)
mAb đặc hiệu với
tetrame làm ổn định
(KD = 0,02nM)

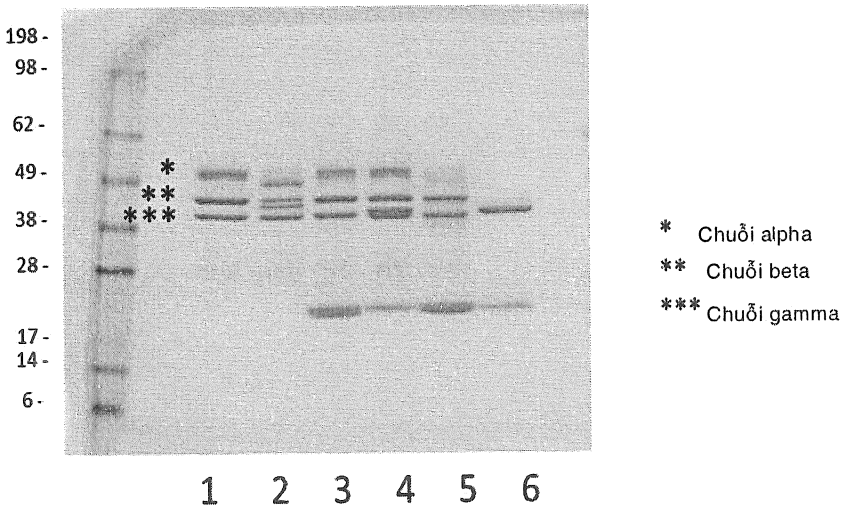
Hình 5A


Độ pH 6,0
198 -
98 -
62 -
49 -
38 -
28 -
17 -
14 -
6 -
*
**
***
1 2 3 4 5 6

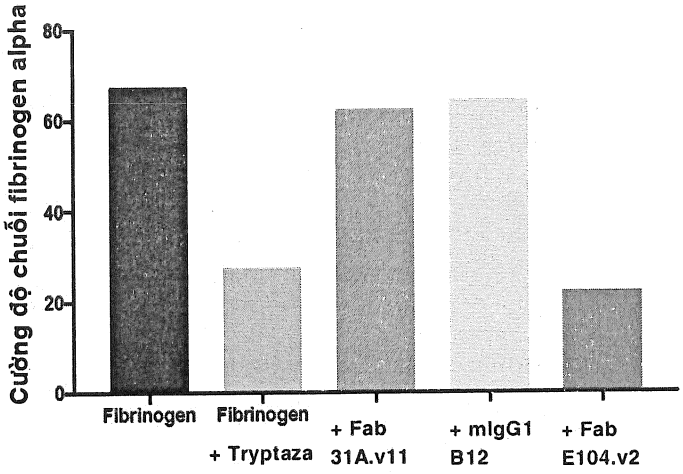

Độ pH 6,0
Cường độ chuỗi fibrinogen alpha
80
60
40
20
0
Fibrinogen
Fibrinogen + Tryptaza
+ Fab 31A.v11
+ mIgG1 B12
+ Fab E104.v2

Hình 5B

Độ pH 7,5



Độ pH 7,5



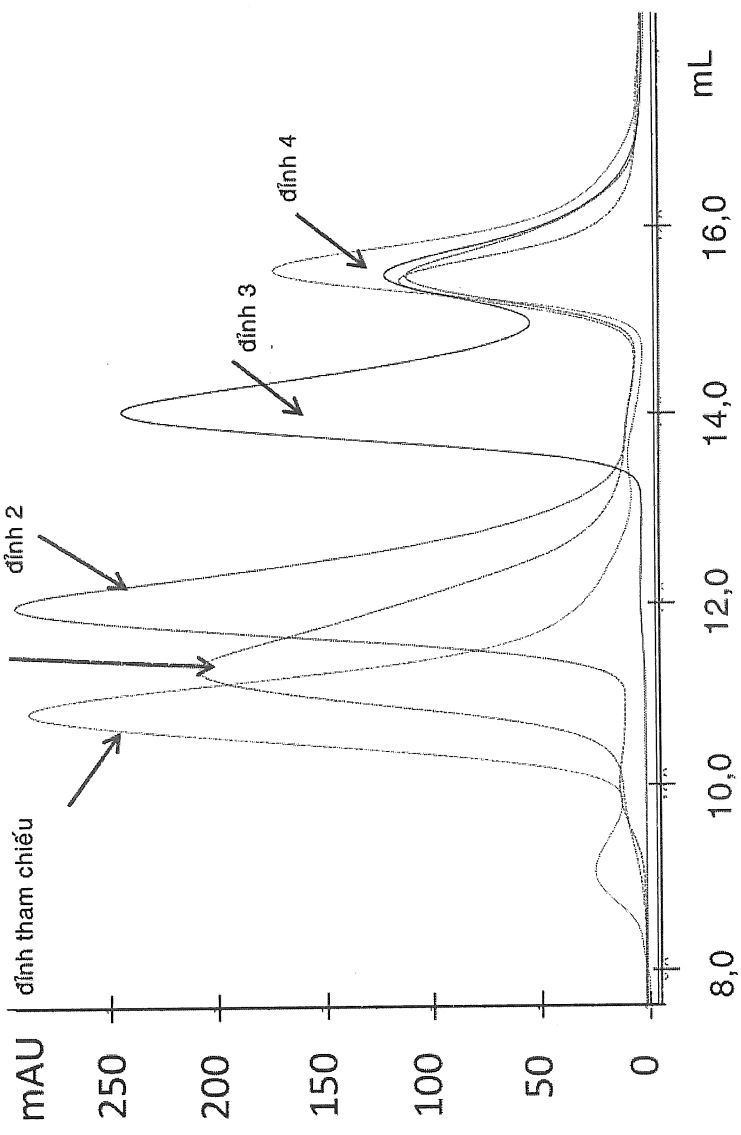
Hình 6A

Lần chạy 1: tetrame WT + Fab huE104.v1 (đỉnh tham chiếu)

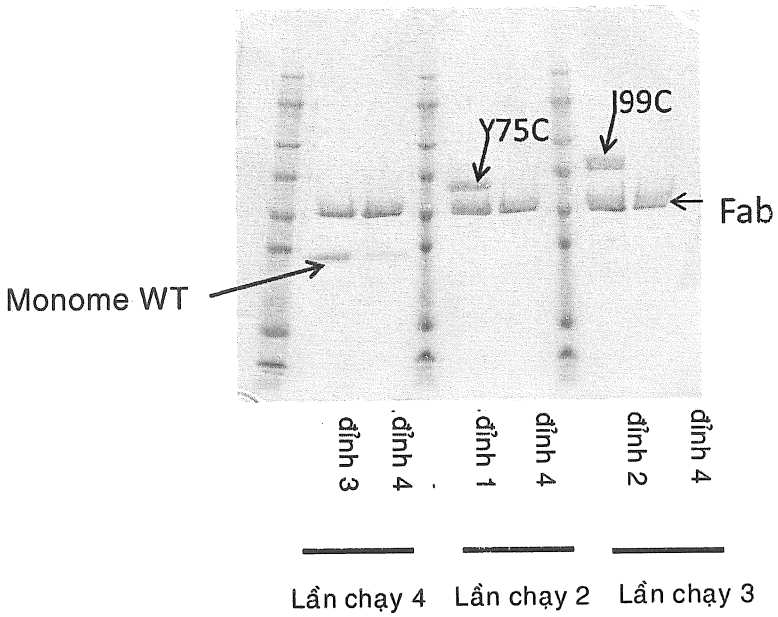
Lần chạy 2: biến thể Y75C tetrame + Fab hu31A.v11 (các đỉnh 1, 4)

Lần chạy 3: biến thể I99C tetrame + Fab hu31A.v11 (các đỉnh 2, 4)

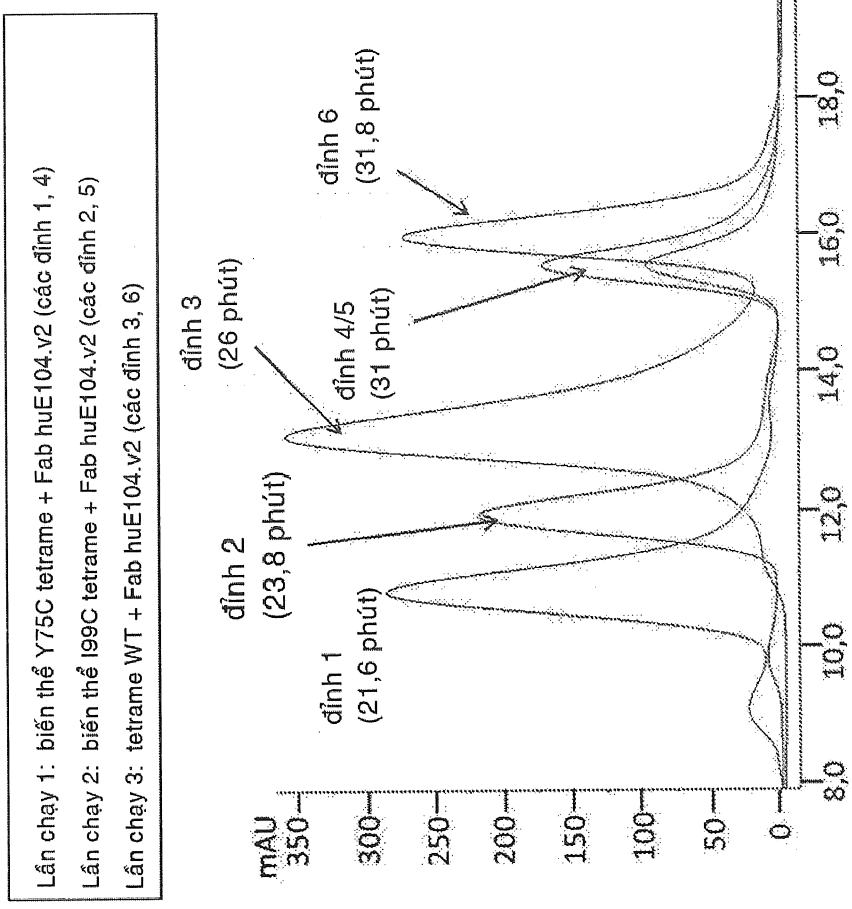
Lần chạy 4: Tetrame WT + Fab hu31A.v11 (các đỉnh 3, 4)



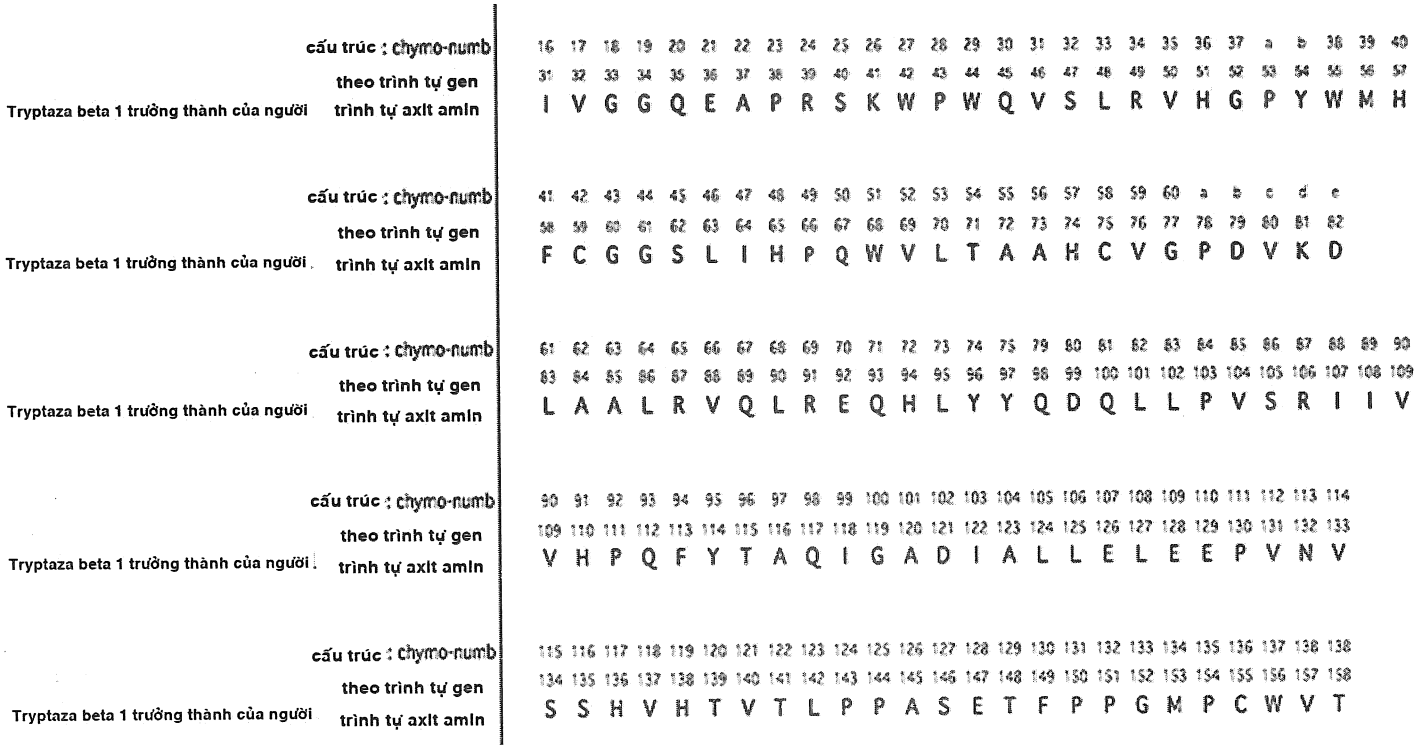
Hình 6B


Y75C
I99C
Fab
Monome WT
đỉnh 3
đỉnh 4
đỉnh 1
đỉnh 4
đỉnh 2
đỉnh 4
Lần chạy 4
Lần chạy 2
Lần chạy 3

Hình 6C


Lần chạy 1: biến thể Y75C tetrame + Fab huE104.v2 (các đỉnh 1, 4)
Lần chạy 2: biến thể I99C tetrame + Fab huE104.v2 (các đỉnh 2, 5)
Lần chạy 3: tetrame WT + Fab huE104.v2 (các đỉnh 3, 6)
mAU
350
300
250
200
150
100
50
0
8,0
10,0
12,0
14,0
16,0
18,0
ml
đỉnh 1
(21,6 phút)
đỉnh 2
(23,8 phút)
đỉnh 3
(26 phút)
đỉnh 4/5
(31 phút)
đỉnh 6
(31,8 phút)

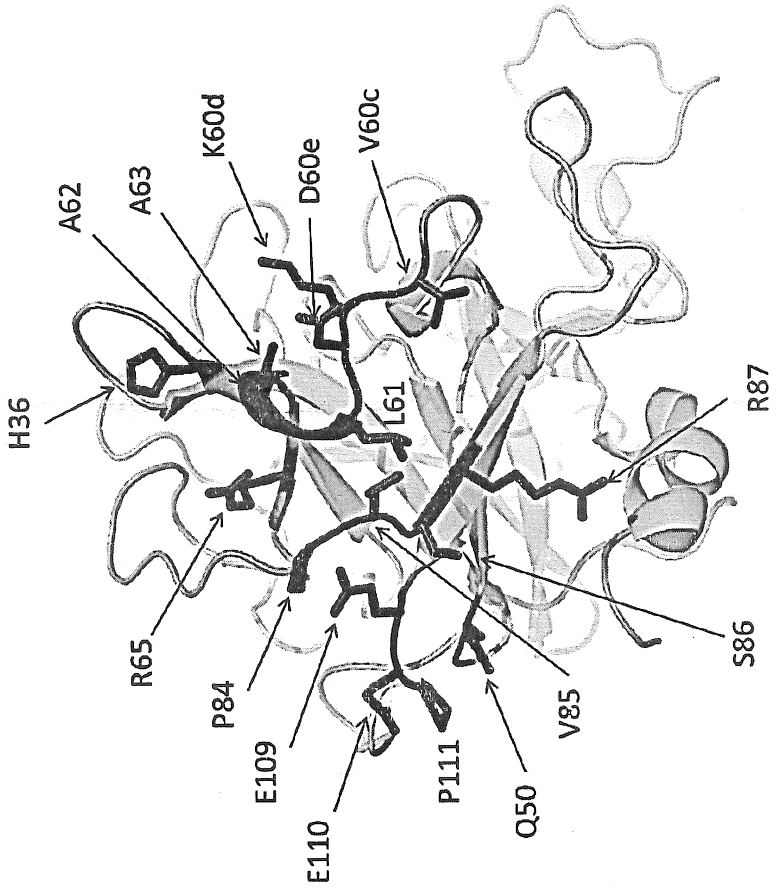
Hình 7


cấu trúc : chymo-numb
theo trình tự gen
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người
trình tự axit amin
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 a b 38 39 40
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57
I V G G Q E A P R S K W P W Q V S L R V H G P Y W M H
cấu trúc : chymo-numb
theo trình tự gen
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người
trình tự axit amin
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 a b c d e
58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82
F C G G S L I H P Q W V L T A A H C V G P D V K D
cấu trúc : chymo-numb
theo trình tự gen
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người
trình tự axit amin
61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109
L A A L R V Q L R E Q H L Y Y Q D Q L L P V S R I I V
cấu trúc : chymo-numb
theo trình tự gen
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người
trình tự axit amin
90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114
109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133
V H P Q F Y T A Q I G A D I A L L E L E E P V N V
cấu trúc : chymo-numb
theo trình tự gen
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người
trình tự axit amin
115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 138
134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158
S S H V H T V T L P P A S E T F P P G M P C W V T

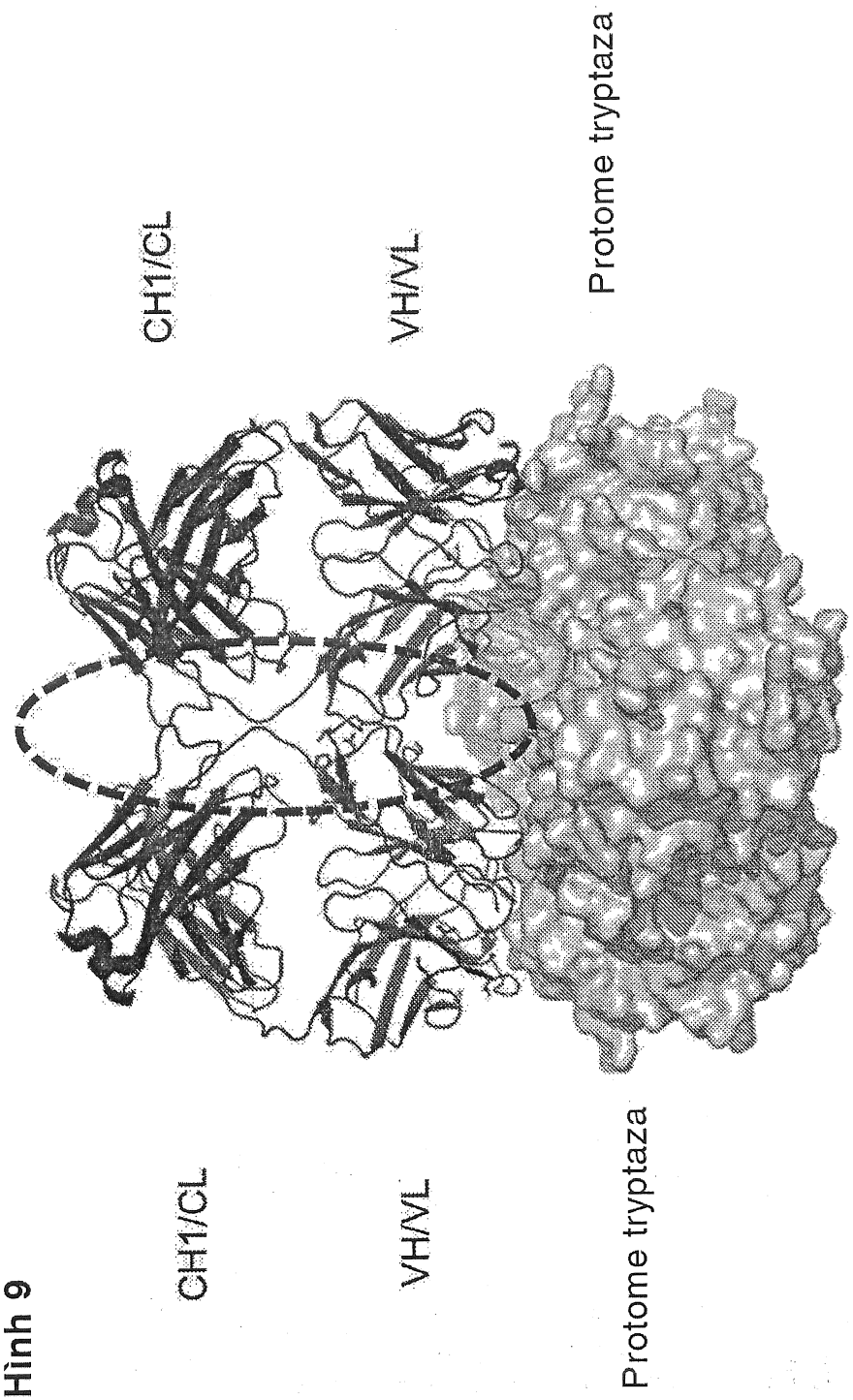
Hình 7 (tiếp)

cấu trúc : chymo-numb	140 141 142 143 144 145 146 147 149 150 151 152 a b 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164
theo trình tự gen	159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 a b c d e f g h i 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người	G W G D V D N D E E R L P P P P F P L K Q V K V P I M E
cấu trúc : chymo-numb	165 166 167 168 169 170 171 172 173 a b c d e f g h i 174 175 176 177 178 179 180 181
theo trình tự gen	183 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người	N H I C D A K Y H L G A Y T G D D V R I V R R D D M L
cấu trúc : chymo-numb	182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206
theo trình tự gen	211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người	C A G N T R R D S C Q G D S G G P L V C K V N G T
cấu trúc : chymo-numb	207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 219 220 221a 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231
theo trình tự gen	235 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người	W L Q A G V V S W G E G C A Q P N R P G I Y T R V
cấu trúc : chymo-numb	232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246
theo trình tự gen	261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275
Tryptaza beta 1 trưởng thành của người	T Y Y L D W I H H Y V P K K P

SEQ. ID NO.:97

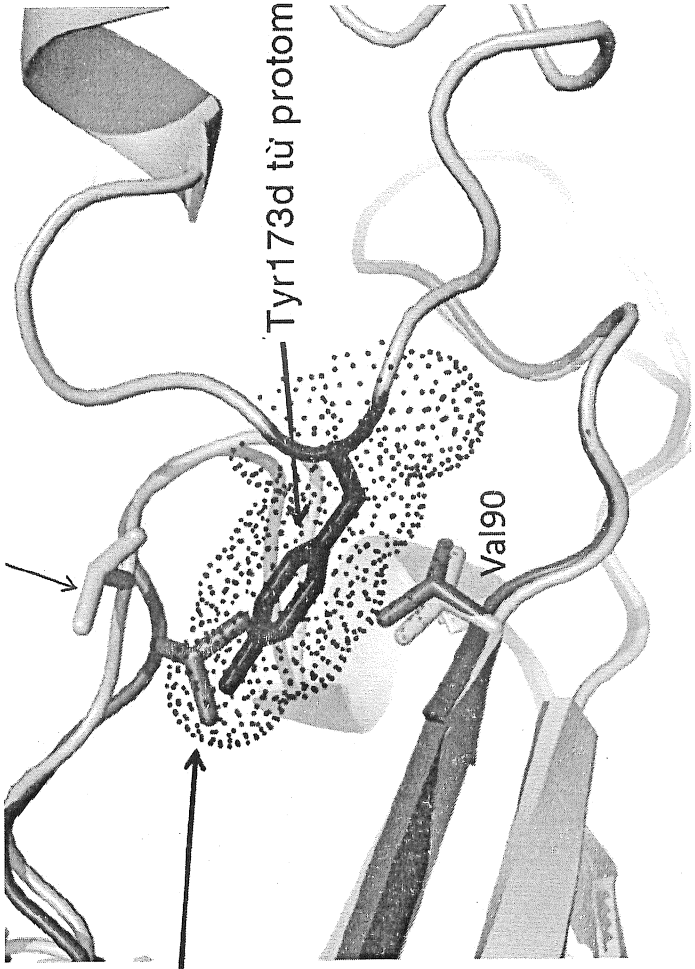

H36
A62
A63
K60d
D60e
V60c
L61
R87
R65
P84
E109
E110
P111
Q50
V85
S86

Hình 8

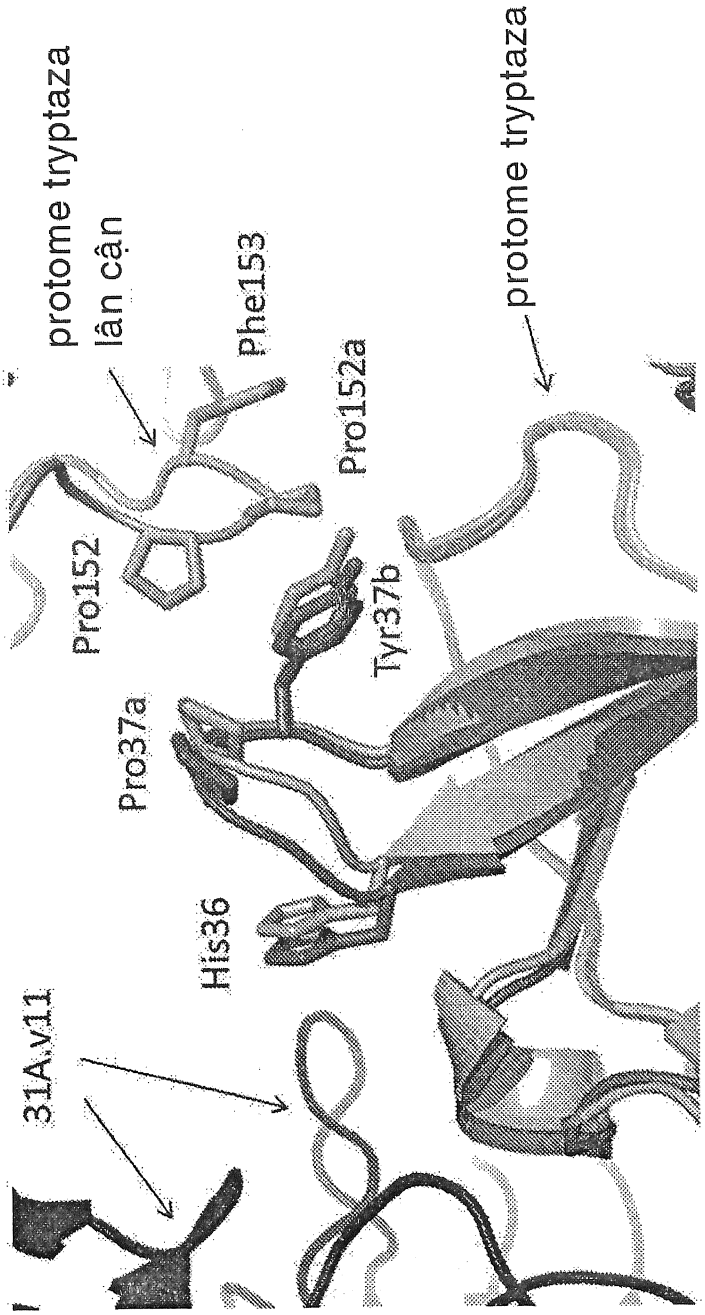


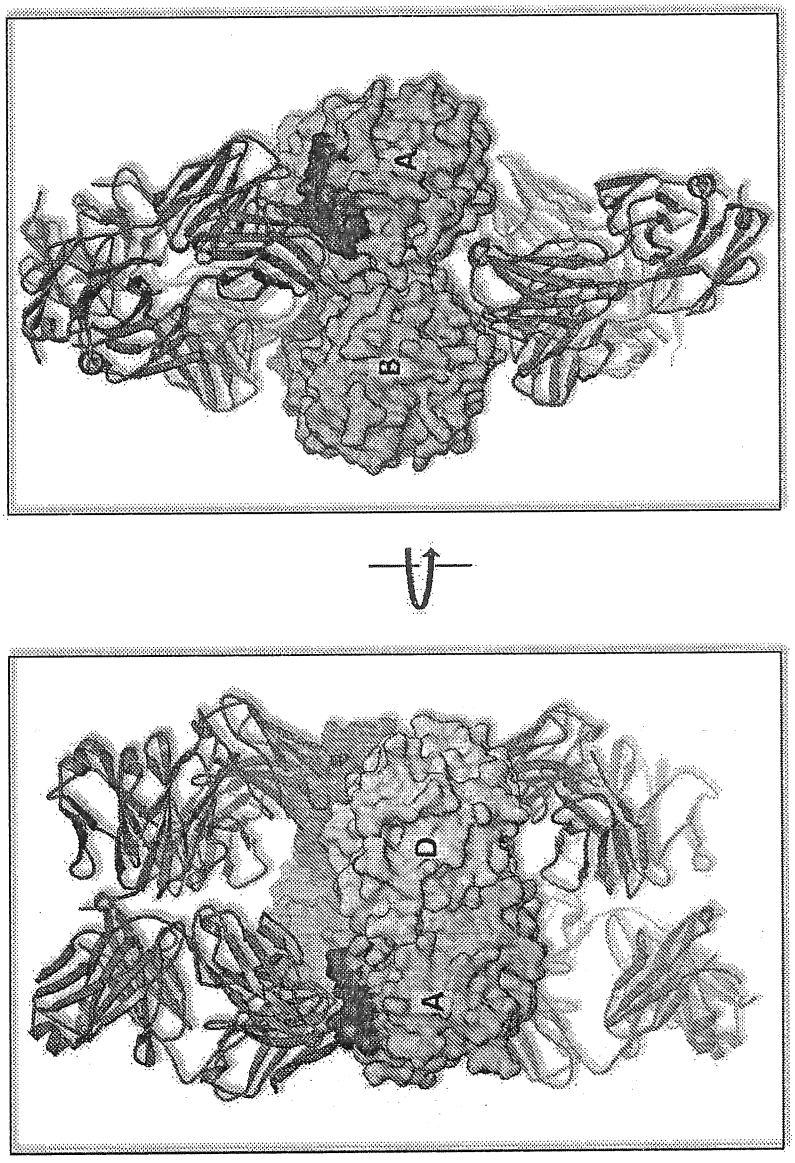
Hình 9

Hình 10


Val60c trong tryptaza chưa được liên kết
Tyr173d từ protome lân cận
Val90
Val60c trong tryptaza được liên kết bởi Fab hu31A.v11

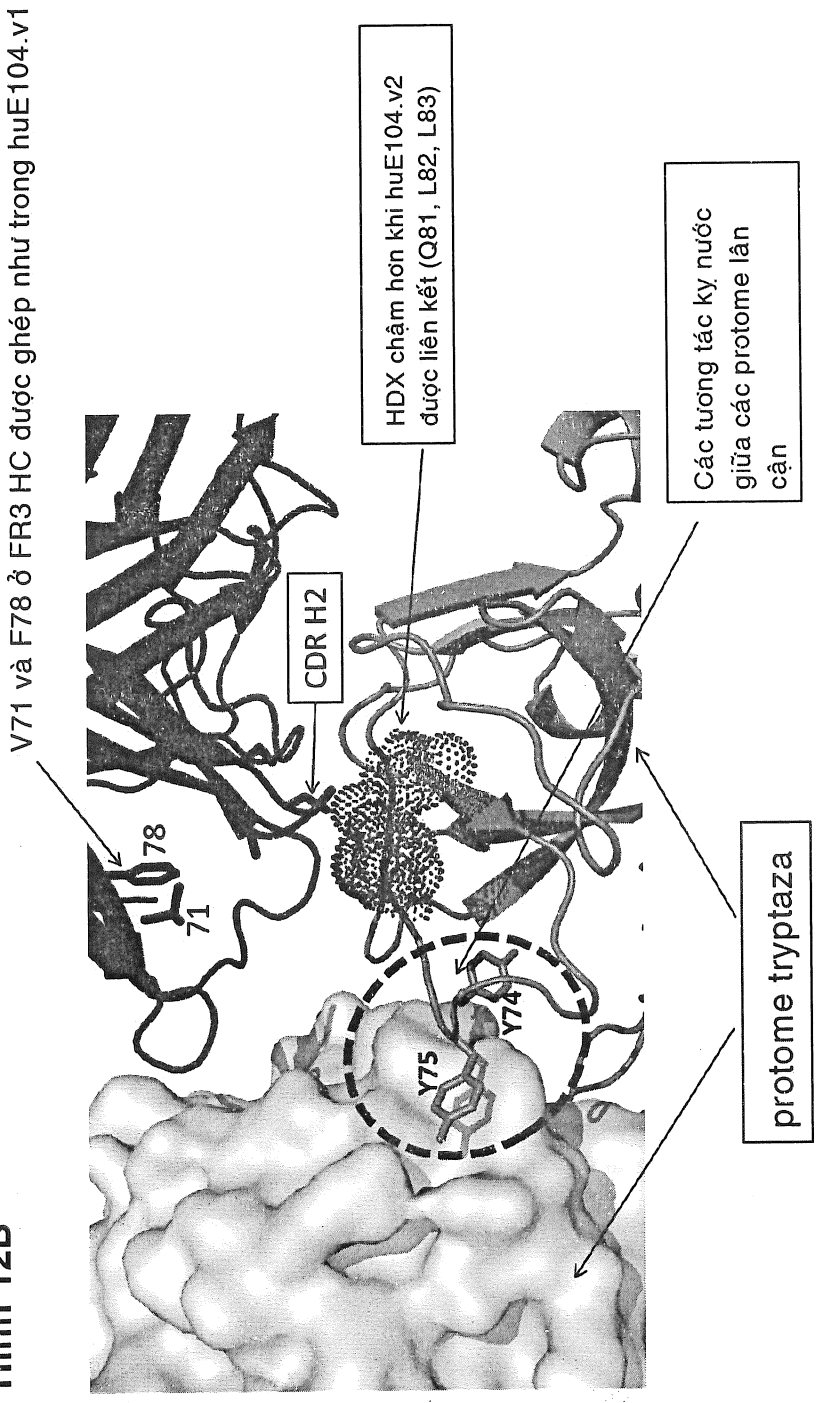
Hình 11


31A.v11
His36
Pro37a
Pro152
protome tryptaza
lân cận
Phe153
Pro152a
Tyr37b
protome tryptaza

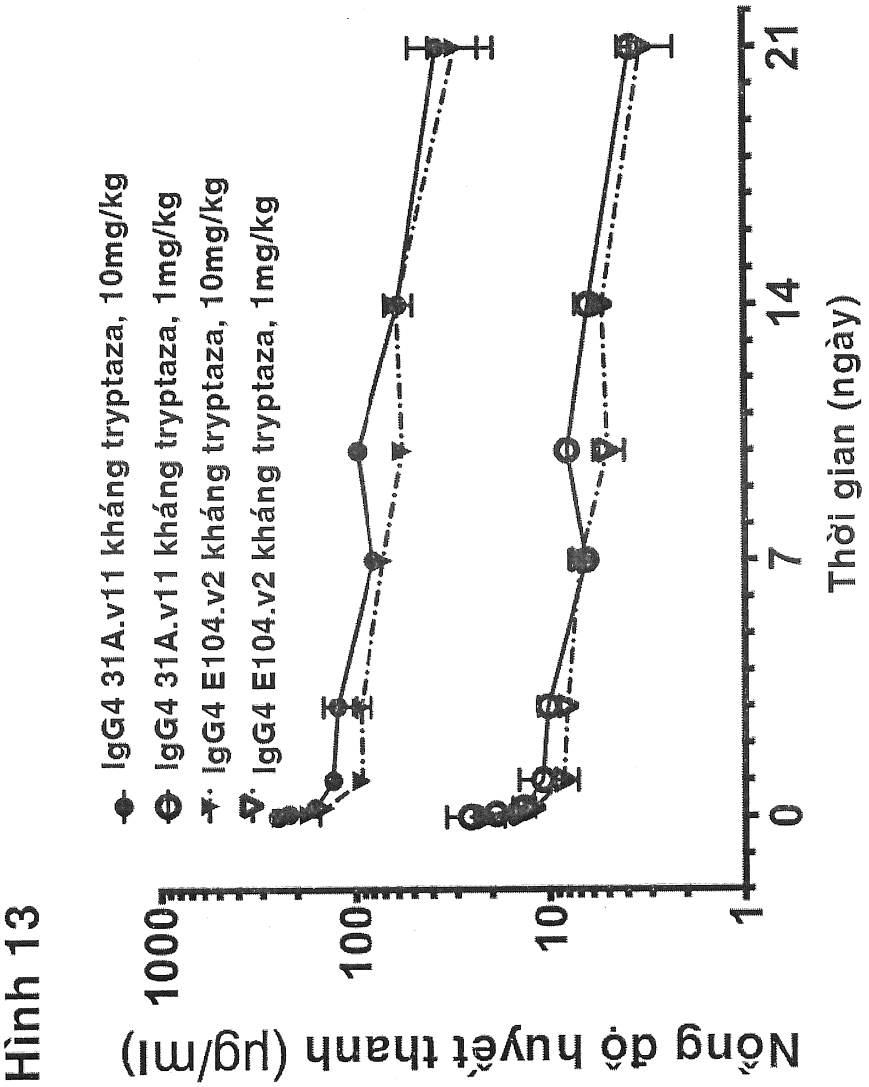


Hình 12A

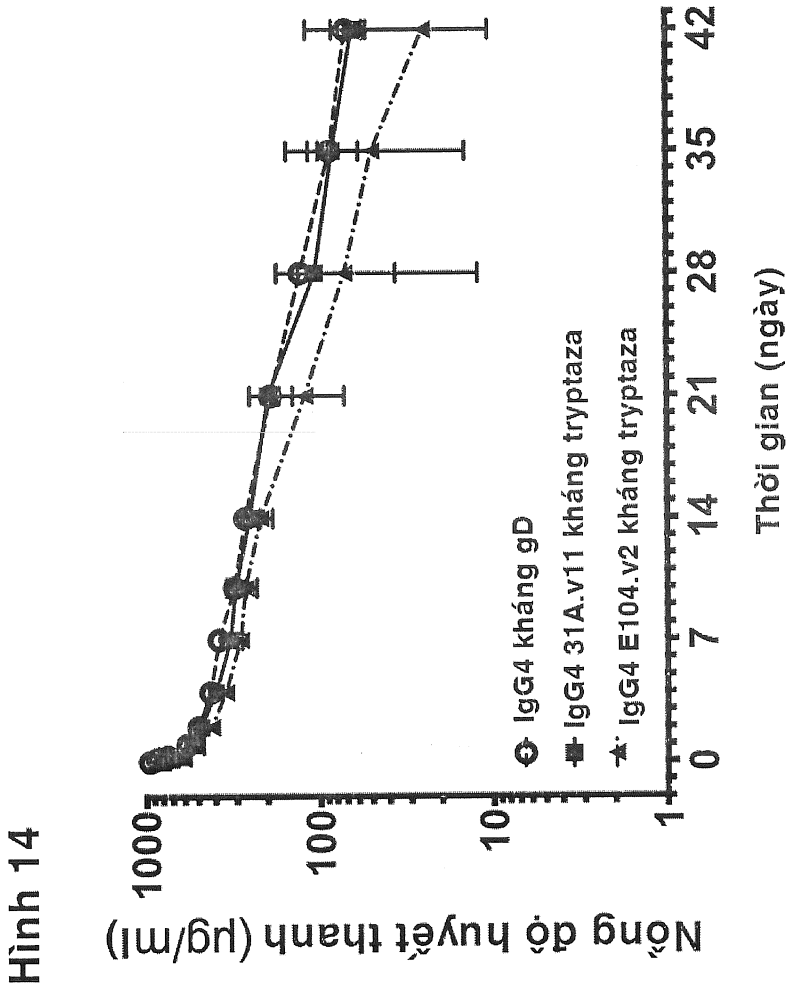
Hình 12B


V71 và F78 ở FR3 HC được ghép như trong huE104.v1
V71
F78
CDR H2
HDX chậm hơn khi huE104.v2 được liên kết (Q81, L82, L83)
Các tương tác kỵ nước giữa các protome lân cận
Y74
Y75
protome tryptaza

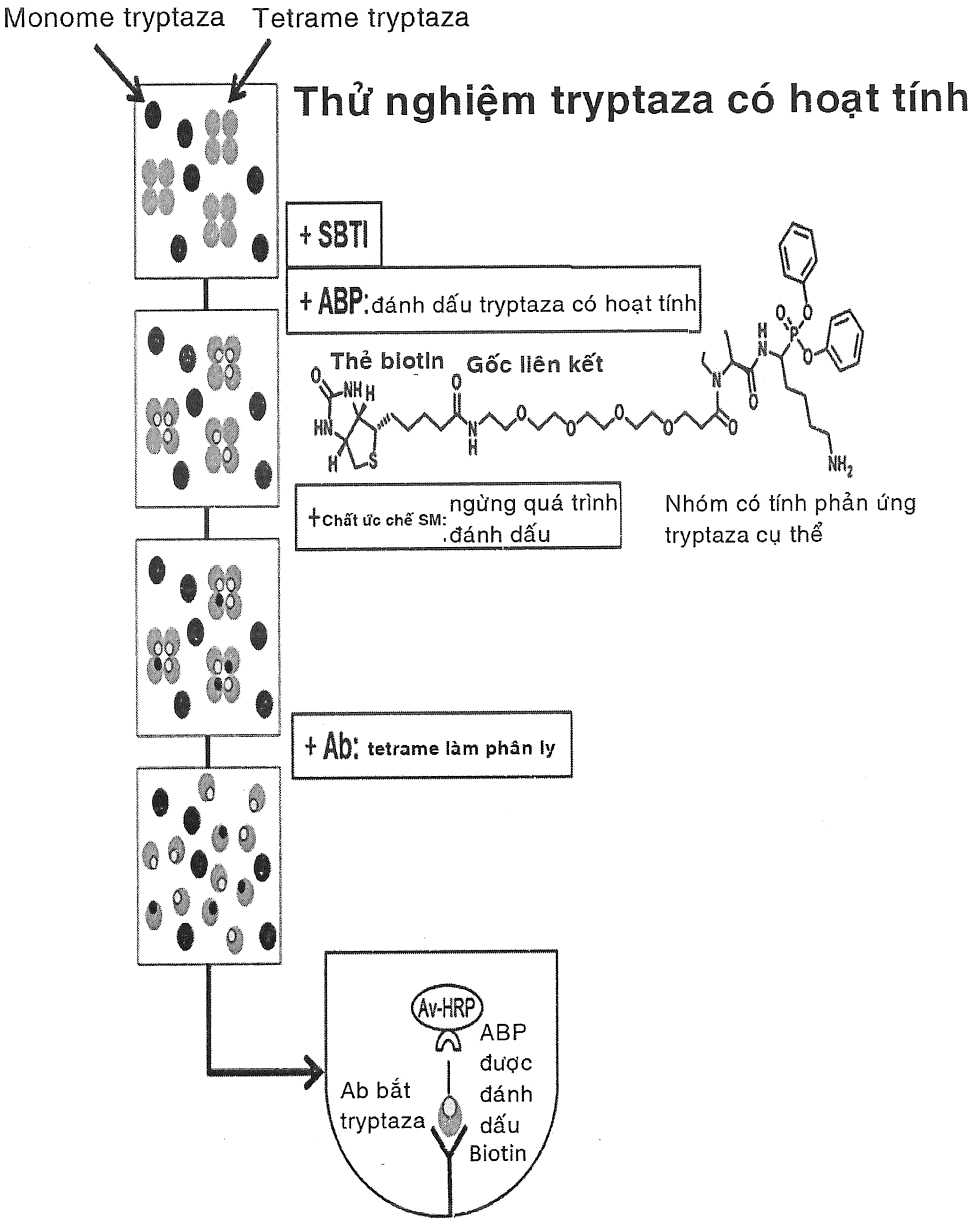
Hình 13


IgG4 31A.v11 kháng tryptaza, 10mg/kg
IgG4 31A.v11 kháng tryptaza, 1mg/kg
IgG4 E104.v2 kháng tryptaza, 10mg/kg
IgG4 E104.v2 kháng tryptaza, 1mg/kg
Nồng độ huyết thanh (µg/ml)
1000
100
10
1
0
7
14
21
Thời gian (ngày)

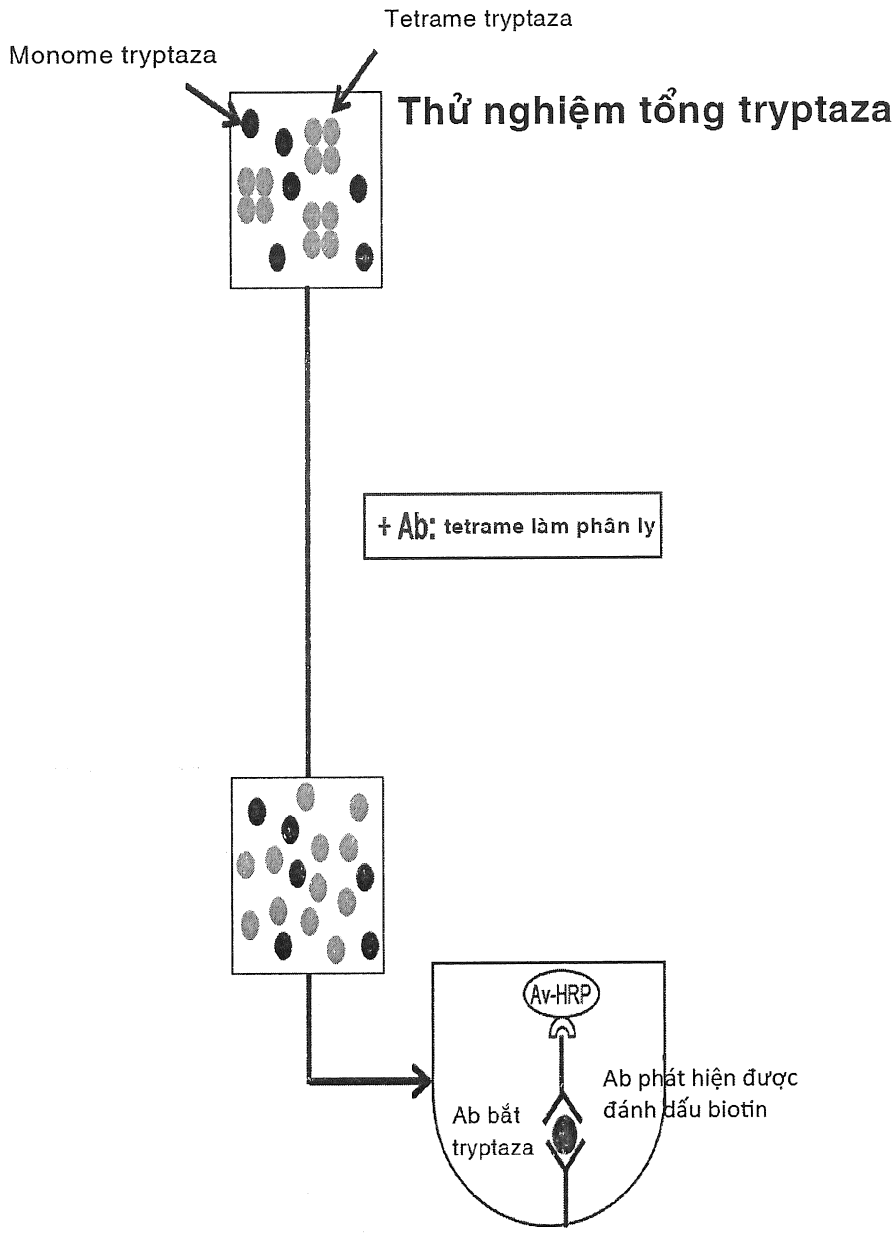
Hình 14


Nồng độ huyết thanh (µg/ml)
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
Thời gian (ngày)
IgG4 kháng gD
IgG4 31A.v11 kháng tryptaza
IgG4 E104.v2 kháng tryptaza

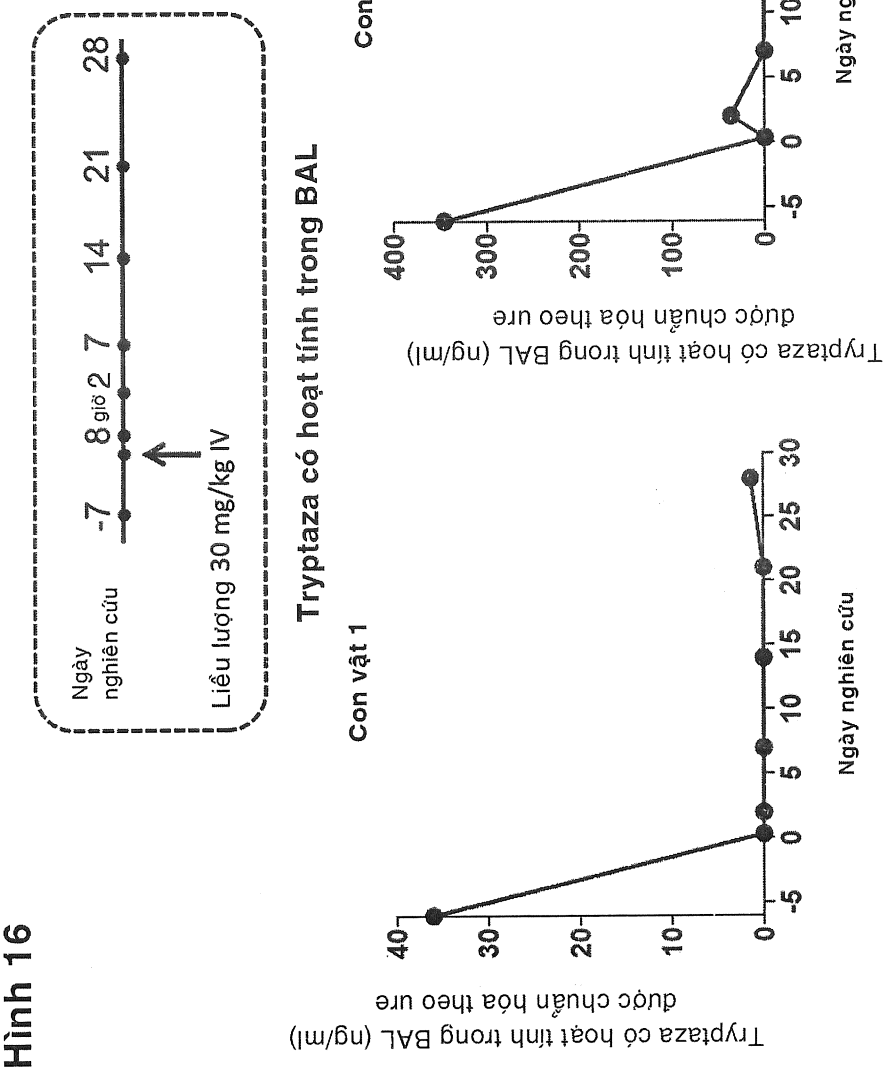
Hình 15


Monome tryptaza
Tetrame tryptaza
Thử nghiệm tryptaza có hoạt tính
+ SBTI
+ ABP: đánh dấu tryptaza có hoạt tính
Thẻ biotin
Gốc liên kết
+Chất ức chế SM: ngừng quá trình đánh dấu
Nhóm có tính phản ứng tryptaza cụ thể
+ Ab: tetrame làm phân ly
Av-HRP
ABP được đánh dấu Biotin
Ab bắt tryptaza

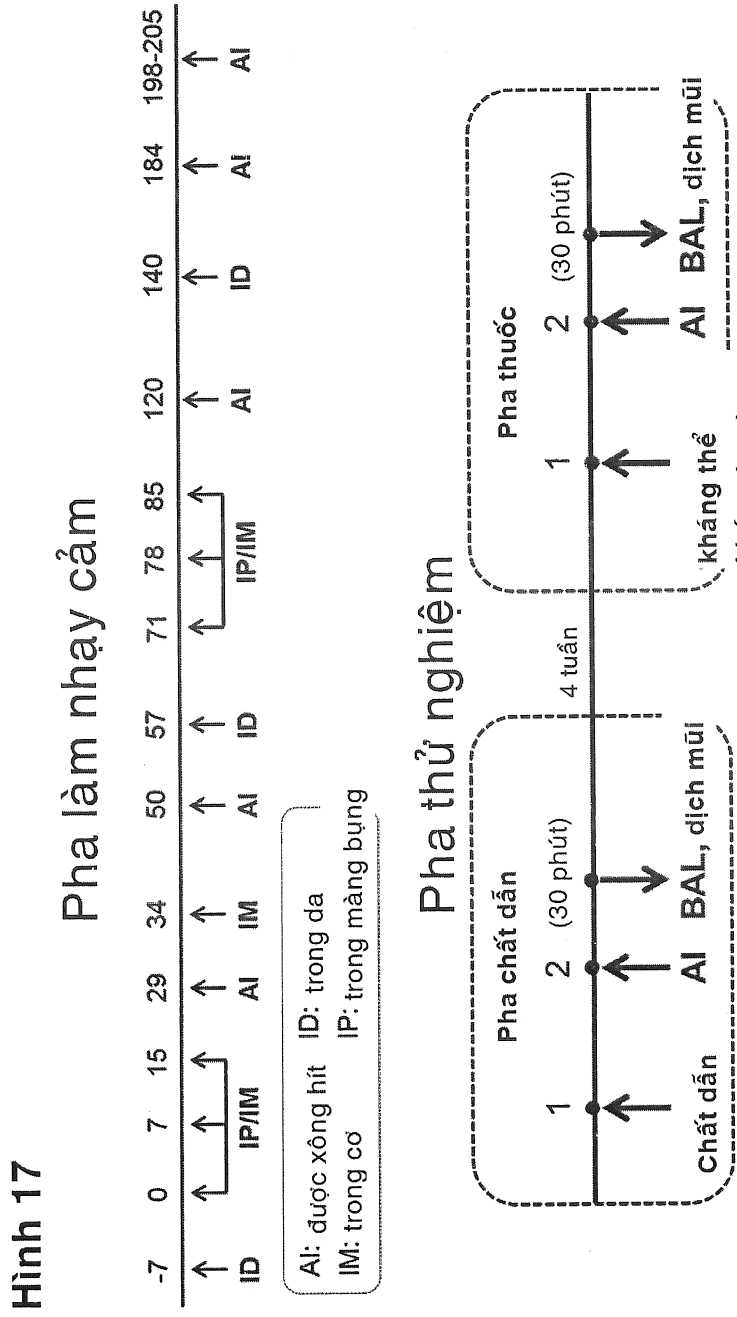
Hình 15 (tiếp)


Tetrame tryptaza
Monome tryptaza
Thử nghiệm tổng tryptaza
+ Ab: tetrame làm phân ly
Av-HRP
Ab phát hiện được đánh dấu biotin
Ab bắt tryptaza

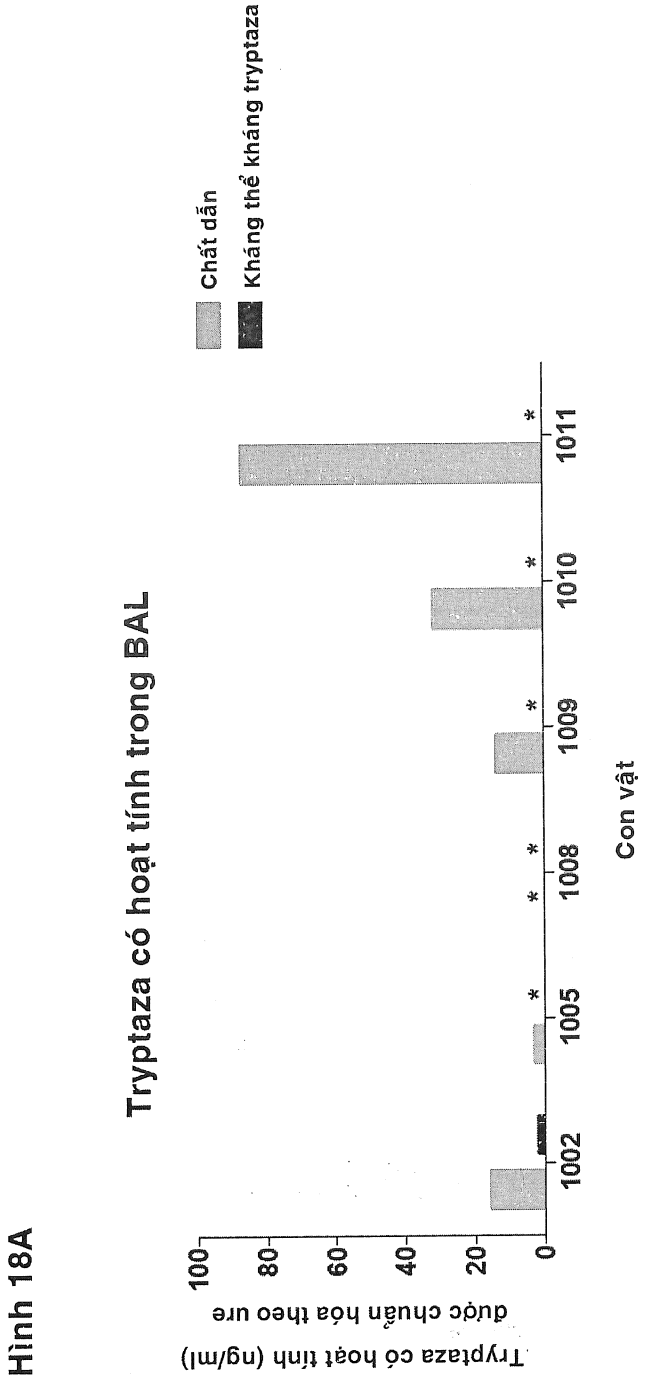
Hình 16


Ngày nghiên cứu
-7
8 giờ
2
7
14
21
28
Liều lượng 30 mg/kg IV
Tryptaza có hoạt tính trong BAL
Con vật 1
Tryptaza có hoạt tính trong BAL (ng/ml) được chuẩn hóa theo ure
Ngày nghiên cứu
Con vật 2
Tryptaza có hoạt tính trong BAL (ng/ml) được chuẩn hóa theo ure
Ngày nghiên cứu

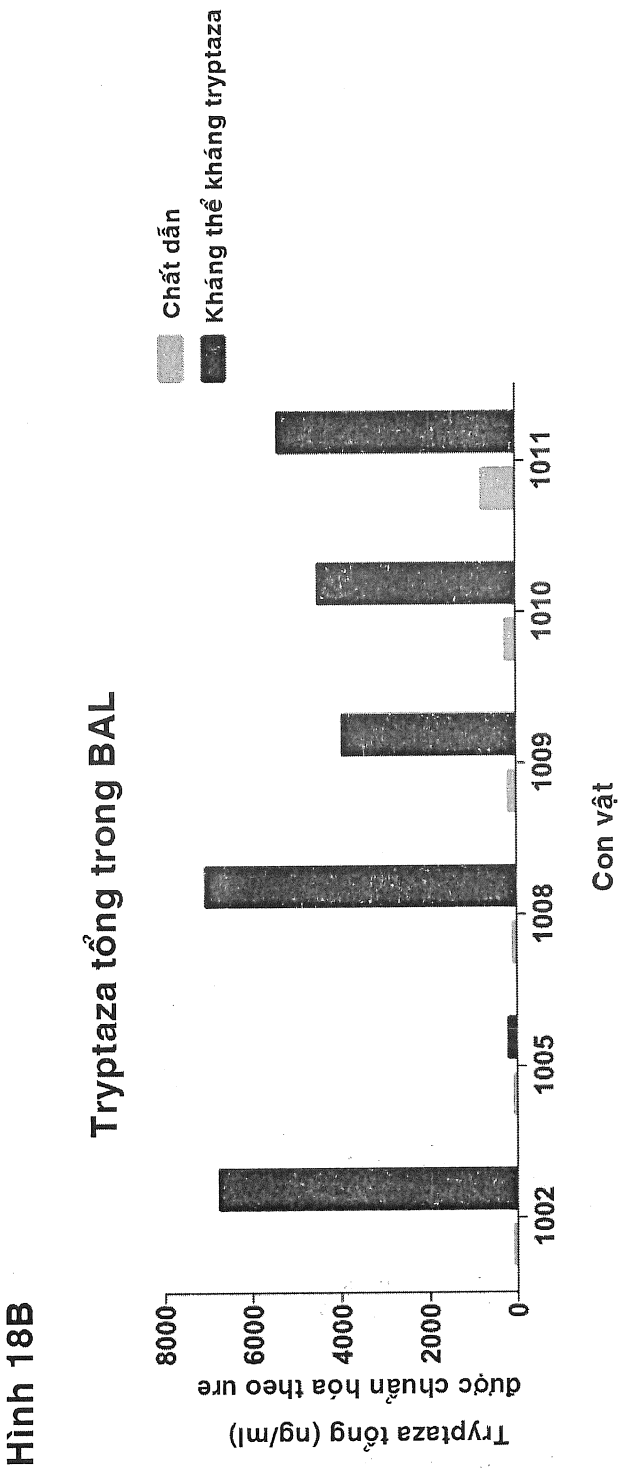
Hình 17


Pha làm nhạy cảm
-7
0
7
15
29
34
50
57
71
78
85
120
140
184
198-205
ID
IP/IM
AI
IM
AI
ID
IP/IM
AI
ID
AI
AI: được xông hít
IM: trong cơ
ID: trong da
IP: trong màng bụng
Pha thử nghiệm
Pha chất dẫn
1
2 (30 phút)
4 tuần
Chất dẫn
AI
BAL, dịch mũi
Pha thuốc
1
2 (30 phút)
kháng thể
AI
BAL, dịch mũi
kháng tryptaza

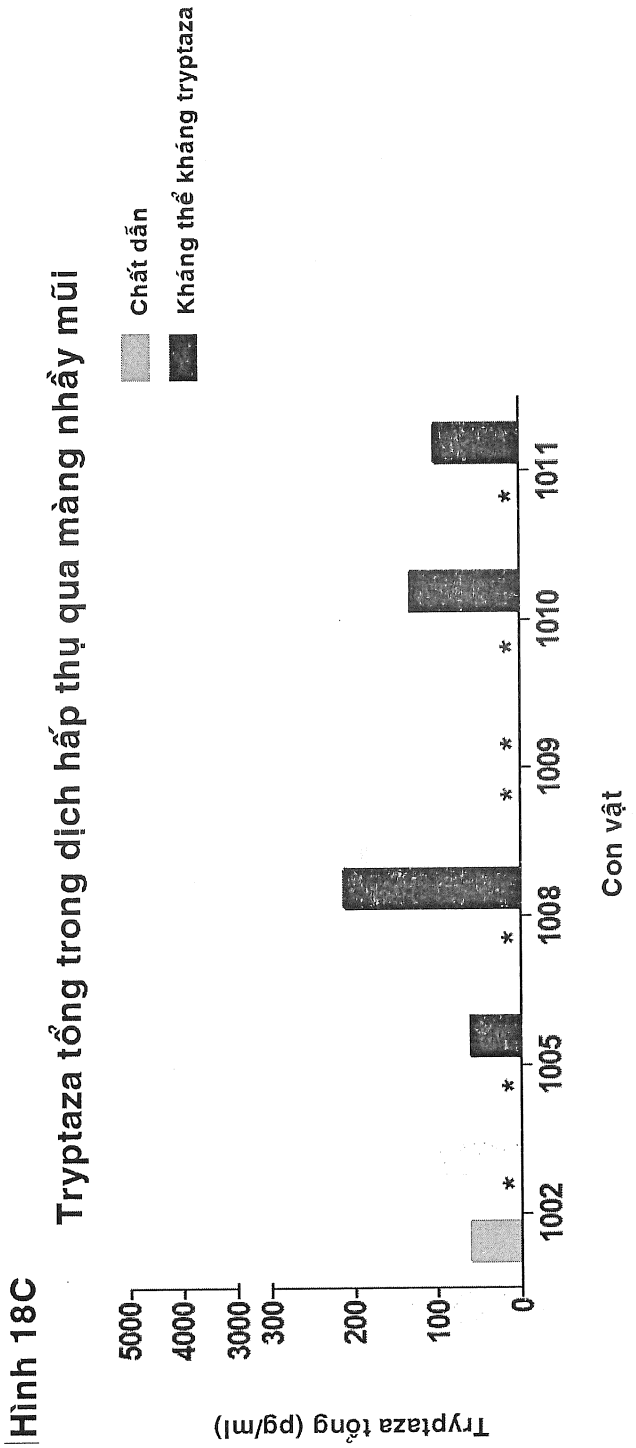
Hình 18A


Tryptaza có hoạt tính trong BAL
Chất dẫn
Kháng thể kháng tryptaza
Tryptaza có hoạt tính (ng/ml)
được chuẩn hóa theo ure
100
80
60
40
20
0
1002
1005
1008
1009
1010
1011
Con vật
*

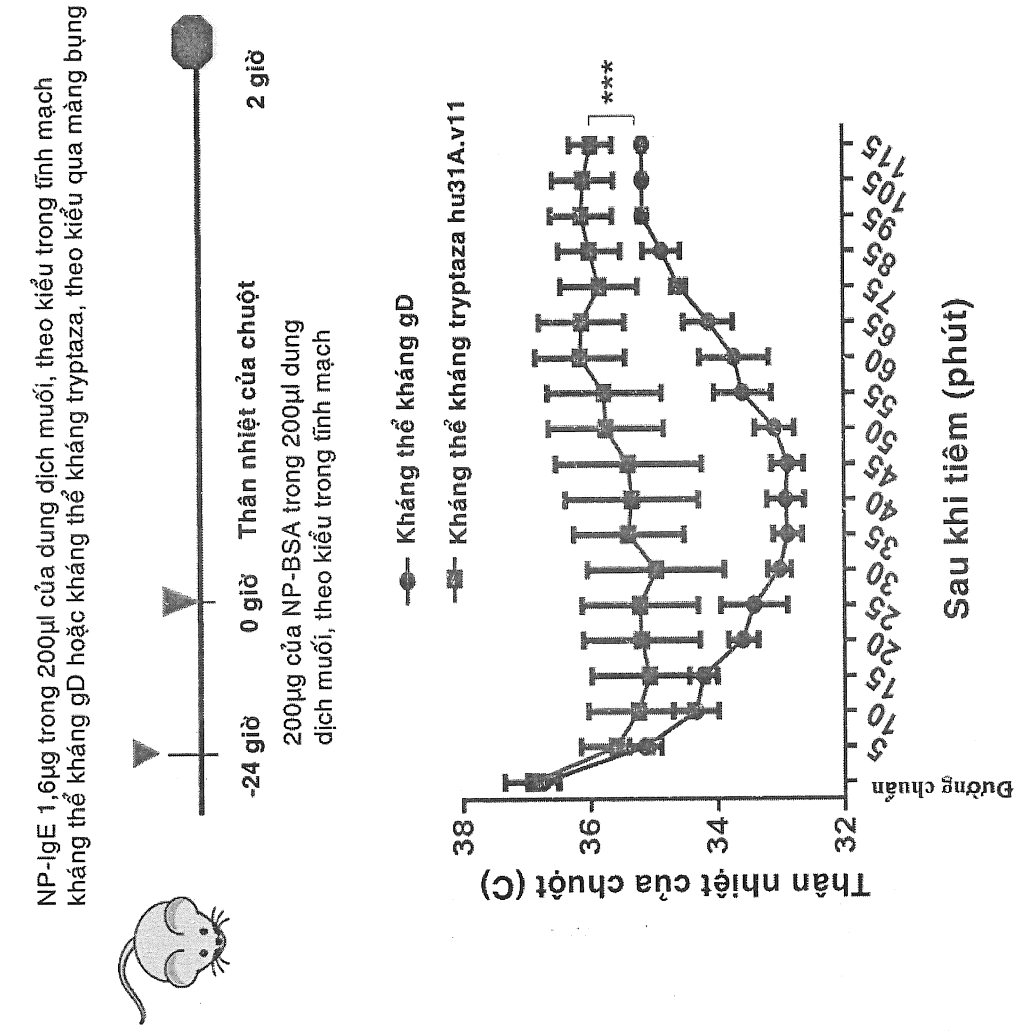
Hình 18B


Tryptaza tổng trong BAL
Chất dẫn
Kháng thể kháng tryptaza
Tryptaza tổng (ng/ml)
được chuẩn hóa theo ure
8000
6000
4000
2000
0
1002
1005
1008
1009
1010
1011
Con vật

Hình 18C


Tryptaza tổng trong dịch hấp thụ qua màng nhầy mũi
Chất dẫn
Kháng thể kháng tryptaza
Tryptaza tổng (pg/ml)
5000
4000
3000
300
200
100
0
1002
1005
1008
1009
1010
1011
Con vật

Hình 19


NP-IgE 1,6µg trong 200µl của dung dịch muối, theo kiểu trong tĩnh mạch
kháng thể kháng gD hoặc kháng thể kháng tryptaza, theo kiểu qua màng bụng
-24 giờ
0 giờ
Thân nhiệt của chuột
2 giờ
200µg của NP-BSA trong 200µl dung
dịch muối, theo kiểu trong tĩnh mạch
Kháng thể kháng gD
Kháng thể kháng tryptaza hu31A.v11
***
Thân nhiệt của chuột (C)
38
36
34
32
Sau khi tiêm (phút)
Đường chuẩn
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 115

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Genentech, Inc.
F. Hoffman-La Roche AG

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP KHÁNG TRYPTAZA VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 50474-112WO2

<150> US 62/457,722
<151> 10-02-2017

<160> 128

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> X là Asp hoặc Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X là Tyr hoặc Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X là Val hoặc His

<400> 1

Xaa Xaa Gly Met Xaa
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 2

Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X là Asn hoặc Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> X là Tyr hoặc Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> X là Asp hoặc Tyr

<400> 3

Arg Xaa Xaa Xaa Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 5

Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 6

Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 7

Asp Tyr Gly Met Val
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 8

Arg Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 9

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

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

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 10

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

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

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 11
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 11

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

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

<210> 12
<211> 14

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 13

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg
20 25 30

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 17

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 19

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

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

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 20

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

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 21

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 22

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 23

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 24

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 25
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 25

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

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys
20

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 26

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 27
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 27

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 28

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 29

Arg Asp Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 30

Gly Tyr Ala Ile Thr
1 5

<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 31

Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys Ser
1 5 10 15

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 32

Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 33

Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn Arg Leu Gly
1 5 10

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

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 34

Glu Thr Ser Ile Leu Thr Ser
1 5

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 35

Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser Gly Asp Thr Thr
1 5 10

<210> 36
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 36

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

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

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

Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 37
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95

Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 38

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile
20 25 30

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X là Ile hoặc Val

<400> 39

Trp Xaa Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 40
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X là Val hoặc Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> X là Arg hoặc Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X là Val hoặc Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> X là Tyr hoặc Phe

<400> 40

Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 41

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 42

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 43

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 44
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 44

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile
20 25 30

<210> 45

<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 45

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 46
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 46

Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 47
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 47

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

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

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

Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 48
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 48

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

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

Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 49
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 49

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

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

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

Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 50
<211> 122

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 50

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

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

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

Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 51
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 51

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

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

Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 52
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 52

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

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

Ile Thr Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Glu Asn Thr Val Thr Leu Lys
65 70 75 80

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

Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 53

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

Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Arg Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Glu Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95

Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

100 105 110

<210> 54
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 54

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile
20 25

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 55

Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 56

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Glu Asn Thr Val Thr Leu Lys
1 5 10 15

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 58

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Arg Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95

Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 59

<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 59

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

Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Arg Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Glu Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
65 70 75 80

Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95

Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 60
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X là Ile hoặc Ala

<220>
<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)
<223> X là Met hoặc Leu

<400> 60

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> X là Ala hoặc Pro

<400> 61

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 62
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X là Gly hoặc Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> X là Tyr hoặc Phe

<400> 62

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Xaa Cys
20 25 30

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 63

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 64
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 64

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 65

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 66
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 66

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 67
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 67

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

Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys
20

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 68

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 69

<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> X là Cys hoặc Ala

<400> 69

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

Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Xaa Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 70

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
1 5 10

<210> 71
<211> 275
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 71

Met Leu Asn Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala Ser Arg Ala
1 5 10 15

Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Gly Gln Ala Leu Gln Arg Val Gly Ile Val
20 25 30

Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu

35 40 45

Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile
50 55 60

His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp Val
65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu Tyr
85 90 95

Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro Gln
100 105 110

Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu
115 120 125

Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr Gly Trp
145 150 155 160

Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro Leu Lys
165 170 175

Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala Lys Tyr
180 185 190

His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg Asp Asp
195 200 205

Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser
210 215 220

Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln Ala Gly
225 230 235 240

Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro Gly Ile
245 250 255

Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr Val Pro
260 265 270

Lys Lys Pro
275

<210> 72
<211> 275
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 72

Met Leu Asn Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala Ser Arg Ala
1 5 10 15

Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Gly Gln Ala Leu Gln Arg Val Gly Ile Val
20 25 30

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

Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile
50 55 60

His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp Val
65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu Tyr
85 90 95

Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro Gln
100 105 110

Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu
115 120 125

Glu Pro Val Lys Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr Gly Trp
145 150 155 160

Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro Leu Lys
165 170 175

Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala Lys Tyr
180 185 190

His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg Asp Asp
195 200 205

Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser
210 215 220

Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln Ala Gly
225 230 235 240

Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro Gly Ile
245 250 255

Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr Val Pro
260 265 270

Lys Lys Pro
275

<210> 73
<211> 233
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 73

Met Leu Asn Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala Ser Arg Ala
1 5 10 15

Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Gly Gln Ala Leu Gln Arg Val Gly Ile Val
20 25 30

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

Arg Val Arg Asp Arg Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile
50 55 60

His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp Val
65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu Tyr
85 90 95

Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro Gln
100 105 110

Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu
115 120 125

Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr Gly Trp
145 150 155 160

Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro Leu Lys
165 170 175

Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala Lys Tyr
180 185 190

His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg Asp Asp
195 200 205

Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Val Ala Thr
210 215 220

Ala Pro His Thr Phe Pro Ala Pro Ser
225 230

<210> 74
<211> 21
<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 74
gatggtgact gttccagttg c
21

<210> 75
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 75
cattggtgag ggtgcccgag ttc
23

<210> 76
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 76

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

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

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
```

290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 77
<211> 213
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 77

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

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

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 78

<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 78

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

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

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
50 55 60

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

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
```

385 390 395 400

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

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

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

<210> 79
<211> 213
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 79

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

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

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 80
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 80

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

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

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

Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly
450

<210> 81
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 81

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95

Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

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

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 82
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 82

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

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

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

Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

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

```
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
        195                 200                 205

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

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 83
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 83

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

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

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

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

```
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
                85                  90                  95

Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110

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

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 84

```
Ala Tyr Ser Val Asn
1               5
```

<210> 85
<211> 16

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 85

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

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 86

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn
1 5 10

<210> 87
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 87

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 88

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 89

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

<210> 90
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 90

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

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

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

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 92

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 93
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 93

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Phe Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 94
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 94

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

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

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

Gly Ala Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

<210> 95
<211> 36
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
1 5 10 15

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
20 25 30

Val Glu Ile Lys
35

<210> 96
<211> 38
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 96

Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe
1 5 10 15

Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly
20 25 30

Thr Glu Val Val Val Lys
35

<210> 97
<211> 245
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 97

Ile Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val

1 5 10 15

Ser Leu Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser
20 25 30

Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro
35 40 45

Asp Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His
50 55 60

Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His
65 70 75 80

Pro Gln Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu
85 90 95

Leu Glu Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu
100 105 110

Pro Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr
115 120 125

Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro
130 135 140

Leu Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala
145 150 155 160

Lys Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg
165 170 175

Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly
180 185 190

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln
195 200 205

Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro
210 215 220

Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr
225 230 235 240

Val Pro Lys Lys Pro
245

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 98

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

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

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

Gly Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 99

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

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 99

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

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

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 100
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 100

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

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

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 101
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 101

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

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

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met

50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 102
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 102

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

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

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

Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 103
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 103

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

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

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 104
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 104
gaagtgcagc tggtggaaag cggcggcggc ctggtgcagc caggcggcag cctgcgcctg
60

agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gattatggca tggtgtgggt gcgccaggcc
120

ccaggcaaag gcctggaatg ggtggccttc atcagcagcg gcagcagcac cgtgtattat
180

gccgatacca tgaaaggccg cttcaccatc agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat
240

ctgcagatga acagcctgcg cgccgaagat accgccgtgt attattgcac ccgccgcaac
300

tacgatgatt ggtatttcga tgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt ctcgagt
357

<210> 105
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 105
gatatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tcgcgtgacc
60

atcacctgca gcgccagcag cagcgtgacc tatatgtatt ggtatcagca gaaaccaggc
120

aaaagcccaa aaccatggat ctatcgcacc agcgatctgg ccagcggcgt gccaagccgc
180

ttcagcggca gcggcagcgg caccgatttc accctgacca tcagcagcct gcagccagaa
240

gatttcgcca cctattattg ccagcactat cacagctatc cactgacctt cggccagggt
300

accaaggtgg agatcaaa
318

<210> 106
<211> 1347
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 106
gaagtgcagc tggtggaaag cggcggcggc ctggtgcagc caggcggcag cctgcgcctg
60

agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gattatggca tggtgtgggt gcgccaggcc
120

ccaggcaaag gcctggaatg ggtggccttc atcagcagcg gcagcagcac cgtgtattat
180

gccgatacca tgaaaggccg cttcaccatc agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat
240

ctgcagatga acagcctgcg cgccgaagat accgccgtgt attattgcac ccgccgcaac
300

tacgatgatt ggtatttcga tgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt ctcgagtgcc
360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc
420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg
480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga
540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctctagca gcttgggcac ccagacctac
600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa
660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg
720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag
780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac
840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc
900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag
960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa
1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaagagatg
1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc
1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg
1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag
1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag
1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa
1347

<210> 107
<211> 639
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 107
gatatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tcgcgtgacc
60

atcacctgca gcgccagcag cagcgtgacc tatatgtatt ggtatcagca gaaaccaggc
120

aaaagcccaa aaccatggat ctatcgcacc agcgatctgg ccagcggcgt gccaagccgc
180

ttcagcggca gcggcagcgg caccgatttc accctgacca tcagcagcct gcagccagaa
240

gatttcgcca cctattattg ccagcactat cacagctatc cactgacctt cggccagggt
300

accaaggtgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct
360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcttct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc
420

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag
480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg
540

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg
600

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt
639

<210> 108
<211> 1338
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 108
gaagtgcagc tggtggaaag cggcggcggc ctggtgcagc caggcggcag cctgcgcctg
60

agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gattatggca tggtgtgggt gcgccaggcc
120

ccaggcaaag gcctggaatg ggtggccttc atcagcagcg gcagcagcac cgtgtattat
180

gccgatacca tgaaaggccg cttcaccatc agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat
240

ctgcagatga acagcctgcg cgccgaagat accgccgtgt attattgcac ccgccgcaac
300

tacgatgatt ggtatttcga tgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt ctcgagtgcc
360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctgct cccgcagtac ttctgagtcc
420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg
480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga
540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctctagca gcttgggcac caagacctac
600

acgtgcaacg tggatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaaacgcgt tgagtccaaa
660

tatggtcccc catgcccacc atgcccagca cctgagttcc tgggggggacc atcagtcttc
720

ctgttccccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc
780

gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc
840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt
900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc
960

aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg
1020

cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac
1080

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg
1140

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac
1200

ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat
1260

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc
1320

tccctgtctc tgggtaaa
1338

<210> 109
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 109
gaagtgcagc tggtggaaag cggcccaggc ctggtgaaac caagcgaaac cctgagcctg
60

acctgcaccg tgagccgctt cagcctgatc ggctatgcca tcacctggat ccgccagcca
120

ccaggcaaag gcctggaatg gatcggcggc atcagcagcg ccgccaccac cttctatagc
180

agctgggcca aaagccgcgt gaccatcagc cgcgatacca gcaaaaacca ggtgagcctg
240

aaactgagca gcgtgaccgc cgccgatacc gccgtgtatt attgcgcccg cgatccacgc
300

ggctatggcg ccgccctgga tcgcctggat ctgtggggcc agggcaccct ggtgaccgtc
360

tcgagt
366

<210> 110
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 110
gatatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tcgcgtgacc
60

atcacctgcc agagcatcaa aagcgtgtat aacaaccgcc tgggctggta tcagcagaaa
120

ccaggcaaag ccccaaaact gctgatctat gaaaccagca tcctgaccag cggcgtgcca
180

agccgcttca gcggcagcgg cagcggcacc gatttcaccc tgaccatcag cagcctgcag
240

ccagaagatt tcgccaccta ttattgcgcc ggcggcttcg atcgcagcgg cgataccacc
300

ttcggccagg gtaccaaggt ggagatcaaa
330

<210> 111
<211> 1356
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 111

gaagtgcagc tggtggaaag cggcccaggc ctggtgaaac caagcgaaac cctgagcctg
60

acctgcaccg tgagccgctt cagcctgatc ggctatgcca tcacctggat ccgccagcca
120

ccaggcaaag gcctggaatg gatcggcggc atcagcagcg ccgccaccac cttctatagc
180

agctgggcca aaagccgcgt gaccatcagc cgcgatacca gcaaaaacca ggtgagcctg
240

aaactgagca gcgtgaccgc cgccgatacc gccgtgtatt attgcgcccg cgatccacgc
300

ggctatggcg ccgccctgga tcgcctggat ctgtggggcc agggcaccct ggtgaccgtc
360

tcgagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg caccctcctc caagagcacc
420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt
660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg
720

gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg
780

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc
1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg
1080

gaagagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac
1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
1356

<210> 112
<211> 651
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 112
gatatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tcgcgtgacc
60

atcacctgcc agagcatcaa aagcgtgtat aacaaccgcc tgggctggta tcagcagaaa
120

ccaggcaaag ccccaaaact gctgatctat gaaaccagca tcctgaccag cggcgtgcca
180

agccgcttca gcggcagcgg cagcggcacc gatttcaccc tgaccatcag cagcctgcag
240

ccagaagatt tcgccaccta ttattgcgcc ggcggcttcg atcgcagcgg cgataccacc
300

ttcggccagg gtaccaaggt ggagatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc
360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgctt ctgttgtgtg cctgctgaat
420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt
480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc
540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc
600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t
651

<210> 113
<211> 1347
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 113
gaagtgcagc tggtggaaag cggcccaggc ctggtgaaac caagcgaaac cctgagcctg
60

acctgcaccg tgagccgctt cagcctgatc ggctatgcca tcacctggat ccgccagcca
120

ccaggcaaag gcctggaatg gatcggcggc atcagcagcg ccgccaccac cttctatagc
180

agctgggcca aaagccgcgt gaccatcagc cgcgatacca gcaaaaacca ggtgagcctg
240

aaactgagca gcgtgaccgc cgccgatacc gccgtgtatt attgcgcccg cgatccacgc
300

ggctatggcg ccgccctgga tcgcctggat ctgtggggcc agggcaccct ggtgaccgtc
360

tcgagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccccctgg caccctgctc ccgcagtact
420

tctgagtcca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc
600

aagacctaca cgtgcaacgt ggatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caaacgcgtt
660

gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca
720

tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag
780

gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac
840

gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc
900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag
960

tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa
1020

gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg
1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc
1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg
1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag
1260

gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag
1320

aagagcctct ccctgtctct gggtaaa
1347

<210> 114
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 114

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

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

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 115
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 115

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

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

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

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

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

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

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

<210> 116
<211> 256
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 116

Ile Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser
20 25 30

Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro
35 40 45

Asp Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His
50 55 60

Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His
65 70 75 80

Pro Gln Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu
85 90 95

Leu Glu Glu Pro Val Lys Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu
100 105 110

Pro Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr
115 120 125

Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro
130 135 140

Leu Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala
145 150 155 160

Lys Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg
165 170 175

Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly
180 185 190

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln
195 200 205

Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro
210 215 220

Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr
225 230 235 240

Val Pro Lys Lys Pro Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
245 250 255

<210> 117
<211> 256
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 117

Ile Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Arg Asp Arg Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser
20 25 30

Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro
35 40 45

Asp Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His
50 55 60

Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His
65 70 75 80

```
Pro Gln Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu
                85                  90                  95

Leu Glu Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu
            100                 105                 110

Pro Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr
        115                 120                 125

Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro
    130                 135                 140

Leu Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala
145                 150                 155                 160

Lys Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg
                165                 170                 175

Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly
            180                 185                 190

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln
        195                 200                 205

Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro
    210                 215                 220

Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr
225                 230                 235                 240

Val Pro Lys Lys Pro Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
                245                 250                 255
```

<210> 118
<211> 256
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 118

```
Ile Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val
1               5                   10                  15
```

Ser Leu Arg Val Arg Asp Arg Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser
20 25 30

Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Gly Pro
35 40 45

Asp Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His
50 55 60

Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His
65 70 75 80

Pro Gln Phe Tyr Ile Ile Gln Thr Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu
85 90 95

Leu Glu Glu Pro Val Asn Ile Ser Ser Arg Val His Thr Val Met Leu
100 105 110

Pro Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr
115 120 125

Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Pro Leu Ser Pro Pro Phe Pro
130 135 140

Leu Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala
145 150 155 160

Lys Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Ile Arg
165 170 175

Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Ser Gln Arg Asp Ser Cys Lys Gly
180 185 190

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln
195 200 205

Ala Gly Val Val Ser Trp Asp Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro
210 215 220

Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr
225 230 235 240

Val Pro Lys Lys Pro Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
245 250 255

<210> 119
<211> 268
<212> PRT
<213> Khỉ đuôi dài

<400> 119

Ala Leu Pro Val Leu Val Ser Pro Ala His Ala Ala Pro Ala Pro Gly
1 5 10 15

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

Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Leu His Gly Gln Tyr Trp
35 40 45

Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr
50 55 60

Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp Val Lys Asp Leu Ala Asp Leu Arg
65 70 75 80

Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro
85 90 95

Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro Gln Phe Tyr Ala Val Gln Ile Gly
100 105 110

Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Glu Pro Val Asn Val Ser Ser
115 120 125

His Val His Thr Val Thr Leu Pro Pro Ala Leu Glu Thr Phe Pro Pro
130 135 140

Gly Thr Pro Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Val

145 150 155 160

Arg Leu Pro Pro Pro Tyr Pro Leu Lys Glu Val Glu Val Pro Ile Val
165 170 175

Glu Asn Gln Leu Cys Asp Ala Glu Tyr His Thr Gly Leu His Thr Gly
180 185 190

Asp Ser Phe Arg Ile Val Arg Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Ser Glu
195 200 205

Lys His Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys
210 215 220

Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly
225 230 235 240

Cys Ala Leu Pro Asn Arg Pro Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr
245 250 255

Leu Asp Trp Ile His Arg Tyr Val Pro Glu Lys Pro
260 265

<210> 120
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 120

Ser Phe Ser Met Ser
1 5

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 121

Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 122
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 122

Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val
1 5 10

<210> 123
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 123

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr Gly Leu Ser Leu Leu Asn
1 5 10 15

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 124

Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser
1 5

<210> 125

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

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 125

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 126
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 126

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 127
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 127

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Leu Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 128
<211> 260
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc Tổng hợp

<400> 128

Ala Gly Ser Thr His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Ile
1 5 10 15

```
Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val Ser
            20                  25                  30

Leu Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu
        35                  40                  45

Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp
    50                  55                  60

Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro
                85                  90                  95

Gln Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu
            100                 105                 110

Glu Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu Pro
        115                 120                 125

Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr Gly
    130                 135                 140

Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro Leu
145                 150                 155                 160

Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala Lys
                165                 170                 175

Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg Asp
            180                 185                 190

Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp
        195                 200                 205

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln Ala
    210                 215                 220
```

```
Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro Gly
225                 230                 235                 240

Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr Val
                245                 250                 255

Pro Lys Lys Pro
            260
```