



(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) 
1-0020157

(51)⁷ **A61K 39/395, A61P 29/00, 37/02, 11/06,** (13) **B**
C07K 16/28

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2010-02157 | (22) | 20.02.2009 | | |
| (86) | PCT/US2009/001085 | 20.02.2009 | (87) | WO2009/136976 | 12.11.2009 |
| (30) | 61/066,538 | 21.02.2008 | US | | |
| | 61/145,901 | 20.01.2009 | US | | |
| (45) | 25.12.2018 | 369 | (43) | 25.08.2011 | 281 |
| (73) | Kirin-Amgen, Inc. (US)
c/o Amgen Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320, United States of America | | | | |
| (72) | BUDELSKY, Alison, L. (US) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.) | | | | |
-

(54) **CHẤT ỨC CHẾ SỰ HOẠT HÓA PHỨC HỢP THỤ THỂ HETEROME IL-17RA-IL-17RB**

(57) Sáng chế đề cập đến chất ức chế sự hoạt hóa phối hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bởi IL-25, chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB làm thành phần hoạt tính. Sáng chế còn đề cập đến chất ức chế sự hình thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bởi IL-25 và chất ức chế sự giải phóng ít nhất một chất điều biến gây viêm bởi IL-25, cũng như các phương pháp sử dụng khác nhau.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thành viên của họ thụ thể và phối tử Interleukin-17, thụ thể IL-17 A và thụ thể IL-17 B tạo thành phức hợp heterome có hoạt tính sinh học. Sáng chế còn đề cập đến chất đối kháng của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB và phương pháp sử dụng chất đối kháng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Họ Interleukin-17 là nhóm gồm sáu xytokin có liên quan về mặt cấu trúc, được gọi là IL-17A đến IL-17F, các xytokin này rất quan trọng trong việc điều tiết các đáp ứng miễn dịch. Ở mức cấu trúc bậc một, độ tương đồng tập trung chủ yếu ở vùng đầu C, là vùng có chứa bốn gốc xystein bảo toàn (được nêu trong tài liệu Kawaguchi et al., J. Allergy Clin Immunol 114:1265, 2004; Kolls and Linden, Immunity 21:467, 2004). Cấu trúc tinh thể của IL-17F được xác định, và được phát hiện là có đặc điểm cấu trúc giống với các yếu tố sinh trưởng của họ máu xystin (Hymowitz, et al., 2001, EMBO J. 20:5532-5341), nhóm phối tử homodime mà liên kết với và phát tín hiệu thông qua cả các cấu trúc đối homodime và heterome (Lu, et al., 2005, Nat. Rev. Neurosci. 6: 603-614; Barker, 2004, Neuron 42:529-533).

Các thụ thể IL-17 (IL-17R) cũng tạo thành họ protein xuyên màng typ I liên quan. Năm thành viên khác nhau của họ protein này đã được xác định (từ IL-17RA đến IL-17RE), một số thành viên trong số đó cũng có khả năng cắt nối luân phiên bao gồm các dạng tan được mà có thể đóng vai trò làm thụ thể bẩm sinh (Kolls and Linden, supra; Moseley et al., Cytokine Growth Factor Rev. 14:155, 2003). Mặc dù IL-17RA có thể multime hóa, không phụ thuộc vào phối tử, và được cho thấy là tạo thành phức hợp thụ thể heterome có hoạt tính sinh học với IL-17RC (Toy et al., J Immunol. 177:36; 2007), nhưng khả năng tạo thành các phức hợp IL-17R heterome khác (hoặc dạng xuyên màng, hoặc dạng tan được), và hoạt tính sinh học tạo thành, nếu có, thì vẫn chưa được biết đến. Theo đó, các phương án khác nhau của sáng chế được đề xuất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chất ức chế sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bởi IL-25, chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB làm thành phần hoạt tính, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB này là kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chất ức chế sự hình thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bởi IL-25, chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB làm thành phần hoạt tính, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB này là kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chất ức chế sự giải phóng ít nhất một chất điều biến gây viêm bởi IL-25, chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB làm thành phần hoạt tính, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB này là kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14. Chất điều biến gây viêm có thể được chọn từ nhóm bao gồm: IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, CXCL1, CXCL2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1 β , TNF α , RANK-L, LIF, PGE2, IL-12, MMP3, MMP9, GRO α và NO.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị minh họa các tác dụng đối với chứng tăng cảm đường hô hấp của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB. Các hình tròn trắng biểu thị kết quả thu được ở chuột nhắt (N=4) khi được sử dụng MSA và MuFc; các ô vuông trắng biểu thị kết quả thu được ở chuột nhắt (N=3) khi được sử dụng IL-25 và MuFc; các hình tam giác đen biểu thị kết quả thu được ở chuột nhắt (N=3) khi được sử dụng IL-25 và M751.

Fig. 2 thể hiện kỹ thuật thẩm tách Western, về cơ bản được tiến hành như trong ví dụ 11. Các dải 1 và 4 có chứa các chất đánh dấu phân tử lượng. Tấm A được thẩm kháng thể kháng IL-17RA, tấm B được thẩm kháng thể kháng HIS. Dải 2 là kết quả của đối chứng dương IL-17RA:HIS, dải 3 là kết quả làm kết tủa IL-17RA:HIS với IL-17RB:Fc. Dải 5 là kết quả đối chứng dương IL-17RD:HIS, dải 6 cho thấy rằng IL-17RD:HIS không thể kết tủa được với IL-17RB:Fc.

Fig. 3 là đồ thị minh họa chứng tăng cảm đường hô hấp (AHR) của chuột nhắt trong mô hình bệnh hen ovalbumin (OVA) trong ví dụ 14, thử nghiệm 1. Chuột nhắt được kích thích với nồng độ metacholin tăng và tính toán sự thay đổi PENH (enhanced pause) trên đường nền cơ sở $\pm$ SEM.

Fig. 4 minh họa khả năng đề kháng của phổi (RL) ở chuột nhắt trong mô hình bệnh hen OVA như nêu trong ví dụ 14. Diện tích dưới đường cong (AUC) của khả năng đề kháng (R) của đường hô hấp trung bình được thể hiện cho mỗi nhóm điều trị $\pm$ SEM. Fig. 4a thể hiện các kết quả từ thử nghiệm 2, Fig. 4b thể hiện các kết quả từ thử nghiệm 3.

Fig. 5 thể hiện kết quả phân tích số lượng tế bào trong dịch rửa phế nang-phế quản (BALF) như nêu trong ví dụ 14, thử nghiệm 1. Các kết quả được thể hiện là trong BALF toàn phần: (Fig. 5a) bạch cầu, (Fig. 5b) bạch cầu ưa eosin, (Fig. 5c) bạch cầu trung tính, (Fig. 5d) limpho bào, và (Fig. 5e) đại thực bào. Mỗi hình tròn đen biểu thị số lượng tế bào trong BALF từ một con chuột nhắt. Các so sánh phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA một chiều không thông số với kiểm định so sánh bội Dunn (* $p < 0,05$).

Fig. 6 tương tự với Fig. 5, nhưng thể hiện các kết quả từ thử nghiệm 2, ví dụ 14. Các kết quả được thể hiện là trong BALF toàn phần: (Fig. 6a) bạch cầu, (Fig. 6b) bạch cầu ưa eosin, (Fig. 6c) bạch cầu trung tính, (Fig. 6d) limpho bào, và (Fig. 6e) đại thực bào. Các so sánh phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phân tích phương sai (ANOVA) một chiều với kiểm định so sánh bội Bonferroni (* $p < 0,05$).

Fig. 7 thể hiện các kết quả từ thử nghiệm 3, ví dụ 14. Các kết quả được thể hiện là trong BALF toàn phần: (Fig. 7a) bạch cầu, (Fig. 7b) bạch cầu ưa eosin, (Fig. 7c) bạch cầu trung tính, (Fig. 7d) limpho bào, và (Fig. 7e) đại thực bào. Mỗi hình tròn đen biểu thị số lượng tế bào trong BALF từ một con chuột nhắt. Các so sánh phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA một chiều không thông số với kiểm định so sánh bội Dunn (* $p < 0,05$).

Fig. 8 thể hiện nồng độ IL-13 trong BALF từ chuột nhắt trong mô hình bệnh hen OVA. Nồng độ IL-13 được xác định bằng kỹ thuật ELISA trong các mẫu BALF từ từng con chuột nhắt trong 3 thử nghiệm riêng biệt như được nêu trong ví dụ 14: (a) thử nghiệm 1, (b) thử nghiệm 2, (c) thử nghiệm 3. Mỗi hình tròn đen biểu thị giá trị từ một

con chuột nhất. Các đường ngang thể hiện giá trị trung bình của nhóm. Việc so sánh giữa các nhóm được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA một chiều. $*p<0,05$.

Fig. 9 thể hiện nồng độ IL-5 trong BALF từ chuột nhất trong mô hình bệnh hen OVA. Nồng độ IL-5 được xác định bằng kỹ thuật ELISA trong các mẫu BALF từ từng con chuột nhất trong 3 thử nghiệm riêng biệt như được nêu trong ví dụ 14: (a) thử nghiệm 1, (b) thử nghiệm 2, (c) thử nghiệm 3. Mỗi hình tròn đen biểu thị giá trị từ một con chuột nhất. Các đường ngang thể hiện giá trị trung bình của nhóm. Việc so sánh giữa các nhóm được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA một chiều. $*p<0,05$.

Fig. 10 thể hiện nồng độ IgE trong huyết thanh được xác định bằng kỹ thuật ELISA ở từng con chuột nhất trong mô hình bệnh hen OVA như được nêu trong ví dụ 14, trong (a) thử nghiệm 1, (b) thử nghiệm 2, (c) thử nghiệm 3. Nồng độ IgE trong huyết thanh của mỗi con chuột nhất được biểu thị bằng hình tròn đen. Các đường ngang thể hiện giá trị trung bình của nhóm. Việc so sánh giữa các nhóm được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA một chiều. $*p<0,05$.

Fig. 11 thể hiện điểm số mô học phổi từ các nhóm chuột nhất trong mô hình bệnh hen OVA như được nêu trong ví dụ 14, thử nghiệm 3. $*p<0,0001$, sử dụng kiểm định t không ghép cặp để so sánh thống kê.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các đề mục được sử dụng theo sáng chế chỉ nhằm mục đích tạo nên các phần cấu trúc cho bản mô tả và không được hiểu là làm giới hạn đối tượng được mô tả.

Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp oligonucleotit, ADN tái tổ hợp, biến nạp và nuôi cấy mô, tinh chế protein v.v.. Các phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế có thể được thực hiện theo tài liệu mô tả của nhà sản xuất hoặc như thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được nêu theo sáng chế. Các quy trình và kỹ thuật sau đây có thể thường được thực hiện theo các phương pháp thông dụng đã biết rõ trong lĩnh vực và như được nêu trong nhiều tài liệu tham khảo tổng quát và các tài liệu tham khảo cụ thể hơn, các tài liệu này được trích dẫn và được nêu trong suốt bản mô tả. Xem, ví dụ, Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Trừ khi có quy định cụ thể, thuật ngữ được sử dụng cho, và các quy trình

và kỹ thuật phòng thí nghiệm về, hóa học phân tích, hóa học hữu cơ và hóa dược và y khoa được nêu theo sáng chế là thuật ngữ đã biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, bào chế dược phẩm, phối trộn, đưa vào và điều trị bệnh nhân.

Việc xác định đặc tính, tạo dòng và tạo ra IL-17RA đã được nêu, ví dụ, trong US 6,072,033, cấp ngày 06/06/2000. Trình tự axit amin của IL-17RA của người được mô tả bởi SEQ ID NO:10 trong US 6,072,033 (số truy cập Ngân hàng gen NM_014339). IL-17RA của người có peptit tín hiệu đầu N với vị trí phân cắt được dự đoán nằm trong khoảng axit amin 27 và 28. Peptit tín hiệu được theo sau bởi miền ngoại bào dài 293 axit amin, miền xuyên màng dài 21 axit amin, và đuôi bào chất dài 525 axit amin. Các dạng tan được của IL-17RA của người (huIL-17RA) hữu dụng trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm miền ngoại bào (các gốc từ 1 đến 320 hoặc các gốc từ 28 đến 320, ngoại trừ peptit tín hiệu) hoặc mảnh của miền ngoại bào mà giữ được khả năng liên kết với IL-17A. Các dạng khác của IL-17RA hữu dụng theo sáng chế bao gồm các mutein và các biến thể có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là nằm trong khoảng từ 70% đến 99% so với IL-17RA nguyên gốc mà vẫn giữ được khả năng liên kết với IL-17A, như mô tả chi tiết cụ thể trong US 6,072,033.

Thụ thể IL-17 B (IL-17RB) và các dạng tương đồng của nó đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các thụ thể được bộc lộ và được nêu trong tài liệu Tian et al., Oncogene 19:2098 (2000). Các ví dụ khác bao gồm các trình tự có sẵn trên các cơ sở dữ liệu công khai, như, nhưng không giới hạn ở, số truy cập Ngân hàng gen NM_018725. Ngoài ra, như được nêu dưới đây, IL-17RB cũng có thể bao gồm các mảnh và/hoặc biến thể có hoạt tính sinh học.

IL-17RA kết hợp với IL-17RB để tạo thành phức hợp thụ thể heterome có hoạt tính sinh học (tức là thông qua việc liên kết với phối tử, phức hợp thụ thể này được hoạt hóa và truyền tín hiệu vào trong tế bào mà ở đó tín hiệu này được biểu hiện, tạo ra hoạt tính sinh học, như kích thích các mARN, tiết xytokin, thay đổi hình thái hoặc trạng thái hoạt hóa của tế bào này, v.v.). Mỗi thành viên của phức hợp thụ thể heterome được gọi là “thành phần” hoặc “cấu trúc dưới phân tử” của chúng. Theo sáng chế, “phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB” (hoặc “phức hợp thụ thể heterome”) chỉ phức hợp chứa ít nhất IL-17RA và IL-17RB; các cấu trúc dưới phân tử

hoặc thành phần bổ sung cũng có thể tạo thành một phần của phức hợp thụ thể heterome.

Do đó, các khía cạnh nhất định của sáng chế đề xuất chất (ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên được nêu dưới đây) và phương pháp phong bế sự kết hợp của IL-17RA với IL-17RB (và/hoặc với cấu trúc dưới phân tử bổ sung của thụ thể) và do đó ngăn chặn sự tạo thành phức hợp thụ thể chức năng (phức hợp thụ thể có khả năng được hoạt hóa). Các khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chất đối kháng mà liên kết với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, hoặc cấu trúc dưới phân tử hoặc thành phần của chúng, và ức chế sự liên kết của phối tử (tức là, IL-25) và sự hoạt hóa phức hợp thụ thể sau đó. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chất đối kháng mà liên kết với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB hoặc cấu trúc dưới phân tử của chúng, và ngăn chặn sự hoạt hóa xảy ra. Việc ngăn chặn không để tạo thành và/hoặc hoạt hóa phức hợp thụ thể chức năng sẽ làm giảm hoặc ngăn chặn sự truyền tín hiệu và làm giảm các tác dụng gây viêm xuôi dòng của sự hoạt hóa IL-17RA/IL-17RB. Các phương pháp và chất đối kháng này sẽ hữu dụng trong điều trị các rối loạn tự miễn và viêm khác nhau mà bị tác động bởi quá trình IL-17/IL-17R. Các phương án của sáng chế hữu dụng đối với các thử nghiệm *in vitro* để sàng lọc chất đối kháng hoặc chất chủ vận của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB và/hoặc để nhận diện các tế bào biểu hiện phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB.

Ngoài ra, việc biết rằng cả IL-17RA và IL-17RB đều cần thiết để tạo thành phức hợp thụ thể IL-25 chức năng đã mang lại hiểu biết về các chất khác (như các protein liên kết kháng nguyên) mà hữu dụng trong việc ức chế hoặc đối kháng hoạt tính sinh học của IL-25. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với một hoặc nhiều cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể (ví dụ, kháng thể liên kết IL-17RA, hoặc kháng thể liên kết IL-17RB) và ức chế sự liên kết hoặc hoạt hóa phức hợp thụ thể bởi IL-25 sẽ là chất đối kháng hữu dụng của IL-25.

Theo một số phương án, chất đối kháng theo sáng chế là phân tử “đã được phân lập” hoặc “về cơ bản tinh khiết” (hoặc “về cơ bản đồng nhất”). Thuật ngữ “phân tử được phân lập” (trong đó phân tử này là, ví dụ, polypeptit, peptit hoặc kháng thể) là phân tử mà theo nguồn gốc hoặc nguồn thu được nó (1) không kết hợp với các thành

phần kết hợp tự nhiên mà đi kèm với nó ở trạng thái nguyên gốc, (2) về cơ bản không chứa các phân tử khác từ cùng loài (3) được biểu hiện bởi tế bào từ loài khác, hoặc (4) không có trong tự nhiên. Do đó, phân tử mà được tổng hợp bằng phương pháp hóa học, hoặc được tổng hợp trong hệ tế bào khác với tế bào mà nó có nguồn gốc tự nhiên từ đó sẽ được "phân lập" ra khỏi các thành phần kết hợp tự nhiên của nó.

Phân tử cũng có thể được làm cho về cơ bản không chứa các thành phần kết hợp tự nhiên bằng cách phân lập, sử dụng các kỹ thuật tinh chế đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (tức là, protein “đã được tinh chế”). Độ đồng nhất hoặc độ tinh khiết phân tử có thể được thử nghiệm bằng nhiều cách đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, độ tinh khiết của mẫu polypeptit có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamit và kỹ thuật nhuộm gel để làm hiển thị polypeptit bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tùy theo từng mục đích cụ thể, có thể tạo ra độ phân giải cao hơn bằng cách sử dụng HPLC hoặc các kỹ thuật khác đã biết rõ trong lĩnh vực tinh chế.

Chất đối kháng “đã được phân lập” (tức là, protein, polypeptit, peptit hoặc kháng thể) không bị đi kèm bởi ít nhất một nguyên liệu nào đó trong số các nguyên liệu mà nó thường kết hợp ở trạng thái tự nhiên của nó, theo một phương án, cấu thành ít nhất khoảng 5%, theo phương án khác, ít nhất khoảng 50% trọng lượng của toàn bộ protein trong mẫu đã cho. Protein “về cơ bản tinh khiết” chứa tổng protein là ít nhất khoảng 75% trọng lượng, với ít nhất khoảng 80% là đặc hiệu, và ít nhất khoảng 90% là đặc biệt đặc hiệu. Định nghĩa này bao gồm cả việc sản xuất protein từ một sinh vật trong sinh vật hoặc tế bào chủ khác. Theo cách khác, protein có thể được tạo ra với nồng độ cao hơn đáng kể so với nồng độ thường thấy, thông qua việc sử dụng trình tự khởi đầu cảm ứng hoặc trình tự khởi đầu biểu hiện cao, sao cho protein được tạo ra với mức nồng độ tăng.

Tuy nhiên, các khía cạnh này chỉ là một số khía cạnh trong số nhiều khía cạnh của các phương án khác nhau theo sáng chế.

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB

IL-17RA kết hợp với IL-17RB để tạo thành phức hợp thụ thể heterome có hoạt tính sinh học (tức là, khi được hoạt hóa bởi sự liên kết của phối tử, tín hiệu được truyền đến tế bào gây ra sự thay đổi hoạt tính sinh học của tế bào này, ví dụ, kích thích

các mARN, tiết xytokin, thay đổi hình thái hoặc trạng thái hoạt hóa của tế bào này, v.v.). Phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB được định nghĩa là sự kết hợp (như, nhưng không giới hạn ở, tương tác protein-protein) của ít nhất protein IL-17RA và protein IL-17RB được biểu hiện ở dạng phức hợp thụ thể heterome trên màng ngoại bào của tế bào. Phức hợp thụ thể heterome này ít nhất là cần thiết cho việc phát tín hiệu IL-25, tức là, hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB. Cần hiểu rằng phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB còn có thể chứa các protein bổ sung (tức là, protein “phụ trợ”). Ví dụ, phân tử phát tín hiệu được gọi là Act-1 là một phần của chu trình phát tín hiệu IL-17A, và bằng chứng gần đây cho thấy rằng nó cũng có thể có liên quan đến sự phát tín hiệu IL-25 (Claudio et al., J. Immunol. 182:1617, 2009; Swaidani et al., J. Immunol. 182:1631, 2009). Sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB được thực hiện thông qua sự liên kết của các thành viên của họ phối tử IL-17, như, nhưng không giới hạn ở, IL-25 (IL-17E). Sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bao gồm, nhưng không giới hạn ở, khởi động (các) chu trình phát tín hiệu nội bào và các sự kiện xuôi dòng, như phiên mã và dịch mã gen.

Các phương án đề xuất chất đối kháng, bao gồm protein liên kết kháng nguyên, mà ức chế sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử (tức là, IL-17RA và IL-17RB và/hoặc protein phụ trợ) để tránh tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, cũng như đề xuất chất đối kháng (tức là, protein liên kết kháng nguyên) ức chế liên kết của phối tử (tức là, IL-25) với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB hoặc cấu trúc dưới phân tử của chúng. Các phương án khác đề xuất chất đối kháng (bao gồm protein liên kết kháng nguyên) liên kết với một hoặc nhiều cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB và gây ra sự thay đổi cấu dạng mà ngăn chặn sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp này, sự liên kết của phối tử với chúng, hoặc sự hoạt hóa chúng.

Theo sáng chế, “protein liên kết kháng nguyên” là protein liên kết đặc hiệu với protein đích xác định (ví dụ, cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, hoặc chính phức hợp thụ thể heterome). “Liên kết đặc hiệu” có nghĩa là protein liên kết kháng nguyên có ái lực đối với protein đích xác định lớn hơn so với protein khác. Thông thường, “liên kết đặc hiệu” có nghĩa là hệ số phân ly cân bằng là từ $< 10^{-7}$ đến 10^{-11} M, hoặc từ $< 10^{-8}$ đến $< 10^{-10}$ M, hoặc từ $< 10^{-9}$ đến $< 10^{-10}$ M.

Protein liên kết kháng nguyên bao gồm kháng thể, hoặc mảnh của chúng, mà liên kết đặc hiệu với protein đích xác định, như được nêu theo cách khác nhau theo sáng chế, cũng như peptit hoặc polypeptit liên kết đặc hiệu với protein đích xác định. Theo sáng chế, protein liên kết kháng nguyên ức chế sự tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB hoặc ức chế liên kết của phối tử với chúng hoặc sự phát tín hiệu bởi chúng được gọi là chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB. Do đó, các phương án của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể liên kết với một phần bất kỳ của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB (tức là, với chính phức hợp này hoặc với cấu trúc dưới phân tử của chúng) và ức chế sự hoạt hóa thụ thể. Các phân nhóm của nhóm chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm kháng thể, như được nêu theo cách khác nhau theo sáng chế, cũng như peptit và polypeptit.

Theo sáng chế, việc hoạt hóa hoặc sự hoạt hóa thụ thể được định nghĩa là việc sử dụng một hoặc nhiều chu trình phát tín hiệu nội bào và việc truyền phát tín hiệu nội bào (tức là, sự truyền tín hiệu) để đáp ứng lại sự liên kết phân tử với thụ thể liên kết màng, như, nhưng không giới hạn ở, tương tác thụ thể:phối tử. Theo sáng chế, sự truyền tín hiệu là sự chuyển tín hiệu bằng cách chuyển hóa từ dạng vật lý hoặc hóa học thành dạng khác, ví dụ, trong sinh học tế bào, là quá trình mà qua đó tế bào chuyển hóa tín hiệu ngoại bào thành một đáp ứng (như tiết xytokin, tăng sinh hoặc thay đổi trạng thái hoạt hóa của tế bào này).

“Sự ức chế” có thể được xác định dưới dạng sự giảm hoạt tính của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, ví dụ, sự giảm tạo thành phức hợp thụ thể heterome, sự giảm liên kết của phối tử (tức là IL-17A IL-17F và/hoặc IL-25) với phức hợp thụ thể heterome (hoặc ít nhất một cấu trúc dưới phân tử của chúng), hoặc sự giảm hoạt tính sinh học đáp ứng lại phối tử, như IL-17A, IL-17F và/hoặc IL-25 (tức là, kích thích sự tiết xytokin, thay đổi số lượng hoặc trạng thái hoạt hóa của tế bào, hoặc các tác dụng sinh học khác) ít nhất là 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 100%. Theo một phương án, chất đối kháng theo sáng chế làm giảm hoạt tính của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB ít nhất là 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 100%; theo phương án khác, chất đối kháng theo sáng chế ức chế hoạt tính ít nhất là 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% hoặc hơn.

Sự ức chế việc tạo thành phức hợp thụ thể heterome có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, như, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp đồng kết tủa miễn dịch được nêu theo sáng chế. Các ví dụ khác bao gồm phép phân tích chuyển hóa năng lượng cộng hưởng Forster (FRET) và các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực và có thể được sử dụng để phân tích định lượng và định tính tương tác phối tử/thụ thể. Sự ức chế liên kết của phối tử cũng có thể được xác định bằng các kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, như FACS, EIA, RIA, các thử nghiệm đã nêu ở trên, và các phương pháp đã biết trong lĩnh vực để đánh giá tương tác của hai hoặc nhiều phân tử, bao gồm các phương pháp được nêu theo sáng chế và trong US 11/906,094.

Ngoài ra, “sự ức chế” có thể được xác định dưới dạng sự mất khả năng hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bởi IL-25 như được xác định bằng (các) kết quả liên quan đến sinh học, như, nhưng không giới hạn ở, điều tiết tăng sự phiên mã gen (ví dụ, mức mRNA của IL-5, IL-13, eotaxin, MCP-1 và/hoặc IL-17RB tăng) và/hoặc sự dịch mã gen, và/hoặc sự giải phóng nhiều yếu tố khác có liên quan đến sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, bao gồm IL-5 và/hoặc IL-13, cũng như chất điều biến gây viêm bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực là được giải phóng từ các tế bào biểu hiện IL-17RA và/hoặc IL-17RB bất kỳ. Các kết quả liên quan đến sinh học khác bao gồm sự thay đổi về số lượng và/hoặc hình thái của tế bào trong mẫu sinh học (như số lượng tế bào tăng trong các mẫu rửa phế nang-phế quản, chứng tăng sản tế bào dạng chén và/hoặc bệnh viêm mạch/quanh mạch ở các mẫu mô phổi).

Các phương án khác của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB đề xuất chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB mà liên kết với IL-17RA. Theo một phương án, chất đối kháng này ức chế một phần hoặc ức chế hoàn toàn sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB và do đó ngăn chặn sự tạo thành phức hợp thụ thể heterome. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB không cần phải phong bế liên kết của IL-25 với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể phong bế liên kết của IL-25 với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB (hoặc với cấu trúc dưới phân tử của chúng).

Các phương án bổ sung của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB đề xuất chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB mà liên kết với IL-17RB. Theo một phương án, chất đối kháng này ức chế một phần hoặc ức chế hoàn toàn sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB và do đó ngăn chặn sự tạo thành phức hợp thụ thể heterome. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB không cần phải phong bế liên kết của IL-25 với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể phong bế liên kết của IL-25 với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB (hoặc với cấu trúc dưới phân tử của chúng).

Các phương án khác nữa của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB đề xuất chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với cả IL-17RA và IL-17RB, bao gồm các chất đối kháng liên kết với phức hợp thụ thể heterome. Theo một phương án, chất đối kháng ức chế một phần hoặc ức chế hoàn toàn sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB và do đó ngăn chặn sự tạo thành phức hợp thụ thể heterome. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB không cần phải phong bế liên kết của IL-25 với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể phong bế liên kết của IL-25 với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB (hoặc với cấu trúc dưới phân tử của chúng).

Các phương án khác nhau của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB nêu trên bao gồm chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB mà liên kết với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc với phức hợp thụ thể heterome, và ức chế hoặc cản trở về mặt không gian sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, do đó ngăn chặn sự tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Trong ví dụ về sự cản trở về mặt không gian sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, liên kết của chất đối kháng với cấu trúc dưới phân tử xảy ra ở vị trí cần thiết cho sự kết hợp của cấu trúc dưới phân tử đó với các cấu trúc dưới phân tử khác của phức hợp thụ thể, hoặc đủ gần với vị trí mà sự sắp xếp trong không gian của chất đối kháng sẽ ngăn chặn sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome. Theo cách khác, các phương án khác nhau của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB nêu trên bao gồm chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB mà liên kết với IL-17RA, hoặc IL-17RB,

hoặc phức hợp thụ thể heterome, và gây ra (hoặc ngăn chặn) sự biến đổi cấu dạng ở một hoặc nhiều cấu trúc dưới phân tử trong số các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, do đó ức chế sự tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Trong ví dụ về sự thay đổi cấu dạng ngăn chặn sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, liên kết của chất đối kháng với cấu trúc dưới phân tử xảy ra ở vị trí mà có thể là ở xa vị trí cần thiết cho sự kết hợp của cấu trúc dưới phân tử đó với các cấu trúc dưới phân tử khác của phức hợp thụ thể, và gây ra sự thay đổi cấu dạng của cấu trúc dưới phân tử, ngăn chặn sự kết hợp của chúng với các cấu trúc dưới phân tử khác, hoặc ngăn chặn sự thay đổi cấu dạng cần thiết cho sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử. Tương tự, các phương án khác nhau của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB nêu trên bao gồm chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc phức hợp thụ thể heterome, và gây ra (hoặc ngăn chặn) sự biến đổi cấu dạng mà ức chế sự truyền tín hiệu, hoặc cản trở về mặt không gian sự truyền tín hiệu bởi phức hợp thụ thể heterome.

Theo phương án thay thế khác, các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB khác nhau nêu trên bao gồm chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB mà liên kết với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc phức hợp thụ thể heterome, và gây ra sự biến đổi cấu dạng ở phức hợp thụ thể heterome (hoặc cấu trúc dưới phân tử của chúng) và do đó ức chế liên kết của IL-25 (hoặc phối tử khác) với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Ngoài ra, các phương án khác còn bao gồm chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB mà liên kết với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB và cản trở hoặc ức chế về mặt không gian liên kết của phối tử (như IL-25) với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Cũng được bao hàm trong các phương án của sáng chế là chất đối kháng liên kết với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB và ức chế (một phần hoặc hoàn toàn) quá trình phát tín hiệu của phức hợp thụ thể, do đó ức chế sự phát tín hiệu thông qua phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB.

Theo phương án thay thế bổ sung, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với phối tử (tức là, IL-17A, IL-25, v.v.), và ức chế sự phát tín hiệu thông qua phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Các chất đối kháng này có thể hoạt động bằng cách ức chế sự liên kết với một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, hoặc với nhiều hơn một cấu trúc dưới phân tử này. Do đó, ví dụ, chất

đối kháng có thể cho phép phối tử liên kết với cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của thụ thể, nhưng ngăn chặn sự tương tác của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của thụ thể với phối tử hoặc với cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của thụ thể. Sự ức chế này có thể xảy ra như được nêu ở trên, ví dụ như bằng cách cản trở về mặt không gian sự liên kết, gây ra sự biến đổi cấu dạng, v.v. theo cách ức chế (một phần hoặc hoàn toàn) sự phát tín hiệu thông qua phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB.

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB: Kháng thể

Các phương án của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm kháng thể, hoặc các mảnh của chúng, như được nêu theo cách khác nhau theo sáng chế. Theo đó, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu kép, đoạn Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody), mảnh kháng thể nhỏ (minibody), kháng thể miền, kháng thể tổng hợp (đôi khi được gọi theo sáng chế là “giả kháng thể”), kháng thể dạng khảm, kháng thể đã được làm giống như của người, kháng thể hoàn toàn của người, thể dung hợp kháng thể (đôi khi được gọi là “thể cộng hợp kháng thể”), cũng như các mảnh của chúng.

Kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB cũng có thể bao gồm kháng thể miền đơn gồm các dime của hai chuỗi nặng và không có chuỗi nhẹ, như các kháng thể miền đơn được thấy ở lạc đà và lạc đà không bướu (ví dụ, xem: Muldermans, et al., 2001, J. Biotechnol. 74:277-302; Desmyter, et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:26285-26290).

Kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể chứa tetrame, hoặc các mảnh của chúng. Mỗi tetrame thường bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (thường có phân tử lượng là khoảng 25 kDa) và một chuỗi "nặng" (thường có phân tử lượng là khoảng 50-70 kDa). Phần đầu amin của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi chủ yếu chịu trách nhiệm cho việc nhận biết kháng nguyên. Phần đầu carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng bảo toàn chủ yếu chịu trách nhiệm cho việc thực hiện chức năng tác động. Các chuỗi nhẹ của người được phân loại thành chuỗi nhẹ kapa và chuỗi nhẹ lambda. Các chuỗi nặng được phân loại thành mu, delta, gama, alpha hoặc epsilon, và theo thứ tự, xác định isotyp của kháng thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE. IgG có một vài phân lớp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. IgM cũng có các phân lớp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IgM1 và IgM2. Kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm tất cả các isotyp này. Để làm

ví dụ, các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mảnh F(ab), mảnh F(ab'), mảnh F(ab')₂, mảnh Fv và mảnh Fv chuỗi đơn (scfv), cũng như kháng thể chuỗi đơn. Kháng thể đôi kháng IL-17RA-IL-17RB có thể bao gồm ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ trên.

Cấu trúc của kháng thể đã được biết rõ trong lĩnh vực và không cần phải nêu lại trong bản mô tả này, tuy nhiên, để làm ví dụ, các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thường có cùng cấu trúc tổng quát của các vùng khung (FR) tương đối bảo toàn được kết nối bởi ba vùng siêu biến, còn được gọi là vùng xác định bổ thể hoặc CDR. CDR là vùng siêu biến của kháng thể (hoặc protein liên kết kháng nguyên, như được nêu theo sáng chế), có nhiệm vụ nhận biết và liên kết kháng nguyên. Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp được sắp hàng so sánh dựa vào các vùng khung này, cho phép liên kết với epitop đặc hiệu. Từ đầu N đến đầu C, cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Theo một số phương án, việc gán các axit amin đối với mỗi miền có thể là theo định nghĩa nêu trong tài liệu Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest. Xem, Chothia, et al., 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia, et al., 1989, Nature 342:878-883.

Theo sáng chế, “vùng xác định bổ thể” hoặc “CDR” chỉ vùng protein liên kết cấu thành các điểm tiếp xúc bề mặt chủ yếu để liên kết kháng nguyên. Protein liên kết theo sáng chế có thể có sáu CDR, ví dụ, một CDR1 chuỗi nặng (“CDRH1”), một CDR2 chuỗi nặng (“CDRH2”), một CDR3 chuỗi nặng (“CDRH3”), một CDR1 chuỗi nhẹ (“CDRL1”), một CDR2 chuỗi nhẹ (“CDRL2”), một CDR3 chuỗi nhẹ (“CDRL3”). CDRH1 thường chứa từ khoảng năm (5) đến khoảng bảy (7) axit amin, CDRH2 thường chứa từ khoảng mười sáu (16) đến khoảng mười chín (19) axit amin, và CDRH3 thường chứa từ khoảng ba (3) đến khoảng hai mươi lăm (25) axit amin. CDRL1 thường chứa từ khoảng mười (10) đến khoảng mười bảy (17) axit amin, CDRL2 thường chứa từ khoảng bảy (7) axit amin, và CDRL3 thường chứa từ khoảng bảy (7) đến khoảng mười (10) axit amin.

Ít nhất là kháng thể đôi kháng IL-17RA-IL-17RB chứa toàn bộ hoặc một phần vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng, hoặc toàn bộ hoặc một phần của vùng biến đổi của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà liên kết đặc hiệu với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB. Ví dụ về mảnh (tức là “một phần”) của

vùng biến đổi gồm các CDR. Theo cách khác, ít nhất là kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB gồm ít nhất một CDR của vùng biến đổi, trong đó CDR này liên kết đặc hiệu với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB. Theo các phương án thay thế, kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB gồm ít nhất hai, hoặc ít nhất ba, hoặc ít nhất bốn, hoặc ít nhất năm, hoặc ít nhất là tất cả sáu CDR của (các) vùng biến đổi, trong đó ít nhất một CDR trong số các CDR này liên kết đặc hiệu với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB. CDR có thể là từ chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, và có thể là một CDR bất kỳ trong số ba CDR trong mỗi chuỗi, tức là mỗi CDR được chọn độc lập từ CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 và CDRL3.

Các phương án của kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể bao gồm cấu trúc giàn khung mà (các) CDR hữu dụng được ghép vào đó. Một số phương án bao gồm thành phần giàn khung của người đối với kháng thể đã được làm giống như của người. Theo một phương án, cấu trúc giàn khung là cấu trúc kháng thể tetrame truyền thống. Do đó, các phương án của kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể bao gồm các thành phần bổ sung như vùng khung, vùng J và D, vùng cố định, v.v., mà tạo thành chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Các phương án của kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể bao gồm kháng thể có miền Fc được biến đổi, được gọi là biến thể Fc. “Biến thể Fc” chỉ phân tử hoặc trình tự được biến đổi từ Fc nguyên thể, nhưng vẫn chứa vị trí liên kết cho thụ thể cứu trợ, FcRn. Các ví dụ khác về “biến thể Fc” bao gồm phân tử hoặc trình tự được làm giống như của người từ Fc nguyên thể không phải của người. Ngoài ra, Fc nguyên thể chứa các vị trí có thể loại bỏ được vì chúng tạo ra các đặc điểm cấu trúc hoặc hoạt tính sinh học không cần thiết đối với các phân tử dung hợp theo sáng chế. Do đó, thuật ngữ “biến thể Fc” bao gồm phân tử hoặc trình tự thiếu một hoặc nhiều vị trí hoặc các gốc Fc nguyên thể mà tác động đến hoặc liên quan đến (1) sự tạo thành liên kết disulfua, (2) tính không tương thích với tế bào chủ được chọn (3) tính không đồng nhất đầu N khi biểu hiện ở tế bào chủ được chọn, (4) sự glycosyl hóa, (5) sự tương tác với bổ thể, (6) sự liên kết với thụ thể Fc mà không liên kết với thụ thể cứu trợ, hoặc (7) tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Các phương án của kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm kháng thể đơn dòng của người. Kháng thể đơn dòng của người có tính kháng IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng

các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như, nhưng không giới hạn ở, công nghệ XenoMouse™ (xem, ví dụ US 6,114,598; 6,162,963; 6,833,268; 7,049,426; 7,064,244; Green et al, 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Green and Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188:483-495). Các ví dụ khác về việc tạo ra kháng thể hoàn toàn của người bao gồm công nghệ UltiMab Human Antibody Development System™ và Trans-Phage Technology™ (Medarex Corp., Princeton, NJ), công nghệ biểu hiện ở thể thực khuẩn, công nghệ biểu hiện ở ribosom (xem, ví dụ, Cambridge Antibody Technology, Cambridge, UK), cũng như phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương án nhất định của kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm kháng thể dạng khảm và đã được làm giống như của người, hoặc các mảnh của chúng. Thông thường, cả kháng thể dạng khảm và kháng thể đã được làm giống như của người đều chỉ kháng thể mà kết hợp các vùng từ nhiều hơn một loài. Ví dụ, kháng thể dạng khảm thường chứa (các) vùng biến đổi từ loài không phải là người và (các) vùng cố định từ người. Thông thường, kháng thể đã được làm giống như của người chỉ kháng thể không phải của người, có các vùng khung miền biến đổi được hoán đổi trình tự mà được tìm thấy trong các kháng thể của người. Thông thường, ở kháng thể đã được làm giống như của người, toàn bộ kháng thể, ngoại trừ các CDR, được mã hóa bởi polynucleotit có nguồn gốc từ người hoặc tương đồng với kháng thể này, ngoại trừ trong các CDR của nó. Các CDR, một số hoặc tất cả, được mã hóa bằng các axit nucleic có nguồn gốc ở sinh vật không phải là người, được ghép vào trong khung phiên beta của vùng biến đổi của kháng thể của người để tạo ra kháng thể, tính đặc hiệu của nó được xác định bằng các CDR được ghép vào. Việc tạo ra các kháng thể này đã được biết rõ trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Jones, 1986, Nature 321:522-525; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536). Kháng thể đã được làm giống như của người cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt có hệ miễn dịch được thiết kế về mặt di truyền hoặc bằng phương pháp hoặc công nghệ bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Roque, et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654). Theo một số phương án, các CDR là của người, và do đó cả kháng thể đã được làm giống như của người và kháng thể dạng khảm theo sáng chế có thể bao gồm một số CDR không phải của người; ví dụ, kháng thể đã được làm giống như của người có thể được

tạo ra sao cho có chứa các vùng CDRH3 và CDRL3, với một hoặc nhiều vùng CDR còn lại có nguồn gốc loài khác nhau.

Theo một phương án, kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm kháng thể đa đặc hiệu. Đó là các kháng thể mà liên kết với hai (hoặc nhiều hơn hai) kháng nguyên khác nhau. Ví dụ về kháng thể đặc hiệu kép đã biết trong lĩnh vực là “đoạn Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody)”. Đoạn Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody) có thể được tạo ra bằng nhiều cách khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, được tạo ra bằng phương pháp hóa học hoặc từ các tế bào thể lai (Holliger and Winter, 1993, *Current Opinion Biotechnol.* 4:446-449). Phương án cụ thể của kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB đa đặc hiệu là kháng thể có khả năng liên kết với cả IL-17RA và IL-17RB.

Theo các phương án thay thế, kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm mảnh kháng thể nhỏ (minibody). Mảnh kháng thể nhỏ (minibody) là các protein giống kháng thể đã được làm nhỏ đến mức tối thiểu có chứa Fv chuỗi đơn (scFv; được mô tả dưới đây) liên kết với miền CH3 (xem, ví dụ, Hu, et al., 1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061).

Theo các phương án thay thế, kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm kháng thể miền; ví dụ như kháng thể miền được nêu trong US 6,248,516. Kháng thể miền (dAb) là các miền liên kết chức năng của kháng thể, tương ứng với các vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) hoặc chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể của người. Các dAb có phân tử lượng khoảng 13 kDa, hoặc nhỏ hơn một phần mười kích thước của kháng thể đầy đủ. Các dAb được biểu hiện tốt ở nhiều vật chủ khác nhau, bao gồm hệ tế bào vi khuẩn, nấm men và động vật có vú. Ngoài ra, các dAb rất ổn định và giữ được hoạt tính thậm chí sau khi phải chịu các điều kiện khắc nghiệt, như làm khô lạnh hoặc làm biến tính bằng nhiệt. Xem, ví dụ, US 6,291,158; US 6,582,915; US 6,593,081; US 6,172,197; US 2004/0110941; EP 0368684; US 6,696,245, WO04/058821, WO04/003019 và WO03/002609.

Như đã nêu, kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể bao gồm mảnh kháng thể, tức là, mảnh của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được nêu theo sáng chế mà giữ được tính đặc hiệu liên kết với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB. Các mảnh kháng thể đặc hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, (i) mảnh

Fab gồm các miền VL, VH, CL và CH1, (ii) mảnh Fd gồm các miền VH và CH1, (iii) mảnh Fv gồm các miền VL và VH của một kháng thể; (iv) mảnh dAb (xem, ví dụ, Ward, et al., 1989, Nature 341:544-546) gồm miền biến đổi chuỗi đơn, (v) vùng CDR đã được phân lập, (vi) mảnh $F(ab')_2$, mảnh hóa trị hai có chứa hai mảnh Fab liên kết, (vii) phân tử Fv chuỗi đơn (scFv), trong đó miền VH và miền VL được liên kết bằng chất liên kết peptit mà giúp cho hai miền này kết hợp lại để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên (xem, ví dụ, Bird, et al., 1988 Science 242:423-426; Huston, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883), (viii) dime Fv chuỗi đơn đặc hiệu kép, và (ix) "đoạn Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody)" hoặc "đoạn Fv chuỗi đơn dạng trime (triabody)", mảnh đa hóa trị hoặc đa đặc hiệu được tạo cấu trúc bằng kỹ thuật dung hợp gen (xem, ví dụ, Tomlinson, et. al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger, et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:6444-6448). Mảnh kháng thể có thể được biến đổi. Ví dụ, các phân tử có thể được làm ổn định bằng cách kết hợp các cầu disulfua liên kết các miền VH và VL (xem, ví dụ, Reiter, et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245). Một lần nữa, như được nêu theo sáng chế, tốt hơn nếu các thành phần không phải CDR của các mảnh này là trình tự của người.

Theo các phương án khác nữa, kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm protein dung hợp kháng thể (đôi khi được gọi theo sáng chế là "thể cộng hợp kháng thể"). Phần cộng hợp có thể là protein hoặc không phải là protein; phần cộng hợp không phải là protein thường được tạo ra bằng cách sử dụng các nhóm chức trên protein liên kết kháng nguyên (xem phần thảo luận về các thể biến đổi cộng hóa trị của protein liên kết kháng nguyên) và trên phần cộng hợp. Ví dụ, các chất liên kết đã được biết đến trong lĩnh vực; ví dụ, các chất liên kết chức năng kép cùng loại hoặc chức năng kép khác loại đã được biết rõ (xem, ví dụ, danh mục 1994 của Pierce Chemical Company, phần mô tả về chất liên kết ngang, trang 155-200). Các thể cộng hợp thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đánh dấu như được nêu dưới đây, thuốc và chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc gây độc tế bào (ví dụ, chất hóa trị liệu) hoặc các độc tố hoặc mảnh hoạt tính của các độc tố này. Các độc tố thích hợp và các mảnh tương ứng của chúng bao gồm diphtheria chuỗi A, exotoxin chuỗi A, rixin chuỗi A, abrin chuỗi A, curxin, crotin, phenomycin, enomycin và dạng tương tự. Chất gây độc tế bào còn bao gồm hóa chất phóng xạ được tạo thành bằng cách kết hợp các đồng vị phóng xạ với các protein liên kết kháng nguyên, hoặc

liên kết nuclit phóng xạ với chất tạo chelat mà được gắn theo cách cộng hóa trị vào protein liên kết kháng nguyên. Các phương án bổ sung sử dụng calicheamixin, auristatin, geldanamycin và maytansin.

Theo một phương án, kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm dạng tương tự kháng thể, đôi khi được gọi là “kháng thể tổng hợp”. Ví dụ, các giàn khung protein hoặc giàn khung nhân tạo thay thế khác nhau có thể được ghép với các CDR từ kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB. Các giàn khung này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đột biến được đưa vào để làm ổn định cấu trúc bậc ba của protein liên kết cũng như các giàn khung tổng hợp hoàn toàn, bao gồm, ví dụ, các polyme tương thích sinh học. Xem, ví dụ, Korndorfer, et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque, et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Theo các phương án thay thế, kháng thể đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể bao gồm các giả kháng thể peptit, hoặc “PAM”, cũng như các giả kháng thể (antibody mimetic) sử dụng các thành phần fibronectin làm giàn khung.

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB: Peptit/Polypeptit

Các phương án của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm protein ở dạng peptit và polypeptit mà liên kết đặc hiệu với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB, ức chế hoạt tính của IL-17A, IL-17F và/hoặc IL-25. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ức chế sự kết hợp của các cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB; gây ra (hoặc ngăn chặn) sự thay đổi cấu dạng ở các cấu trúc dưới phân tử của thụ thể, do đó ức chế sự tương tác của chúng; ức chế liên kết của phối tử (tức là, IL-25) với phức hợp thụ thể heterome (hoặc cấu trúc dưới phân tử của chúng) hoặc gây ra sự thay đổi cấu dạng ở phức hợp thụ thể heterome (hoặc cấu trúc dưới phân tử của chúng), ức chế liên kết của phối tử với chúng.

Các phương án bao gồm chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB tái tổ hợp. “Protein tái tổ hợp” là protein được tạo thành bằng các kỹ thuật tái tổ hợp, tức là, thông qua việc biểu hiện axit nucleic tái tổ hợp bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo sáng chế, “peptit” chỉ phân tử có từ 1 đến 100 axit amin. Các peptit tiêu biểu mà liên kết với IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB, ức chế

sự kết hợp của IL-17RA và IL-17RB tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB hoặc ức chế sự phát tín hiệu phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB có thể bao gồm peptit được tạo ra từ các thư viện được ngẫu nhiên hóa. Ví dụ, trình tự peptit từ các trình tự đầy đủ ngẫu nhiên (ví dụ, được chọn bằng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn hoặc sàng lọc ARN-peptit) và các trình tự mà trong đó một hoặc nhiều gốc của phân tử có trong tự nhiên được thay thế bằng gốc axit amin không xuất hiện tại vị trí đó trong phân tử có trong tự nhiên. Các phương pháp nhận diện trình tự peptit tiêu biểu bao gồm biểu hiện thể thực khuẩn, biểu hiện *E. coli*, biểu hiện ribosom, sàng lọc ARN-peptit, sàng lọc hóa học và phương pháp tương tự.

Theo sáng chế, “protein” có nghĩa là ít nhất hai axit amin gắn với nhau theo cách cộng hóa trị, bao gồm protein, polypeptit, oligopeptit và peptit. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều axit amin gắn với nhau theo cách cộng hóa trị này được gắn với nhau bằng liên kết peptit. Protein này có thể được tạo thành từ các axit amin có trong tự nhiên và các liên kết peptit, ví dụ như khi protein được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp bằng cách sử dụng các hệ biểu hiện và tế bào chủ, như được nêu dưới đây. Theo cách khác, theo một số phương án (ví dụ như khi protein ứng viên được sàng lọc đối với khả năng ức chế sự kết hợp của IL-17RA và IL-17RB), protein này có thể bao gồm các axit amin tổng hợp (ví dụ, homophenylalanin, citrulin, ornithin và norleuxin), hoặc các cấu trúc giả peptit, tức là, “dạng tương tự peptit hoặc protein”, như peptoit (xem, Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:9367), mà có tính kháng lại proteaza hoặc các điều kiện sinh lý và/hoặc bảo quản khác. Các axit amin tổng hợp này có thể được kết hợp đặc biệt khi protein được tổng hợp *in vitro* bằng các phương pháp thông dụng đã biết rõ trong lĩnh vực. Ngoài ra, có thể sử dụng dạng kết hợp bất kỳ của các gốc/cấu trúc giả peptit, tổng hợp và có trong tự nhiên. “Axit amin” còn bao gồm các gốc axit imin như prolin và hydroxyprolin. “Mạch bên” hoặc “nhóm R” axit amin có thể là ở cấu hình (L)- hoặc (S)-. Theo phương án cụ thể, các axit amin là ở cấu hình (L)- hoặc (S)-.

Một ví dụ về protein đối kháng là thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB tan được. Các phương pháp tạo ra thụ thể heterome tan được này đã được biết đến trong lĩnh vực, và được mô tả, ví dụ, trong US 6,589,764, cấp ngày 08/07/2003. Phức hợp thụ thể IL-17A-IL-17B bao gồm IL-17RA và IL-17RB (và/hoặc các cấu trúc dưới phân tử bổ

sung) dưới dạng các protein được đồng biểu hiện ở cùng tế bào, hoặc dưới dạng các cấu trúc dưới phân tử của thụ thể được liên kết với nhau (ví dụ, thông qua các liên kết cộng hóa trị theo cách thích hợp bất kỳ, như thông qua chất phản ứng liên kết ngang hoặc chất liên kết polypeptit). Theo một phương án, thụ thể heterome được tạo thành từ protein dung hợp của mỗi thành phần thụ thể với một phần của phân tử kháng thể, như vùng Fc. Theo cách khác, thụ thể heterome IL-17A-IL-17B có thể được tạo thành thông qua các tương tác không cộng hóa trị, như tương tác của biotin với avidin.

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB

Như được nêu ở trên, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm protein liên kết kháng nguyên IL-17RA-IL-17RB, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể, peptit và polypeptit, cũng như các chất đối kháng khác (bao gồm các polypeptit hoặc protein khác). Các phương án thay thế của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên IL-17RA-IL-17RB) bao gồm các thể biến đổi cộng hóa trị của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB. Các biến đổi này có thể được thực hiện sau khi dịch mã. Ví dụ, một số dạng biến đổi cộng hóa trị của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được đưa vào trong phân tử bằng cách cho các gốc axit amin đặc biệt của chất đối kháng tương tác với chất tạo dẫn xuất hữu cơ có khả năng tương tác với các mạch bên được chọn hoặc các gốc đầu N hoặc C. Ví dụ về các biến đổi đối với chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB này được trình bày dưới đây.

Các gốc xysteinyll phổ biến nhất được cho tương tác với α -haloaxetat (và các amin tương ứng), như axit cloaxetic hoặc cloaxetamit, để tạo ra các dẫn xuất carboxymetyl hoặc carboxyamidometyl. Các gốc xysteinyll cũng được tạo dẫn xuất nhờ tương tác với bromtrifloaxeton, axit α -brom- β -(5-imidozoyl)propionic, cloaxetyl phosphat, N-alkylmaleimit, 3-nitro-2-pyridyl disulfua, metyl 2-pyridyl disulfua, p-clo thủy ngân benzoat, 2-clo thủy ngân-4-nitrophenol hoặc clo-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol. Các gốc histidyl được tạo dẫn xuất nhờ tương tác với diethylpyrocacbonat ở độ pH = 5,5-7,0 vì chất này tương đối đặc hiệu đối với mạch bên histidyl. Para-bromophenaxyl bromua cũng hữu dụng; tốt hơn nếu phản ứng được thực hiện trong natri cacodylat 0,1 M ở độ pH = 6,0. Các gốc đầu amin và lysinyl được tương tác với anhydrit axit suxinic hoặc các anhydrit axit carboxylic khác. Việc tạo dẫn xuất với các chất này có tác dụng làm đảo điện tích của các gốc lysinyl. Các chất phản ứng thích

hợp khác để tạo dẫn xuất các gốc có chứa alpha-amino bao gồm các imidoeste như methyl picolinimidat; pyridoxal phosphat; pyridoxal; cloborohydrit; axit trinitrobenzensulfonic; O-metylisoure; 2,4-pentandion; và phản ứng được xúc tác bởi transaminaza với glyoxylat. Các gốc arginyl được biến đổi nhờ tương tác với một hoặc một vài chất phản ứng thông dụng, các chất phản ứng trong số đó là phenylglyoxal, 2,3-butanedion, 1,2-xyclohexanedion và ninhydrin. Việc tạo dẫn xuất các gốc arginin yêu cầu phản ứng phải được thực hiện trong điều kiện kiềm do pK_a cao của nhóm chức guanidin. Ngoài ra, các chất phản ứng này có thể tương tác với các nhóm lysin cũng như nhóm epsilon-amino arginin.

Việc biến đổi đặc hiệu các gốc tyrosyl có thể được thực hiện, với sự quan tâm đặc biệt đến việc đưa các chất đánh dấu quang phổ vào các gốc tyrosyl nhờ tương tác với các hợp chất diazoni thơm hoặc tetranitrometan. Phổ biến nhất, N-axetylimidizol và tetranitrometan được sử dụng để, theo thứ tự, tạo thành nhóm O-axetyl tyrosyl và các dẫn xuất 3-nitro. Các gốc tyrosyl được iot hóa bằng cách sử dụng ^{125}I hoặc ^{131}I để tạo ra protein được đánh dấu để sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch phóng xạ đối với IL-17, phương pháp cloamin T nêu trên là thích hợp. Các nhóm bên carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl) được biến đổi chọn lọc nhờ tương tác với carbodiimit ($\text{R}'\text{---N}=\text{C}=\text{N---R}$), trong đó R và R' tùy ý là các nhóm alkyl khác nhau, như 1-xyclohexyl-3-(2-morpholiny-4-etyl) carbodiimit hoặc 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpentyl) carbodiimit. Ngoài ra, các gốc aspartyl và glutamyl được chuyển hóa thành các gốc asparaginy-yl và glutaminy-yl nhờ tương tác với các ion amoni.

Việc tạo dẫn xuất với chất chức năng kép hữu dụng để liên kết ngang các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB với nền đỡ hoặc bề mặt không tan trong nước để sử dụng trong nhiều phương pháp khác nhau. Chất liên kết ngang thường được sử dụng bao gồm, ví dụ, 1,1-bis(diazoaxetyl)-2-phenyletan, glutaraldehyt, N-hydroxysuxinimit este, ví dụ, este với axit 4-azidosalixylic, imidoeste chức năng kép cùng loại, bao gồm các disuxinimidyl este như 3,3'-dithiobis(suxinimidylpropionat), và maleimit chức năng kép như bis-N-maleimido-1,8-octan. Chất tạo dẫn xuất như methyl-3-((p-azidophenyl)dithio)propioimidat tạo ra các sản phẩm trung gian có thể quang hoạt có khả năng tạo thành các liên kết ngang trong điều kiện có mặt ánh sáng. Theo cách khác, các nền không tan trong nước có hoạt tính mạnh như các cacbohydrat được hoạt

hóa bằng xyanogen bromua và các chất có hoạt tính mạnh được nêu trong US 3,969,287; US 3,691,016; US 4,195,128; US 4,247,642; US 4,229,537 và US 4,330,440 được sử dụng để giữ cố định protein.

Các gốc glutaminyl và asparaginyl thường được loại nhóm amit thành các gốc glutamyl và aspartyl một cách tương ứng. Theo cách khác, các gốc này được loại nhóm amit trong điều kiện axit nhẹ. Dạng bất kỳ của các gốc này đều thuộc phạm vi của sáng chế. Các dạng biến đổi khác bao gồm dạng hydroxyl hóa của prolin và lysin, dạng phosphoryl hóa nhóm hydroxyl của các gốc seryl hoặc threonyl, dạng metyl hóa nhóm alpha-amino của các mạch bên lysin, arginin, và histidin (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), dạng axetyl hóa của amin đầu N, và dạng amit hóa của nhóm carboxyl đầu C bất kỳ.

Dạng biến đổi cộng hóa trị khác của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được bao hàm trong phạm vi của sáng chế bao gồm thay đổi kiểu glycosyl hóa protein. Như đã biết trong lĩnh vực, các kiểu glycosyl hóa có thể phụ thuộc vào cả trình tự của protein (ví dụ, sự có mặt hoặc không có mặt của các gốc axit amin glycosyl hóa cụ thể, được nêu dưới đây), hoặc sinh vật hoặc tế bào chủ mà protein được tạo ra trong đó. Glycosyl hóa polypeptit thường là glycosyl hóa liên kết N hoặc glycosyl hóa liên kết O. Glycosyl hóa liên kết N chỉ việc gắn gốc cacbohydrat vào mạch bên của gốc asparagin. Các trình tự tri-peptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ trừ prolin, là trình tự nhận diện việc gắn gốc cacbohydrat vào mạch bên asparagin bằng enzym. Do đó, sự có mặt của một trong số các trình tự tri-peptit trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Glycosyl hóa liên kết O chỉ việc gắn một đường trong số các đường N-axetylgalactosamin, galactoza hoặc xyloza vào axit hydroxyamin, phổ biến nhất là serin hoặc threonin, mặc dù cũng có thể sử dụng 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin. Việc bổ sung các vị trí glycosyl hóa vào các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB thường được thực hiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho nó có chứa một hoặc nhiều trình tự tri-peptit trong số các trình tự tri-peptit nêu trên (đối với các vị trí glycosyl hóa liên kết N). Sự thay đổi cũng có thể được thực hiện bằng cách bổ sung, hoặc thế bằng, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự bắt đầu (đối với các vị trí glycosyl hóa liên kết O). Một cách đơn

giản, trình tự axit amin của protein liên kết kháng nguyên tốt hơn nếu được thay đổi nhờ sự biến đổi ở cấp độ ADN, cụ thể là bằng cách gây đột biến ADN mã hóa cho polypeptit đích tại các bazơ đã được chọn trước sao cho tạo ra các codon mà sẽ dịch mã thành các axit amin mong muốn.

Các cách khác để làm tăng số lượng gốc cacbohydrat trên chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB là bằng cách kết hợp glycosit với protein bằng phương pháp hóa học hoặc bằng enzym. Các quy trình này có ưu điểm ở chỗ chúng không cần đến việc sản xuất protein trong tế bào chủ có khả năng glycosyl hóa để glycosyl hóa liên kết N và O. Tùy thuộc vào cách thức kết hợp được sử dụng, (các) phân tử đường có thể được gắn vào (a) arginin và histidin, (b) nhóm carboxyl tự do, (c) nhóm sulfhydryl tự do, như nhóm sulfhydryl tự do của xystein, (d) nhóm hydroxyl tự do, như nhóm hydroxyl tự do của serin, threonin hoặc hydroxyprolin, (e) gốc thơm, như gốc thơm của phenylalanin, tyrosin hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit của glutamin. Các phương pháp này được mô tả trong WO 87/05330, công bố ngày 11/09/1987, và trong tài liệu Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Việc loại bỏ các gốc cacbohydrat có mặt trên chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ban đầu có thể được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc bằng enzym. Việc khử glycosyl hóa học cần phải cho protein tiếp xúc với hợp chất axit triflometansulfonic, hoặc hợp chất tương đương. Việc xử lý này làm phân cắt hầu hết hoặc tất cả các đường, trừ đường liên kết (N-axetylglucosamin hoặc N-axetylgalactosamin), trong khi vẫn giữ cho polypeptit nguyên vẹn. Việc khử glycosyl hóa học được mô tả trong tài liệu Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 và tài liệu Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Việc phân cắt các gốc cacbohydrat trên polypeptit bằng enzym có thể đạt được bằng cách sử dụng nhiều endo- và exo-glycosidaza khác nhau, như được mô tả trong tài liệu Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Sự glycosyl hóa tại các vị trí glycosyl hóa tiềm năng có thể được ngăn chặn bằng cách sử dụng hợp chất tunicamycin như được mô tả trong tài liệu Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Tunicamycin phong bế sự tạo thành các liên kết protein-N-glycosit.

Dạng biến đổi cộng hóa trị khác của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm liên kết protein liên kết kháng nguyên với các polyme không protein khác nhau, bao

gồm, nhưng không giới hạn ở, các polyol khác nhau, như polyetylen glycol (PEG), polypropylen glycol hoặc polyoxyalkylen, theo cách được nêu trong US 4,640,835; US 4,496,689; US 4,301,144; US 4,670,417; US 4,791,192 hoặc US 4,179,337. Ngoài ra, như đã biết trong lĩnh vực, việc thể axit amin có thể được thực hiện ở các vị trí khác nhau trong protein liên kết kháng nguyên để tạo điều kiện thuận lợi cho việc bổ sung các polyme như PEG.

Các thể biến đổi cộng hóa trị của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được bao hàm trong phạm vi của sáng chế, và thường, nhưng không bắt buộc, được thực hiện sau khi dịch mã. Ví dụ, một số dạng biến đổi cộng hóa trị của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được đưa vào trong phân tử bằng cách cho các gốc axit amin đặc biệt của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB tương tác với chất tạo dẫn xuất hữu cơ có khả năng tương tác với các mạch bên được chọn hoặc các gốc đầu N hoặc C.

Theo một số phương án, dạng biến đổi cộng hóa trị của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm dạng bổ sung một hoặc nhiều chất đánh dấu. Thông thường, các chất đánh dấu thuộc nhiều lớp khác nhau, tùy thuộc vào thử nghiệm mà trong đó chúng cần được phát hiện: a) chất đánh dấu đồng vị, có thể là đồng vị phóng xạ hoặc đồng vị nặng; b) chất đánh dấu từ tính (ví dụ, hạt từ tính); c) các gốc hoạt tính oxy hóa-khử; d) thuốc nhuộm quang học; nhóm enzym (ví dụ peroxidaza cải ngựa, beta-galactosidaza, luxiferaza, alkaline phosphatase); e) nhóm đã được biotinyl hóa; và f) epitop polypeptit đã xác định trước được nhận diện bằng chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, trình tự cặp khóa kéo leuxin, vị trí liên kết kháng thể thứ cấp, miền liên kết kim loại, thẻ gắn epitop, v.v.). Theo một số phương án, nhóm đánh dấu được kết hợp với protein liên kết kháng nguyên qua các tay đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm ẩn. Các phương pháp đánh dấu protein khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực và có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế.

Các chất đánh dấu đặc hiệu bao gồm thuốc nhuộm quang học, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhóm mang màu, phospho và nhóm huỳnh quang, trong đó phospho và nhóm huỳnh quang là đặc hiệu trong nhiều trường hợp. Nhóm huỳnh quang có thể là chất phát huỳnh quang “phân tử nhỏ”, hoặc chất phát huỳnh quang protein. Thuật ngữ “chất đánh dấu huỳnh quang” có nghĩa là phân tử bất kỳ có thể được phát hiện thông qua các tính chất huỳnh quang vốn có của nó. Các chất đánh dấu huỳnh quang

thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, florescein, rhodamin, tetramethylrhodamin, eosin, erythrosin, coumarin, methyl-coumarin, pyren, Malachite green, stilben, Lucifer Yellow, Cascade BlueJ, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, các thuốc nhuộm Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow và R-phycoerythrin (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rhodamine, và Texas Red (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Thuốc nhuộm quang học thích hợp, bao gồm nhóm huỳnh quang, được mô tả trong tài liệu Molecular Probes Handbook của Richard P. Haugland.

Chất đánh dấu huỳnh quang protein thích hợp còn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein huỳnh quang xanh lục, bao gồm GFP của loài *Renilla*, *Ptilosarcus* hoặc *Aequorea* (Chalfie et al., 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Accession Number U55762), protein huỳnh quang xanh dương (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), protein huỳnh quang vàng tăng cường (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luxiferaza (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galactosidaza (Nolan et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) và *Renilla* (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, US 5292658, US 5418155, US 5683888, US 5741668, US 5777079, US 5804387, US 5874304, US 5876995, US 5925558).

Tất cả các dạng biến đổi nêu trên của protein liên kết kháng nguyên cũng có thể được thực hiện đối với chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB protein bất kỳ khác, ví dụ như phức hợp IL-17RA-IL-17RB heterome, hoặc chất đối kháng polypeptit hoặc peptit như được nêu theo sáng chế.

Phương pháp sử dụng

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB, bao gồm, ví dụ, sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB cho các mục đích chẩn đoán, hoặc cho các mục đích điều trị. Cần hiểu rằng, đối với mục đích điều trị, việc sử

dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB thường là để làm giảm hoặc làm thuyên giảm các dấu hiệu và/hoặc triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh cần điều trị. Sáng chế đề xuất chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế mà có thể được sử dụng để bào chế và sản xuất thuốc dùng để điều trị các bệnh và tình trạng bệnh khác nhau được nêu theo sáng chế. Ngoài ra, lượng hữu hiệu của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB và lượng hữu hiệu để trị liệu của một hoặc nhiều hoạt chất bổ sung được nêu theo sáng chế có thể được sử dụng để bào chế và sản xuất thuốc hữu dụng trong điều trị đã nêu. Một số phương án bao gồm kit gồm các phần có chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB; tùy ý, kit này có thể bao gồm ít nhất một thành phần hoạt tính bổ sung để sử dụng riêng biệt, đồng thời hoặc lần lượt cho đối tượng cần điều trị.

Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp ức chế sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB ở các tế bào biểu hiện IL-17RA và IL-17RB bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế. Ví dụ, phương pháp ức chế sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB ở các tế bào biểu hiện IL-17RA và IL-17RB bao gồm việc cho các tế bào này tiếp xúc với chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với ít nhất một cấu trúc dưới phân tử hoặc thành phần của phức hợp thụ thể heterome và ức chế một phần hoặc ức chế hoàn toàn sự kết hợp của chúng với cấu trúc dưới phân tử hoặc thành phần khác của phức hợp thụ thể heterome (hoặc thông qua việc cản trở về mặt không gian hoặc thay đổi cấu dạng), do đó ngăn chặn sự tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với nhiều hơn một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, hoặc liên kết với chính phức hợp thụ thể heterome. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB không cần phải ức chế liên kết của phối tử (như IL-25) với một hoặc nhiều thành phần của phức hợp thụ thể heterome để ức chế sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ức chế liên kết của phối tử (tức là, IL-25) với IL-17RA và/hoặc IL-17RB, và ức chế sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB. Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nói đến là protein liên kết kháng nguyên, như được

định nghĩa theo sáng chế; tùy ý protein liên kết kháng nguyên này là ở dạng dược phẩm.

Các phương án khác nữa bao gồm phương pháp ức chế sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB ở các tế bào biểu hiện ít nhất IL-17RA và IL-17RB *in vivo* bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế. Ví dụ, phương pháp ức chế sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB ở các tế bào biểu hiện IL-17RA và IL-17RB *in vivo* bao gồm việc cho các tế bào này tiếp xúc với chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với ít nhất một cấu trúc dưới phân tử hoặc thành phần của phức hợp thụ thể heterome và ức chế một phần hoặc ức chế hoàn toàn sự kết hợp của chúng với cấu trúc dưới phân tử hoặc thành phần khác của phức hợp thụ thể heterome (hoặc thông qua việc cản trở về mặt không gian, hoặc thay đổi cấu dạng), do đó ức chế sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với nhiều hơn một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, hoặc liên kết với chính phức hợp thụ thể heterome. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB không cần phải phong bế liên kết của phối tử (như IL-25) với một hoặc nhiều thành phần của phức hợp thụ thể heterome để ức chế sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ức chế liên kết của phối tử (tức là, IL-25) với IL-17RA và/hoặc IL-17RB, và ức chế sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB. Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nói đến là protein liên kết kháng nguyên, như được định nghĩa theo sáng chế; tùy ý, protein liên kết kháng nguyên này là ở dạng dược phẩm.

Các phương án khác bao gồm phương pháp làm giảm chất điều biến gây viêm được giải phóng sau khi hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB ở các tế bào biểu hiện phức hợp này *in vivo* bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế. Ví dụ, phương pháp làm giảm sự giải phóng chất điều biến gây viêm sau khi hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB ở các tế bào biểu hiện phức hợp này *in vivo*

bao gồm bước cho các tế bào này tiếp xúc với chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với ít nhất một cấu trúc dưới phân tử hoặc thành phần của phức hợp thụ thể heterome và ức chế một phần hoặc ức chế hoàn toàn sự tạo thành hoặc hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB phức hợp thụ thể heterome (hoặc thông qua việc cản trở về mặt không gian, hoặc thay đổi cấu dạng), do đó làm giảm sự giải phóng chất điều biến gây viêm. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với nhiều hơn một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, hoặc liên kết với chính phức hợp thụ thể heterome. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB không cần phải ức chế liên kết của phối tử (như IL-25) với một hoặc nhiều thành phần của phức hợp thụ thể heterome để làm giảm sự giải phóng chất điều biến gây viêm. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ức chế liên kết của phối tử (tức là, IL-25) với IL-17RA và/hoặc IL-17RB, và làm giảm sự giải phóng chất điều biến gây viêm. Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nói đến là protein liên kết kháng nguyên, như được định nghĩa theo sáng chế; tùy ý protein liên kết kháng nguyên này là ở dạng được phẩm.

Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp, như được nêu ở trên, trong đó chất điều biến gây viêm là ít nhất một chất trong số các chất sau: IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, CXCL1, CXCL2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1 β , TNF α , RANK-L, LIF, PGE2, MMP3, MMP9, GRO α , NO, eotaxin, MCP-1 và IL-17RB, cũng như chất điều biến gây viêm bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực là được giải phóng từ các tế bào bất kỳ thông qua sự hoạt hóa IL-17RA và/hoặc IL-17RB.

Các phương án khác nữa bao gồm phương pháp, như được nêu ở trên, điều trị các rối loạn liên quan đến thành viên của họ IL-17, như, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn tự miễn và viêm bằng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB.

Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp điều trị bệnh viêm, trong đó phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bị phong bế không được hoạt hóa một phần hoặc hoàn toàn bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế. Ví dụ, phương pháp điều trị bệnh

viêm ở bệnh nhân cần điều trị bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân này chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với ít nhất một cấu trúc dưới phân tử hoặc thành phần của phức hợp thụ thể heterome và ức chế một phần hoặc ức chế hoàn toàn sự tạo thành hoặc hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome (hoặc thông qua việc cản trở về mặt không gian, hoặc thay đổi cấu dạng), do đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc điều trị bệnh viêm. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với nhiều hơn một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, hoặc liên kết với chính phức hợp thụ thể heterome. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB không cần phải phong bế liên kết của phối tử (như IL-25) với một hoặc nhiều thành phần của phức hợp thụ thể heterome để hữu dụng trong điều trị bệnh viêm. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ức chế liên kết của phối tử (tức là, IL-25) với IL-17RA và/hoặc IL-17RB, và hữu dụng trong điều trị bệnh viêm. Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB là kháng thể, như được định nghĩa theo sáng chế; tùy ý, kháng thể này là ở dạng được phẩm.

Các phương án khác nữa bao gồm phương pháp điều trị rối loạn tự miễn, trong đó phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bị phong bế không được hoạt hóa một phần hoặc hoàn toàn bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế. Ví dụ, phương pháp điều trị rối loạn tự miễn ở bệnh nhân cần điều trị bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân này chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với ít nhất một cấu trúc dưới phân tử hoặc thành phần của phức hợp thụ thể heterome và ức chế một phần hoặc ức chế hoàn toàn sự tạo thành hoặc hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome, do đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc điều trị rối loạn tự miễn. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB liên kết với nhiều hơn một cấu trúc dưới phân tử của phức hợp thụ thể heterome, hoặc liên kết với chính phức hợp thụ thể heterome. Theo một số phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB không cần phải phong bế liên kết của phối tử (như IL-25) với một hoặc nhiều thành phần của phức hợp thụ thể heterome để

hữu dụng trong điều trị rối loạn tự miễn. Theo các phương án thay thế, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ức chế liên kết của phối tử (tức là, IL-25) với IL-17RA và/hoặc IL-17RB, và hữu dụng trong điều trị rối loạn tự miễn. Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nói đến là kháng thể, như được định nghĩa theo sáng chế; tùy ý, kháng thể này là ở dạng dược phẩm.

Các phương án bổ sung bao gồm phương pháp điều trị các rối loạn tự miễn và/hoặc viêm, như được nêu ở trên, trong đó các rối loạn này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh viêm sụn, và/hoặc chứng thoái hóa xương, bệnh viêm khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp tuổi vị thành niên, bệnh viêm khớp dạng thấp tuổi vị thành niên, bệnh viêm khớp dạng thấp tuổi vị thành niên tác dụng lên một vài khớp (ít hơn 5 khớp), bệnh viêm đa khớp dạng thấp tuổi vị thành niên, bệnh viêm khớp dạng thấp tuổi vị thành niên khởi phát toàn thân, bệnh viêm đốt sống dạng thấp tuổi vị thành niên, bệnh viêm khớp ruột non tuổi vị thành niên, bệnh viêm khớp tái hoạt tuổi vị thành niên, hội chứng Reter tuổi vị thành niên, hội chứng SEA (hội chứng huyết thanh âm tính, bệnh tại vị trí gắn cơ và gân vào xương, bệnh khớp), bệnh viêm da-cơ tuổi vị thành niên, bệnh viêm khớp vẩy nến tuổi vị thành niên, bệnh cứng bì tuổi vị thành niên, bệnh luput ban đỏ toàn thân tuổi vị thành niên, bệnh viêm mạch tuổi vị thành niên, bệnh viêm khớp dạng thấp tác dụng lên một vài khớp (ít hơn 5 khớp), bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp dạng thấp khởi phát toàn thân, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh viêm khớp ruột non, bệnh viêm khớp tái hoạt, hội chứng Reter, hội chứng SEA (hội chứng huyết thanh âm tính, bệnh tại vị trí gắn cơ và gân vào xương, bệnh khớp), bệnh viêm da-cơ, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh cứng bì, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh viêm mạch, bệnh viêm nhũn cơ, bệnh viêm nhũn đa cơ, bệnh viêm nhũn da-cơ, bệnh viêm xương-khớp, bệnh viêm đa động mạch nút, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm động mạch, bệnh thấp đau nhiều cơ, bệnh sarcoit, bệnh cứng bì, bệnh xơ cứng, bệnh xơ cứng mật nguyên phát, bệnh viêm đường mật xơ hóa, hội chứng Sjogren, bệnh vẩy nến, bệnh vẩy nến mảng, bệnh vẩy nến giọt, bệnh vẩy nến chỗ uốn (nơi da tiếp xúc da), bệnh vẩy nến mụn mủ, bệnh vẩy nến đỏ da, bệnh viêm da, bệnh viêm da dị ứng, bệnh vữa xơ động mạch, bệnh luput, bệnh Still, bệnh luput ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh nhược cơ, bệnh viêm ruột (IBD), bệnh Crohn, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh về bụng, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh hen (bao gồm bệnh hen ngoại sinh và nội sinh cũng như các tình trạng viêm mạn tính liên quan,

hoặc chứng tăng cảm, của đường hô hấp), bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD, tức là bệnh viêm phế quản mạn tính, bệnh tràn khí), hội chứng rối loạn hô hấp cấp tính (ARDS), hội chứng suy hô hấp, bệnh xơ nang, chứng cao huyết áp động mạch phổi, chứng co mạch phổi, tổn thương phổi cấp tính, bệnh nấm Aspergillosis phế quản–phổi dị ứng, bệnh viêm phổi tăng cảm, bệnh viêm phổi ưa eosin, bệnh viêm phế quản, chứng giãn phế quản do viêm phế quản dị ứng, bệnh lao, bệnh viêm phổi khu trú tăng cảm, bệnh hen nghề nghiệp, các rối loạn giống bệnh hen, bệnh sarcoit, hội chứng (hoặc loạn chức năng) của bệnh đường hô hấp tái hoạt, bệnh bụi bông phổi, bệnh khe phổi, hội chứng tăng tính ưa eosin, bệnh viêm mũi, bệnh viêm xoang, và bệnh phổi ký sinh trùng, chứng tăng cảm đường hô hấp kết hợp với các tình trạng bệnh gây ra bởi virus (ví dụ, virus hợp bào hô hấp (RSV), virus parainfluenza (PIV), rhinovirus (RV) và adenovirus), bệnh Guillain-Barre, bệnh đái tháo đường typ I, bệnh Graves, bệnh Addison, hiện tượng Raynaud, bệnh viêm gan tự miễn, GVHD và các bệnh tương tự.

Các phương án bổ sung bao gồm dược phẩm có chứa lượng hữu hiệu để trị liệu của một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB cùng với chất pha loãng, chất mang, chất làm tan, chất nhũ hóa, chất bảo quản và/hoặc chất phụ trợ được dụng. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhân bằng cách sử dụng dược phẩm này cũng như phương pháp bào chế hoặc sản xuất thuốc để sử dụng trong điều trị các tình trạng bệnh được nêu ở trên.

Các nguyên liệu bào chế có thể chấp nhận được là không độc đối với người nhận theo liều lượng và nồng độ được sử dụng. Theo các phương án nhất định, dược phẩm có thể chứa các nguyên liệu bào chế để làm thay đổi, duy trì hoặc bảo quản, ví dụ, độ pH, nồng độ molal đồng thẩm áp, độ nhớt, độ trong, màu, tính đẳng trương, mùi, độ vô trùng, độ ổn định, tốc độ hòa tan hoặc giải phóng, sự hấp phụ hoặc thâm nhập của hợp phần. Theo các phương án này, các nguyên liệu bào chế thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit amin (như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin); chất kháng vi sinh vật; chất chống oxy hóa (như axit ascorbic, natri sulfit hoặc natri hydron-sulfit); chất đệm (như borat, bicarbonat, Tris-HCl, xitrat, phosphat hoặc các axit hữu cơ khác); chất tạo khối lượng (như manitol hoặc glyxin); chất tạo chelat (như axit etylenđiamin tetraaxetic (EDTA)); chất tạo phức (như cafein, polyvinylpyrrolidon, beta-xyclodextrin hoặc hydroxypropyl-beta-xyclodextrin); chất độn; monosacarit;

disacarit; và các cacbohydrat khác (như glucoza, mannoza hoặc dextrin); protein (như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch); chất tạo màu, tạo mùi và pha loãng; chất nhũ hóa; polyme ưa nước (như polyvinylpyrrolidon); polypeptit có phân tử lượng thấp; các ion trái dấu tạo thành muối (như natri); chất bảo quản (như benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salixylic, thimerosal, rượu phenetylic, metylparaben, propylparaben, clohexidin, axit sorbic hoặc hydro peroxit); dung môi (như glyxerin, propylen glycol hoặc polyetylen glycol); rượu đường (như mannitol hoặc sorbitol); chất tạo huyền phù; chất hoạt động bề mặt hoặc chất thấm ướt (như các pluronic, PEG, sorbitan este, các polysorbat như polysorbat 20, polysorbat, triton, trometamin, lexitin, cholesterol, tyloxapal); chất tăng cường độ ổn định (như sucroza hoặc sorbitol); chất tăng cường trương lực (như halogenua kim loại kiềm, tốt hơn nếu là natri hoặc kali clorua, mannitol sorbitol); môi trường dẫn thuốc; chất pha loãng; tá dược và/hoặc chất phụ trợ dược dụng. Xem, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm tối ưu sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tùy thuộc vào, ví dụ, đường dùng dự định, dạng vận chuyển và liều lượng mong muốn. Xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, nêu trên. Theo các phương án nhất định, các hợp phần này có thể gây ảnh hưởng đến trạng thái vật lý, độ ổn định, tốc độ giải phóng *in vivo* và tốc độ thanh thải chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB *in vivo*. Theo các phương án nhất định, môi trường dẫn thuốc hoặc chất mang nguyên gốc trong dược phẩm có thể là dạng nước hoặc về bản chất không phải dạng nước. Ví dụ, môi trường dẫn thuốc hoặc chất mang thích hợp có thể là nước pha tiêm, dung dịch muối sinh lý hoặc dịch não-tủy sống nhân tạo, có thể có bổ sung các nguyên liệu khác phổ biến trong hợp phần để dùng ngoài đường tiêu hóa. Nước muối được đệm trung tính hoặc nước muối trộn với albumin huyết thanh là các môi trường dẫn thuốc tiêu biểu khác. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm có chứa đệm Tris có độ pH khoảng 7,0-8,5, hoặc đệm axetat có độ pH khoảng 4,0-5,5, và có thể còn bao gồm sorbitol hoặc chất thể thích hợp. Theo các phương án nhất định, hợp phần chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể được điều chế để bảo quản bằng cách trộn hợp phần được chọn có mức độ tinh khiết mong muốn với chất phối trộn tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences, nêu trên) ở dạng bánh đông khô hoặc dung dịch nước. Ngoài ra, theo các phương án nhất định, sản phẩm chất đối kháng IL-

17RA-IL-17RB có thể được phối trộn dưới dạng sản phẩm đông khô bằng cách sử dụng các tá dược thích hợp như sucroza.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được chọn để đưa vào cơ thể theo đường ngoài đường tiêu hóa. Theo cách khác, các chế phẩm có thể được chọn để xông hít hoặc để đưa vào cơ thể qua đường tiêu hóa, như qua đường miệng. Việc bào chế các chế phẩm dược dụng này có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thành phần bào chế tốt hơn nếu có mặt với nồng độ chấp nhận được đối với vị trí được sử dụng. Theo các phương án nhất định, các đệm dược sử dụng để duy trì hợp phần ở độ pH sinh lý hoặc ở độ pH thấp hơn không đáng kể, thường nằm trong khoảng độ pH từ khoảng 5 đến khoảng 8.

Khi sử dụng ngoài đường tiêu hóa, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể được tạo ra ở dạng dung dịch nước không chứa pyrogen có thể chấp nhận được ngoài đường tiêu hóa có chứa protein liên kết kháng nguyên-thụ thể IL-17 mong muốn trong môi trường dẫn thuốc dược dụng. Môi trường dẫn thuốc đặc biệt thích hợp để tiêm ngoài đường tiêu hóa là nước cất vô trùng trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được phối trộn dưới dạng dung dịch vô trùng đẳng trương được bảo quản đúng cách. Theo các phương án nhất định, việc điều chế có thể bao gồm việc phối trộn phân tử mong muốn với chất, như các vi cầu tiêm được, các hạt có thể ăn mòn sinh học, các hợp chất polyme (như axit polylactic hoặc axit polyglycolic), hạt hoặc liposom, mà có thể tạo ra sự giải phóng có kiểm soát hoặc giải phóng duy trì liên tục sản phẩm mà có thể được đưa vào cơ thể vào bằng cách tiêm thuốc kiểu kho chứa (depot). Theo các phương án nhất định, axit hyaluronic cũng có thể được sử dụng, có tác dụng thúc đẩy khoảng thời gian duy trì liên tục trong hệ tuần hoàn. Theo các phương án nhất định, có thể sử dụng các thiết bị đưa thuốc có thể cấy dưới da để đưa protein liên kết kháng nguyên mong muốn vào cơ thể.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để xông hít. Theo các phương án này, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể được bào chế dưới dạng bột khô có thể xông hít. Dung dịch xông hít cũng có thể được bào chế với chất đẩy để đưa vào cơ thể dưới dạng khí dụng. Theo các phương án nhất định, các dung dịch có thể được tạo khí dụng. Các phương pháp bào chế và dùng qua đường phối còn được mô tả trong đơn

sáng chế quốc tế PCT/US94/001875, tài liệu này mô tả việc đưa các protein đã được biến đổi hóa học vào cơ thể qua đường phổi.

Các chế phẩm cũng có thể được dùng qua đường miệng. Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB mà có thể được dùng theo cách này có thể được phối trộn cùng với hoặc không cùng với các chất mang thường được sử dụng cho các hợp chất ở dạng liều rắn, như viên nén và viên nang. Theo các phương án cụ thể, viên nang có thể được thiết kế để giải phóng phần hoạt tính của chế phẩm tại vị trí trong đường dạ dày-ruột khi tính sinh khả dụng được tối đa hóa và sự phân giải trước khi vào toàn thân được tối thiểu hóa. Chất bổ sung có thể được bao hàm để tạo điều kiện thuận lợi cho sự hấp thụ chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB. Chất pha loãng, chất tạo mùi, sáp có điểm sôi thấp, dầu thực vật, chất làm trơn, chất tạo huyền phù, chất gây rã viên nén và chất gắn kết cũng có thể được sử dụng.

Dược phẩm theo sáng chế tốt hơn nếu được tạo ra sao cho chứa lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng hỗn hợp với các tá dược không độc thích hợp để sản xuất viên nén. Có thể điều chế các dung dịch ở dạng liều đơn vị bằng cách hòa tan viên nén trong nước vô trùng, hoặc môi trường dẫn thuốc thích hợp khác. Các tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất pha loãng trợ, như canxi cacbonat, natri cacbonat hoặc bicarbonat, lactoza hoặc canxi phosphat; hoặc chất gắn kết, như tinh bột, gelatin hoặc acacia; hoặc chất làm trơn, như magie stearat, axit stearic hoặc hoạt thạch.

Các dược phẩm khác đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, bao gồm các chế phẩm gồm chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB trong chế phẩm đưa vào cơ thể theo cách có kiểm soát hoặc duy trì liên tục. Các kỹ thuật bào chế các phương tiện đưa thuốc vào cơ thể theo cách có kiểm soát hoặc duy trì liên tục khác, như chất mang liposom, vi hạt có thể ăn mòn sinh học hoặc hạt xốp và thuốc tiêm kiểu kho chứa (depot), cũng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, PCT/US93/00829, tài liệu này mô tả sự giải phóng có kiểm soát của các vi hạt polyme xốp để đưa dược phẩm vào cơ thể. Các chế phẩm giải phóng duy trì liên tục có thể bao gồm chất nền polyme bán thấm ở dạng các vật phẩm được tạo hình, ví dụ như màng hoặc viên vi nang. Các chất nền giải phóng duy trì liên tục có thể bao gồm polyeste, hydrogel, polylactit (như được mô tả trong US 3,773,919 và EP

058481), copolyme của axit L-glutamic và gama etyl-L-glutamat (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poly (2-hydroxyetyl-inetacrylat) (Langer, et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 và Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etylen vinyl axetat (Langer, et al., 1981, supra) hoặc axit poly-D(-)-3-hydroxybutyric (EP 133,988). Các hợp phần giải phóng duy trì liên tục cũng có thể bao gồm liposom mà được điều chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Eppstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; EP 036,676; EP 088,046 và EP 143,949.

Dược phẩm để sử dụng *in vivo* thường được tạo ra dưới dạng các chế phẩm vô trùng. Việc khử trùng có thể được thực hiện bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Khi chế phẩm được làm đông khô, việc khử trùng bằng cách sử dụng phương pháp này có thể được thực hiện trước hoặc sau khi làm đông khô và hoàn nguyên. Các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được bảo quản ở dạng đông khô hoặc ở dạng dung dịch. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thường được cho vào trong vật chứa có cửa vào vô trùng, ví dụ như ống hoặc túi dung dịch dùng đường tĩnh mạch có nút chặn có thể xuyên thủng bằng kim tiêm dưới da.

Khi dược phẩm đã được bào chế, nó có thể được bảo quản trong các lọ vô trùng dưới dạng dung dịch, huyền phù, gel, nhũ tương, rắn, tinh thể hoặc dưới dạng bột đã được khử nước hoặc được làm đông khô. Các chế phẩm này có thể được bảo quản ở dạng sẵn sàng để sử dụng hoặc ở dạng (ví dụ, được làm đông khô) được tái tạo lại trước khi dùng. Sáng chế còn đề xuất bộ kit để tạo ra đơn vị dùng liều đơn. Mỗi bộ kit theo sáng chế có thể gồm cả vật chứa thứ nhất có protein đã được làm khô và vật chứa thứ hai có chế phẩm dạng nước. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất bộ kit gồm các ống tiêm có một hoặc nhiều ngăn đã được nạp đầy sẵn (ví dụ, ống tiêm chứa chất lỏng và ống tiêm chứa sản phẩm được làm đông khô).

Lượng hữu hiệu để trị liệu của dược phẩm chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được sử dụng sẽ phụ thuộc, ví dụ, vào các mục đích và phạm vi trị liệu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng mức liều lượng thích hợp để điều trị sẽ thay đổi tùy thuộc một phần vào phân tử được đưa vào cơ thể, chỉ định cần dùng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB, đường dùng, và kích thước (trọng lượng cơ thể, bề mặt cơ thể hoặc kích thước cơ quan) và/hoặc thể trạng (độ tuổi và sức khỏe tổng quát)

của bệnh nhân. Theo các phương án nhất định, bác sĩ lâm sàng có thể chuẩn độ liều lượng và thay đổi đường dùng để đạt được tác dụng trị liệu tối ưu. Liều lượng điển hình có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 µg/kg đến khoảng 30 mg/kg hoặc cao hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Theo các phương án cụ thể, liều lượng có thể nằm trong khoảng từ 0,1 µg/kg đến khoảng 30 mg/kg, tùy ý từ 1 µg/kg đến khoảng 30 mg/kg hoặc từ 10 µg/kg đến khoảng 5 mg/kg. Tất nhiên, cần hiểu rằng liều lượng được xác định bởi các bác sĩ điều trị có đủ năng lực chuyên môn và cần hiểu rằng các liều này chỉ đơn thuần là ví dụ. Tần suất dùng liều sẽ phụ thuộc vào các thông số dược động học của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB cụ thể trong chế phẩm được sử dụng. Thông thường, bác sĩ lâm sàng cho dùng hợp phần cho đến khi đạt tới liều lượng tạo ra tác dụng mong muốn. Vì vậy, hợp phần có thể được dùng dưới dạng một liều, hoặc dưới dạng hai liều hoặc nhiều liều hơn (có thể chứa hoặc có thể không chứa cùng lượng phân tử mong muốn) theo thời gian, hoặc dưới dạng truyền liên tục thông qua thiết bị hoặc ống thông cấy dưới da. Việc tiếp tục tinh chỉnh liều lượng thích hợp được thực hiện thường xuyên bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và thuộc phạm vi nhiệm vụ cần thực hiện thường xuyên của họ. Các liều lượng thích hợp có thể được xác định thông qua việc sử dụng các dữ liệu đáp ứng liều thích hợp. Theo các phương án nhất định, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể được sử dụng cho bệnh nhân trong một khoảng thời gian dài. Việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB thường xuyên có thể làm giảm tối thiểu đáp ứng miễn dịch có hại hoặc đáp ứng dị ứng thường có liên quan tới chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB mà không phải là hoàn toàn của người, ví dụ như kháng thể kháng kháng nguyên của người được tạo ra ở động vật không phải là người, ví dụ, kháng thể không hoàn toàn của người hoặc kháng thể không phải của người được tạo ra ở loài không phải là người.

Đường dùng được phẩm là theo các phương pháp đã biết, ví dụ như qua đường miệng, thông qua việc tiêm qua đường tĩnh mạch, trong màng bụng, trong não (trong nhu mô), trong não thất, trong cơ, trong mắt, trong động mạch, trong khoang gian cực hoặc trong thương tổn; bằng các hệ giải phóng duy trì liên tục hoặc bằng các thiết bị cấy dưới da. Theo các phương án nhất định, hợp phần có thể được dùng bằng cách tiêm liều nhanh (bolus) hoặc liên tục bằng cách truyền hoặc bằng các thiết bị cấy dưới da.

Hợp phần cũng có thể được dùng tại chỗ thông qua việc cấy dưới da màng, bột xốp hoặc nguyên liệu thích hợp khác mà phân tử mong muốn được hấp thụ hoặc được kết nang trên đó. Theo các phương án nhất định, khi thiết bị cấy dưới da được sử dụng, thiết bị này có thể được cấy dưới da vào trong mô hoặc cơ quan thích hợp bất kỳ, và việc đưa phân tử mong muốn vào cơ thể có thể là thông qua việc sử dụng khuếch tán, sử dụng liều nhanh (bolus) giải phóng theo thời gian hoặc sử dụng liên tục.

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với dược chất được sử dụng trong điều trị các bệnh và tình trạng bệnh được nêu theo sáng chế. Theo một phương án, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất ức chế TNF dùng để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế, như, nhưng không giới hạn ở, tất cả các dạng của thụ thể TNF tan được bao gồm Etanercept (như ENBREL[®]), cũng như tất cả các dạng của phân tử thụ thể TNF p75 và/hoặc p55 monome hoặc multimer và các mảnh của chúng; kháng thể kháng TNF của người, như, nhưng không giới hạn ở, Infliximab (như REMICADE[®]) và D2E7 (như HUMIRA[®]), và dạng tương tự. Các chất ức chế TNF này bao gồm các hợp chất và protein phong bế sự tổng hợp *in vivo* hoặc sự giải phóng TNF ra ngoài tế bào. Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất ức chế TNF trong số sau: protein liên kết TNF (thụ thể TNF tan được typ I và thụ thể TNF tan được typ II ("sTNFR"), như được định nghĩa theo sáng chế), kháng thể kháng TNF, yếu tố kích thích khuẩn lạc tế bào hạt; thalidomit; BN 50730; tenidap; E 5531; tiapafant PCA 4248; nimesulit; panavir; rolipram; RP 73401; peptit T; MDL 201,449A; (1R,3S)-Cis-1-(9-(2,6-diaminopurinyl))-3-hydroxy-4-cyclopenten hydroclorua; (1R,3R)-trans-1-(9-(2,6-diamino)purin)-3-axetoxycyclopentan; (1R,3R)-trans-1-(9-adenyl)-3-azidoxycyclopentan hydroclorua và (1R,3R)-trans-1-(6-hydroxy-purin-9-yl)-3-azidoxycyclopentan. Protein liên kết TNF đã được bộc lộ trong tình trạng kỹ thuật (EP 308 378, EP 422 339, GB 2 218 101, EP 393 438, WO 90/13575, EP 398 327, EP 412 486, WO 91/03553, EP 418 014, JP 127,800/1991, EP 433 900, US 5,136,021, GB 2 246 569, EP 464 533, WO 92/01002, WO 92/13095, WO 92/16221, EP 512 528, EP 526 905, WO 93/07863,

EP 568 928, WO 93/21946, WO 93/19777, EP 417 563, WO 94/06476, và đơn PCT quốc tế số PCT/US97/12244). Ví dụ, EP 393 438 và EP 422 339 mô tả trình tự axit amin và trình tự axit nucleic của thụ thể TNF tan được typ I (còn được gọi là "sTNFR-I" hoặc "chất ức chế TNF 30kDa") và thụ thể TNF tan được typ II (còn được gọi là "sTNFR-II" hoặc "chất ức chế TNF 40kDa"), được gọi chung là "sTNFR", cũng như các dạng được biến đổi của chúng (ví dụ, các mảnh, dẫn xuất chức năng và biến thể). EP 393 438 và EP 422 339 cũng bộc lộ các phương pháp phân lập gen chịu trách nhiệm mã hoá các chất ức chế, tạo dòng gen này trong các vector và loại tế bào thích hợp và biểu hiện gen này để tạo ra các chất ức chế. Ngoài ra, các dạng đa hoá trị (tức là các phân tử có chứa nhiều hơn một gốc hoạt tính) của sTNFR-I và sTNFR-II cũng được bộc lộ. Theo một phương án, dạng đa hoá trị có thể được tạo cấu trúc bằng cách kết hợp hoá học ít nhất một chất ức chế TNF và gốc khác với chất liên kết được chấp nhận trong y tế bất kỳ, ví dụ như polyetylen glycol (WO 92/16221 và WO 95/34326), bằng chất liên kết peptit (Neve et al. (1996), *Cytokine*, 8(5):365-370, bằng cách kết hợp hoá học với biotin và sau đó liên kết với avidin (WO 91/03553), và cuối cùng, bằng cách kết hợp các phân tử kháng thể dạng khảm (US 5,116,964, WO 89/09622, WO 91/16437 và EP 315062. Các kháng thể kháng TNF bao gồm kháng thể MAK 195F Fab (Holler et al. (1993), 1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147); kháng thể đơn dòng kháng TNF CDP 571 (Rankin et al. (1995), *British Journal of Rheumatology*, 34:334-342); kháng thể sơ cấp kháng yếu tố hoại tử khối u của chuột BAY X 1351 (Kieft et al. (1995), 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, page 9); kháng thể đơn dòng kháng TNF CenTNF cA2 (Elliott et al. (1994), *Lancet*, 344:1125-1127 và Elliott et al. (1994), *Lancet*, 344:1105-1110).

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với tất cả các dạng của chất ức chế IL-1, như, nhưng không giới hạn ở, kiniret (ví dụ, ANAKINRA[®]) (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời). Chất đối kháng thụ thể interleukin-1 (IL-1ra) là protein của người đóng vai trò làm chất ức chế tự nhiên của interleukin-1. Các chất đối kháng thụ thể interleukin-1, cũng như các phương pháp tạo ra và phương pháp sử dụng chúng, được mô tả trong US 5,075,222; WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626; WO

94/20517; WO 96/22793 và WO 97/28828. Các protein này bao gồm các chất đối kháng thụ thể IL-1 đã được glycosyl hoá cũng như chưa được glycosyl hoá. Cụ thể, ba dạng của IL-1ra (IL-1ra α , IL-1ra β và IL-1rax), được mã hoá bởi cùng ADN mã hoá trình tự, và các biến thể của chúng, được bộc lộ và được nêu trong US 5,075,222. Các phương pháp tạo ra các chất ức chế IL-1, cụ thể là IL-1ra, cũng được bộc lộ trong US 5,075,222. Lớp chất ức chế interleukin-1 bổ sung bao gồm các hợp chất có khả năng ngăn chặn đặc hiệu sự hoạt hoá các thụ thể tế bào thành IL-1. Các hợp chất này bao gồm protein liên kết IL-1, như các kháng thể đơn dòng và các thụ thể tan được. Các hợp chất này cũng bao gồm kháng thể đơn dòng tương ứng với các thụ thể. Lớp chất ức chế interleukin-1 khác bao gồm hợp chất và protein phong bế sự tổng hợp IL-1 *in vivo* và/hoặc giải phóng IL-1 ra ngoài tế bào. Các hợp chất này bao gồm chất tác động lên sự phiên mã các gen IL-1 hoặc sự xử lý các tiền protein IL-1.

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được nêu theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với tất cả các dạng của chất ức chế CD28, như, nhưng không giới hạn ở, abatacept (ví dụ, ORENCIA[®]) (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời). Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều cytokin, lymphokin, (các) yếu tố tạo máu và/hoặc chất chống viêm (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời).

Việc điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế có thể bao gồm việc sử dụng các thuốc tuyến đầu để kiểm soát cơn đau và/hoặc bệnh viêm ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với việc điều trị bằng một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được đề xuất theo sáng chế. Các thuốc này được phân loại thành thuốc chống viêm không steroid (NSAID). Các thuốc điều trị thứ cấp bao gồm corticosteroid, thuốc trị thấp tác dụng chậm (SAARD) hoặc thuốc làm thay đổi bệnh (DM). Thông tin liên quan đến các hợp chất sau có thể được tìm thấy trong tài liệu The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Eighteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N.J. (2006) và trong tài liệu Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB và một hoặc nhiều NSAID bất kỳ để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời). Các NSAID có tác

dụng chống viêm, ít nhất một phần, đối với việc ức chế tổng hợp prostaglandin (Goodman and Gilman in "The Pharmacological Basis of Therapeutics," MacMillan 7th Edition (1985)). Các NSAID có thể được mô tả thành ít nhất chín nhóm: (1) dẫn xuất của axit salixylic; (2) dẫn xuất của axit propionic; (3) dẫn xuất của axit axetic; (4) dẫn xuất của axit fenamic; (5) dẫn xuất của axit carboxylic; (6) dẫn xuất của axit butyric; (7) oxicam; (8) pyrazol và (9) pyrazolon.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều dẫn xuất của axit salixylic, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Dẫn xuất của axit salixylic, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng bao gồm: axetaminosalol, aloxiprin, aspirin, benorylat, bromsaligenin, canxi axetylsalixylat, cholin magie trisalixylat, magie salixylat, cholin salixylat, diflusinal, etersalat, fendosal, axit gentisic, glycol salixylat, imidazol salixylat, lysin axetylsalixylat, mesalamin, morpholin salixylat, 1-naphtyl salixylat, olsalazin, parsalmit, phenyl axetylsalixylat, phenyl salixylat, salaxetamit, axit salixylamit O-axetic, salsalat, natri salixylat và sulfasalazin. Các dẫn xuất của axit salixylic có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều dẫn xuất của axit propionic, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Dẫn xuất của axit propionic, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng bao gồm: alminoprofen, benoxaprofen, axit bucloxic, carprofen, dexindoprofen, fenoprofen, flunoxaprofen, fluprofen, flurbiprofen, furclopafen, ibuprofen, ibuprofen nhôm, ibuprofen, indoprofen, isoprofen, ketoprofen, loxoprofen, miroprofen, naproxen, naproxen natri, oxaprozin, piketoprofen, pimeprofen, pirprofen, pranoprofen, axit protizinic, pyridoxiprofen, suprofen, axit tiaprofenic và tioxaprofen. Các dẫn xuất của axit propionic có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án đặc biệt khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều dẫn xuất của axit axetic, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Dẫn xuất của axit axetic, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng bao gồm: axemetaxin, alclofenac, amfenac, bufexamac, xinmetaxin, clopirac, delmetaxin, diclofenac kali, diclofenac natri, etodolac, felbinac, fenclofenac, fenclorac, axit fenclozic, fentiazac, furofenac, glucametaxin, ibufenac, indometaxin, isofezolac, isoxepac, lonazolac, axit metiazinic, oxametaxin, oxpinac, pimetaxin, proglumetaxin, sulindac, talmetaxin, tiaramit, tiopinac, tolmetin, tolmetin natri, zidometaxin và zomepirac. Các dẫn xuất của axit axetic có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều dẫn xuất của axit fenamic, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Dẫn xuất của axit fenamic, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng bao gồm: axit enfenamic, etofenamat, axit flufenamic, isonixin, axit meclofenamic, meclofenamat natri, axit medofenamic, axit mefenamic, axit niflumic, talniflumat, terofenamat, axit tolfenamic và ufenamat. Các dẫn xuất của axit fenamic có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều dẫn xuất của axit carboxylic, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Dẫn xuất của axit carboxylic, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm: clidanac, diflunisal, flufenisal, inoridin, ketorolac và tinoridin. Các dẫn xuất của axit carboxylic có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án đặc biệt khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời)

với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều dẫn xuất của axit butyric, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Dẫn xuất của axit butyric, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng bao gồm: bumadizon, butibufen, fenbufen và xenbuxin. Các dẫn xuất của axit butyric có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều oxicam, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Oxicam, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng bao gồm: droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam và 4-hydroxyl-1,2-benzothiazin 1,1-dioxide 4-(N-phenyl)-carboxamit. Các oxicam có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều pyrazol, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Pyrazol, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm: difenamizol và epirizol. Các pyrazol có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều pyrazolon, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng. Pyrazolon, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm: apazon, azapropazon, benzpiperylon, feprazon, mofebutazon, morazon, oxyphenbutazon, phenylbutazon, pipebuzon, propylphenazon, ramifenazon, suxibuzon và thiazolinobutazon. Các pyrazolon có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với

chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều NSAID trong số các NSAID sau: axit ϵ -axetamidocaproic, S-adenosyl-methionin, axit 3-amino-4-hydroxybutyric, amixetrin, anitrazafen, antrafenin, bendazac, bendazac lysinat, benzydamin, beprozin, broperamol, bucolom, bufezolac, xiproquazon, cloximat, dazidamin, deboxamet, detomidin, difenpiramit, difenpyramit, difisalamin, ditazol, emorfazon, fanetizol mesylat, fenflumizol, floctafenin, flumizol, flunixin, fluproquazon, fopirtolin, fosfosol, guaimesal, guaiazolen, isonixirn, lefetamin HCl, leflunomit, lofemizol, lotifazol, lysin clonixinat, meseclazon, nabumeton, nictindol, nimesulit, orgotein, orpanoxin, oxaceprol, oxapadol, paranylin, perisoxal, perisoxal xitrat, pifoxim, piproxen, pirazolac, pirfenidon, proquazon, proxazol, thielavin B, ticlamizol, timegadin, tolectin, tolpadol, tryptamit và các NSAID được định danh bằng mã số công ty như 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (axit 4-benzoyl-1-indancarboxylic), TVX2706, U60257, UR2301 và WY41770. Các NSAID có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự với các NSAID này cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều corticosteroid, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Corticosteroid, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng bao gồm hydrocortison và các hợp chất có nguồn gốc từ hydrocortison, như 21-axetoxypregnenolon, alclomerason, algeston, amxinonit, beclometason, betametason, betametason valerat, budesonit, cloprednison, clobetasol, clobetasol propionat, clobetason, clobetason butyrat, clocortolon, cloprednol, corticosteron, cortison, cortivazol, deflazacort, desonit, desoximerason, dexametason, diflorason, diflucortolon, difluprednat, enoxolon, fluazacort, flucloronit, flumetason, flumetason pivalat, fluxinolon axetonit, flunisolit, floxinonit, floxinolon axetonit, floccortin butyl, floccortolon, floccortolon hexanoat, diflucortolon valerat, flometholon, fluperolon axetat, flupredniden axetat, fluprednisolon, flurandenolit, formocortal, halxinonit,

halometason, halopredon axetat, hydro-cortamat, hydrocortison, hydrocortison axetat, hydro-cortison butyrat, hydrocortison phosphat, hydrocortison 21-natri suxinat, hydrocortison tebutat, mazipredon, medryson, meprednison, metylprednisolon, mometason furoat, parametason, prednicarbat, prednisolon, prednisolon 21-diedryaminoaxetat, prednisolon natri phosphat, prednisolon natri suxinat, prednisolon natri 21-*m*-sulfobenzoat, prednisolon natri 21-stearoglycolat, prednisolon tebutat, prednisolon 21-trimetylaxetat, prednison, prednival, prednyliden, prednyliden 21-diethylaminoaxetat, tixocortol, triamxinolon, triamxinolon axetonit, triamxinolon benetonit và triamxinolon hexaxetonit. Các corticosteroid có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều thuốc trị thấp tác dụng chậm (SAARD) hoặc thuốc trị thấp làm thay đổi bệnh (DMARD), este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. SAARD hoặc DMARD, este của tiền dược chất và muối dược dụng của chúng bao gồm: allocupreide natri, auranofin, aurothioglucosa, aurothioglycanit, azathioprin, brequinar natri, buxillamin, canxi 3-aurothio-2-propanol-1-sulfonat, clorambuxil, cloroquin, clobuzarit, cuproxolin, xyclo-phosphamit, xyclosporin, dapson, 15-deoxyspergualin, diaxerein, glucosamin, muối vàng (ví dụ, muối vàng xycloquin, natri thiomalat vàng, natri thiosulfat vàng), hydroxycloquin, hydroxycloquin sulfat, hydroxyure, kebuzon, levamisol, lobenzarit, melittin, 6-mercaptopurin, metotrexat, mizoribin, mycophenolat mofetil, myoral, hơi cay chứa nitơ, D-penixilamin, pyridinol imidazol như SKNF86002 và SB203580, rapamycin, thiol, thymopoietin và vincristin. Các SAARD hoặc DMARD có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất ức chế COX2, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về

chất ức chế COX2, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng bao gồm, ví dụ, celecoxib. Các chất ức chế COX2 có liên quan về mặt cấu trúc có các tính chất giảm đau và chống viêm tương tự cũng được bao hàm trong nhóm này. Các ví dụ về chất ức chế chọn lọc COX-2 bao gồm, nhưng không giới hạn ở, etoricoxib, valdecoxib, xelecoxib, licofelon, lumiracoxib, rofecoxib, và chất tương tự.

Việc điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế có thể bao gồm việc sử dụng các thuốc tuyến đầu để kiểm soát các đáp ứng viêm, như chứng tăng cảm trong đường hô hấp của cá thể bị tác động ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với việc điều trị bằng một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được đề xuất theo sáng chế. Thuốc thường được sử dụng trong điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh như vậy bao gồm chất chủ vận beta2, chất ức chế leukotrien, metylxanthin, chất chống viêm, chất kháng axetylcholin, chất làm giãn phế quản, corticosteroid, và dạng kết hợp của chất này. Thông tin liên quan đến các hợp chất sau có thể được tìm thấy trong tài liệu The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Eighteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N.J. (2006) và trong tài liệu Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

Theo phương án cụ thể khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất chủ vận beta-2, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về chất chủ vận beta-2, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng bao gồm, ví dụ, albuterol (Accuneb®, Proair HFA®, Proventil® HFA, Ventolin HFA®), metaproterenol (Alupent®, Alupent® Inhalation Solution, Alupent® Syrup), pirbuterol axetat (Maxair Autohaler®), và terbutalin sulfat (Brethair®, Brethine®,). Các chất chủ vận beta-2 tác động lâu dài, một số trong số chúng được liên kết với chất khác (ví dụ, Advair®, Symbicort®, Serevent® và Foradil®) cũng đã được biết đến, và hữu dụng ở dạng kết hợp với chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB.

Phương án khác của sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất ức chế leukotrien, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của

chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về chất ức chế leukotrien, este của tiền dược chất hoặc muối được dụng của chúng bao gồm, ví dụ, zileuton (Zyflo®), zafirlukast (Accolate®) và montelukast (Singulair®).

Theo phương án cụ thể khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều methylxanthin, este của tiền dược chất hoặc muối được dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về methylxanthin, este của tiền dược chất hoặc muối được dụng của chúng bao gồm, ví dụ, theophyllin (ví dụ, Bronkodyl®, Elixophyllin®, Slo-bid®, Slo-Phyllin®, Theo-24®, Theo-Dur®, Theolair®, Uniphyll®) và aminophyllin (ví dụ, Phyllocontin®, Truphylline®).

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất chống viêm, este của tiền dược chất hoặc muối được dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về chất chống viêm này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Cromolyn (Nasalcrom®, Intal®, Opticrom®) và nedocromil (Tilade®).

Phương án khác của sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất kháng axetylcholin, este của tiền dược chất hoặc muối được dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về chất kháng axetylcholin, este của tiền dược chất hoặc muối được dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ipratropium bromit (Atrovent®) và tiotropium (Spiriva®).

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều corticosteroid, este của tiền dược chất hoặc muối được dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về corticosteroid dạng xông hít bao gồm beclometason dipropionat (Beclovent®, Beconase®, Vancenase® và Vanceril®), triamxinolon axetonit (Azmacort®, Nasacort®, Tri-Nasal®) và flunisolit (Aerobid®, Nasalide®). Các ví dụ về

corticosteroid khác hữu dụng theo sáng chế bao gồm predison (Prednisone Intensol®), Sterapred®) và prednisolon (Orapred®, Pediapred®, Prelone®).

Phương án đặc biệt khác nữa của sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất chủ vận beta-2 dạng xông hít, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về corticosteroid, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng bao gồm, ví dụ, albuterol (Ventolin®, Proventil®), metaproterenol (Alupent®), pirbuterol axetat (Maxair®), terbutalin (Brethine®, Brethaire®), isoetharin (Bronkosol®) và levalbuterol (Xopenex®).

Theo phương án cụ thể khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất làm giãn phế quản (hoặc chất kháng axetylcholin), este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Các ví dụ về chất làm giãn phế quản bao gồm ipratropium (Atrovent®) và tiotropium (Spiriva®).

Việc điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế có thể bao gồm việc sử dụng các thuốc tuyến đầu để điều trị hoặc kiểm soát bệnh nhiễm khuẩn ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với việc điều trị bằng một hoặc nhiều chất đối kháng trong số các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được đề xuất theo sáng chế. Thuốc thường được sử dụng trong điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh như vậy bao gồm thuốc kháng sinh, chất kháng vi sinh vật, chất kháng virus, và dạng kết hợp của chúng. Thông tin liên quan đến các hợp chất sau có thể được tìm thấy trong tài liệu The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Eighteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N.J. (2006) và trong tài liệu Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

Theo phương án cụ thể khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB ở dạng kết hợp (trước điều trị, sau điều trị hoặc điều trị đồng thời) với chất bất kỳ trong số một hoặc nhiều chất kháng vi sinh vật, este của tiền dược chất hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị các bệnh và rối loạn được nêu theo sáng chế. Chất kháng vi sinh vật bao gồm, ví dụ, các nhóm thuốc penicilin, xephalosporin

và các beta-lactam khác, aminoglycosit, azol, quinolon, macrolit, rifamycin, tetracyclin, sulfonamid, lincosamid và polymyxin. Penicillin bao gồm, nhưng không giới hạn ở, penicillin G, penicillin V, methicillin, nafcillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, floxacillin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, amoxicillin, amoxicillin/clavulanat, ticarcillin, ticarcillin/clavulanat, azlocillin, mezlocillin, piperacillin, và meropenem. Cephalosporin và các beta-lactam khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cephalothin, cephradine, cephalexin, cephazolin, cefadroxil, cefaclor, cefamandol, cefotetan, cefoxitin, cefuroxime, cefonicid, ceforandiol, cefixime, cefotaxime, meropenem, ceftazidime, imipenem và aztreonam. Aminoglycosit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, streptomycin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin, kanamycin và neomycin. Azol bao gồm, nhưng không giới hạn ở, fluconazole. Quinolon bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit nalidixic, norfloxacin, enoxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin và temafloxacin. Macrolit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, erythromycin, spiramycin và azithromycin. Rifamycin bao gồm, nhưng không giới hạn ở, rifampin. Tetracyclin bao gồm, nhưng không giới hạn ở, spiroxacin, clotetracyclin, clomoxycycline, demeclocycline, deoxyxycycline, guamexycycline, lymexycycline, meclocycline, metaxycycline, minocycline, oxytetracycline, penimepoxycycline, pipaxycycline, rolitetracycline, sanxycycline, senoxycycline và tetracycline. Sulfonamid bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sulfanilamid, sulfamethoxazole, sulfacetamid, sulfadiazine, sulfisoxazole và co-trimoxazole (trimethoprim/sulfamethoxazole). Lincosamid bao gồm, nhưng không giới hạn ở, clindamycin và lincomycin. Polymyxin (polypeptid) bao gồm, nhưng không giới hạn ở polymyxin B và colistin.

Thử nghiệm sàng lọc

Các phương án khác bao gồm phương pháp sàng lọc chất đối kháng của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Sáng chế bao gồm các kiểu thử nghiệm sàng lọc đã biết trong lĩnh vực và có thể làm theo để nhận diện các chất đối kháng của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Ví dụ, phương pháp sàng lọc chất đối kháng của phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, bao gồm việc lắp ráp IL-17RA và IL-17RB thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB; cho chất đang quan

tâm tiếp xúc với phức hợp thụ thể này; và xác định lượng tạo thành phức hợp thụ thể so với phức hợp thụ thể không được tiếp xúc với chất đang quan tâm. Bước cho chất đang quan tâm tiếp xúc với phức hợp thụ thể có thể được thực hiện trước, trong hoặc sau khi IL-17RA và IL-17RB tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB.

Các phương án khác bao gồm phương pháp sàng lọc chất đối kháng sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, bao gồm việc lắp ráp IL-17RA và IL-17RB thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB; cho chất đang quan tâm tiếp xúc với phức hợp thụ thể này; bổ sung một hoặc nhiều phối tử IL-17; và xác định lượng hoạt hoá phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB so với phức hợp thụ thể không được tiếp xúc với chất đang quan tâm. Các chất đang quan tâm mà làm giảm sự hoạt hoá phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB trong điều kiện có mặt của một hoặc nhiều phối tử IL-17, như được xác định bằng kết quả liên quan đến sinh học (xem dưới đây), được xem là dương tính. Phối tử IL-17 có thể là IL-17A, IL-17F, IL-25 hoặc phối tử IL-17 bất kỳ khác mà liên kết với và hoạt hoá IL-17RA, IL-17RB, hoặc phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Sự hoạt hoá đã được định nghĩa theo sáng chế. Các kết quả liên quan đến sinh học bao gồm IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, CXCL1, CXCL2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1 β , TNF α , RANK-L, LIF, PGE2, IL-12, MMP3, MMP9, GRO α , NO, cũng như phân tử bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực là được giải phóng từ các tế bào bất kỳ biểu hiện IL-17RA và/hoặc IL-17RB. Bước cho chất đang quan tâm tiếp xúc với phức hợp thụ thể có thể được thực hiện trước, trong hoặc sau khi IL-17RA và IL-17RB tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Cần hiểu rằng chất đang quan tâm có thể ức chế một phần phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB, tức là, ức chế nhỏ hơn 100%. Trong điều kiện thử nghiệm nhất định, chất đang quan tâm có thể ức chế hoàn toàn phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thử nghiệm dựa vào tế bào để phát hiện tác dụng của các chất đang quan tâm đối với sự kết hợp của IL-17RA và IL-17RB, phức hợp thụ thể heterome 17RA-IL-17RB, cũng như sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome 17RA-IL-17RB. Do đó, sáng chế đề xuất việc bổ sung chất đang quan tâm vào tế bào để sàng lọc các chất đối kháng phức hợp thụ thể heterome 17RA-IL-17RB.

Theo sáng chế, “chất đang quan tâm” hoặc “thuốc đang quan tâm” mô tả phân tử bất kỳ, như, nhưng không giới hạn ở, peptit, protein dung hợp của peptit (ví dụ, peptit liên kết với IL-17RA, IL-17RB, hoặc phức hợp thụ thể heterome 17RA-IL-17RB mà được liên kết cộng hoá trị hoặc không cộng hoá trị với các protein khác, như các mảnh kháng thể hoặc các giàn khung có nguồn gốc protein đã biết trong lĩnh vực), protein, kháng thể, phân tử hữu cơ nhỏ bao gồm thuốc đã biết và thuốc đang quan tâm, polysacarit, axit béo, vacxin, axit nucleic v.v. mà có thể được sàng lọc về hoạt tính như được nêu theo sáng chế.

Các chất đang quan tâm bao gồm nhiều nhóm chất hóa học. Theo một phương án, chất đang quan tâm là phân tử hữu cơ, tốt hơn nếu là hợp chất hữu cơ nhỏ có phân tử lượng lớn hơn 100 và nhỏ hơn khoảng 2500 dalton. Được bao hàm là các hợp chất hữu cơ nhỏ có phân tử lượng lớn hơn 100 và nhỏ hơn khoảng 2000 dalton, tốt hơn nữa nếu là nhỏ hơn khoảng 1500 dalton, tốt hơn nữa nếu là nhỏ hơn khoảng 1000 dalton, tốt hơn nữa nếu là nhỏ hơn 500 dalton. Chất đang quan tâm có chứa các nhóm chức cần thiết cho sự tương tác cấu trúc với các protein, cụ thể là liên kết hydro, và thường bao gồm ít nhất một trong số các nhóm amin, cacbonyl, hydroxyl hoặc carboxyl, tốt hơn nếu là ít nhất hai trong số các nhóm chức hóa học đó. Chất đang quan tâm thường chứa cacbon vòng hoặc các cấu trúc dị vòng và/hoặc các cấu trúc thơm hoặc cấu trúc thơm đa vòng được thể bằng một hoặc nhiều nhóm chức trong số các nhóm chức nêu trên. Chất đang quan tâm cũng được tìm thấy trong số các phân tử sinh học bao gồm peptit, sacarit, axit béo, steroid, purin, pyrimidin, dẫn xuất, các dạng tương tự về cấu trúc hoặc các dạng kết hợp của chúng.

Chất đang quan tâm được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau, bao gồm các thư viện hợp chất tự nhiên hoặc tổng hợp. Ví dụ, có nhiều cách để tổng hợp ngẫu nhiên và có định hướng nhiều hợp chất và phân tử sinh học hữu cơ, bao gồm việc biểu hiện và/hoặc tổng hợp các oligonucleotit và peptit được ngẫu nhiên hóa. Theo cách khác, thư viện hợp chất tự nhiên ở dạng chất chiết vi khuẩn, nấm, thực vật và động vật đã có sẵn hoặc được tạo ra dễ dàng. Ngoài ra, các thư viện tự nhiên hoặc được tạo ra bằng cách tổng hợp và các hợp chất dễ dàng được biến đổi bằng các phương pháp hóa học, vật lý và sinh hóa thông dụng. Dược chất đã biết có thể được làm biến đổi hóa học có

định hướng hoặc ngẫu nhiên, như axyl hóa, alkyl hóa, este hóa, amit hóa để tạo ra các dạng tương tự về cấu trúc.

Theo các phương án thay thế, chất có hoạt tính sinh học đang quan tâm có thể là protein hoặc mảnh protein. Do đó, ví dụ, các chất chiết tế bào có chứa protein, hoặc các chất chuyển hóa ngẫu nhiên hoặc có định hướng của chất chiết tế bào protein, có thể được sử dụng. Theo cách này, các thư viện protein của sinh vật có nhân điển hình và không có nhân điển hình có thể được tạo ra để sàng lọc trong các hệ được nêu theo sáng chế. Được bao hàm trong phương án này là các thư viện protein của vi khuẩn, nấm, virus, và động vật có vú, bao gồm protein của người.

Theo một số phương án, chất đang quan tâm là peptit. Theo phương án này, có thể hữu dụng nếu sử dụng cấu trúc peptit mà bao gồm cấu trúc trình diện. “Cấu trúc trình diện” hoặc các dạng tương đương về ngữ pháp theo sáng chế có nghĩa là trình tự mà khi được dung hợp với chất hoạt tính sinh học đang quan tâm sẽ làm cho các chất đang quan tâm có dạng bị giới hạn về mặt cấu dạng. Các protein tương tác với nhau phần lớn là qua các miền bị hạn chế về mặt cấu dạng. Mặc dù các peptit nhỏ với các đầu amin và carboxyl quay tự do có thể có các chức năng hiệu lực như đã biết trong lĩnh vực, tuy nhiên việc chuyển hóa các cấu trúc peptit này thành được chất là rất khó do không thể dự đoán các vị trí mạch bên để tổng hợp các giả peptit. Do đó, việc trình diện peptit ở các cấu trúc bị hạn chế về mặt cấu dạng sẽ giúp ích cho cả việc sản xuất được chất sau đó và cũng có thể tạo ra sự tương tác ái lực lớn hơn của peptit với protein đích. Thực tế này được nhận biết thấy trong các hệ sản xuất thư viện tổ hợp sử dụng các peptit ngắn được tạo ra bằng phương pháp sinh học trong các hệ thể thực khuẩn vi khuẩn. Nhiều nhà nghiên cứu đã tạo cấu trúc các phân tử miền nhỏ trong đó một phân tử miền nhỏ có thể trình diện các cấu trúc peptit được ngẫu nhiên hóa. Các cấu trúc trình diện đặc biệt làm tối đa hóa khả năng tiếp cận với peptit bằng cách trình diện nó trên vòng ngoài. Theo đó, các cấu trúc trình diện thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cấu trúc mảnh kháng thể nhỏ (minibody), các vòng trên vòng xoắn phiến beta và các cấu trúc thân xoắn cuộn trong đó các góc không có tính quyết định đối với cấu trúc được ngẫu nhiên hóa, các miền ngón tay kềm, các cấu trúc liên kết xystein (disulfua), các cấu trúc liên kết transglutaminaza, các peptit vòng, các cấu trúc vòng B, các ống hoặc bó xoắn ốc, các motif khóa kép leuxin, v.v.. Xem US 6,153,380.

Được sử dụng đặc biệt trong các thử nghiệm sàng lọc là các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn; xem ví dụ, US 5,223,409; US 5,403,484; US 5,571,698 và US 5,837,500, tất cả các tài liệu này được đưa vào bản mô tả theo cách viện dẫn cho các cấu trúc và phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Thông thường, các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn có thể sử dụng phần cài xen protein tổng hợp (ví dụ peptit), hoặc có thể sử dụng chất phân giải của hệ gen, cADN, v.v..

Tùy thuộc vào thử nghiệm và kết quả mong muốn, có thể sử dụng nhiều loại tế bào khác nhau, bao gồm tế bào có nhân điển hình và không có nhân điển hình, với tế bào động vật có vú, và tế bào người, có thể được sử dụng đặc biệt trong sáng chế. Theo một phương án, các tế bào có thể được thiết kế về mặt di truyền, ví dụ như chúng có thể chứa các axit nucleic ngoại sinh, như các axit nucleic mã hóa cho IL-17RA và IL-17RB. Trong một số trường hợp, protein IL-17RA và IL-17RB theo sáng chế được thiết kế để bao gồm chất đánh dấu như thể gắn epitop, như, nhưng không giới hạn ở, thể gắn epitop được sử dụng trong các thử nghiệm kết tủa miễn dịch hoặc cho các mục đích sử dụng khác.

Chất đang quan tâm được bổ sung vào tế bào và được ủ trong một khoảng thời gian thích hợp. Bước cho chất đang quan tâm tiếp xúc với phức hợp thụ thể có thể được thực hiện trước, trong hoặc sau khi IL-17RA và IL-17RB tạo thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Theo một phương án, sự kết hợp của IL-17RA và IL-17RB được đánh giá trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt chất đang quan tâm. Ví dụ, có thể thực hiện các thử nghiệm kết tủa miễn dịch bằng cách sử dụng các kháng thể hoặc các cấu trúc được gắn thể. Sau đó, chất đang quan tâm mà can thiệp vào sự kết hợp IL-17RA và IL-17RB được kiểm tra về hoạt tính phát tín hiệu bởi thành viên họ phối tử IL-17 (như IL-17A và IL-17F), như bằng cách kiểm tra sự biểu hiện gen được hoạt hóa bởi thành viên họ phối tử IL-17, như được nêu ở trên.

Theo một số phương án, protein IL-17RA và/hoặc IL-17RB là protein dung hợp. Ví dụ, protein thụ thể có thể được biến đổi theo cách tạo thành phân tử dạng khảm có chứa apoprotein (tức là gốc protein của phức hợp hoặc phân tử dạng khảm) được dung hợp với trình tự axit amin hoặc polypeptit khác loài khác. Theo một phương án, phân tử dạng khảm này có chứa dạng dung hợp của một hoặc nhiều thụ thể với polypeptit thể gắn mà tạo ra epitop để kháng thể kháng thể gắn có thể liên kết đặc hiệu vào đó.

Thẻ gắn epitop thường được đặt ở các đầu amino- hoặc carboxyl- của protein thụ thể. Sự có mặt của các dạng thụ thể được gắn thẻ epitop này có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng polypeptit thẻ gắn. Việc cung cấp thêm thẻ gắn epitop cũng cho phép dễ dàng tinh chế polypeptit thụ thể bằng phương pháp tinh chế dựa vào ái lực sử dụng kháng thể kháng thẻ gắn hoặc dạng khác của thẻ nền ái lực mà liên kết với thẻ gắn epitop này. Các thẻ gắn epitop này có thể được sử dụng để giữ cố định vào giá đỡ rắn, như được nêu theo sáng chế.

Các polypeptit thẻ gắn khác nhau và các kháng thể tương ứng của chúng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ bao gồm thẻ gắn poly-histidin (poly-his) hoặc thẻ gắn poly-histidin-glyxin (poly-his-gly); polypeptit thẻ gắn flu HA và kháng thể của nó 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)); thẻ gắn c-myc và các kháng thể 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 và 9E10 tương ứng với chúng (Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)); và thẻ gắn glycoprotein D (gD) của virus Herpes Simplex và kháng thể của nó (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)). Các polypeptit thẻ gắn khác bao gồm peptit FLAGGTM (Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)); peptit epitop KT3 (Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)); peptit epitop tubulin (Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)); và thẻ gắn peptit T7 gen 10 protein (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)).

Nhiều vector biểu hiện khác nhau có thể được tạo ra. Vector biểu hiện có thể là vector tự sao chép ngoài nhiễm sắc thể hoặc vector kết hợp vào trong hệ gen của vật chủ. Thông thường, vector biểu hiện bao gồm axit nucleic điều tiết phiên mã và dịch mã được liên kết theo cách có điều khiển với axit nucleic mã hóa cho kim loại-protein. Thuật ngữ "trình tự kiểm soát" chỉ trình tự ADN cần thiết cho sự biểu hiện của trình tự mã hóa được liên kết có điều khiển ở sinh vật chủ cụ thể. Trình tự kiểm soát thích hợp cho tế bào không có nhân điển hình, ví dụ, bao gồm trình tự khởi đầu, tùy ý, trình tự điều khiển và vị trí liên kết ribosom. Các tế bào có nhân điển hình được biết là sử dụng các trình tự khởi đầu, tín hiệu polyadenyl hóa và trình tự tăng cường.

Theo một số phương án, thử nghiệm ức chế liên kết với phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB được tiến hành *in vitro*. Ví dụ, các thành phần của hỗn hợp thử nghiệm (chất đang quan tâm, IL-17RA và IL-17RB) được giữ cố định trên

một bề mặt, các thành phần khác được bổ sung vào (một thành phần trong số đó được đánh dấu theo một số phương án). Ví dụ, IL-17RA hoặc IL-17RB có thể được gắn vào một bề mặt, chất đang quan tâm và IL-17RA và/hoặc IL-17RB đã được đánh dấu được bổ sung vào. Sau khi rửa, đánh giá sự có mặt của chất đánh dấu. Theo phương án này, protein IL-17RA và IL-17RB được phân lập như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thông thường, việc gắn thường sẽ được thực hiện như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và sẽ phụ thuộc vào hợp phần của hai nguyên liệu cần được gắn. Thông thường, các chất gắn kết được sử dụng thông qua việc sử dụng các nhóm chức trên mỗi thành phần mà có thể được sử dụng để gắn sau đó. Các nhóm chức để gắn là nhóm amino, nhóm carboxy, nhóm oxo, nhóm hydroxyl và nhóm thiol. Các nhóm chức này có thể được gắn trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua việc sử dụng chất liên kết. Các chất liên kết đã được biết rõ trong lĩnh vực; ví dụ, các chất liên kết chức năng kép cùng loại hoặc khác loại như đã được biết rõ (xem danh mục 1994 của Pierce Chemical Company, phần mô tả về chất liên kết ngang, trang 155-200). Các chất gắn kết bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhóm alkyl (bao gồm nhóm alkyl được thế và nhóm alkyl có chứa các gốc nguyên tử khác loại), bao gồm nhóm alkyl ngắn, este, amit, amin, nhóm epoxy và etylen glycol và các dẫn xuất. Theo cách khác, các phân dung hợp được sử dụng; phân dung hợp thích hợp bao gồm các thành phần giữ cố định khác, như thế gắn histidin để gắn vào bề mặt với niken, các thành phần chức năng để gắn các chất liên kết và chất đánh dấu, v.v., và các chất đánh dấu protein.

Theo một phương án, đặc biệt khi các chất đang quan tâm được giữ cố định trên giá đỡ rắn, phân dung hợp thích hợp là chất đánh dấu protein tự phát huỳnh quang. Các chất đánh dấu huỳnh quang protein thích hợp còn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein huỳnh quang xanh lục (GFP), bao gồm GFP của loài *Renilla*, *Ptilosarcus*, hoặc *Aequorea* (Chalfie et al., 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Accession Number U55762), protein huỳnh quang xanh dương (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), protein huỳnh quang vàng tăng cường (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luxiferaza (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galactosidaza (Nolan et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

85:2603-2607) và Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, US 5292658, US 5418155, US 5683888, US 5741668, US 5777079, US 5804387, US 5874304, US 5876995, US 5925558).

Giá đỡ không tan được có thể được tạo thành từ hợp phần bất kỳ mà các hợp phần có thể liên kết vào đó, dễ tách khỏi nguyên liệu tan được, và mặt khác, tương thích với toàn bộ phương pháp sàng lọc. Bề mặt của các giá đỡ này có thể là rắn hoặc xốp và có hình dạng thông dụng bất kỳ. Các ví dụ về giá đỡ thích hợp bao gồm các đĩa vi chuẩn độ, mảnh giá thể, màng và hạt, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thủy tinh và thủy tinh được biến đổi hoặc tạo chức năng, chất dẻo (bao gồm acrylic, polystyren và copolyme của styren và các nguyên liệu khác, polypropylen, polyetylen, polybutylen, polyuretan, Teflon, v.v.), polysacarit, nylon hoặc nitroxenluloza, nhựa, silic oxit hoặc các nguyên liệu có nguồn gốc silic oxit bao gồm silic và silic được biến đổi, cacbon, kim loại, thủy tinh vô cơ, chất dẻo, gốm, và nhiều polyme khác nhau. Theo một số phương án, các giá đỡ rắn cho phép phát hiện quang học và bản thân chúng không phát huỳnh quang đáng kể. Ngoài ra, như đã biết trong lĩnh vực, giá đỡ rắn có thể được phủ bằng nhiều nguyên liệu bất kỳ, bao gồm polyme, như dextran, acrylamit, gelatin, agarosa, v.v.. Các giá đỡ rắn tiêu biểu bao gồm silic, thủy tinh, polystyren và các chất dẻo khác và acrylic. Đĩa vi chuẩn độ và mảnh giá thể đặc biệt tiện lợi vì có thể tiến hành đồng thời nhiều thử nghiệm, sử dụng lượng chất phản ứng và mẫu nhỏ. Cách thức cụ thể để liên kết hợp phần không quan trọng, miễn là nó tương thích với chất phản ứng và toàn bộ phương pháp theo sáng chế, duy trì được hoạt tính của hợp phần và không khuếch tán được.

Các chất đang quan tâm được cho tiếp xúc với các thành phần khác của thử nghiệm trong điều kiện phản ứng mà làm xảy ra tương tác chất-chất đích. Thông thường, đó sẽ là các điều kiện sinh lý. Có thể thực hiện việc ủ ở nhiệt độ bất kỳ mà tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt tính tối ưu, thường nằm trong khoảng từ 4 đến 40°C. Khoảng thời gian ủ được chọn để có hoạt tính tối ưu, nhưng cũng có thể được tối ưu hóa để tạo điều kiện thuận lợi cho việc sàng lọc nhanh thông lượng cao. Thông thường từ 0,1 đến 1 giờ là đủ. Chất phản ứng dư thường được loại bỏ hoặc rửa bỏ, trong trường hợp thử nghiệm pha rắn. Các kiểu thử nghiệm được nêu dưới đây.

Nhiều chất phản ứng khác cũng có thể được bao hàm trong thử nghiệm. Các chất phản ứng này bao gồm chất phản ứng như muối, protein trung tính, ví dụ như albumin, chất tẩy rửa, v.v. mà có thể được sử dụng để tạo điều kiện thuận lợi cho việc liên kết apoprotein-chất tối ưu và/hoặc làm giảm các tương tác không đặc hiệu hoặc tương tác nền. Theo cách khác, chất phản ứng mà cải thiện hiệu quả của thử nghiệm, như chất ức chế proteaza, chất ức chế nucleaza, chất kháng vi khuẩn, v.v., cũng có thể được sử dụng. Hỗn hợp của các thành phần này có thể được bổ sung theo thứ tự bất kỳ mà tạo ra liên kết cần thiết.

Theo một phương án, thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm được nêu theo sáng chế có thể sử dụng các hệ thống máy để sàng lọc thông lượng cao. Nhiều hệ thống thường hướng tới việc sử dụng đĩa vi chuẩn độ loại 96 giếng (hoặc nhiều hơn), tuy nhiên như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, các đĩa hoặc hình dạng khác bất kỳ có thể được sử dụng. Ngoài ra, bước bất kỳ hoặc tất cả các bước được nêu theo sáng chế có thể được tự động hóa; do đó, ví dụ, hệ thống có thể được tự động hóa hoàn toàn hoặc một phần.

Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, có rất nhiều thành phần có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều tay máy; bộ điều khiển đĩa để điều chỉnh vị trí các vi đĩa; bộ điều khiển nắp tự động để mở và thay nắp cho các giếng trên đĩa không bị nhiễm bẩn chéo; bộ phận đầu tip để phân phối mẫu bằng đầu tip dùng một lần; bộ phận đầu tip có thể rửa để phân phối mẫu; khối tải mẫu 96 giếng; giá đựng chất phản ứng được giữ lạnh; bộ phận định vị pipet cho đĩa vi chuẩn độ (được giữ lạnh tùy ý); tháp chồng để đựng đĩa và đầu tip; và hệ thống máy tính.

Các hệ vi lưu chất và hệ robot hoàn toàn bao gồm bộ phận vận chuyển chất lỏng, hạt, tế bào và sinh vật tự động bao gồm bộ phận nhỏ pipet thông lượng cao để thực hiện tất cả các bước ứng dụng sàng lọc. Việc này bao gồm các thao tác trên chất lỏng, hạt, tế bào và sinh vật như hút, phân tán, trộn, pha loãng, rửa, vận chuyển thể tích chính xác; lấy và bỏ đầu tip pipet; và nhỏ pipet lặp lại nhiều lần các thể tích giống nhau cho nhiều lần chuyển từ một lần hút mẫu. Các thao tác này là các thao tác vận chuyển chất lỏng, hạt, tế bào và sinh vật không bị nhiễm bẩn chéo. Thiết bị này thực hiện việc lấy mẫu lặp lại tự động hóa từ vi đĩa chuyển sang bộ phận lọc, màng và/hoặc

đĩa con, bộ phận chuyển mật độ cao, bộ phận pha loãng đầy đĩa theo dây và bộ phận vận hành công suất cao.

Theo một phương án, có thể sử dụng các hạt, đĩa, ống, hạt từ hoặc thể nền pha rắn khác được tạo dẫn xuất bằng phương pháp hóa học có tính đặc hiệu với các thành phần thử nghiệm. Bề mặt liên kết của các vi đĩa, ống hoặc thể nền pha rắn bất kỳ bao gồm bề mặt không phân cực, bề mặt phân cực mạnh, lớp phủ dextran biến đổi để đẩy mạnh liên kết cộng hóa trị, lớp phủ kháng thể, môi trường ái lực để liên kết peptit hoặc protein dung hợp, protein được cố định vào bề mặt như protein tái tổ hợp A hoặc G, lớp phủ hoặc nhựa nucleotit, và thể nền ái lực khác cũng có thể được sử dụng trong sáng chế.

Theo một phương án, bộ cho các đĩa nhiều giếng, nhiều ống, vi ống, đĩa giếng sâu, ống ly tâm nhỏ, ống giữ mẫu ở nhiệt độ thấp (cryovial), đĩa giếng vuông, lọc, chip, sợi quang, hạt và các nền pha rắn khác hoặc bộ có các thể tích khác nhau được trang bị lên bộ kiểu môđun có thể nâng cấp để có thêm công suất. Bộ kiểu môđun này bao gồm thiết bị lắp theo quỹ đạo với tốc độ có thể thay đổi được, thiết bị điện chuyển, và sàn làm việc nhiều vị trí dùng cho các mẫu nguồn, pha loãng mẫu và chất phản ứng, các đĩa thử nghiệm, bình chứa mẫu và chất phản ứng, các đầu pipet và trạm rửa hoạt động.

Theo một phương án, các hệ máy luân nhiệt và điều chỉnh nhiệt được sử dụng để ổn định nhiệt độ của các bộ phận trao đổi nhiệt như các bộ hoặc khối được kiểm soát để kiểm soát nhiệt độ chính xác của quá trình ủ mẫu từ 4°C đến 100°C.

Theo một số phương án, thiết bị sẽ bao gồm thiết bị phát hiện, có thể là nhiều loại thiết bị phát hiện khác nhau, tùy thuộc vào chất đánh dấu và thử nghiệm. Theo một phương án, thiết bị phát hiện hữu dụng bao gồm (các) kính hiển vi có nhiều kênh huỳnh quang; thiết bị đọc đĩa có thể phát hiện huỳnh quang, tử ngoại và quang phổ khả kiến có khả năng đọc động học và đọc điểm cuối bước sóng đơn và kép, vận chuyển năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET), hệ SPR, phát quang, làm dừng, kích thích hai photon, và phân phối lại cường độ; các máy ảnh CCD để thu và chuyển dữ liệu và hình ảnh thành các định dạng có thể định lượng; và trạm máy tính. Các thiết bị này sẽ cho phép kiểm tra kích thước, sự sinh trưởng và sự biểu hiện kiểu hình của các chất đánh dấu đặc hiệu trên tế bào, mô, và sinh vật; xác nhận tính hợp lệ của đích; tối

ưu hóa đích tốt nhất; phân tích dữ liệu, khai thác, tổ chức, và tích hợp các sàng lọc thông lượng cao với các cơ sở dữ liệu công khai hoặc có tính phí.

Phức hợp thụ thể heterome 17RA-IL-17RB là dạng có hoạt tính sinh học của thụ thể và được thể hiện bản mô tả này là đáp ứng lại sự hoạt hóa đặc hiệu phối tử bằng cách giải phóng chất điều biến gây viêm. Trong lĩnh vực này, đã biết rằng các tình trạng bệnh khác nhau, như được nêu ví dụ theo sáng chế, đều liên quan đến mức sinh lý tăng của các thành viên thuộc họ phối tử IL-17. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên IL-17RA-IL-17RB hữu dụng để phát hiện phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB trong các mẫu sinh học và nhận diện tế bào hoặc mô tiếp xúc với phức hợp này. Điều này có thể có giá trị đáng kể đối với cộng đồng nghiên cứu.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng cho các mục đích chẩn đoán để phát hiện, chẩn đoán, hoặc theo dõi bệnh và/hoặc tình trạng bệnh liên quan đến IL-17 hoặc thụ thể IL-17RA hoặc IL-17RB. Sáng chế đề xuất việc phát hiện sự có mặt của thụ thể IL-17 trong mẫu bằng cách sử dụng các phương pháp miễn dịch cổ điển đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (ví dụ, Tijssen, 1993, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, 1987, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen et al., 1985, *J. Cell. Biol.* 101:976-985; Jalkanen et al., 1987, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096). Việc phát hiện thụ thể IL-17 có thể được thực hiện *in vivo* hoặc *in vitro*.

Các ứng dụng chẩn đoán được đề xuất theo sáng chế bao gồm việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên để phát hiện sự biểu hiện của protein IL-17 IL-17RA và IL-17RB và liên kết của (các) phối tử với thụ thể IL-17. Các ví dụ về phương pháp hữu dụng trong việc phát hiện sự có mặt của thụ thể IL-17 bao gồm các thử nghiệm miễn dịch, như thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA). Như nêu trên, việc sử dụng phương pháp đồng kết tủa miễn dịch rất hữu dụng để phát hiện phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Đối với các ứng dụng chẩn đoán, protein liên kết kháng nguyên có thể thường được đánh dấu bằng nhóm đánh dấu có thể phát hiện như được định nghĩa theo sáng chế.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất việc nhận diện tế bào hoặc các tế bào biểu hiện phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB. Theo phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên được đánh dấu bằng nhóm đánh dấu và liên kết của protein liên kết kháng nguyên đã được đánh dấu với thụ thể IL-17 được phát hiện. Theo phương án cụ thể khác nữa, liên kết của protein liên kết kháng nguyên với thụ thể IL-17 được phát hiện *in vivo*. Theo phương án cụ thể khác nữa, protein liên kết kháng nguyên-thụ thể IL-17 được phân lập và được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 và các phụ trương định kỳ); John E. Coligan, ed., 1993, *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons.

Tạo chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm tế bào không có nhân điển hình, nấm men hoặc các tế bào có nhân điển hình bậc cao. Các vectơ tạo dòng và biểu hiện thích hợp để sử dụng với vật chủ tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào nấm men và tế bào động vật có vú được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Pouwels et al. *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985). Hệ dịch mã không chứa tế bào cũng có thể được sử dụng để tạo ra polypeptit LDCAM bằng cách sử dụng ARN có nguồn gốc từ cấu trúc ADN được nêu theo sáng chế.

Các sinh vật không có nhân điển hình bao gồm sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ, *E. coli* hoặc *Bacilli*. Các tế bào chủ không có nhân điển hình thích hợp để biến nạp bao gồm, ví dụ, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, và nhiều loài khác thuộc chi *Pseudomonas*, *Streptomyces* và *Staphylococcus*. Trong tế bào chủ không có nhân điển hình, như *E. coli*, chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể bao gồm gốc methionin đầu N để tạo điều kiện thuận lợi cho sự biểu hiện của polypeptit tái tổ hợp trong tế bào chủ không có nhân điển hình. Met đầu N có thể được phân cắt ra khỏi chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB tái tổ hợp đã được biểu hiện.

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể được biểu hiện ở các tế bào chủ nấm men, tốt hơn nữa từ chi *Saccharomyces* (ví dụ, *S. cerevisiae*). Các chi nấm men khác, như *Pichia*, *K. lactis* hoặc *Kluyveromyces*, cũng có thể được sử dụng. Các vectơ nấm men thường sẽ chứa điểm khởi đầu sao chép từ plasmit của nấm men 2 μ , trình tự sao chép tự chủ (ARS), vùng trình tự khởi đầu, các trình tự để polyadenyl hóa, các trình tự

để kết thúc phiên mã và gen đánh dấu chọn lọc. Các trình tự khởi đầu thích hợp cho vectơ nấm men bao gồm, trong số các trình tự khởi đầu khác, trình tự khởi đầu cho metallothionein, 3-phosphoglyxerat kinaza (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) hoặc các enzyme thủy phân glucoza khác (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; và Holland et al., Biochem. 17:4900, 1978), như enolaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglyxerat mutaza, pyruvat kinaza, triosephosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza và glucokinaza. Các vectơ và trình tự khởi đầu thích hợp khác để sử dụng cho việc biểu hiện ở nấm men còn được mô tả trong tài liệu Hitzeman, EPA-73,657 hoặc trong tài liệu Fleer et. al., Gene, 107:285-195 (1991); và van den Berg et. al., Bio/Technology, 8:135-139 (1990). Dạng thay thế khác là trình tự khởi đầu ADH2 ức chế được glucoza được mô tả bởi Russell và cộng sự (J. Biol. Chem. 258:2674, 1982) và Beier và cộng sự (Nature 300:724, 1982). Các vectơ con thoi có thể sao chép ở cả nấm men và *E. coli* có thể được tạo cấu trúc bằng cách cài xen trình tự ADN từ pBR322 để chọn lọc và sao chép ở *E. coli* (gen Amp^r và bản gốc để sao chép) vào trong các vectơ của nấm men nêu trên.

Trình tự dẫn đầu yếu tố α của nấm men có thể được sử dụng để trực tiếp tiết chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB. Trình tự dẫn đầu yếu tố α thường được cài xen vào giữa trình tự khởi đầu và trình tự gen cấu trúc. Xem, ví dụ, Kurjan et al., Cell 30:933, 1982; Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330, 1984; US 4,546,082 và EP 324,274. Các trình tự dẫn đầu khác thích hợp để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tiết polypeptit tái tổ hợp từ vật chủ nấm men là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Trình tự dẫn đầu có thể được biến đổi ở gần đầu cuối 3' của nó để chứa một hoặc nhiều vị trí giới hạn. Điều này sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc dung hợp trình tự dẫn đầu với gen cấu trúc.

Các quy trình biến nạp nấm men đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một quy trình như vậy được mô tả trong tài liệu Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978. Quy trình của Hinnen và cộng sự chọn lọc các thể biến nạp Trp⁺ trong môi trường chọn lọc, trong đó môi trường chọn lọc bao gồm bazơ nitơ của nấm men 0,67%, axit casamin 0,5%, glucoza 2%, adenin 10 μ g/mL và uraxil 20 μ g/mL. Các tế bào chủ nấm men được biến nạp bởi

vectơ có chứa trình tự điều khiển ADH2 có thể được cho sinh trưởng để gây ra sự biểu hiện trong môi trường “giàu”. Ví dụ về môi trường giàu là môi trường bao gồm chất chiết nấm men 1%, pepton 2% và glucoza 1% được bổ sung adenin 80 $\mu\text{g/mL}$ và uraxil 80 $\mu\text{g/mL}$. Việc khử ức chế trình tự khởi đầu ADH2 xảy ra khi glucoza bị rút hết khỏi môi trường.

Các hệ tế bào chủ côn trùng và động vật có vú cũng có thể được sử dụng để biểu hiện chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB tái tổ hợp. Các hệ baculovirut để tạo ra các protein khác loài ở các tế bào côn trùng được nêu trong tài liệu Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Các dòng tế bào được tạo ra có nguồn gốc động vật có vú cũng có thể được sử dụng. Các ví dụ về dòng tế bào chủ động vật có vú thích hợp bao gồm dòng COS-7 của tế bào thận khỉ (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., Cell 23:175, 1981), tế bào L, tế bào C127, tế bào 3T3 (ATCC CCL 163), tế bào trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), tế bào HeLa, và dòng tế bào BHK (ATCC CRL 10), và dòng tế bào CV-1/EBNA-1 có nguồn gốc từ dòng tế bào thận khỉ xanh châu Phi CVI (ATCC CCL 70) như được mô tả bởi McMahan và cộng sự (EMBO J. 10: 2821, 1991).

Các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã đối với các vectơ biểu hiện của tế bào chủ động vật có vú có thể được cắt từ hệ gen virut. Các trình tự khởi đầu và các trình tự tăng cường thường được sử dụng có nguồn gốc từ virut Polyoma, Adenovirut 2, virut Simian 40 (SV40) và virut cự bào của người. Các trình tự ADN có nguồn gốc từ hệ gen virut SV40, ví dụ, gen gốc SV40, trình tự khởi đầu sớm và muộn, trình tự tăng cường, các vị trí ghép, và các vị trí polyadenyl hóa có thể được sử dụng để tạo ra các yếu tố di truyền khác để biểu hiện trình tự gen cấu trúc ở tế bào chủ động vật có vú. Các trình tự khởi đầu sớm và muộn của virut là đặc biệt hữu dụng vì cả hai đều dễ dàng thu được từ hệ gen virut dưới dạng mảnh mà cũng có thể chứa điểm khởi đầu sao chép của virut (Fiers et al., Nature 273:113, 1978). Các mảnh SV40 nhỏ hơn hoặc lớn hơn cũng có thể được sử dụng, miễn là trình tự dài khoảng 250 cặp bazơ kéo dài từ vị trí *Hind* III đến vị trí *Bgl* I nằm ở gen gốc virut SV40 của vị trí sao chép được bao hàm.

Các vectơ biểu hiện tiêu biểu để sử dụng trong các tế bào chủ động vật có vú có thể được tạo cấu trúc như được bộc lộ bởi Okayama và Berg (Mol. Cell. Biol. 3:280,

1983). Hệ hữu dụng cho sự biểu hiện ổn định mức cao của các cADN của động vật có vú ở các tế bào biểu mô của chuột C127 có thể được tạo cấu trúc về cơ bản như được mô tả trong tài liệu Cosman et al. (Mol. Immunol. 23:935, 1986). Vector biểu hiện cao hữu dụng, PMLSV N1/N4, được mô tả trong tài liệu Cosman et al., Nature 312:768, 1984 được nộp lưu dưới tên ATCC 39890. Các vector biểu hiện của động vật có vú hữu dụng khác được mô tả trong tài liệu EP-A-0367566, và trong đơn yêu cầu cấp patent US 07/701,415, nộp ngày 16 tháng 5 năm 1991. Các vector này có thể có nguồn gốc từ các retrovirus. Tại vị trí trình tự tín hiệu nguyên gốc, và ngoài yếu tố khởi động methionin, trình tự tín hiệu khác loài có thể được bổ sung vào, như trình tự tín hiệu cho IL-7 được mô tả trong US 4,965,195; trình tự tín hiệu cho thụ thể IL-2 được mô tả trong Cosman et al., Nature 312:768 (1984); peptit tín hiệu IL-4 được mô tả trong EP 367,566; peptit tín hiệu thụ thể IL-1 typ I được mô tả trong US 4,968,607; và peptit tín hiệu thụ thể IL-1 typ II được mô tả trong EP 460,846.

Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB, là protein đã được phân lập, đã được tinh chế hoặc đồng nhất theo sáng chế, có thể được tạo ra bằng các hệ biểu hiện tái tổ hợp như được nêu ở trên hoặc được tinh chế từ các tế bào có trong tự nhiên.

Một quy trình để tạo ra chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ đã được biến nạp với vector biểu hiện có chứa trình tự ADN mã hóa cho ít nhất một chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB trong điều kiện đủ để thúc đẩy sự biểu hiện của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB này. Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB sau đó được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc chất chiết tế bào, tùy thuộc vào hệ biểu hiện được sử dụng. Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, quy trình tinh chế protein tái tổ hợp sẽ thay đổi theo các yếu tố như loại tế bào chủ được sử dụng và liệu protein tái tổ hợp này có được tiết vào trong môi trường nuôi cấy hay không. Ví dụ, khi các hệ biểu hiện tiết protein tái tổ hợp này được sử dụng, môi trường nuôi cấy trước tiên được cô đặc bằng cách sử dụng thiết bị lọc cô protein có sẵn trên thị trường, ví dụ như thiết bị siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Sau bước cô đặc, chất cô có thể được đưa vào nền tinh chế như môi trường lọc gel. Theo cách khác, có thể sử dụng nhựa trao đổi anion, ví dụ, nền hoặc cơ chất có các nhóm diethylaminoethyl (DEAE) treo. Nền có thể là acrylamit, agarosa, dextran, xenluloza hoặc các dạng thường được sử dụng để tinh chế protein khác. Theo cách khác, có thể

sử dụng bước trao đổi cation. Các chất trao đổi cation thích hợp bao gồm các nền không tan khác nhau có chứa các nhóm sulfopropyl hoặc carboxymetyl. Cuối cùng, một hoặc nhiều bước sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) sử dụng môi trường RP-HPLC kỵ nước, (ví dụ, silicagel có methyl treo hoặc các nhóm béo khác) có thể được sử dụng để tiếp tục tinh chế các chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB. Một số hoặc tất cả các bước tinh chế nêu trên, ở các dạng kết hợp khác nhau, đã được biết rõ và có thể được sử dụng để tạo ra protein tái tổ hợp đồng nhất về cơ bản.

Có thể sử dụng cột ái lực có chứa IL-17RA, hoặc IL-17RB, hoặc cả IL-17RA và IL-17RB, hoặc phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB protein để tinh chế dựa vào ái lực chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB được biểu hiện. Chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB có thể được loại bỏ khỏi cột ái lực bằng các kỹ thuật thông dụng, ví dụ như trong đệm rửa giải có nồng độ muối cao và sau đó được thẩm tách vào trong đệm có nồng độ muối thấp hơn để sử dụng hoặc bằng cách thay đổi độ pH hoặc các thành phần khác tùy thuộc vào nền ái lực được sử dụng. Theo cách khác, cột ái lực có thể chứa kháng thể liên kết chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB.

Protein tái tổ hợp được tạo ra trong giống cây vi khuẩn có thể được phân lập bằng cách ban đầu phá vỡ các tế bào chủ, ly tâm, chiết từ lớp tế bào lắng kết nếu đó là polypeptit không tan được, hoặc từ dịch nổi bề mặt nếu đó là polypeptit tan được, tiếp đó là một hoặc nhiều bước cô đặc, loại muối, trao đổi ion, tinh chế dựa vào ái lực hoặc sắc ký loại theo kích thước. Cuối cùng, RP-HPLC có thể được sử dụng cho bước tinh chế cuối cùng. Các tế bào vi khuẩn có thể được phá vỡ bằng phương pháp thông dụng bất kỳ, bao gồm chu trình đóng băng-tan băng, lắc rung bằng sóng siêu âm, phá vỡ cơ học, hoặc sử dụng chất làm tan tế bào.

Các tế bào chủ nấm men biến nạp có thể được sử dụng để biểu hiện chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB dưới dạng polypeptit tiết để dễ dàng tinh chế. Polypeptit tái tổ hợp được tiết từ mẻ lên men tế bào chủ nấm men có thể được tinh chế bằng các phương pháp tương tự với các phương pháp được bộc lộ trong tài liệu Urdal et al. 1984, J. Chromatog. 296:171. Urdal và cộng sự mô tả hai bước HPLC pha đảo liên tiếp để tinh chế IL-2 tái tổ hợp của người trên cột HPLC điều chế.

Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn theo sáng chế được đưa vào bằng cách viện dẫn. Các ví dụ sau đây, cả ví dụ thực tế và dự đoán, được nêu nhằm mục

đích minh họa các phương án hoặc dấu hiệu cụ thể của sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

IL-17RD.HIS của người, kháng thể đa dòng kháng hIL-17RA ở dê, kháng thể đa dòng kháng hIL-17RB ở dê, kháng thể đa dòng kháng hIL-17RC ở dê, và tất cả các kit ELISA nhận được từ R & D Systems (Minneapolis, MN) và được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. IL-13 của chuột nhận được từ Invitrogen Biosource (Carlsbad, CA). Albumin huyết thanh chuột (MSA) nhận được từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Kháng thể đơn dòng kháng IL-25, IL-17RA và IL-17RB của người và chuột nhất được tạo ra về cơ bản như được mô tả bởi Yao và cộng sự (Yao, et al., 1995, Immunity 3: 811-821; Yao, et al., 1995, J. Immunol. 155:5483-5486; Yao, 1997, Cytokine 9:794-800). cADN mã hóa cho IL-17RA của người và chuột nhất đã được mô tả trước đó (xem ba tài liệu tham khảo của Yao, nêu trên). Các khung đọc mở mã hóa IL-17RB của người và chuột nhất giống như khung đọc mở đã được mô tả trước đó (Tian, et al., 2000, Oncogene 19(17):2098-2109). cADN mã hóa cho IL-25 của chuột đã được mô tả trước đó (Hurst, et al., 2002, J Immunol. 169(1):443-453.). IL-25 của chuột được biểu hiện ở *E.coli* và được tinh chế như đã được mô tả (Hurst et al. nêu trên). Vùng ngoại bào của IL-17RA của người được dung hợp với poly HIS hoặc Fc IgG1 của người (lần lượt là IL-17RA:HIS hoặc IL-17RA:Fc); vùng ngoại bào của IL-17RB của người được dung hợp với poly HIS (IL-17RB.HIS) hoặc Fc IgG1 của người (IL-17RB.Fc) về cơ bản như được nêu trong Yao, et al., 1995, Immunity (nêu trên). Trong một số thử nghiệm, IL-25, IL-17RA Fc và IL-17RB Fc của chuột nhất và của người có sẵn trên thị trường được sử dụng (R & D Systems).

Ví dụ 1

Ví dụ này chứng minh sự cần thiết của IL-17RB để đáp ứng lại IL-25 *in vivo*. Chuột nhất IL-17RB-/- được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Một cách tóm tắt, vector hướng gen đích được tạo cấu trúc bằng cách thay thế trình tự hệ gen có chứa exon 3 của IL-17RB của chuột bằng kết cấu PGKneo. Kết cấu thymidin kinaza (MC-TK) được cài xen vào trong đầu cuối 5' của vector. Tế bào gốc phôi (ES) có nguồn gốc từ 129 được điện chuyển với vector hướng đích và được chọn trong điều kiện có mặt của G418 và ganciclovir như đã nêu (Kolls, J, et al. 1994. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA. 91:215-219). Các dòng ES mang đột biến được hướng đích ở IL-17RB được nhận diện bằng các phân tích kết hợp PCR và thẩm tách Southern hệ gen và được tiêm vào trong các tế bào phôi Swiss Black. Các thể khảm được lai với con cái Swiss Black để tạo ra chuột nhất dị hợp tử để gây đột biến IL-17RB mà sau đó được lai chéo để tạo ra chuột nhất thiếu IL-17RB. Các chuột nhất này được chuyển sang nền C57BL/6 bằng 5 lần lai ngược liên tiếp với chuột nhất C57BL/6, bằng cách sử dụng công nghệ lai ngược tăng cường được hỗ trợ bằng chất đánh dấu (MAX-BAXSM) (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Chuột nhất được nhận diện là 99,5% C57BL/6 được sử dụng để tạo cụm tế bào lai giống để tạo ra chuột nhất cho mục đích thử nghiệm.

Chuột nhất C57BL/6 đối chứng (WT) hoặc chuột nhất IL-17RB^{-/-} (KO) nhận 50 μ L MSA (Sigma-Aldrich, St. Louis MO; 10 μ g/mL) hoặc IL-25 của chuột nhất (Amgen; 10 μ g/mL) trong mũi (IN), một lần một ngày trong bốn ngày, về cơ bản như được mô tả bởi Hurst và cộng sự (J. Immunol. 169:443, 2002). Vào ngày 5, thu dịch rửa phế nang-phế quản (BALF) và mô phổi từ chuột nhất và phân tích.

Rửa phế nang-phế quản (BAL) bằng cách luồn ống vào chuột nhất được gây mê bằng liều tiêm trong màng bụng 300 μ L Avertin 2,5% (2-2-2-tribrometanol, Sigma) và rửa phổi bằng hai lần thể tích 600 μ L Dulbecco's PBS được giữ lạnh trong nước đá (Gibco). Các tế bào trong dịch BAL được làm lắng kết bằng cách ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 10 phút và được tái tạo huyền phù bằng PBS + huyết thanh bào thai bò 5% (FBS; HyClone; Logan, UT) để đếm và phân tích tổng số lượng tế bào bạch cầu cũng như sự thay đổi số lượng của các loại tế bào khác nhau bằng cách sử dụng máy huyết học ADVIA® 120 (máy phân tích để bàn để xử lý và phân tích các mẫu huyết học; Siemens Diagnostics, Tarrytown, NY). BALF cũng được kiểm tra về nồng độ protein IL-5 và IL-13 bằng kỹ thuật ELISA (R&D Systems; giới hạn phát hiện: IL-5, 31 pg/mL; IL-13, 62 pg/mL).

Mức mARN đối với các chất điều tiết viêm khác nhau ở mô phổi được xác định bằng cách biểu hiện TaqMan® (phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza nhanh, thời gian thực dựa vào nhóm huỳnh quang) sử dụng các đoạn môi Assays-On-Demand TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) về cơ bản như được mô tả trước đó (Hartel, C., et al, 1999 Scand.J.Immunol. 49(6):649-654). Phép phân tích TaqMan®

được thực hiện trên hệ ABI Prism 7900HT Fast RT-PCR System (Applied Biosystems). Sự biểu hiện tương đối của mỗi gen so với sự biểu hiện gen beta-actin, HPRT hoặc GAPDH ở mỗi nhóm điều trị được xác định bằng hệ thống Sequence Detection System 2.2.3 (Applied Biosystems). Các kết quả của hai thử nghiệm riêng biệt được thể hiện trong các bảng từ 1 đến 4 dưới đây.

Bảng 1: Phân tích số lượng tế bào, nồng độ IL-5 và nồng độ IL-13 trong BALF ở chuột nhắt IL-17RB KO và WT được cho dùng liều IL-25 trong mũi

Kiểu gen, điều trị IN	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Limpho bào	Đại thực bào	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
WT, MSA	59000 ± 21622	220 ± 491	520 ± 483	980 ± 828	57280 ± 21493	31	63 ± 1
IL-17RB KO, MSA	48750 ± 24958	187 ± 375	537 ± 485	750 ± 501	47275 ± 24110	31	65 ± 7
WT, IL-25	261000 ± 61482	99850 ± 20802	67320 ± 20230	10020 ± 6376	83810 ± 39933	206 ± 48	296 ± 85
IL-17RB KO, IL-25	90000 ± 15411	700 ± 416	7470 ± 8945	2790 ± 2707	79040 ± 13483	31	64 ± 4

N= 5/nhóm; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD); các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-5 được gán giá trị là 31 pg/mL.

Bảng 2: Phân tích mRNA của IL-5, IL-13 và IL-17RA ở phổi của chuột nhắt IL-17RB KO và WT đáp ứng kích thích IN IL-25

Kiểu gen, điều trị IN	IL-5	IL-13	IL-17RA
WT, MSA	0,0001524 ± 0,0002235	0,004738 ± 0,005697	0,03015 ± 0,01009
IL-17RB KO, MSA	0,0004190 ± 0,0003338	0,006084 ± 0,007098	0,02895 ± 0,009634
WT, IL-25	0,001011 ± 0,0002767	0,02066 ± 0,005046	N/A
IL-17RB KO, IL-25	2,310e-005 ± 1,173e-005	3,146e-005 ± 2,068e-005	N/A

N= 5/nhóm; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD); các giá trị IL-5 và IL-13 được thể hiện là sự biểu hiện gen tương đối so với β -actin ($2E-\Delta Ct$) (giá trị trung bình ± SD). Các giá trị IL-17RA được thể hiện là sự biểu hiện gen tương đối so với HPRT ($2E-\Delta Ct$) (giá trị trung bình ± SD). N/A = Không được phân tích

Chuột nhắt IL-17RB KO với thử nghiệm kích thích IN IL-25 được lặp lại theo cùng một cách về cơ bản, có bổ sung nhánh kích thích bằng interleukin-13 của chuột nhắt (IL-13; Invitrogen Biosource™, Carlsbad, CA; được cho dùng liều một lần một ngày trong bốn ngày, 50 μ L với nồng độ 10 μ g/mL); các kết quả được thể hiện trong các bảng 3-4 dưới đây.

Bảng 3: Phân tích số lượng tế bào trong BALF ở chuột nhắt IL-17RB KO và WT đáp ứng lại kích thích IN IL-13 hoặc IL-25

Kiểu gen, điều trị IN	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Lympho bào	Đại thực bào
WT, MSA	41625 $\pm$ 12479	0	9500 $\pm$ 4143	5378 $\pm$ 3772	26750 $\pm$ 7309
IL-17RB KO, MSA	15875 $\pm$ 9578	0	2625 $\pm$ 3351	1125 $\pm$ 2250	12125 $\pm$ 4366
WT, IL-13	49700 $\pm$ 38836	12600 $\pm$ 8459	20000 $\pm$ 27611	6300 $\pm$ 1037	10800 $\pm$ 4192
IL-17RB KO, IL-13	27100 $\pm$ 11475	8200 $\pm$ 3328	4200 $\pm$ 5586	6200 $\pm$ 2168	8500 $\pm$ 5948
WT, IL-25	185400 $\pm$ 103332	55600 $\pm$ 31053	70200 $\pm$ 74492	14600 $\pm$ 5355	45000 $\pm$ 6255
IL-17RB KO, IL-25	23800 $\pm$ 4550	0	4600 $\pm$ 3070	2500 $\pm$ 2318	16700 $\pm$ 2683

N= 5/nhóm; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình $\pm$ SD)

Bảng 4: Phân tích mRNA của IL-5, IL-13, eotaxin, MCP-1, IL-9, IL-10, IL-17A và IL-17RA ở phổi của chuột nhắt IL-17RB KO và WT đáp ứng lại kích thích IN IL-25

Kiểu gen, điều trị IN	IL-13	IL-5	Eotaxin	MCP-1
WT, MSA	1,404e-02 $\pm$ 1,159e-02	1,111e-03 $\pm$ 8,247e-04	5,558e-02 $\pm$ 4,341e-02	1,777e-03 $\pm$ 1,056e-03
IL-17RB KO, MSA	1,546e-02 $\pm$ 1,523e-02	1,237e-03 $\pm$ 1,142e-03	5,541e-02 $\pm$ 4,541e-02	1,621e-03 $\pm$ 1,039e-03
Bảng 4, tiếp				
Kiểu gen, điều trị IN	IL-9	IL-10	IL-17A	IL-17RA
WT, IL-25	7,523e-01 $\pm$ 2,561e-01	5,668e-02 $\pm$ 2,070e-02	5,795e-01 $\pm$ 1,474e-01	1,138e-02 $\pm$ 3,890e-03
IL-17RB KO, IL-25	8,828e-04 $\pm$ 4,888e-04	5,335e-04 $\pm$ 1,725e-04	1,091e-02 $\pm$ 3,142e-03	1,485e-03 $\pm$ 6,347e-04
WT, MSA	5,098e-04 $\pm$ 4,573e-04	1,240e-04 $\pm$ 5,739e-05	2,735e-04 $\pm$ 2,080e-04	1,208e-02 $\pm$ 1,615e-03

IL-17RB KO, MSA	6,091e-04 ± 5,795e-04	1,624e-04 ± 8,018e-05	2,551e-04 ± 2,221e-04	9,86e-03 ± 1,599e-03
WT, IL-25	4,820e-03 ± 1,108e-03	60688e-03 ± 2,235e-03	2,310e-03 ± 1,588e-03	3,255e-02 ± 1,287e-02
IL-17RB KO, IL-25	1,385e-05 ± 2,399e-05	5,868e-04 ± 1,391e-04	2,725e-04 ± 4,720e-04	1,748e-02 ± 8,050e-03

N= 4 phổi từ các chuột nhất riêng biệt; các giá trị được thể hiện là sự biểu hiện gen tương đối so với HPRT (2E-ΔCt) (giá trị trung bình ± SD)

Đối với các thử nghiệm mô bệnh học phổi, chuột nhắt bị gây chết bằng cách gây ngạt CO₂. Phổi được thu nhận, được giữ cố định trong formalin được đệm trung tính 10% (NBF), được xử lý, được cắt thành lát 6 micromet và được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E) hoặc thuốc nhuộm axit periodic Schiff (PAS) về cơ bản như đã nêu (Harkema, J. R., and J. A. Hotchkiss, Am. J. Pathol. 141:307; 1992); thang điểm số được sử dụng trong phân tích các lát cắt mô được thể hiện dưới đây cho bốn lớp khác nhau. Tổng điểm số viêm trung bình của mỗi nhóm được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5: Phân tích mô học bệnh viêm mô phổi và chứng tăng sản tế bào dạng chén ở chuột nhắt IL-17RB KO và WT được kích thích bằng IN IL-25

	IL-17RB KO, IL-25 (N = 5)	IL-17RB KO, MSA (N = 4)	WT, IL- 25 (N = 5)	WT, MSA (N = 5)
Chứng tăng sản tế bào dạng chén	0	0	2,2 ± 1,3	0
Bệnh viêm quanh phế quản	0,6 ± 0,5	0	1,6 ± 0,9	0
Bệnh viêm phế quản-phổi	0,8 ± 0,4	0	1 ± 0	0
Bệnh viêm mạch/quanh mạch phổi	0	0	0,6 ± 1,3	0
Tổng điểm số	2,2 ± 1,1	0	7,4 ± 1,9	0

Điểm số trung bình được trình bày ± SD.

Chứng tăng sản tế bào dạng chén (nhuộm PAS)

0 = bình thường

1 = rất nhỏ, chứng tăng sản tế bào dạng chén ở các nhánh phế quản lớn

2 = nhẹ, chứng tăng sản tế bào dạng chén ở các nhánh phế quản lớn và trung bình

3 = vừa phải, chứng tăng sản tế bào dạng chén ở các nhánh phế quản lớn và trung bình và một số nhánh phế quản nhỏ

4 = rõ ràng, chứng tăng sản tế bào dạng chén ở toàn bộ đường hô hấp

Bệnh viêm quanh phế quản

0 = bình thường

1 = các vòng quần bạch cầu ưa eosin/đại thực bào/limpho bào rất nhỏ (lớp không liên tục đến lớp đơn), không phù

2 = các vòng quần bạch cầu ưa eosin/đại thực bào/limpho bào nhẹ (2-5 tế bào); phù, mô xơ rất nhỏ

3 = các vòng quần bạch cầu ưa eosin/đại thực bào/limpho bào vừa phải (5-10 tế bào); xuất hiện phù và mô xơ

4 = các vòng quần bạch cầu ưa eosin/đại thực bào/limpho bào rõ ràng (>10 tế bào); phù và mô xơ rõ ràng

Bệnh viêm phế quản-phổi

0 = bình thường

1 = rất nhỏ, tích tụ tập trung của đại thực bào/bạch cầu trung tính/bạch cầu ưa eosin/MNGC

2 = nhẹ, tích tụ tập trung của đại thực bào/bạch cầu trung tính/bạch cầu ưa eosin/MNGC

3 = vừa phải, tích tụ đa tập trung của đại thực bào/bạch cầu trung tính/bạch cầu ưa eosin/MNGC

4 = rõ ràng, tích tụ đa tập trung của đại thực bào/bạch cầu trung tính/bạch cầu ưa eosin/MNGC

Bệnh viêm mạch/quanh mạch phổi

0 = bình thường

1 = các vòng quần bạch cầu ưa eosin/limpho bào/đại thực bào rất nhỏ (lớp không liên tục đến lớp đơn), không có chứng thâm nhiễm nội mạc mạch /chứng tăng sản

2 = các vòng quần bạch cầu ưa eosin/limpho bào/đại thực bào nhẹ (2-5 tế bào); chứng thâm nhiễm nội mạc mạch ưa eosin và chứng tăng sản nội mô tập trung

3 = các vòng quần bạch cầu ưa eosin/limpho bào/đại thực bào vừa phải (5-10 tế bào); chứng thâm nhiễm nội mạc mạch ưa eosin và chứng tăng sản nội mô với một số MNGC tập trung rộng

4 = các vòng quần bạch cầu ưa eosin/limpho bào/đại thực bào rõ ràng (>10 tế bào); thành mạch đôi khi bị xóa bỏ và MNGC nhô lên; bệnh viêm mạch rời rạc xuất hiện

Ở chuột nhắt C57BL/6 kiểu đại, tác dụng của việc dùng IL-25 trong mũi bao gồm (1) số lượng bạch cầu trong BALF toàn phần tăng, bao gồm số lượng bạch cầu ưa eosin, bạch cầu trung tính, limpho bào và đại thực bào trong BALF tăng, và nồng độ IL-5 và IL-13 trong BALF tăng (bảng 1 và 3), (2) mức mARN của IL-5, IL-13, eotaxin và MCP-1 ở phổi tăng (bảng 2 và 4), và (3) chứng tăng sản tế bào dạng chén trong đường hô hấp lớn và trung bình, và bệnh viêm mạch/quanh mạch tăng cường liên quan đến cả các động mạch và các tĩnh mạch, nhưng không liên quan đến các mao mạch phế nang (bảng 5). Không quan sát thấy tác dụng nào trong số các tác dụng này khi dùng IL-25 trong mũi cho chuột nhắt IL-17RB KO (các bảng 1-5). mARN của IL-17RA có mặt ở chuột nhắt IL-17RB KO (các bảng 2 và 4). Các dữ liệu này chứng minh rằng IL-17RB cần thiết cho tất cả các hoạt tính IL-25 ở phổi được xác định đến nay.

Ví dụ 2

Ví dụ này chứng minh sự cần thiết của IL-17RA để đáp ứng lại IL-25 *in vivo*. Việc tạo ra chuột nhắt C57BL/6 IL-17RA^{-/-} đã được nêu trước đó (Ye, P., et al, 2001 J. Exp. Med. 194:519-527). Chuột nhắt C57BL/6 đối chứng (WT) hoặc chuột nhắt IL-17RA^{-/-} (KO) được điều trị về cơ bản như đã nêu trong ví dụ 1 đối với chuột nhắt IL-17RB^{-/-}; các kết quả được thể hiện trong các bảng 6 và 7 dưới đây.

Bảng 6: Phân tích BALF ở chuột nhắt IL-17RA KO so với C57BL/6 WT: số lượng tế bào và protein

	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Limpho bào	Đại thực bào	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
WT, MSA	44900 ± 9283	5300 ± 5718	6400 ± 4022	4700 ± 1304	28500 ± 5420	31	76,39 ± 26,88
KO, MSA	43300 ± 10634	1800 ± 1643	8400 ± 8422	7300 ± 4778	25800 ± 4056	31	94,74 ± 30,19
WT, IL-13	191600 ± 54874	69100 ± 25297	74000 ± 49050	22400 ± 10268	26100 ± 10096	31	N/A
KO, IL-13	161900 ± 56720	40300 ± 25250	62100 ± 19064	38400 ± 27869	21100 ± 9134	31	N/A
WT, IL-25	520500 ± 129960	206100 ± 36906	220000 ± 97248	27300 ± 15470	67100 ± 21355	213,6 ± 115,2	2413 ± 1206
KO, IL-25	30300 ± 15123	0	10300 ± 7621	4700 ± 3309	15300 ± 6048	31	85,06 ± 12,65

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình $\pm$ SD). N/A = Không được kiểm tra. Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-5 được gán giá trị là giới hạn phát hiện dưới là 31 pg/mL.

Bảng 7: Phân tích mô phổi ở chuột nhắt IL-17RA KO so với C57BL/6 WT:
mức mARN

	IL-5	IL-13	Eotaxin	MCP-1	IL-17RB
WT, MSA	4,347e-005 $\pm$ 1,198e-005	2,105e-005 $\pm$ 8,093e-006	0,001674 $\pm$ 0,0004063	0,0001465 $\pm$ 2,076e-005	0,0001526 $\pm$ 6,955e-005
KO, MSA	7,767e-005 $\pm$ 5,119e-005	0,0001564 $\pm$ 0,0002616	0,003062 $\pm$ 0,0008565	0,0002408 $\pm$ 4,665e-005	0,0005272 $\pm$ 0,0004737
WT, IL-25	0,004601 $\pm$ 0,002347	0,005463 $\pm$ 0,003147	0,06500 $\pm$ 0,01270	0,001429 $\pm$ 0,0005115	0,01030 $\pm$ 0,009463
KO, IL-25	0,0001166 $\pm$ 7,309e-005/-	9,084e-006 $\pm$ 6,040e-006	0,002149 $\pm$ 0,0009068	0,0005612 $\pm$ 0,0003233	0,001637 $\pm$ 0,0006343

N= 4; các giá trị được thể hiện là sự biểu hiện gen tương đối so với β -actin (2E- Δ Ct) (giá trị trung bình $\pm$ SD). Mô phổi từ chuột nhắt được điều trị bằng IL-13 không được phân tích trong thử nghiệm này

Các mô phổi được cắt lát, được chuẩn bị để phân tích mô học, được nhuộm và được phân tích về cơ bản như được nêu trong ví dụ 1. Tổng điểm số viêm trung bình của mỗi nhóm được trình bày trong bảng 8.

Bảng 8: Phân tích mô học mô phổi ở chuột nhắt IL-17 RA KO so với WT

	KO, IL-25	KO, MSA	WT, IL-25	WT, MSA
Chứng tăng sản tế bào dạng chén	0,6 $\pm$ 0,5	0	2,8 $\pm$ 0,4	0
Bệnh viêm quanh phế quản	0,8 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$,5	0
Bệnh viêm phế quản-phổi	1,0 $\pm$ 0	1,0 $\pm$ 0	1,2 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,5
Bệnh viêm mạch/quanh mạch phổi	1,6 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,4
Tổng điểm số	4,0 $\pm$ 1	3,0 $\pm$ 1,4	10,6 $\pm$ 1,3	1,4 $\pm$ 0,9

N=5 đối với tất cả các nhóm, trừ đối với chuột nhắt IL-17RA KO được điều trị bằng MSA, đối với nhóm này N=4. Điểm số trung bình được trình bày $\pm$ SD.

Thử nghiệm được lặp lại theo cùng một cách về cơ bản; các kết quả được thể hiện trong các bảng 9 và 10 dưới đây. Phép phân tích mô học các mô phổi không được thực hiện trong các thử nghiệm này.

Bảng 9: Phân tích BALF ở chuột nhắt KO so với WT

	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Limpho bào	Đại thực bào
WT, MSA	32200 ± 11066	1400 ± 1949	3800 ± 2225	2700 ± 2490	24300 ± 8983
KO, MSA	44167 ± 4252	0	7333 ± 763	5333 ± 3175	31500 ± 1323
WT, IL-13	126300 ± 52821	60500 ± 39019	37300 ± 19110	12500 ± 5160	16000 ± 4138
KO, IL-13	87000 ± 20788	19800 ± 9358	38000 ± 12525	19200 ± 5563	10000 ± 3606
WT, IL-25	327600 ± 144145	129100 ± 63800	136900 ± 65040	18400 ± 8828	43200 ± 16799
KO, IL-25	65800 ± 80169	1300 ± 1789	30100 ± 58729	4700 ± 4894	29700 ± 17946

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD)

Bảng 10: Phân tích mô phổi ở chuột nhắt KO so với WT: mức mARN

	IL-13	IL-5	IL-17RB	Eotaxin	MCP-1
WT, MSA	3,200e-011 ± 9,360e-012	8,280e-005 ± 2,122e-005	4,290e-010 ± 2,512e-011	3,377e-009 ± 7,773e-010	7,743e-010 ± 1,499e-010
KO, MSA	5,768e-011 ± 7,292e-011	0,0001578 ± 6,837e-005	4,373e-010 ± 4,755e-011	2,755e-009 ± 9,058e-010	8,060e-010 ± 3,463e-010
WT, IL-13	3,953e-011 ± 1,572e-011	9,838e-005 ± 5,447e-006	3,205e-010 ± 5,943e-011	9,333e-009 ± 1,588e-009	4,378e-009 ± 1,612e-009
KO, IL-13	2,353e-009 ± 3,857e-009	0,0003726 ± 0,0004745	6,198e-010 ± 6,295e-010	2,308e-008 ± 7,232e-009	9,863e-009 ± 3,469e-009
WT, IL-25	6,675e-008 ± 1,662e-008	0,008895 ± 0,0008927	1,436e-008 ± 4,626e-009	1,181e-007 ± 1,734e-008	8,005e-009 ± 1,252e-009
KO, IL-25	5,135e-011 ± 2,720e-011	0,000196 ± 6,249e-005	3,865e-010 ± 7,159e-011	2,690e-009 ± 1,547e-010	1,157e-009 ± 4,762e-010

N= 4; các giá trị được thể hiện là sự biểu hiện gen tương đối so với GAPDH (2E-ΔCt) (giá trị trung bình ± SD)

Ở chuột nhắt C57BL/6 kiểu dại, tác dụng của việc dùng IL 25 trong mũi bao gồm: (1) số lượng bạch cầu trong BALF toàn phần tăng, số lượng bạch cầu ưa eosin, bạch cầu trung tính, limpho bào và đại thực bào trong BALF tăng, và nồng độ IL-5 và IL-13 trong BALF tăng (các bảng 1 và 4), (2) chứng tăng sản tế bào dạng chén trong đường hô hấp lớn và trung bình, và bệnh viêm mạch/quanh mạch tăng cường liên quan đến cả các động mạch và các tĩnh mạch, nhưng không liên quan đến các mao mạch phế nang (bảng 3), và (3) mức mARN của IL-5, IL-13, eotaxin, MCP-1 và IL-17RB ở

phổi tăng (các bảng 2 và 5). Không quan sát thấy tác dụng nào trong số các tác dụng này khi dùng IL-25 trong mũi cho chuột nhắt IL-17RA KO (các bảng 1-5), mặc dù mRNA của IL-17RB có mặt ở chuột nhắt IL-17RA KO. Các dữ liệu này chứng minh rằng IL-17RA cần thiết cho các hoạt tính IL-25 ở phổi.

Ví dụ 3

Ví dụ này chứng minh sự cần thiết của IL-17RA và IL-17RB để đáp ứng lại IL-25 *in vitro*. Việc tạo ra các tế bào lách đã được nêu trước đó (Hamilton, et al., 1978, J Clin Invest. 62(6):1303-12). Một cách tóm tắt, các lách riêng biệt từ chuột nhắt C57BL/6 WT, C57BL/6 IL-17RB KO và C57BL/6 IL-17RA KO được lấy ra trong điều kiện vô trùng và được xử lý bằng collagenase D 0,4 mg/mL (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) và ADNase-I 0,1% (Roche Applied Science) trong RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) để tạo ra huyền phù tế bào đơn. Các tế bào lách được nuôi cấy ở nồng độ $2,0 \times 10^7$ tế bào/mL trong môi trường DMEM đầy đủ (Gibco-Invitrogen) riêng lẻ hoặc có bổ sung Concanavalin A 1 μ g/mL (Con A; Sigma-Aldrich), hoặc IL-25 (Amgen) với nồng độ cuối cùng đã định. Các tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ được làm ẩm 5% CO₂. Dịch nổi bề mặt được kiểm tra về nồng độ IL-5 và IL-13 bằng kỹ thuật ELISA (R&D Systems). Các thử nghiệm tế bào lách được lặp lại hai lần đối với mỗi kiểu gen sử dụng các lứa khác nhau của chuột IL-17RA KO, IL-17RB KO và WT; các dữ liệu từ hai thử nghiệm riêng biệt được thể hiện dưới đây (các bảng 11-14).

Bảng 11: Sản xuất IL-5 và IL-13 bởi các tế bào lách IL-17RA KO và WT được kích thích bởi IL-25

IL-25, ng/mL	IL-17RA KO, IL-5 pg/mL	WT, IL-5 pg/mL	IL-17RA KO, IL-13 pg/mL	WT, IL-13 pg/mL
500,0	31	1044 $\pm$ 423	62	1581 $\pm$ 389
250,0	31	1435 $\pm$ 580	85 $\pm$ 43	2363 $\pm$ 459
125,0	31	1481 $\pm$ 542	119 $\pm$ 87	2442 $\pm$ 103
62,0	32 $\pm$ 14	1721 $\pm$ 641	141 $\pm$ 87	3133 $\pm$ 239
31,0	33, $\pm$ 19	1737 $\pm$ 634	122 $\pm$ 40	2520 $\pm$ 185
15,0	31	1405 $\pm$ 624	97 $\pm$ 55	1897 $\pm$ 479
0,1	36 $\pm$ 6	41 $\pm$ 16	80 $\pm$ 38	103 $\pm$ 82
0,0	31	31	62	62

N= 2 lách riêng biệt; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình $\pm$ SD). Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-5 được gán giá trị là 31 pg/mL. Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-13 được gán giá trị là 62 pg/mL.

Bảng 12: Sản xuất IL-5 và IL-13 bởi các tế bào lách WT và IL-17RA KO được kích thích bởi IL-25

IL-25, ng/mL	IL-17RA KO, IL-5 pg/mL	WT, IL-5 pg/mL	IL-17RA KO, IL-13 pg/mL	WT, IL-13 pg/mL
60	31	538 $\pm$ 200	109 $\pm$ 7	864 $\pm$ 335
20	31	491 $\pm$ 181	188 $\pm$ 6	892 $\pm$ 424
6,66	31	364 $\pm$ 219	129 $\pm$ 1	657 $\pm$ 316
2,22	31	191 $\pm$ 105	113 $\pm$ 4	367 $\pm$ 214
0,7	31	115 $\pm$ 82	143 $\pm$ 14	212 $\pm$ 133
0,2	31	46 $\pm$ 16	138 $\pm$ 29	112 $\pm$ 44
0	31	31	161 $\pm$ 13	68 $\pm$ 27
Con A	168 $\pm$ 64	116 $\pm$ 28	1730 $\pm$ 118	674 $\pm$ 151

Bảng 13: Sản xuất IL-5 và IL-13 bởi các tế bào lách IL-17RB KO và WT được kích thích bởi IL-25

IL-25, ng/mL	IL-17RB KO, IL-5 pg/mL	WT, IL-5 pg/mL	IL-17RB KO, IL-13 pg/mL	WT, IL-13 pg/mL
60	31	358 $\pm$ 181	62	990 $\pm$ 470
20	31	228 $\pm$ 120	71 $\pm$ 33	875 $\pm$ 441
6,66	31	217 $\pm$ 110	95 $\pm$ 27	680 $\pm$ 361
2,22	31	223 $\pm$ 170	80 $\pm$ 51	528 $\pm$ 254
0,7	31	82 $\pm$ 41	95 $\pm$ 32	369 $\pm$ 131
0,2	31	43 $\pm$ 19	104 $\pm$ 59	265 $\pm$ 116
0	31	31	110 $\pm$ 30	197 $\pm$ 66
Con A	31	130 $\pm$ 57	342 $\pm$ 97	628 $\pm$ 241

N= 3 lách riêng biệt; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình $\pm$ SD); Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-5 được gán giá trị là 31 pg/mL. Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-13 được gán giá trị là 62 pg/mL.

Bảng 14: Sản xuất IL-5 và IL-13 bởi các tế bào lách IL-17RB KO và WT được kích thích bởi IL-25

IL-25, ng/mL	IL-17RB KO, IL-5 pg/mL	WT, IL-5 pg/mL	IL-17RB KO, IL-13 pg/mL	WT, IL-13 pg/mL
60	31	114 ± 88	61	250 ± 151
20	31	99 ± 62	61	181 ± 90
6,66	31	62 ± 33	61	140 ± 63
2,22	31	36 ± 13	67 ± 32	108 ± 38
0,7	31	32 ± 27	61	77 ± 22
0,2	31	31	61	61
0	31	31	61	61
Con A	80 ± 47	113 ± 17	460 ± 104	744 ± 61

N= 3 lách riêng biệt; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD); Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-5 được gán giá trị là 31 pg/mL. Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-13 được gán giá trị là 62 pg/mL.

Sự kích thích IL-25 gây ra sự sản xuất IL-5 và IL-13 bởi các tế bào lách C57BL/6 kiểu đại được nuôi cấy. Sự sản xuất xytokin này không được gây ra bởi sự kích thích IL-25 đối với các tế bào lách IL-17RB KO hoặc IL-17RA KO (các bảng 11-14). Con A, đối chứng dương cho sự hoạt hóa tế bào lách, gây ra sự sản xuất IL-13 bởi các tế bào lách IL-17RB KO và gây ra sự sản xuất IL-5 và IL-13 bởi các tế bào lách IL-17RA KO. Việc kích thích Con A không gây ra sự sản xuất IL-5 bởi các tế bào lách IL-17RB KO trong một thử nghiệm, nhưng gây ra sự sản xuất IL-5 từ các tế bào lách IL-17RB KO trong thử nghiệm thứ hai. Các dữ liệu giống cây tế bào *in vitro* này cung cấp thêm bằng chứng chứng tỏ rằng cả IL-17RB và IL-17RA đều cần thiết cho sự phát tín hiệu IL-25.

Ví dụ 4

Ví dụ này mô tả khả năng ức chế đáp ứng IL-25 *in vitro* của kháng thể kháng IL-17RB-M735 và kháng thể kháng IL-25-M819. Huyền phù tế bào đơn của tế bào lách được chuẩn bị bằng cách sử dụng các lách từ chuột nhắt BALB/C chưa quen thí nghiệm và được pha loãng đến 4×10^7 tế bào/mL trong môi trường DMEM đầy đủ (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA). Các tế bào (100 μ L) được bổ sung vào đĩa loại 96 giếng để có nồng độ cuối cùng là 4×10^6 tế bào/giếng với các điều kiện sau:

Chỉ có môi trường

muIL-25 10 ng/mL (đối chứng kích thích)

muIL-25 10 ng/mL + muIL-17RB.muFc 100 ng/mL (đối chứng phong bế)

muIL-25 10 ng/mL + kháng thể kháng muIL-17RB M735463, 154, 51, 17, 5,7, 1,9, 0,64, 0,21, 0,07, 0,023, 0,007, 0,003 ng/mL

muIL-25 10 ng/mL + M819 kháng muIL-25 1000, 100, 10, 1,0 hoặc 0,1 ng/mL.

Ba mẫu sinh học riêng biệt, mỗi mẫu bao gồm các tế bào lách từ hai lách của chuột nhắt BALB/c chưa quen thí nghiệm, được kiểm tra về từng điều kiện được liệt kê ở trên, và mỗi điều kiện được lặp lại ba lần trong ba thử nghiệm riêng biệt. Các giống cây được ủ trong 72 giờ ở 37° và 10% CO₂, tại thời điểm này dịch nổi bề mặt được thu lại và được thử nghiệm về nồng độ IL-5 bằng kỹ thuật ELISA. Cả M735 và M819 đều ức chế sự tiết IL-5 gây ra bởi IL-25 từ tế bào lách chuột nhắt; các giá trị IC₅₀ được tính toán đối với sự ức chế sản xuất IL-5 gây ra bởi IL-25 bởi các tế bào lách BALB/c được nuôi cấy của mỗi kháng thể trong 3 thử nghiệm tế bào lách riêng biệt được thể hiện dưới đây trong các bảng 15 – 16.

Bảng 15: Giá trị IC₅₀ của M735
kháng IL-17RB

Mô tả kháng thể	IC ₅₀
kháng thể đơn dòng M735, thử nghiệm 1	1,32 ng/mL
kháng thể đơn dòng M735, thử nghiệm 2	0,166 ng/mL
kháng thể đơn dòng M735, thử nghiệm 3	2,15 ng/mL

Bảng 16: Giá trị IC₅₀ của M819
kháng IL-25

Mô tả kháng thể	IC ₅₀
kháng thể đơn dòng M819, thử nghiệm 1	0,24 ng/mL
kháng thể đơn dòng M819, thử nghiệm 2	4,2 ng/mL
kháng thể đơn dòng M819, thử nghiệm 2	1,12 ng/mL

Sự sản xuất IL-5 gây ra bởi IL-25 bị ức chế bởi cả kháng thể kháng IL-17RB M735 và kháng thể kháng IL-25-M819. Các dữ liệu này cung cấp thêm bằng chứng chứng tỏ rằng IL-17RB cần thiết cho việc phát tín hiệu IL-25 ở các tế bào lách.

Ví dụ 5

Ví dụ này mô tả khả năng ức chế đáp ứng IL-25 *in vitro* của các kháng thể kháng IL-17RA khác nhau. Huyền phù tế bào đơn của tế bào lách được chuẩn bị về cơ bản

như được nêu ở trên ví dụ 4. Các tế bào (100 μ L) được bổ sung vào đĩa loại 96 giếng để có nồng độ cuối cùng là 4×10^6 tế bào/giếng với các điều kiện sau:

Chỉ có môi trường

muIL-25 10 ng/mL (đối chứng kích thích)

muIL-25 10 ng/mL + muIL-17RB.muFc 100 ng/mL (đối chứng phong bế)

muIL-25 10 ng/mL + kháng thể đơn dòng kháng muIL-17RA 1000, 100, 10, 1,0 hoặc 0,1 ng/mL.

Ba mẫu sinh học riêng biệt, mỗi mẫu bao gồm các tế bào lách từ hai chuột nhất, được kiểm tra về từng điều kiện. Các giếng cấy được ủ trong 72 giờ ở 37° và 10% CO₂, tại thời điểm này dịch nổi bề mặt được thu lại và được thử nghiệm về nồng độ IL-5 bằng kỹ thuật ELISA. Nhóm gồm tám kháng thể đơn dòng khác nhau kháng IL-17RA của chuột nhất ở chuột Rattus được kiểm tra. Không có kháng thể nào trong số các kháng thể này ức chế đáng kể sự tiết IL-5 gây ra bởi IL-25 từ tế bào lách chuột nhất.

Ngoài các kháng thể kháng chuột nhất ở chuột Rattus này, một kháng thể đơn dòng kháng IL-17RA của chuột nhất ở chuột nhất, M751, được đánh giá hai lần trong thử nghiệm tế bào lách này. M751 ức chế sự tiết IL-5 gây ra bởi IL-25 từ tế bào lách chuột nhất. IC₅₀ được tính cho kháng thể kháng muIL-17RA M751 trong 2 thử nghiệm tế bào lách riêng biệt được thể hiện dưới đây trong bảng 17. Do đó, kháng thể kháng IL-17RA-M751 là chất ức chế kháng IL-17RA tốt nhất đối với sự sản xuất IL-5 gây ra bởi IL-25 trong thử nghiệm tế bào lách này, tuy nhiên nó không có hiệu quả làm chất ức chế như so với kháng thể kháng IL-17RB-M735 (bảng 15).

Bảng 17: Giá trị IC₅₀ của kháng thể kháng IL-17RA-M751

Mô tả kháng thể	IC ₅₀
kháng thể đơn dòng M751, thử nghiệm 1	4,03 ng/mL
kháng thể đơn dòng M751, thử nghiệm 2	2,79 ng/mL

Ví dụ 6

Ví dụ này chứng minh sự ức chế đáp ứng IL-25 *in vivo* bằng kháng thể kháng IL-17RA, M751, kháng thể này ức chế hoạt tính IL-25 trong thử nghiệm sinh học *in vitro*

(đã nêu trước đó). Chuột nhắt BALB/c được cho dùng albumin huyết thanh chuột (MSA; Sigma, 10 µg/mL) hoặc IL-25 của chuột nhắt (Amgen, TO; 10µg/mL) trong mũi, một lần một ngày trong bốn ngày. Vào các ngày 1-4, bốn giờ trước khi nhỏ MSA hoặc IL-25 vào trong mũi, chuột nhắt được tiêm trong màng bụng với 200 µg kháng thể kháng IL-17RA trung hòa (M751), kháng thể kháng IL-17A trung hòa (M210) hoặc kháng thể đối chứng isotyp (Fc của chuột; Amgen). Vào ngày 5, dịch rửa phế nang-phế quản (BALF) và mô phổi được thu lại và được phân tích như đã nêu trước đó. Các kết quả của hai thử nghiệm riêng biệt được thể hiện trong các bảng từ 18 đến 21 dưới đây.

Bảng 18: Phân tích số lượng tế bào, nồng độ IL-5 và IL-13 trong BALF ở chuột nhắt BALB/c được điều trị bằng IN IL-25 trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt của kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RA M751 của chuột nhắt – Thử nghiệm 1

Điều trị	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Limpho bào	Đại thực bào	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
Fc của chuột, MSA	38400 ± 16850	0	16000 ± 10828	2900 ± 4278	19500 ± 3482	31	62
M751, MSA	48000 ± 15320	0	21300 ± 9991	2900 ± 2748	23800 ± 7059	31	62
M210, MSA	44300 ± 16965	0	19600 ± 9443	3600 ± 3362	21100 ± 7805	31	62
Fc của chuột, IL-25	156400 ± 37662	18300 ± 7571	62600 ± 32190	15200 ± 3564	60300 ± 14025	200 ± 131	271 ± 291
M751, IL-25	28800 ± 16832	0	14800 ± 12122	600 ± 1342	13400 ± 5889	31	62
M210, IL-25	138900 ± 94677	25200 ± 15291	52100 ± 51574	16100 ± 8799	45500 ± 22453	303 ± 64	428 ± 112

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD)

Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-5 được gán giá trị là 31 pg/mL. Các mẫu dưới khoảng giá trị phát hiện của ELISA đối với IL-13 được gán giá trị là 62 pg/mL.

Bảng 19: Phân tích số lượng tế bào, nồng độ IL-5 và IL-13 trong BALF ở chuột nhắt BALB/c được điều trị bằng IN IL-25 trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt của kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RA M751 của chuột nhắt – Thử nghiệm 2

Điều trị	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Limpho bào	Đại thực bào	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
Fc của chuột, MSA	68800 ± 18527	1300 ± 1600	12900 ± 4789	2800 ± 3428	51800 ± 14176	57 ± 3	82 ± 9
M751, MSA	40600 ± 26640	0	14400 ± 18372	1500 ± 3000	24700 ± 7406	96 ± 30	117 ± 56
M210, MSA	37200 ± 15455	700 ± 1400	7300 ± 1860	2000 ± 1643	27200 ± 13588	83 ± 36	119 ± 47
Fc của chuột, IL-25	235900 ± 76855	23800 ± 12476	119500 ± 61007	16600 ± 4872	76000 ± 11811	290 ± 123	298 ± 127
M751, IL-25	38100 ± 11778	0	5200 ± 3295	3200 ± 2993	29700 ± 8755	58 ± 17	122 ± 40
M210, IL-25	99500 ± 41105	16700 ± 8121	26900 ± 18169	10100 ± 3916	45800 ± 16067	281 ± 104	233 ± 87

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD)

Bảng 20: Phân tích mARN của IL-13, IL-5, IL-17RB, eotaxin và MCP-1 ở mô phổi từ chuột nhắt được kích thích IN IL-25 trong điều kiện không có mặt hoặc có mặt kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RA M751 của chuột nhắt – Thử nghiệm 1

	IL-13	IL-5	IL-17RB	Exotaxin	MCP-1
muFc, MSA,	1,518e-04 ± 2,387e-05	2,893e-04 ± 4,011e-05	9,885e-04 ± 6,524e-05	9,488e-03 ± 1,219e-03	5,430e-03 ± 1,798e-03
M751, MSA,	1,478e-02 ± 2,354e-02	2,286e-03 ± 3,47e-03	4,241e-03 ± 5,528e-03	3,937e-02 ± 5,416e-02	8,210e-03 ± 7,656e-03
M210, MSA,	1,320e-04 ± 2,501e-05	2,895e-04 ± 1,507e-05	1,109e-03 ± 1,209e-04	8,155e-03 ± 1,668e-04	3,178e-03 ± 5,785e-04
muFc, IL-25,	3,845e-02 ± 1,147e-02	6,348e-03 ± 1,959e-03	1,570e-02 ± 3,551e-03	1,638e-01 ± 1,281e-02	1,534e-02 ± 4,643e-03
M751, IL-25,	7,518e-05 ± 1,225e-05	2,165e-04 ± 2,145e-05	1,330e-03 ± 1,869e-04	6,430e-03 ± 2,422e-03	2,983e-03 ± 3,795e-04
M210, IL-25,	1,100e-01 ± 2,483e-02	1,123e-02 ± 3,066e-03	2,063e-02 ± 8,663e-03	2,108e-01 ± 1,601e-02	1,468e-02 ± 1,734e-03

N= 4; các giá trị được thể hiện là sự biểu hiện gen tương đối so với GAPDH (2E-ΔCt) (giá trị trung bình ± SD);

Bảng 21: Phân tích mARN của IL-13, IL-5, IL-17RB, eotaxin và MCP-1 ở mô phổi từ chuột nhắt được kích thích IN IL-25 trong điều kiện không có mặt hoặc có mặt kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RA M751 của chuột nhắt – Thử nghiệm 2

	IL-13	IL-5	IL-17RB	Eotaxin	MCP-1
muFc, MSA,	1,420e-04 ± 5,510e-05	2,173e-04 ± 3,291e-05	N/D	6,673e-03 ± 7,293e-05	1,715e-03 ± 2,458e-04
M751, MSA,	2,205e-04 ± 1,286e-04	2,465e-04 ± 5,150e-05	N/D	7,040e-03 ± 7,584e-04	1,703e-03 ± 4,502e-04
M210, MSA,	1,073e-04 ± 1,891e-05	2,583e-04 ± 4,472e-05	N/D	8,983e-03 ± 8,737e-04	2,185e-03 ± 4,961e-04
MuFc, IL-25,	1,749e-01 ± 7,166e-02	90993e-03 ± 3,952e-03	N/D	1,953e-01 ± 7,327e-03	1,509e-02 ± 5,096e-03
M751, IL-25,	4,120e-04 ± 1,738e-04	3,755e-04 ± 1,014e-04	N/D	7,440e-03 ± 7,159e-04	2,130e-03 ± 2,238e-04
M210, IL-25,	1,412e-01 ± 4,586e-02	7,845e-03 ± 1,617e-03	N/D	2,348e-01 ± 5,629e-02	6,760e-03 ± 6,823e-04

N= 4; các giá trị được thể hiện là sự biểu hiện gen tương đối so với GAPDH (2E-ΔCt) (giá trị trung bình ± SD); N/D = không được xác định

Việc điều trị bằng kháng thể đơn dòng kháng IL-17RA M751 ức chế số lượng tế bào trong BALF gây ra bởi IL-25, cũng như nồng độ IL-5 và IL-13 trong BALF và sự kích thích phiên mã ở phổi gây ra bởi IL-25. Ngược lại, việc điều trị bằng kháng thể đơn dòng kháng IL-17A M210 không gây ảnh hưởng đáng kể đối với số lượng tế bào trong BALF gây ra bởi IL-25 (mặc dù các dữ liệu cho thấy các tác dụng có thể có của kháng thể này đối với lượng bạch cầu trung tính trong BALF gây ra bởi IL-25). Các dữ liệu này, cùng với các dữ liệu đã nêu trước đó ở chuột nhắt IL-17RA KO, cho thấy rằng IL-17RA cần thiết cho số lượng tế bào trong BALF gây ra bởi IL-25 và sự tăng nồng độ IL-5 và IL-13. Các tác dụng *in vivo* của IL-25 dường như không được điều tiết thông qua IL-17A, ngoại trừ sự bổ sung bạch cầu trung tính gây ra bởi IL-25, như được thể hiện bởi việc điều trị bằng kháng thể kháng IL-17A làm giảm đáng kể dòng chảy bạch cầu trung tính vào trong BALF gây ra bởi IL-25.

Ví dụ 7

Ví dụ này minh họa sự gây ra chứng tăng cảm đường hô hấp (AHR) bởi IL-25 và các tác dụng của kháng thể kháng IL-17RA-M751 và kháng thể kháng IL-17A-M210 đối với chúng. Chuột nhắt BALB/c được cho dùng MSA hoặc IL-25 của chuột nhắt trong mũi hằng ngày, trong khoảng thời gian bốn ngày, về cơ bản như được mô tả

trước đó. Vào ngày 5, chứng tăng cảm đường hô hấp (AHR) đáp ứng kích thích metacholin (MCh) được xác định trước tiên theo cách không xâm lấn ở chuột nhắt tỉnh táo, không bị kiểm soát bằng máy ghi thể tích toàn cơ thể (Buxco Electronics, Troy, NY). Thông số PENH (enhanced pause) được xác định dựa vào dạng sóng áp suất trong hộp máy ghi thể tích đáp ứng lại sự tăng nồng độ kích thích MCh, và được ghi lại dưới dạng phần trăm thay đổi so với kết quả đọc nền cơ sở được thực hiện trước khi cho tiếp xúc với MChS. PC200 là nồng độ MCh cần thiết để gây ra 200% PENH trên nền cơ sở, và được nêu trong các bảng 22 và 23 dưới đây.

Bảng 22: AHR đáp ứng kích thích MCh của chuột nhắt BALB/c được điều trị bằng IN IL-25 trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RA hoặc IL-17A của chuột nhắt

Điều trị	PC200, MCh, mg/mL
muFc, MSA	19,3 ± 5,3
M751, MSA	20,7 ± 7,6
M210, MSA	25,8 ± 10,6
muFc, IL-25	4 ± 4,7
M751, IL-25	15,9 ± 1,5
M210, IL-25,	2 ± 2,2

N= 5/nhóm; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD)

Bảng 23: AHR đáp ứng kích thích metacholin của chuột nhắt BALB/c được điều trị bằng IN IL-25 trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt của kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RA M751 của chuột nhắt

Điều trị	PC200, MCh, mg/mL
muFc, MSA	12,5 ± 2,6
M751, MSA	17,5 ± 3,4
M210, MSA	21,5 ± 3,4
MuFc, IL-25	4,3 ± 0,5
M751, IL-25	9,0 ± 1,7
M210, IL-25	5,3 ± 1,3

N=4/nhóm; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD)

Chứng tăng cảm đường hô hấp cũng được xác định ở chuột nhắt được gây mê và được thông khí bằng phương pháp cơ học được cho dùng liều IL-25 trong mũi và được điều trị bằng kháng thể kháng IL-17RA-M751. Chuột nhắt BALB/c được cho

dùng MSA hoặc IL-25 của chuột nhắt trong mũi hằng ngày, trong khoảng thời gian bốn ngày, về cơ bản như được mô tả trước đó. Vào ngày 5, chuột nhắt được làm giảm đau bằng xylazin hydroclorua (20 mg/kg, trong màng bụng), và được gây mê bằng natri pentobarbital (100 mg/kg, trong màng bụng). Thông kim kim loại vào khí quản, và kết nối chuột nhắt với thiết bị thông khí cho động vật nhỏ (flexiVent, SCIREQ: Scientific Respiratory Equipment, Montreal, Canada). Mỗi chuột nhắt được thông khí bằng nhịp hít khí hình sin và nhịp thở bị động với tốc độ là 150 lần thở/phút và biên độ là 10 mL/kg trọng lượng của chuột nhắt. Áp suất thở dương tại thời điểm cuối (PEEP) là 3,0 cmH₂O được tạo ra bằng cách kết nối chuột nhắt với cột nước.

Sau khi chuột nhắt được thông khí trong một phút, phổi được mở rộng hai lần tới tổng dung tích phổi (TLC, biên độ áp suất là 30 cmH₂O). Sol khí nước muối hoặc nồng độ axetyl-beta-metylcholin tăng (MCh, Sigma-Aldrich) được đưa vào phổi trong 15 giây, tiếp đó là 15 giây thông khí. Sau khi phun sol khí và thông khí, dao động phát động bởi thể tích (VD) 2,5 Hz được áp lên cửa đường hô hấp. Mỗi lần dao động 10-2,5 Hz VD có biên độ 0,20 mL và kéo dài 1,25 giây. Trước khi dùng liều MCh tiếp theo, phổi được mở rộng hai lần tới TLC. Các phép đo áp suất và thể tích theo thời gian trong hệ hô hấp được ghi lại bằng thiết bị thông khí cho động vật nhỏ, và khả năng đề kháng (R) của hệ hô hấp được tính bằng cách hiệu chỉnh dữ liệu với mô hình hệ hô hấp một buồng trong đó $P_{tr} = RV + EV + P_O$ (P_{tr} = áp suất khí quản, V = thể tích/thời gian, E = hệ số đàn hồi phổi=áp suất/thể tích, V = thể tích, P_O = áp suất nền cơ sở). Khả năng đề kháng của phổi được xác định ở các nồng độ MCh khác nhau được thể hiện trong Fig. 2.

Các kết quả này chứng minh rằng, ngoài việc ức chế hoạt tính IL-25 *in vitro* cũng như số lượng tế bào trong BALF và nồng độ IL-5 và IL-13 tăng gây ra bởi IL-25 *in vivo*, M751 còn ức chế AHR gây ra bởi IL-25, cho thấy rằng kháng thể mà liên kết IL-17RA và ức chế hoạt tính của IL-25 sẽ hữu dụng trong điều trị hoặc làm thuyên giảm các tình trạng bệnh được điều tiết bởi IL-25 mà có liên quan đến AHR.

Ví dụ 8

Ví dụ này chứng minh sự ức chế đáp ứng IL-25 *in vivo* bằng kháng thể kháng IL-17RB (M735) hoặc kháng thể kháng IL-25 (M819), cả hai kháng thể này ức chế hoạt tính IL-25 trong thử nghiệm sinh học *in vitro* (nêu trên). Chuột nhắt BALB/c được cho

dùng PBS hoặc IL-25 của chuột nhắt trong mũi, và được tiêm trong màng bụng với 250 μ g kháng thể trung hòa kháng IL-17RB của chuột nhắt ở chuột nhắt (M735), kháng thể trung hòa kháng IL-25 của chuột nhắt ở chuột Rattus (M819), kháng thể đối chứng IgG1 của chuột không có liên quan (muIgG1; Amgen), protein Fc của chuột (muFc; Amgen), hoặc IgG toàn bộ của chuột Rattus (Pierce, Rockford IL). Vào ngày 5, thu dịch rửa phế nang-phế quản (BALF) và phân tích như đã nêu trước đó. Thực hiện các thử nghiệm lặp lại riêng biệt; trong thử nghiệm thứ hai, không xác định nồng độ protein IL-5 và IL-13 trong BALF. Các kết quả được thể hiện trong các bảng 24 - 26 dưới đây.

Bảng 24: Phân tích số lượng tế bào, nồng độ IL-5 và nồng độ IL-13 trong BALF từ chuột nhắt được kích thích IN IL-25 trong điều kiện không có mặt hoặc có mặt kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RB (M735)

Điều trị	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Limpho bào	Đại thực bào	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
PBS	57300 $\pm$ 61940	600 $\pm$ 1200	21000 $\pm$ 34625	3100 $\pm$ 6200	32600 $\pm$ 23484	543 $\pm$ 155	79 $\pm$ 21
MuIgG1, IL-25	187300 $\pm$ 96994	28300 $\pm$ 13492	84100 $\pm$ 54232	16600 $\pm$ 8157	58300 $\pm$ 23770	2680 $\pm$ 792	754 $\pm$ 501
M735, IL-25	63500 $\pm$ 16646	5700 $\pm$ 6063	17100 $\pm$ 5633	8600 $\pm$ 4127	32100 $\pm$ 8404	909 $\pm$ 433	82 $\pm$ 22

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình $\pm$ SD)

Bảng 25: Phân tích số lượng tế bào, nồng độ IL-5 và nồng độ IL-13 trong BALF từ chuột nhắt được kích thích IN IL-25 trong điều kiện không có mặt hoặc có mặt kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RB (M735) hoặc kháng thể phong bế tương ứng với IL-25 (M819)

Điều trị	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Limpho bào	Đại thực bào
PBS	80400 $\pm$ 13488	0 $\pm$ 0	17000 $\pm$ 7503	5400 $\pm$ 1364	58000 $\pm$ 7893
muFc, IL-25	277400 $\pm$ 38077	10400 $\pm$ 1363	106200 $\pm$ 14981	29000 $\pm$ 2768	106200 $\pm$ 14981
M735, IL-25	50800 $\pm$ 8720	0 $\pm$ 0	10400 $\pm$ 3501	4000 $\pm$ 1673	50800 $\pm$ 8720
rIgG, IL-25	144000 $\pm$ 43192	5400 $\pm$ 2293	53600 $\pm$ 24669	20600 $\pm$ 4297	64400 $\pm$ 16157

M819, IL-25	99250 ± 29122	20600 ± 4261	79000 ± 67941	23400 ± 9277	51260 ± 13668
----------------	------------------	-----------------	------------------	-----------------	------------------

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD)

Bảng 26: Phân tích số lượng tế bào trong BALF, nồng độ IL-5 và nồng độ IL-13 từ chuột nhắt được kích thích IN IL-25 trong điều kiện không có mặt hoặc có mặt kháng thể phong bế tương ứng với IL-17RB (M735) hoặc kháng thể phong bế tương ứng với IL-25 (M819)

Điều trị	Số lượng tế bào	Bạch cầu ưa eosin	Bạch cầu trung tính	Limpho bào	Đại thực bào	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
PBS	101300 ± 30899	8400 ± 1145	85900 ± 13106	200 ± 200	6800 ± 3887	68 ± 24	90 ± 28
muIgG1, IL-25	769400 ± 258902	616300 ± 237391	50200 ± 10755	65800 ± 25649	37100 ± 10105	230 ± 33	598 ± 68
M735, IL-25	29800 ± 3774	1800 ± 1114	23300 ± 2931	900 ± 458	3800 ± 1007	94 ± 16	303 ± 125
rIgG, IL-25	575700 ± 180123	428200 ± 143432	48900 ± 10656	61300 ± 18219	37300 ± 13338	230 ± 33	598 ± 68
M819, IL-25	321400 ± 14445	231800 ± 109952	30900 ± 11884	31400 ± 15182	27300 ± 10100	121 ± 50	476 ± 220

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình ± SD)

Ví dụ 9

Ví dụ này minh họa sự gây ra phản ứng tăng cảm đường hô hấp (AHR) bởi IL-25 và các tác động của kháng thể kháng IL-17RB (M735) hoặc kháng thể kháng IL-25 (M819) đối với chúng. Dãy thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được nêu trước đó; AHR được xác định theo cách không xâm lấn ở chuột nhắt tỉnh táo, không bị kiểm soát bằng máy ghi thể tích toàn cơ thể. Các kết quả của ba thử nghiệm riêng biệt được thể hiện trong các bảng 27 – 29 dưới đây.

Bảng 27: Các giá trị AHR từ chuột nhắt được kích thích IN IL-25 trong điều kiện không có mặt hoặc có mặt kháng thể phong bế tương ứng với kháng thể kháng IL-17RB (M735)

Điều trị	PC200, MCh, mg/mL
PBS	37,6 ± 15

muIgG1, IL-25	$5,5 \pm 3,2$
M735, IL-25,	$16,5 \pm 5,7$

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình $\pm$ SD)

Bảng 28: Các giá trị AHR từ chuột nhắt được kích thích IN IL-25 trong điều kiện không có mặt hoặc có mặt kháng thể phong bế tương ứng với kháng thể kháng IL-17RB (M735) hoặc kháng thể phong bế tương ứng với IL-25 (M819)

Điều trị	PC200, MCh, mg/mL
PBS	42 ± 13
muFc, IL-25	$0,5 \pm 0,8$
M735, IL-25	$19,7 \pm 6,2$
rIgG, IL-25	$6,1 \pm 4,3$
M819, IL-25	$18,4 \pm 2,8$

N= 5; các giá trị được thể hiện là (giá trị trung bình $\pm$ SD)

Bảng 29: Các giá trị AHR từ chuột nhắt được kích thích IN IL-25 trong điều kiện không có mặt hoặc có mặt kháng thể phong bế tương ứng với kháng thể kháng IL-17RB (M735) hoặc kháng thể phong bế tương ứng với IL-25 (M819)

Điều trị	PC200, MCh, mg/mL
PBS	$29,9 \pm 3,3$
muIgG1, IL-25	$6,38 \pm 1,2$
M735, IL-25	$16,8 \pm 1,6$
rIgG, IL-25	$10,9 \pm 1,2$
M819, IL-25	$15,6 \pm 1,9$

Các kết quả này cho thấy rằng IL-25 làm tăng AHR, tác dụng này có thể được làm dịu bằng kháng thể kháng IL-17RB hoặc kháng thể kháng IL-25.

Ví dụ 10

Ví dụ này cung cấp xác nhận mô học rằng các đáp ứng IL-25 *in vivo* bị phong bế bởi việc điều trị bằng kháng thể kháng IL-17RB (M735), kháng thể kháng IL-25 (M819) hoặc kháng thể kháng IL-17RA (M751). Chuột nhắt BALB/c được cho dùng PBS hoặc IL-25 của chuột nhắt trong mũi, và được tiêm trong màng bụng với 200 μ g kháng thể kháng IL-17RB trung hòa (M735), 200 μ g kháng thể kháng IL-25 trung hòa (M819), 200 μ g kháng thể kháng IL-17RA trung hòa (M751), 200 μ g kháng thể kháng

IL17A trung hòa (M210) hoặc kháng thể đối chứng isotyp về cơ bản như được mô tả trước đó. Chuột nhắt bị gây chết vào ngày nghiên cứu 5 bằng cách gây ngạt CO₂. Phổi được thu nhận, được giữ cố định, được xử lý, được cắt lát, được nhuộm và được đánh giá như đã nêu. Tổng kết các kết quả mô bệnh học được thể hiện trong bảng 30 dưới đây.

Bảng 30: Phân tích mô học bệnh viêm mô phổi và chứng tăng sản tế bào dạng chén ở chuột nhắt được kích thích bằng IN IL-25 và được điều trị bằng kháng thể kháng IL-17RA, kháng thể kháng IL-17A, kháng thể kháng IL-25, kháng thể kháng IL-17RB hoặc đối chứng

	IL-25 + M751	IL-25 + M210	IL-25 + M819	IL-25 + M735	IL-25 + muFc	MSA + muFc
Chứng tăng sản tế bào dạng chén	0	2,0 ± 1	0	0,2 ± 0,4	2,0 ± 1,4	0,0
Quanh phế quản bệnh viêm	0	1,0 ± 1,0	0	0,0	1,8 ± 0,4	0,0
Bệnh viêm phế quản-phổi	1,0 ± 0,7	1,8 ± 0,4	1,0 ± 1,0	0,8 ± 0,8	2,0 ± 0	1,4 ± 0,5
Bệnh viêm mạch/quanh mạch phổi	0	2,0 ± 0	0,4 ± 0,5	0,8 ± 0,4	1,8 ± 0,4	0,4 ± 0,5
Tổng điểm số	1,0 ± 0,7	6,8 ± 1,3	1,4 ± 1,1	1,8 ± 1,5	7,6 ± 2,2	1,8 ± 0,8

N=5/nhóm; điểm số trung bình được trình bày ± SD.

Chuột nhắt được kích thích bằng IL-25 và được điều trị bằng đối chứng isotyp bị các thương tổn sâu sắc nhất và điểm số trung bình là $7,6 \pm 2,2$ so với chuột nhắt được kích thích bằng MSA và được điều trị bằng đối chứng isotyp có điểm số trung bình là $1,8 \pm 0,8$. Việc điều trị chuột nhắt bằng kháng thể kháng IL-17A về cơ bản không có tác dụng đối với các thương tổn phổi, như được thể hiện bởi điểm số trung bình là $6,8 \pm 1,3$. Ngược lại, việc điều trị bằng kháng thể kháng IL-17RA (điểm số là $1,0 \pm 0,7$), kháng thể kháng IL-25 (điểm số là $1,4 \pm 1,1$) hoặc kháng thể kháng IL-17RB (điểm số là $1,8 \pm 1,5$) đều có hiệu quả ức chế bệnh viêm gây ra bởi IL-25 đến mức nền, cho thấy rằng sự phong bế IL-25 hoặc một trong số các protein tham gia vào phức hợp thụ thể là các cách điều trị có hiệu quả như nhau.

Ví dụ 11

Ví dụ này chứng minh sự kết hợp giữa IL-17RA và IL-17RB. Dây kết tua miễn dịch được thực hiện bằng cách sử dụng các miền ngoại bào của IL-17RA của người và IL-17RB của người được dung hợp với vùng Fc của IgG của người (R&D Systems, Minneapolis, MN) hoặc với thẻ gắn polyhistidin (Amgen). 50 μ L huyền phù đặc Protein G được bổ sung vào ống Eppendorf, được rửa bằng nước muối được đệm phosphat (PBS), và được ủ với 2 μ g protein IL-17RA.Fc hoặc IL-17RB.Fc trong một giờ ở 4°C trong điều kiện quay. Vào cuối quá trình ủ, 2 μ g protein thụ thể tan thuận nghịch (tức là, IL-17RA-HIS được bổ sung vào IL-17RB.Fc và IL-17RB-HIS được bổ sung vào IL-17RA.Fc) được bổ sung và nồng độ cuối cùng này được ủ qua đêm ở 4°C trong điều kiện quay.

Sáng hôm sau, các ống được ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 1 phút, và các hạt protein G được rửa bằng PBS, sau đó bằng đệm RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis MO). Các hạt này được tái tạo huyền phù trong 60 μ L đệm mẫu 2x Tris-Glyxin SDS (Invitrogen, Carlsbad CA) với beta-mercaptoetanol 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA) và được bảo quản trên nước đá hoặc ở -20°C. Các mẫu được phân tích trên mini gel acrylamit loại 10 giếng chứa Tris-Glyxin 4-20% (Novex ®-Invitrogen, Carlsbad CA) và được chuyển sang màng nitroxenluloza (Invitrogen, Carlsbad CA). Màng được phong bế bằng cách sử dụng đệm phong bế Odyssey®, là đệm phong bế thẩm tách Western được tối ưu hóa cho các thử nghiệm hồng ngoại (Li-cor® Biosciences, Lincoln, NE) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ hoặc qua đêm ở 4°C trong điều kiện lắc rung nhẹ. Sau đó, màng được ủ với kháng thể sơ cấp được pha loãng từ 1:1000 đến 1:5000 trong đệm phong bế Odyssey® có chứa Tween-20 0,1% trong 60 phút ở 4°C trong điều kiện lắc nhẹ. Màng được rửa 4 lần trong PBS + Tween-20 0,1%, và sau đó được ủ trong kháng thể thứ cấp được pha loãng 1:10000 trong đệm phong bế Odyssey® có chứa Tween-20 0,1% trong 60 phút ở 4°C trong điều kiện lắc nhẹ. Màng được rửa 4 lần trong PBS + Tween-20 0,1% và protein được làm hiển thị bằng cách sử dụng hệ thống hiển thị hình ảnh hồng ngoại Li-Cor® Odyssey®. Các kháng thể sau đây được sử dụng:

Kháng thể sơ cấp:	Kháng thể thứ cấp:
Kháng thể đa dòng kháng hIL-17RA ở dê đã được tinh chế dựa vào ái lực (R&D Systems, Minneapolis, MN)	IgG kháng dê ở lừa IRDye® 800CW (H + L), hấp thụ cao (Li-Cor® Biosciences, Lincoln, NE; IRDye® Infrared dyes: US06027709)

Kháng thể đa dòng kháng hIL-17RB ở dê đã được tinh chế dựa vào ái lực (R&D Systems, Minneapolis, MN)	Kháng thể đơn dòng His•Tag® (kháng thể đơn dòng ở chuột nhắt (IgG ₁) có tính kháng trình tự His•Tag; Novagen, EMD Chemicals, Inc., San Diego, CA)
Kháng thể đa dòng kháng hIL-17RC ở dê đã được tinh chế dựa vào ái lực (R&D Systems, Minneapolis, MN)	
IgG kháng chuột nhắt ở thỏ Alexa Fluor® 680 (H+L) (Invitrogen, Carlsbad, CA; Alexa Fluor680: Berlier JE et al., J Histochem Cytochem 51, 1699-712 (2003))	

Kết quả thẩm tách đại diện được thể hiện trong Fig. 2. Trong một số thử nghiệm, IL-17RB.Fc có thể làm kết tủa miễn dịch IL-17RA.HIS. Trong hệ thử nghiệm này, IL-17RA.Fc cũng có thể làm kết tủa miễn dịch IL-17RC.HIS, chứng minh rằng hệ này có thể tái tạo các tương tác hóa sinh giữa các protein đã được chứng minh trước đó trong các hệ khác (Toy, D. et al, JI, 2006, 177: 36). Cả IL-17RA.Fc và IL-17RB.Fc đều không thể làm kết tủa miễn dịch IL-17RD.HIS (R&D Systems, Minneapolis, MN), cho thấy rằng tương tác giữa IL-17RA và IL-17RB là duy nhất đối với các protein này và không phải là vốn có đối với tất cả các thành viên của họ IL-17R. Đây là mô tả đầu tiên về tương tác hóa sinh giữa IL-17RA và IL-17RB.

Ví dụ 12

Tiến hành phát triển kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người có tính kháng IL-17RA của người bằng cách sử dụng công nghệ XenoMouse® của Abgenix (hiện nay là Amgen Fremont Inc.) (US 6,114,598; 6,162,963; 6,833,268; 7,049,426; 7,064,244; Green et al, 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Green and Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188:483-495)), như được nêu trong USSN 11/906,094. Như được nêu theo sáng chế, các kháng thể kháng IL-17RA hoàn toàn của người được sàng lọc về khả năng ức chế IL-17A của người liên kết với IL-17RA của người (và với IL-17RA của khỉ Cynomolgus) của chúng. Nhóm gồm các kháng thể được nhận diện và được chọn để tiếp tục nhân giống và phân tích; trình tự axit amin của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng biến đổi được thể hiện trong danh mục trình tự, và bảng tổng kết các trình tự khác nhau được thể hiện dưới đây. Một kháng thể, 3.454.1, thể hiện bằng chứng về hai biến thể của chuỗi nhẹ biến đổi.

Bảng 31: Tổng kết các kháng thể kháng huIL-17A

Số nhận diện	SEQ ID NO:	Mô tả	SEQ ID NO:	Mô tả
2.133.1	SEQ ID NO:1	AM _H 1 Vh	SEQ ID NO:27	AM _L 1 V1
1.98.1	SEQ ID NO:2	AM _H 2 Vh	SEQ ID NO:28	AM _L 2 V1
1.235.1	SEQ ID NO:3	AM _H 3 Vh	SEQ ID NO:29	AM _L 3 V1
1.185.1	SEQ ID NO:4	AM _H 4 Vh	SEQ ID NO:30	AM _L 4 V1
1.166.1	SEQ ID NO:5	AM _H 5 Vh	SEQ ID NO:31	AM _L 5 V1
2.98.1	SEQ ID NO:6	AM _H 6 Vh	SEQ ID NO:32	AM _L 6 V1
2.67.1	SEQ ID NO:7	AM _H 7 Vh	SEQ ID NO:33	AM _L 7 V1
2.46.1	SEQ ID NO:8	AM _H 8 Vh	SEQ ID NO:34	AM _L 8 V1
2.225.1	SEQ ID NO:9	AM _H 9 Vh	SEQ ID NO:35	AM _L 9 V1
2.159.1	SEQ ID NO:10	AM _H 10 Vh	SEQ ID NO:36	AM _L 10 V1
1.124.1	SEQ ID NO:11	AM _H 11 Vh	SEQ ID NO:37	AM _L 11 V1
4.357.1	SEQ ID NO:12	AM _H 12 Vh	SEQ ID NO:38	AM _L 12 V1
4.180.1	SEQ ID NO:13	AM _H 13 Vh	SEQ ID NO:39	AM _L 13 V1
3.1404.1	SEQ ID NO:14	AM _H 14 Vh	SEQ ID NO:40	AM _L 14 V1
3.1338.1	SEQ ID NO:15	AM _H 15 Vh	SEQ ID NO:41	AM _L 15 V1
4.393.1	SEQ ID NO:16	AM _H 16 Vh	SEQ ID NO:42	AM _L 16 V1
4.361.1	SEQ ID NO:17	AM _H 17 Vh	SEQ ID NO:43	AM _L 17 V1
4.224.1	SEQ ID NO:18	AM _H 18 Vh	SEQ ID NO:44	AM _L 18 V1
4.16.1	SEQ ID NO:19	AM _H 19 Vh	SEQ ID NO:45	AM _L 19 V1
3.211.1	SEQ ID NO:20	AM _H 20 Vh	SEQ ID NO:46	AM _L 20 V1
3.1545.1	SEQ ID NO:21	AM _H 21 Vh	SEQ ID NO:47	AM _L 21 V1
3.381.1.1	SEQ ID NO:22	AM _H 22 Vh	SEQ ID NO:48	AM _L 22 V1
3.454.1	SEQ ID NO:23	AM _H 23 Vh	SEQ ID NO:49	AM _L 23 V1 v 1
			SEQ ID NO:50	AM _L 23 V1 v 2
3.454.1.1	SEQ ID NO:24	AM _H 24 Vh	SEQ ID NO:51	AM _L 24 V1
3.891.1	SEQ ID NO:25	AM _H 25 Vh	SEQ ID NO:52	AM _L 25 V1
2.23.1	SEQ ID NO:26	AM _H 26 Vh	SEQ ID NO:53	AM _L 26 V1

Các kháng thể tiếp tục được mô tả về khả năng ức chế hoạt tính sinh học IL-17A và/hoặc IL-17F của chúng, và các miền của IL-17RA là quan trọng đối với việc liên kết kháng thể.

Thử nghiệm tiết xytokin/chemokin gây ra bởi IL-17A/IL-17F

Thử nghiệm này sử dụng dòng tế bào nguyên bào sợi bao quy đầu của người (HFF). Các kháng thể kháng IL-17RA được ủ với các tế bào HFF (5000 tế bào/giếng

trong đĩa loại 96 giếng) trong 30 phút ở 36°C; các giếng cấy sau đó được kích thích qua đêm bằng IL-17A (5 ng/mL) riêng lẻ hoặc bằng IL-17F (20 ng/mL) và TNF-alpha (5 ng/mL). Dịch nổi bề mặt của giếng cấy nguyên bào sợi được phân tích bằng kỹ thuật ELISA về sự có mặt của IL-6 hoặc GRO-alpha. Các kháng thể có thể ức chế hoạt tính sinh học của IL-17A và của IL-17F như được thể hiện bởi sự giảm lượng IL-6 và/hoặc GRO-alpha được tạo ra trong thử nghiệm này.

Thử nghiệm cạnh tranh chéo

Các nghiên cứu cạnh tranh chéo được thực hiện để xác định các đặc tính liên kết IL-17RA của một số kháng thể nhất định, như được nêu trong USSN 11/906,094. Dạng cải biên của phương pháp liên kết bội nêu bởi Jia và cộng sự được sử dụng (xem Jia, et al., J. Immun. Meth., 2004, 288:91-98), sử dụng phần mềm và máy trạm Bio-Plex (BioRad, Hercules, CA), cũng như chất phản ứng từ Luminex[®] Corp. (Austin, TX). Nhìn chung là thực hiện theo các quy trình cơ bản của nhà sản xuất. Các kháng thể được kiểm tra ở dạng kết hợp theo từng cặp; nếu hai kháng thể cạnh tranh chéo với nhau, chúng được nhóm hoặc “xếp khối” với nhau. Nói chung, các kháng thể được xếp vào các khối khác nhau thì liên kết với các phần khác nhau của IL-17RA và các kháng thể được xếp vào cùng (các) khối thì liên kết với các phần tương tự nhau của IL-17RA.

Đánh giá các phần quyết định kháng nguyên trung hòa: thể khảm Hu/Mu

Tiến hành các nghiên cứu để xác định nơi các chất đối kháng IL-17RA khác nhau (ở dạng kháng thể của người) liên kết với IL-17RA của người, sử dụng các IL-17RA dạng khảm của người/chuột nhất. Phương pháp này tận dụng ưu điểm về khả năng không tương tác chéo của các kháng thể IL-17RA khác nhau với IL-17RA của chuột nhất. Đối với mỗi thể khảm, một hoặc hai vùng của miền ngoại bào IL-17RA của người được thay thế bằng (các) vùng tương ứng của IL-17RA của chuột nhất. Sáu thể khảm vùng đơn và 8 thể khảm vùng đôi được tạo cấu trúc; phép phân tích bội sử dụng phần mềm và máy trạm Bio-Plex (BioRad, Hercules, CA) được thực hiện để xác định các phần quyết định kháng nguyên trung hòa trên IL-17RA của người bằng cách phân tích các kháng thể đơn dòng IL-17RA của người tiêu biểu mà liên kết khác biệt với dạng khảm so với các protein IL-17RA kiểu dại.

Đánh giá các phần quyết định kháng nguyên trung hòa: sàng lọc arginin

Tiến hành các nghiên cứu khác sử dụng các protein IL-17RA đột biến có các phần thể arginin tại các gốc axit amin chọn lọc của IL-17RA của người. Sàng lọc arginin là phương pháp đã được công nhận trong lĩnh vực để đánh giá nơi các kháng thể, hoặc các protein khác, liên kết với protein khác, xem, ví dụ, Nanevicz, T., et al., 1995, J. Biol. Chem., 270:37, 21619-21625 và Zupnick, A., et al., 2006, J. Biol. Chem., 281:29, 20464-20473. Thông thường, mạch bên arginin được tích điện dương và tương đối lớn so với các axit amin khác, có thể phá vỡ liên kết của kháng thể với vùng của kháng nguyên nơi đột biến được đưa vào. Sàng lọc arginin là phương pháp xác định liệu một gốc có phải là một phần của phần quyết định kháng nguyên trung hòa và/hoặc epitop hay không. 95 axit amin phân bố khắp miền ngoại bào IL-17RA của người được chọn để gây đột biến thành arginin. Việc chọn lọc thiên về các axit amin mang điện hoặc phân cực để tối đa hóa khả năng nằm trên bề mặt của gốc và làm giảm khả năng gây đột biến tạo ra protein gấp cuộn sai.

Bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực, các oligonucleotit có nghĩa và đối nghĩa chứa các gốc đột biến được thiết kế dựa vào các tiêu chuẩn nêu trong bộ kit quy trình Stratagene Quickchange® II (Stratagene/Agilent, Santa Clara, CA). Việc gây đột biến HuIL-17RA-Flag-pHis kiểu đại (WT) được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit Quickchange® II (Stratagene). Tất cả các cấu trúc dạng khảm được tạo cấu trúc để mã hóa cho thể gắn FLAG-histidin (sáu histidin) trên đầu carboxy của miền ngoại bào để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế thông qua thể gắn poly-His, phân tích Multiplex sử dụng phần mềm và máy trạm Bio-Plex (BioRad, Hercules, CA) được thực hiện để xác định các phần quyết định kháng nguyên trung hòa trên IL-17RA của người bằng cách phân tích một số kháng thể đơn dòng IL-17RA của người liên kết khác biệt với các thể đột biến arginin so với các protein IL-17RA kiểu đại.

Kết quả của các nghiên cứu này được tổng kết trong bảng 32 dưới đây.

Bảng 32: Tổng kết các tính chất của một số kháng thể IIL-17RA

Khối	Số nhận diện	Thể khảm Hu/Mu	Thể đột biến Arginin
1	4.224.2	F: 229-319	S220R, E226R, T228R, S236R, L270R, Q284R
2	2.133.1	B: 75-96 D: 176-197	D152R

3	3.381.1	C: 128-154 D: 176-197	D152R, D154R, E156R, D184R, E186R, S198R
	3.1404.1	D: 176-197	D152R, D154R, E156R, D184R, E186R, H297R
	4.16.1	D: 176-197	D152R, D154R, E156R, D184R, E186R
	3.454.1	B: 75-96 C: 128-154 D: 176-197	E97R, D152R, D154R, E156R, Q176R, D184R, E186R, S198R, T235R, H297R
4	2.23.1	F: 229-319	H138R, K166R, H215R, S220R, E226R, T228R, S236R, E241R, H243R, L270R
5	3.1545.1	D: 176-197	E113R, S115R, D152R, D154R, E156R, S177R, S198R
6	3.211.2	D: 176-197	D152R, D154R, E156R, S177R, L270R

Ví dụ 13

Ví dụ này mô tả thử nghiệm tái kích thích IL-25 hữu dụng để đánh giá tác dụng của chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB đối với hoạt tính sinh học của IL-25. Các tế bào đơn nhân máu ngoại biên (PBMC) của người được phân lập từ người cho bình thường và được kích thích trong 24 giờ ở 5×10^6 tế bào/mL trong điều kiện có mặt của lymphopoietin mô đờ tuyến ức (TSLP (Quentmeier et al., Leukemia. 2001 Aug;15(8):1286), 100 nanogram/mL; có thể mua được từ R&D Systems, Minneapolis, MN). PBMC sau đó được thu lại và được đưa vào các giếng cấy tái kích thích trong điều kiện có mặt của IL-2 (10 nanogram/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN) và IL-25 (10 nanogram/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN), trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt của chất cần kiểm tra hoạt tính ức chế. Các giếng cấy tái kích thích được chuẩn bị dưới dạng huyền phù tế bào đơn và được pha loãng đến 4×10^7 tế bào/mL; 100 μ L tế bào được bổ sung vào đĩa loại 48 giếng để có nồng độ cuối cùng là 4×10^6 tế bào/giếng. Sau ba ngày, dịch nổi bề mặt được thu lại và được kiểm tra về IL-5 bằng kỹ thuật ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Chất được kiểm tra bao gồm các dạng tan được của IL-17RB (đã nêu trước đó) và nhóm gồm kháng thể đa dòng và đơn dòng được tóm tắt dưới đây:

- MAB1771: MuIgG2b kháng HuIL-17RA (R&D Systems)
- MAB1207: MuIgG2b kháng HuIL-17RB (R&D Systems)
- AF177: IgG đa dòng kháng HuIL-17RA ở dê (R&D Systems)

- Một số HuIgG2 kháng HuIL-17RA hoàn toàn của người (đã nêu trong ví dụ 12)

Các kết quả kiểm tra các chất khác nhau trong một số thử nghiệm tái kích thích khác nhau sử dụng PBMC từ nhiều người cho khác nhau được thể hiện trong bảng 33 dưới đây.

Bảng 33: Sản xuất IL-5 từ PBMC của người được điều trị bằng TSLP kích thích bởi IL-2 + IL-25 trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt của các chất ức chế IL-17RB và IL-17RA khác nhau

Mô tả chất ức chế	(chất ức chế), μg/mL	(IL-5), pg/mL	% ức chế
Không	Không	$93,9 \pm 9,7$	0%
HuIL-17RB:Fc	10	$42,0 \pm 10,8$	55%
HuIL-17RB:HIS	10	$31,2 \pm 11,5$	67%
3.1404	10	$35,9 \pm 5,3$	62%
3.1404	1,0	$42,9 \pm 5,1$	54%
3.1404	0,1	$83,4 \pm 4,6$	12%
Không	Không	$576 \pm 6,8$	0%
HuIL-17RB:Fc	10	$72,7 \pm 3,8$	87%
MAB1771	10	$437,7 \pm 7,8$	24%
MAB1207	10	$499,4 \pm 6,3$	13%
AF177	10	$105,8 \pm 4,0$	82%
3.1404	10	$100,5 \pm 5,1$	83%
Không	Không	$191,6 \pm 4,9$	0%
HuIL-17RB:Fc	10	$24,5 \pm 4,2$	88%
MAB1771	10	$127,9 \pm 3,6$	33%
AF177	10	$26,0 \pm 4,0$	86%
3.1404	10	$19,2 \pm 3,4$	90%
4.16	10	$22,2 \pm 3,4$	88%
3.381	10	$0,0 \pm 0,0$	100%

Nhóm gồm các kháng thể của người mà liên kết với IL-17RA được kiểm tra, trong ba thử nghiệm tái kích thích riêng biệt sử dụng người cho PBMC khác nhau, vào các ngày khác nhau và với các chế phẩm kháng thể khác nhau. Các kết quả được thể hiện trong bảng 34 dưới đây.

Bảng 34: Sản xuất IL-5 từ PBMC của người được điều trị bằng TSLP kích thích bằng IL-2 + IL-25 trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể IL-17RA khác nhau

Kháng thể	Khối	% ức chế, thử nghiệm 1	% ức chế, thử nghiệm 2	% ức chế, thử nghiệm 3
3.1404	3	68%	76%	Không xác định
4.16	3	76%	77%	Không xác định
3.381	3	90%	75%	Không xác định
1.243.3	1	0%	43%	0%
1.185.1	1	0%	41%	9%
2.46.1	1	0%	6%	0%
2.67.1	1	0%	13%	3%
2.98.1	1	0%	79%	0%
2.159.2	1	0%	86%	0%
4.224.2	1	13%	86%	53%
2.133.1	2	0%	16%	28%
3.381.1	3	69%	82%	74%
3.454.2	3	75%	không xác định	70%
3.1404.1	3	77%	100%	69%
4.16.1	3	85%	không xác định	100%
4.357.1	3	0%	không xác định	11%
4.361.3	3	60%	không xác định	0%
4.393.1	3	28%	72%	45%
2.23.1	4	0%	không xác định	0%
3.1545.1	5	0%	43%	0%
3.211.2	6	0%	47%	7%
2.225.1	*	0%	không xác định	0%
4.180.3	*	0%	0%	0%

*Các kết quả phân tích liên kết đối với các kháng thể này không rõ ràng.

Cũng thu được các kết quả tương tự về cơ bản với các chế phẩm khác của các kháng thể này. Các kết quả cho thấy rằng một số kháng thể mà liên kết với IL-17RA và ức chế IL-17A cũng ức chế IL-25.

Ví dụ 14

Ví dụ này mô tả mô hình bệnh hen ở chuột nhắt. Chuột nhắt (ví dụ, BALB/c) được gây mẫn cảm bằng kháng nguyên (ví dụ, ovalbumin (OVA)) bằng cách tiêm

trong màng bụng kháng nguyên trong phèn hoặc chất phụ trợ khác. Một số quy trình gây mẫn cảm đã được biết đến trong lĩnh vực; một quy trình trong số đó là tiêm 10 μg OVA trong phèn ba lần với khoảng cách thời gian là một tuần (tức là, vào ngày -21, ngày -14 và ngày -7). Chuột nhắt sau đó được kích thích bằng kháng nguyên bằng cách tiếp xúc sol khí (OVA 5%) hoặc đưa vào trong mũi (0,1 mg OVA). Lịch trình kích thích có thể được chọn trong số các thời hạn ngắn hơn (tức là, kích thích hằng ngày vào các ngày 1, 2 và 3) hoặc thời hạn dài hơn (tức là, kích thích hằng tuần trong từ hai đến ba tuần). Các thông số cuối được xác định có thể bao gồm AHR, số lượng tế bào và hợp phần trong dịch BAL, mức xytokin trong hạch lympho phổi hút ra *in vitro*, mức IgE trong huyết thanh, và đánh giá mô bệnh học của mô phổi. Các mô hình bệnh hen ở động vật khác đã được biết đến, và bao gồm việc sử dụng các động vật khác (ví dụ, chuột nhắt C57BL/6), các quy trình gây mẫn cảm (ví dụ, tiêm chủng trong mũi, sử dụng các chất phụ trợ khác hoặc không sử dụng chất phụ trợ, v.v.) và/hoặc kháng nguyên (bao gồm peptit, như peptit có nguồn gốc từ OVA hoặc các kháng nguyên protein, chất chiết từ gián, chất chiết từ cây cúc bạc đồng cỏ hoặc các chất chiết khác như các chất chiết được sử dụng trong các quy trình khử mẫn cảm, v.v.). Tác dụng của kháng thể đối với IL-17RA, IL-17RB, IL-17 và IL-25 được đánh giá trong mô hình này, sử dụng nhóm chuột nhắt như được nêu dưới đây.

Chuột nhắt BALB/c cái được gây miễn dịch trong màng bụng bằng OVA trong phèn vào các ngày -21, -14 và -7 và được kích thích sol khí bằng OVA trong PBS vào các ngày 1-3. Chuột nhắt được tiêm trong tĩnh mạch với kháng thể vào ngày trước khi kích thích sol khí OVA (ngày -1) trong các thử nghiệm 1 và 2, hoặc trong màng bụng với kháng thể vào ngày kích thích sol khí OVA đầu tiên (ngày 1) 30 phút trước khi kích thích OVA trong thử nghiệm 3, hoặc được tiêm trong màng bụng với Dexametason (Dex), đối chứng dương, hoặc nước muối được đệm phosphat (PBS), đối chứng âm, 30 phút trước mỗi lần tiếp xúc sol khí với OVA (các ngày 1-3) trong thử nghiệm 1 và 3. Nhóm chỉ được mồi OVA có độ tuổi tương xứng được sử dụng để so sánh. Chứng tăng cảm đường hô hấp (AHR) đáp ứng kích thích MCh được xác định 48 giờ sau lần kích thích OVA cuối cùng. Chuột nhắt bị gây chết để thí nghiệm 72 giờ sau lần kích thích OVA cuối cùng, và huyết thanh, dịch BAL, hạch lympho phổi hút ra, và phổi được thu lại để phân tích. Thực hiện chuỗi ba thử nghiệm.

Thử nghiệm 1 bao gồm các nhóm điều trị sau:

- Nhóm 1, chuột nhắt đã được mồi nhưng chưa được kích thích, n=10
- Nhóm 2, PBS, trong màng bụng, n=10
- Nhóm 3, 1 mg/kg Dex, trong màng bụng, n=10
- Nhóm 4, 500 µg kháng thể đối chứng isotyp mIgG1, trong tĩnh mạch, n=10
- Nhóm 5, 500 µg kháng thể đơn dòng kháng IL-17RB M735, trong tĩnh mạch, n=10
- Nhóm 6, 500 µg kháng thể đơn dòng kháng mIL-17RA dạng khảm M751, trong tĩnh mạch, n=10
- Nhóm 7, 500 µg kháng thể đối chứng IgG của chuột Rattus, trong tĩnh mạch, n=10
- Nhóm 8, 500 µg kháng thể kháng mIL-25 M819, trong tĩnh mạch, n=10
- Nhóm 9, 500 µg kháng thể đơn dòng kháng mIL-17 M210, trong tĩnh mạch, n=10

Thử nghiệm 2 bao gồm các nhóm điều trị sau:

- Nhóm 1, chuột nhắt đã được mồi nhưng chưa được kích thích, n=10
- Nhóm 2, 500 µg kháng thể đối chứng isotyp mIgG1, trong tĩnh mạch, n=10
- Nhóm 3, 500 µg kháng thể đơn dòng kháng mIL-17RA dạng khảm M751, trong tĩnh mạch, n=10

Thử nghiệm 3 bao gồm các nhóm điều trị sau:

- Nhóm 1, chuột nhắt đã được mồi nhưng chưa được kích thích, n=10
- Nhóm 2, PBS, trong màng bụng, n=10
- Nhóm 3, Dex 1 mg/kg, trong màng bụng, n=10
- Nhóm 4, 500 µg kháng thể đối chứng isotyp mIgG1, trong màng bụng, n=10
- Nhóm 5, 500 µg kháng thể đơn dòng kháng IL-17RB M735, trong màng bụng, n=10
- Nhóm 6, 500 µg kháng thể đơn dòng kháng mIL-17RA dạng khảm M751, trong màng bụng, n=10
- Nhóm 7, 500 µg kháng thể đối chứng g IgG của chuột Rattus, trong màng bụng, n=10
- Nhóm 8, 500 µg kháng thể kháng mIL-25 M819, trong màng bụng, n=10

- Nhóm 9, 500 μg kháng thể đơn dòng kháng mIL-17 M210, trong màng bụng, n=10

- Nhóm 10, 500 μg kháng thể đơn dòng kháng mIL-17F M850, trong màng bụng, n=10

Các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 mà không kháng IL-17A làm giảm AHR trong mô hình bệnh hen OVA ở chuột nhắt; các kết quả được thể hiện trong các Fig. 1-3. Phần trăm thay đổi PENH trung bình so với nền cơ sở được nêu cho mỗi nhóm điều trị $\pm$ SE từ thử nghiệm 1 (Fig. 1). Chứng tăng cảm đường hô hấp được xác định về cơ bản như được mô tả trước đó trong ví dụ 7. Mức độ co phế quản được thể hiện dưới dạng phần trăm thay đổi PENH so với nền cơ sở. Việc điều trị bằng các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25, mà không kháng IL-17A, làm giảm AHR để đáp ứng lại kích thích MCh so với chuột nhắt được điều trị bằng PBS hoặc các kháng thể đối chứng (Fig. 3).

Khả năng đề kháng của phổi (R_L) để đáp ứng lại kích thích metacholin được xác định trong các thử nghiệm 2 và 3 ở chuột nhắt được thông khí bằng phương pháp cơ học. Các phép đo áp suất và thể tích theo thời gian trong hệ hô hấp được ghi lại bằng thiết bị thông khí cho động vật nhỏ, và khả năng đề kháng của hệ hô hấp ($R = \text{cmH}_2\text{O/mL}$) được tính bằng cách hiệu chỉnh dữ liệu với mô hình hệ hô hấp một buồng trong đó $P_{tr} = RV + EV + P_0$ (P_{tr} = áp suất khí quản, V = thể tích/thời gian, E = hệ số đàn hồi phổi = áp suất/thể tích, V = thể tích, P_0 = áp suất nền cơ sở). Diện tích dưới đường cong (AUC) của khả năng đề kháng (R) của đường hô hấp được tính bằng cách lấy tổng của tất cả các lần đo R đối với mỗi nồng độ của metacholin đối với mỗi chuột nhắt. Trong thử nghiệm 2, việc điều trị bằng kháng thể trung hòa tương ứng với IL-17RA làm giảm khả năng đề kháng của phổi đối với kích thích metacholin so với chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể đối chứng (Fig. 4a). Trong thử nghiệm 3, việc điều trị bằng các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 mà không kháng IL-17A làm giảm khả năng đề kháng của phổi đối với kích thích metacholin so với chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể đối chứng (Fig. 4b).

Tác dụng của kháng thể đối với hợp phần và số lượng tế bào trong BALF cũng được xác định; các kết quả được thể hiện trong các Fig. 5-7. Trong thử nghiệm 1, các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 mà không kháng IL-17A làm giảm đáng kể bạch cầu (Fig. 5a), bạch cầu ưa eosin (Fig. 5b) và limpho bào (Fig.

5d) trong BALF toàn phần so với việc điều trị bằng kháng thể đối chứng thích hợp trong mô hình bệnh hen OVA ở chuột nhắt này. Các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB hoặc IL-17RA mà không kháng IL-17A làm giảm đáng kể bạch cầu trung tính (Fig. 5c) trong BALF toàn phần. Kháng thể trung hòa kháng IL-25 làm giảm bạch cầu trung tính trong BALF toàn phần nhưng điều này không đáng kể (Fig. 5c).

Trong thử nghiệm 2, các kháng thể trung hòa kháng IL-25, IL-17RB và IL-17RA làm giảm đáng kể bạch cầu (Fig. 6a), bạch cầu ưa eosin (Fig. 6b) và limpho bào (Fig. 6d) trong BALF toàn phần so với việc điều trị bằng kháng thể đối chứng thích hợp trong mô hình bệnh hen OVA ở chuột nhắt này. Các kháng thể này không có tác dụng quan trọng đối với số lượng bạch cầu trung tính (Fig. 6c) hoặc đại thực bào (Fig. 6e) trong BALF toàn phần.

Trong thử nghiệm 3, các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 mà không kháng IL-17A hoặc IL-17F làm giảm đáng kể bạch cầu (Fig. 7a), bạch cầu ưa eosin (Fig. 7b) và limpho bào (Fig. 7d) trong BALF toàn phần trong mô hình bệnh hen OVA ở chuột nhắt này. Các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 mà không kháng IL-17A hoặc IL-17F làm giảm bạch cầu trung tính (Fig. 7c) trong BALF toàn phần, nhưng chỉ có các kháng thể IL-17RB và IL-25 là có tác dụng đáng kể. Các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB hoặc IL-17RA mà không kháng IL-25, IL-17A hoặc IL-17F làm giảm đại thực bào (Fig. 7e) trong BALF toàn phần, nhưng chỉ có kháng thể IL-17RA là có tác dụng đáng kể.

Các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25, mà không kháng IL-17A hoặc IL-17F, làm giảm đáng kể nồng độ IL-13 trong BALF như được thể hiện trong Fig. 8a (thử nghiệm 1) và Fig. 8c (thử nghiệm 3). Nồng độ IL-13 trong BALF thấp hơn ở chuột nhắt được điều trị bằng các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 nhưng không đáng kể trong thử nghiệm 2, có thể là do mức độ gây ra IL-13 toàn bộ thấp hơn so với mức độ thường được quan sát thấy trong mô hình chuột nhắt này (Fig. 8b).

Các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25, mà không kháng IL-17A hoặc IL-17F, cũng làm giảm nồng độ IL-5 trong BALF trong mô hình bệnh hen OVA ở chuột nhắt này, tuy nhiên trong thử nghiệm 1, chỉ có nhóm được điều trị bằng kháng thể đơn dòng kháng IL-25 là thấp hơn đáng kể so với chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp (Fig. 9a), trong khi trong thử nghiệm 3, tất cả các

nhóm được điều trị bằng kháng thể đơn dòng kháng IL-17RB, kháng IL-17RA và kháng IL-25 đều được làm giảm đáng kể (Fig. 9c). Ngoài ra, nồng độ IL-5 trong BALF được làm giảm đáng kể nhờ điều trị bằng các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA và IL-25 trong thử nghiệm 2 (Fig. 9b).

Tương tự, các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25, mà không kháng IL-17A hoặc IL-17F, làm giảm tổng nồng độ IgE trong huyết thanh trong mô hình bệnh hen OVA ở chuột nhắt này. Trong thử nghiệm 1, các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 làm giảm tổng nồng độ IgE trong huyết thanh, nhưng chỉ có nhóm được điều trị bằng kháng thể trung hòa kháng IL-25 là làm giảm đáng kể tổng nồng độ IgE trong huyết thanh so với nhóm được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp thích hợp (Fig. 10a). Trong thử nghiệm 2, các kháng thể trung hòa kháng IL-25, IL-17RB hoặc IL-17RA làm giảm tổng nồng độ IgE trong huyết thanh nhưng không đáng kể so với nhóm được điều trị bằng kháng thể đối chứng (Fig. 10b). Trong thử nghiệm 3, các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 mà không kháng IL-17A hoặc IL-17F làm giảm đáng kể tổng nồng độ IgE trong huyết thanh so với các nhóm được điều trị bằng kháng thể đối chứng thích hợp của chúng (Fig. 10c).

Mẫu phổi từ 8 chuột nhắt từ mỗi nhóm điều trị trong thử nghiệm 3 được phân tích mô học. Các lát cắt mô phổi được nhuộm bằng H&E hoặc PAS, và sau đó được chấm điểm bởi chuyên gia bệnh học như đã nêu trước đó trong ví dụ 1. Việc điều trị bằng các kháng thể trung hòa kháng IL-17RB, IL-17RA hoặc IL-25 mà không kháng IL-17A hoặc IL-17F làm giảm đáng kể điểm số viêm trong mô hình bệnh hen OVA ở chuột nhắt này (Fig. 11).

Các kết quả này chứng minh rằng việc điều trị bằng kháng thể đơn dòng kháng IL-17RB M735, kháng thể đơn dòng kháng IL-17RA M751 hoặc kháng thể đơn dòng kháng IL-25 M819 làm giảm đáng kể nhiều thông số của bệnh viêm trong mô hình bệnh hen gây ra bởi OVA ở chuột nhắt này, mô hình này được xem là mô hình về tình trạng viêm phổi, như bệnh hen ở người. Ngược lại, việc điều trị bằng kháng thể đơn dòng kháng IL-17A hoặc kháng thể đơn dòng kháng IL-17F không làm giảm đáng kể bệnh viêm trong mô hình này. Do đó, IL-25 và các thụ thể của nó là IL-17RB và IL-17RA đóng vai trò trong việc điều tiết bệnh viêm trong mô hình bệnh hen OVA ở chuột nhắt này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất ức chế sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bởi IL-25, chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB làm thành phần hoạt tính, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB này là kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.
2. Chất ức chế sự hình thành phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB bởi IL-25, chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB làm thành phần hoạt tính, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB này là kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.
3. Chất ức chế sự giải phóng ít nhất một chất điều biến gây viêm bởi IL-25, chứa chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB làm thành phần hoạt tính, trong đó chất đối kháng IL-17RA-IL-17RB này là kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.
4. Chất ức chế theo điểm 3, trong đó chất điều biến gây viêm được chọn từ nhóm bao gồm: IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, CXCL1, CXCL2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1 β , TNF α , RANK-L, LIF, PGE2, IL-12, MMP3, MMP9, GRO α và NO.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AMGEN INC.
 Budelsky, Alison L.
 Comeau, Michael R.
 Tocker, Joel E.

<120> Chất ức chế sự hoạt hóa phức hợp thụ thể heterome IL-17RA-IL-17RB

<130> A-1371-WO-PCT

<140> --được chỉ định--
 <141> 2009-02-20

<150> 61/066,538
 <151> 2008-02-21

<150> 61/145,901
 <151> 2009-01-20

<160> 53

<170> PatentIn phiên bản 3.4

<210> 1
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Asp Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

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

Arg Asp Gly Glu Leu Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Gln Phe
 100 105 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 115 120 125

Val Ser Ser
 130

<210> 2

20157

<211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asn Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His 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 Asp Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 4
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asn Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His 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 Asp Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 5
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr
          20          25          30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50          55          60

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

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

Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp
          100          105          110

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

```

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr
          20          25          30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50          55          60

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

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

Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp
          100          105          110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

```

20157

115

120

<210> 8
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

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

20157

	100		105		110
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210>	10				
<211>	124				
<212>	PRT				
<213>	Homo sapiens				
<400>	10				
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln					
1	5		10		15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly					
	20		25		30
Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu					
	35		40		45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Phe Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Pro Ser					
	50		55		60
Leu Lys Ser Arg Val Ala 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 Glu Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Pro Asp Ala Phe Asp					
	100		105		110
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210>	11				
<211>	114				
<212>	PRT				
<213>	Homo sapiens				
<400>	11				
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg					
1	5		10		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr					
	20		25		30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
	35		40		45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Asp Thr Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 12
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Lys Lys 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

20157

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

```
<210> 14
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 14

[illegible]

```
<210> 15
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

20157

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 Gly Arg Val Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Ala Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

20157

35

40

45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asp Leu Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 19
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr

20157

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

<210> 20
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

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

<210> 21
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

20157

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

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

<210> 23
 <211> 125
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

<210> 24

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

20157

115

120

125

<210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Asp	Ile	Leu	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	Arg	Asn	Asp
			20					25					30		
Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	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	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Asn	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 28
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

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 Arg Asn Asp
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

```

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

```

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

```

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 Arg Asn Asp
          20           25           30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

20157

```

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 Arg Asn Asp
          20           25           30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

```

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

```

```

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 Arg Asn Asp
          20           25           30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

```

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

```

```

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

```

20157

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

20157

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

 <210> 38
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 38
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asn Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 39
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 39
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ala Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Tyr Gly Thr Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ile Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 44
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Thr Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Lys Asn Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Leu Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Asp
 50 55 60

Asn Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 46
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

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 Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

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 Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

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

<210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

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

<210> 50

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

Asp Gly His Thr Cys Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

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

Lys

<210> 51
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

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

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

Asp Gly His Thr Cys Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

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

Lys

<210> 52
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

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

<210> 53
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

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

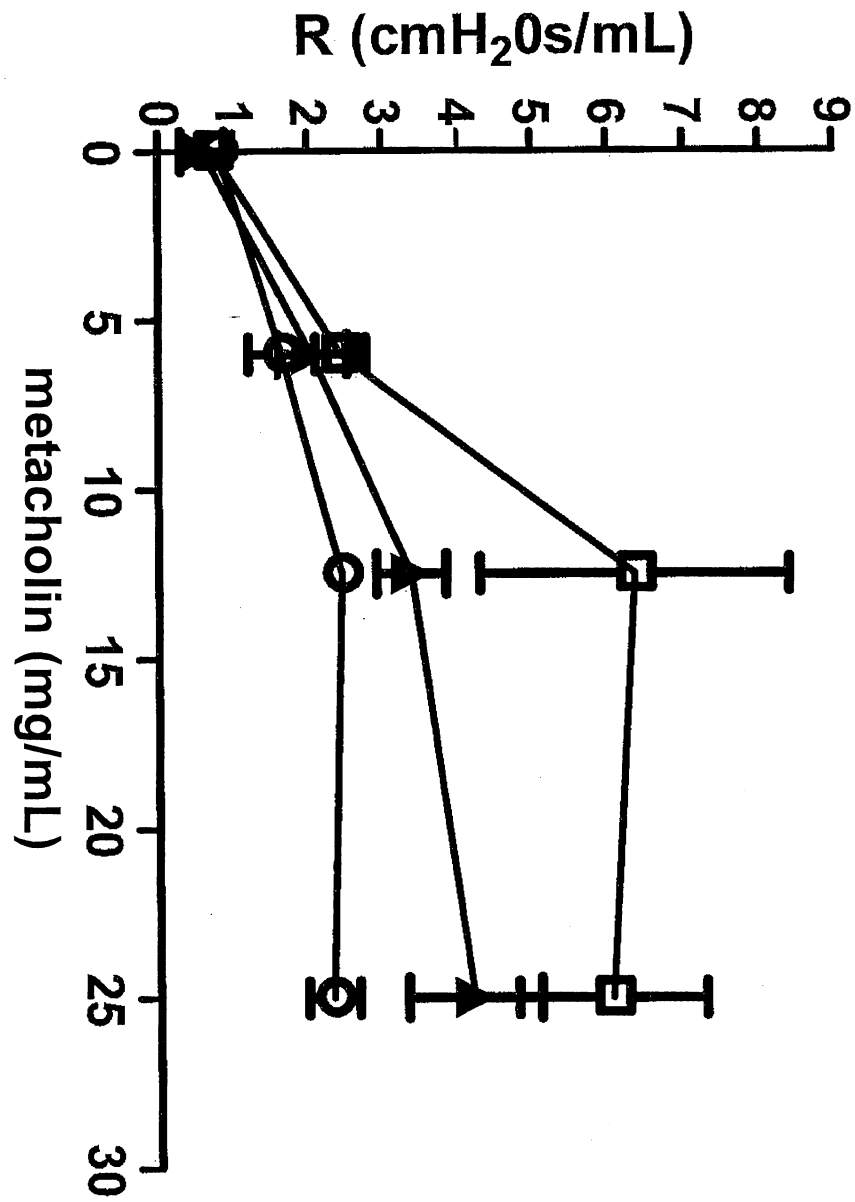
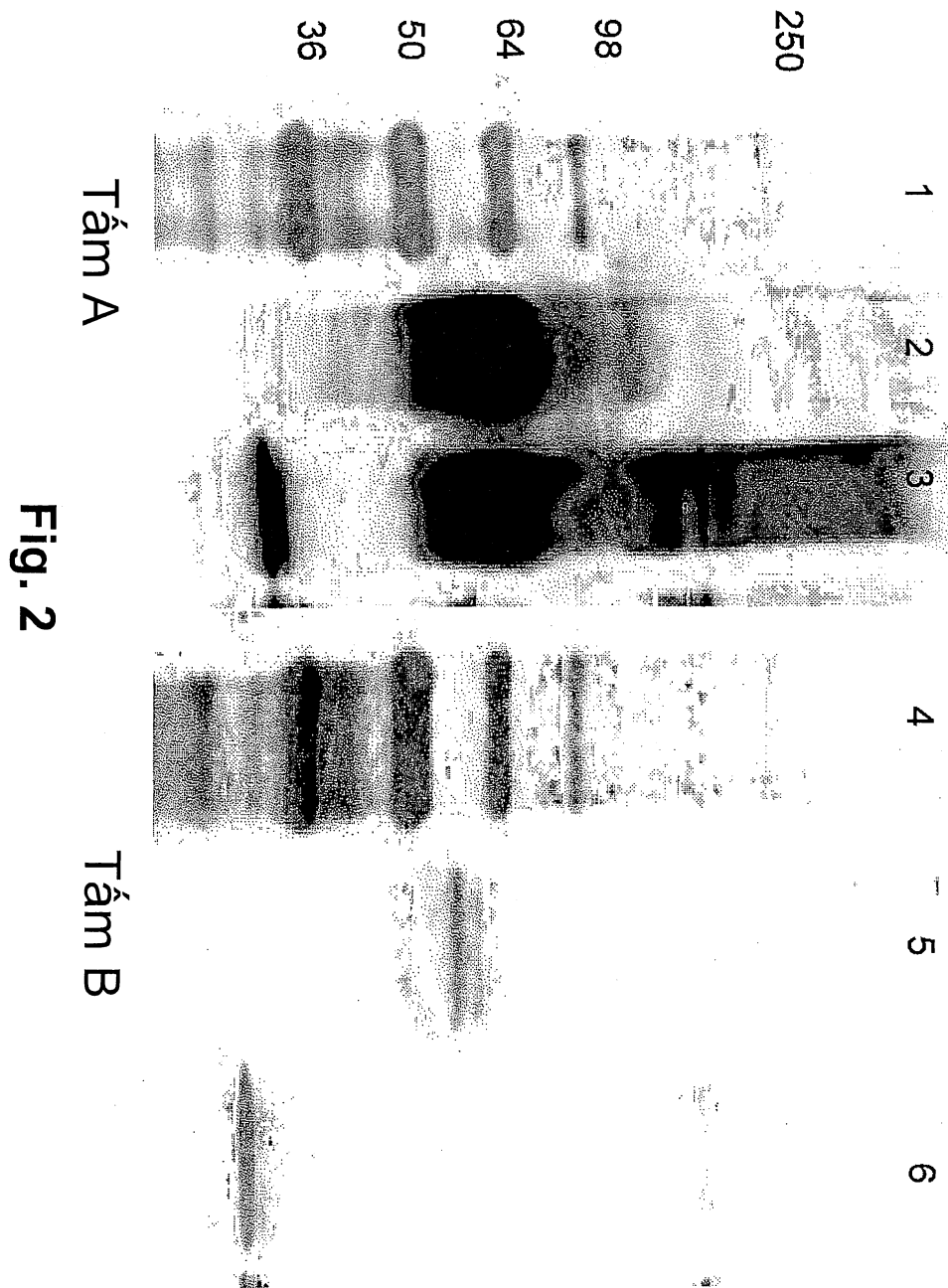


Fig. 1



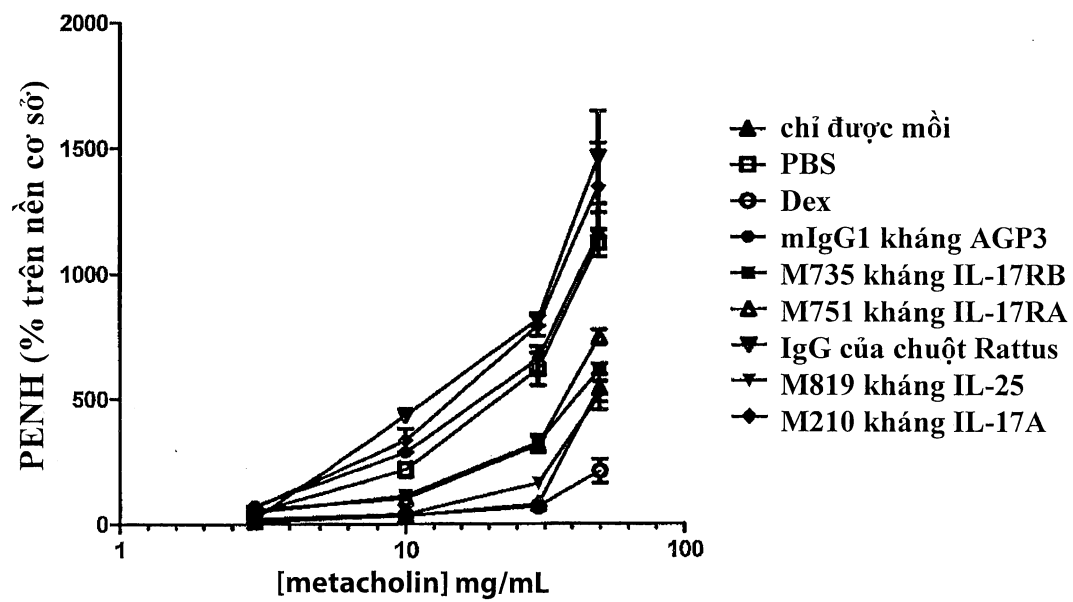


Fig. 3

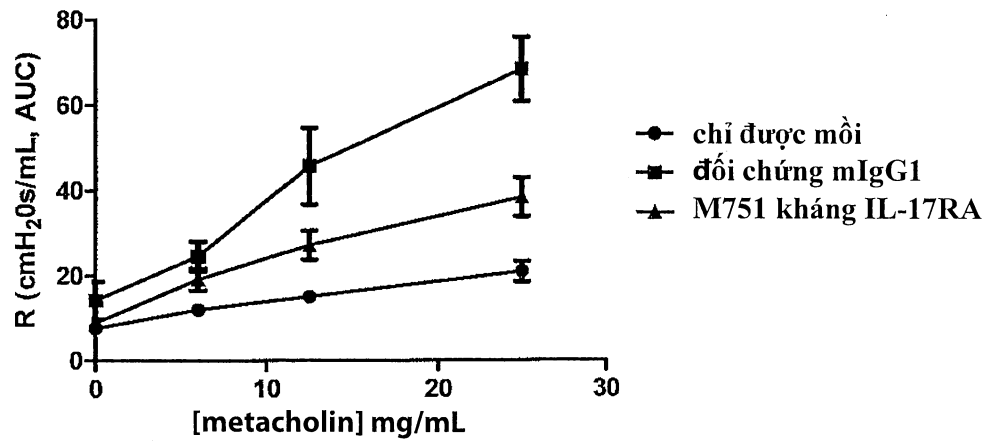


Fig. 4a

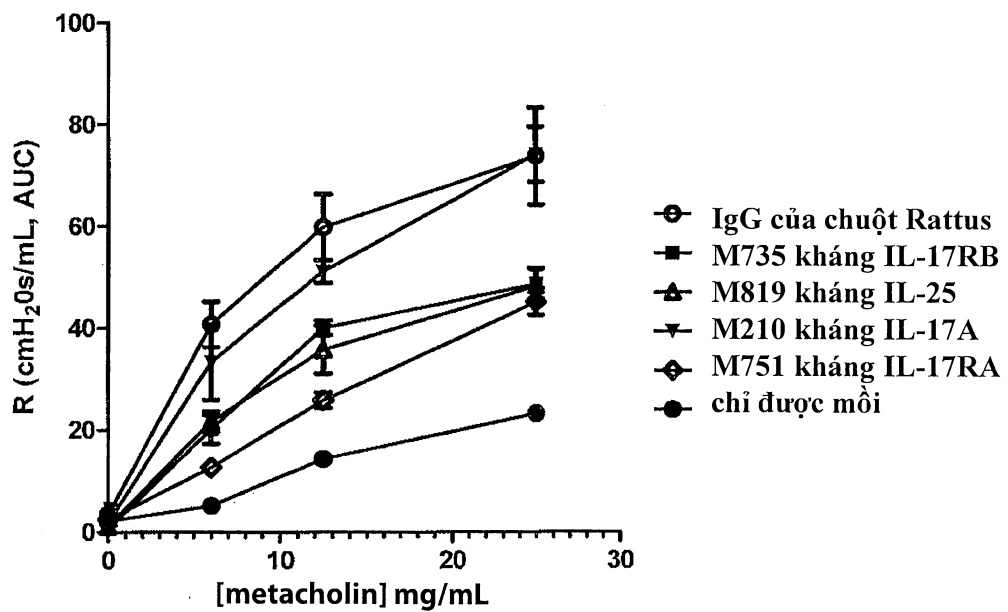


Fig. 4b

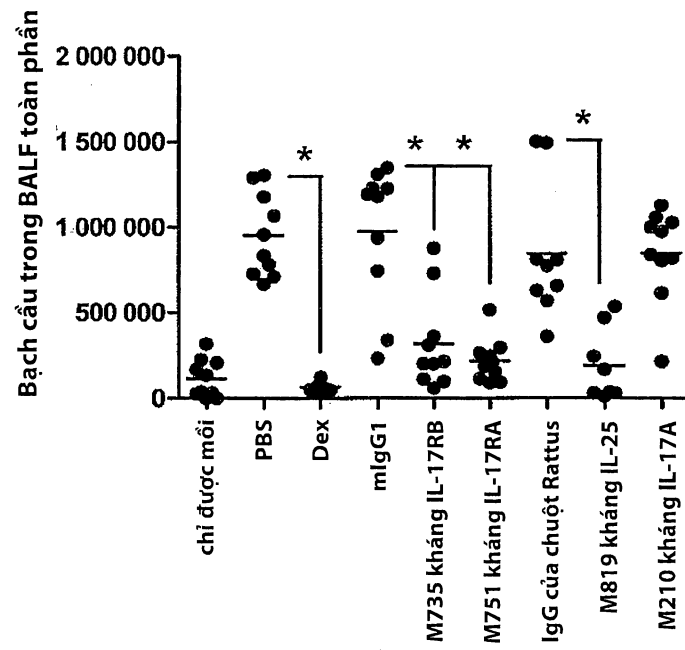


Fig. 5a

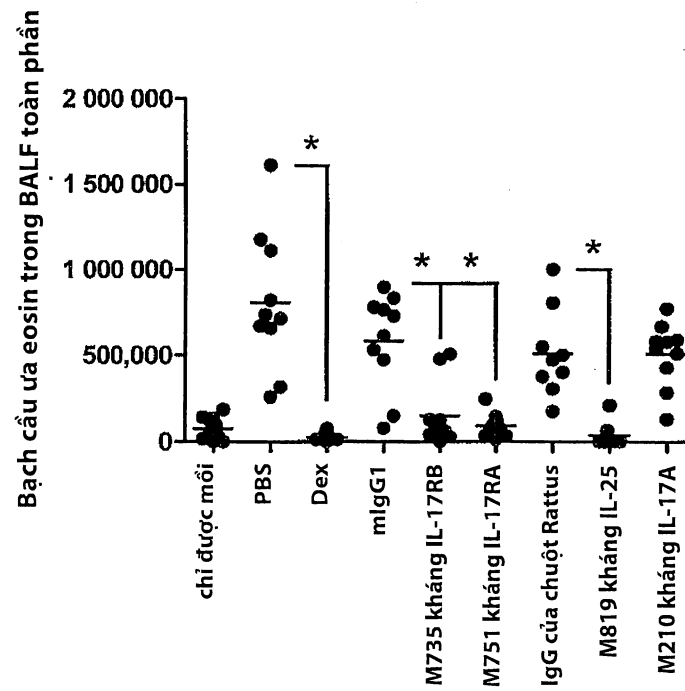


Fig. 5b

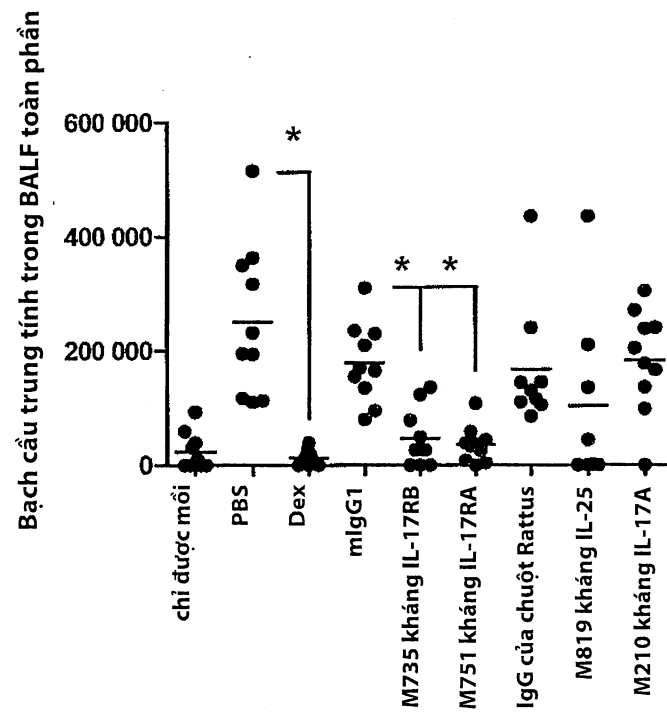


Fig. 5c

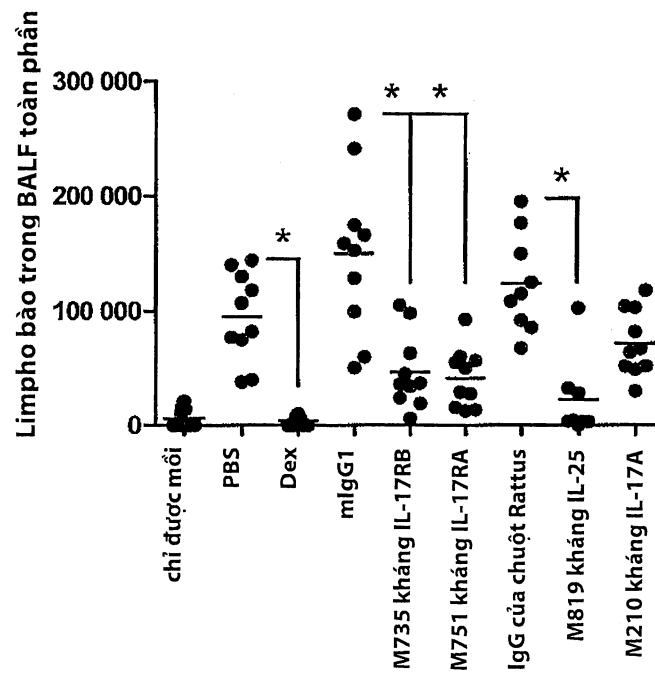


Fig. 5d

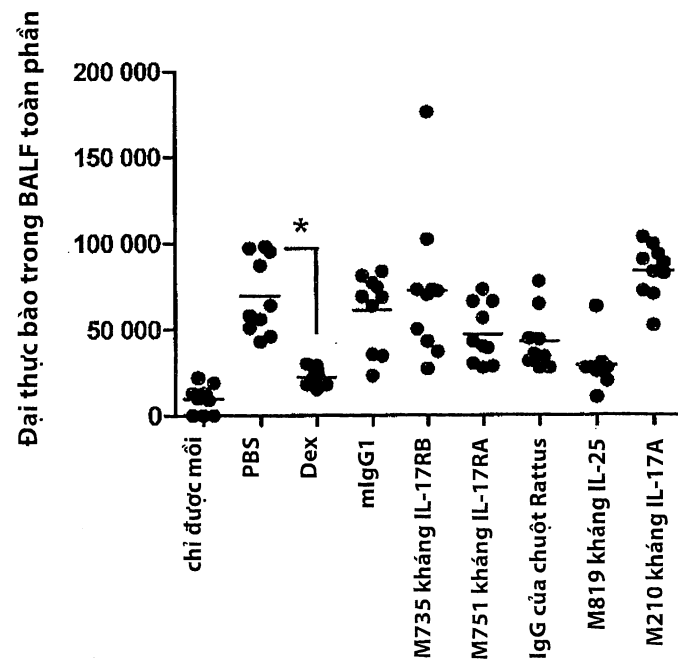


Fig. 5e

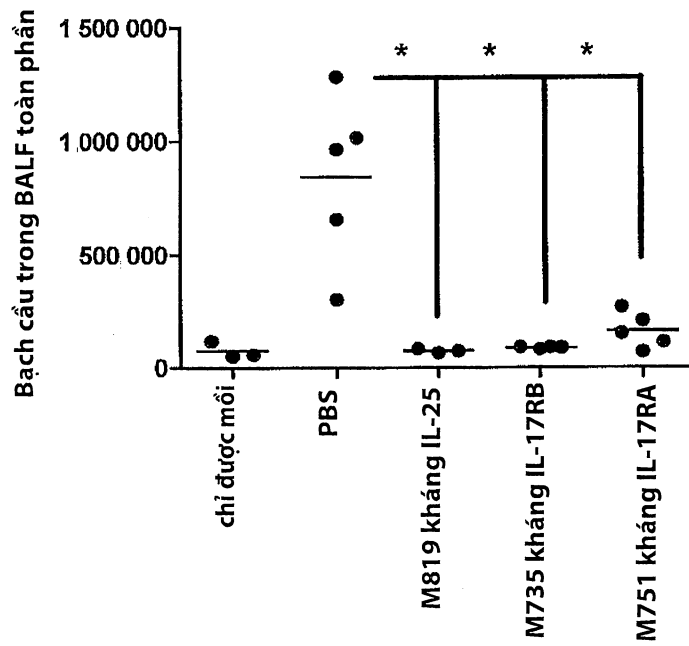


Fig. 6a

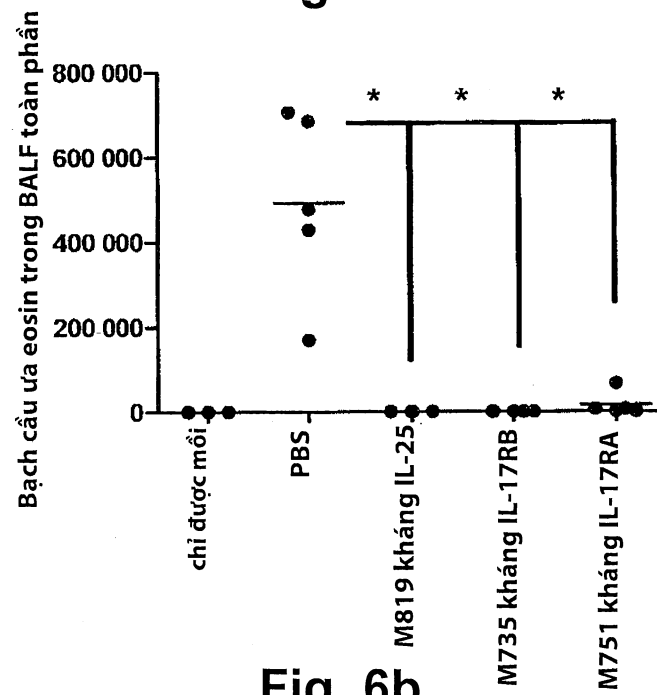


Fig. 6b

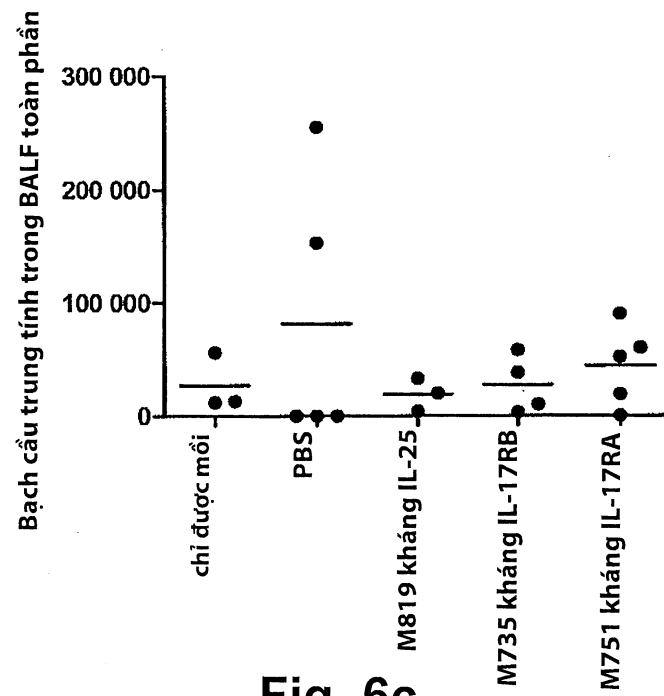


Fig. 6c

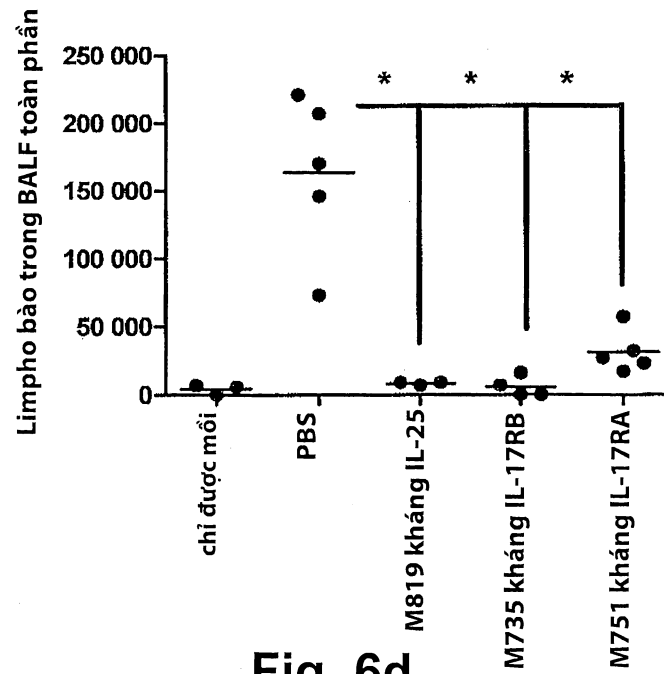
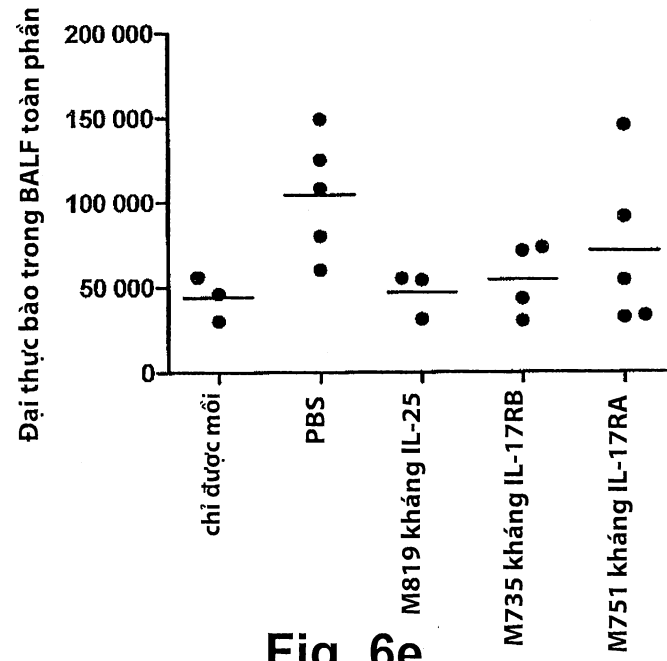


Fig. 6d



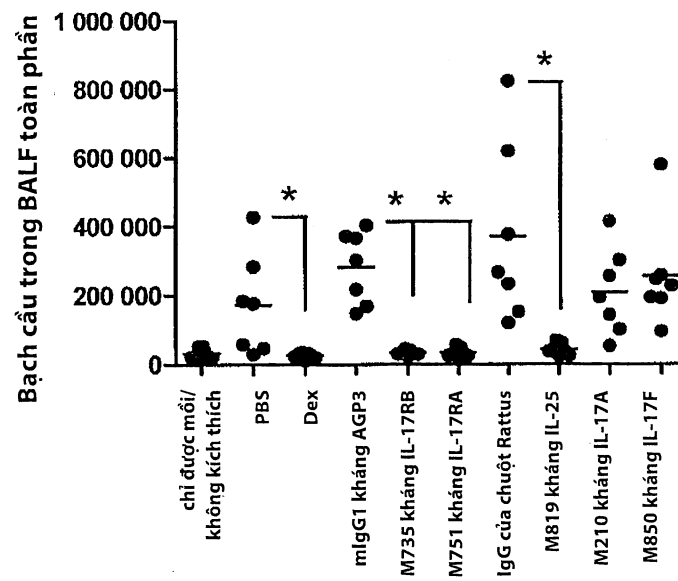


Fig. 7a

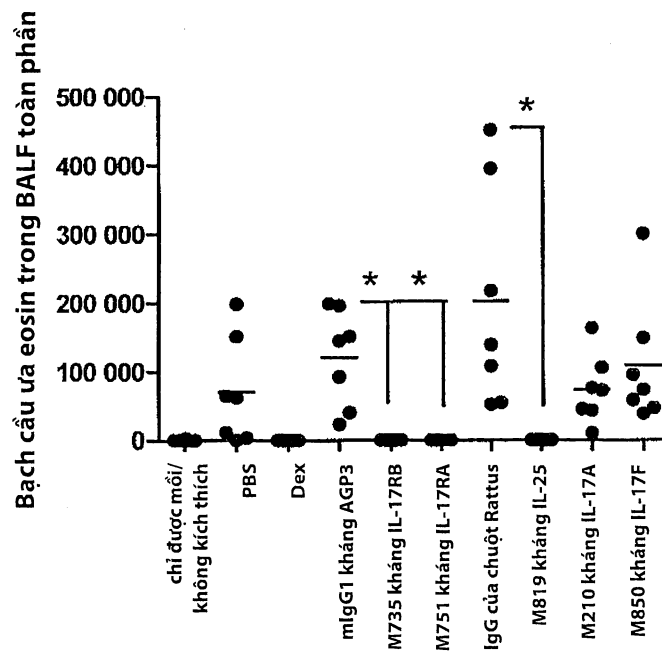


Fig. 7b

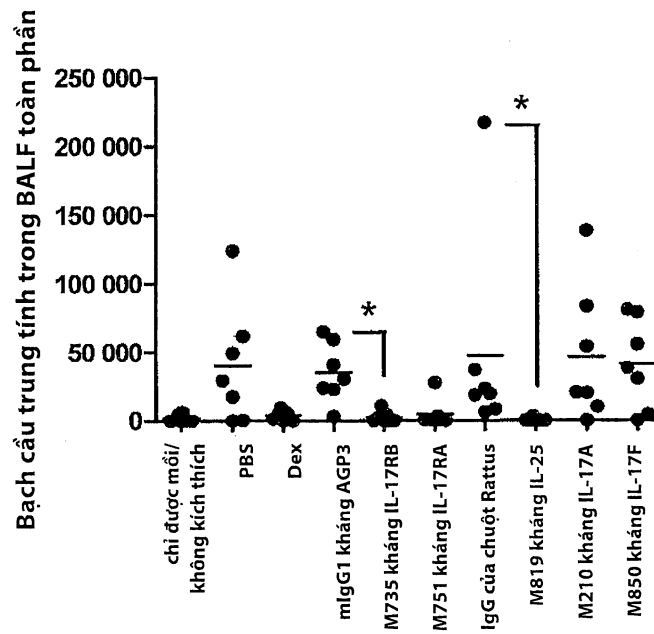


Fig. 7c

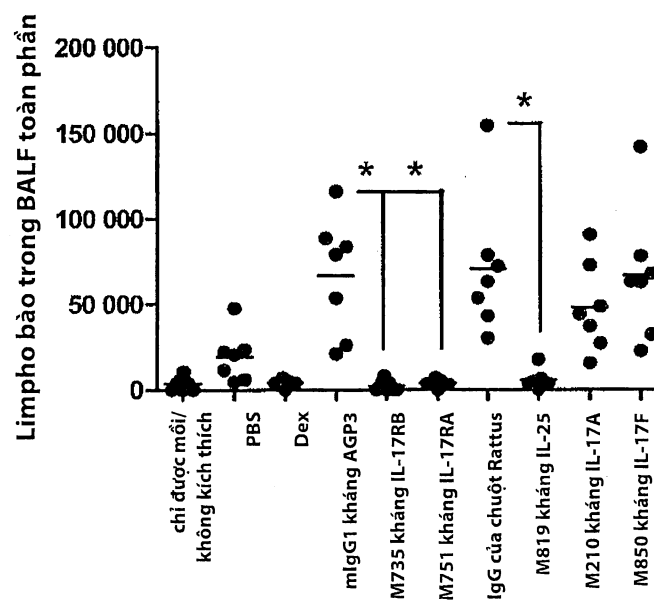


Fig. 7d

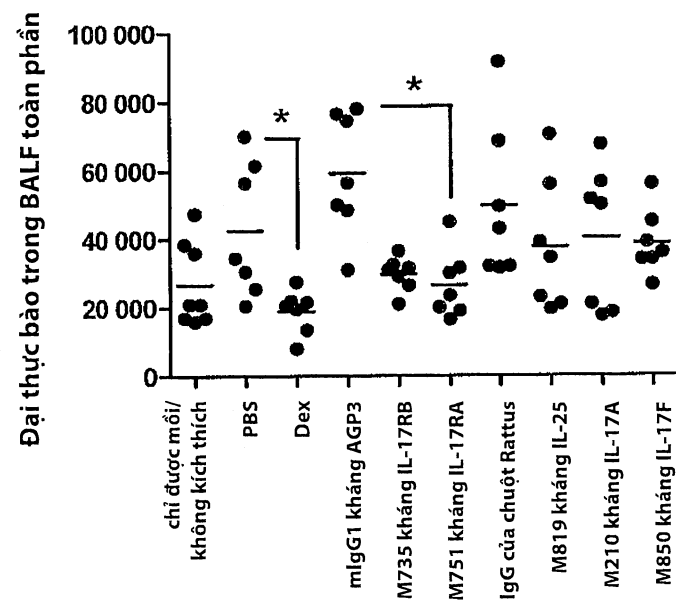


Fig. 7e

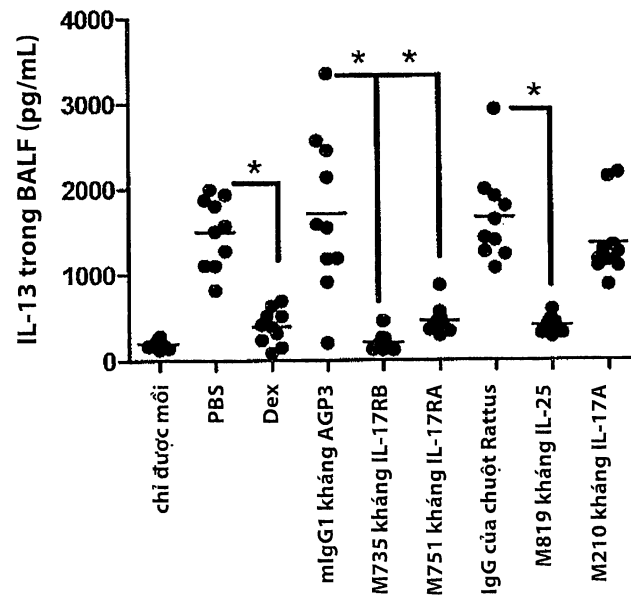


Fig. 8a

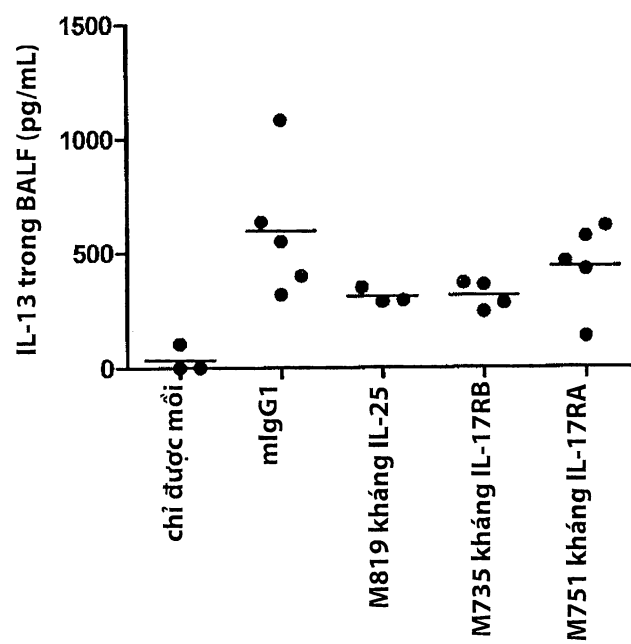
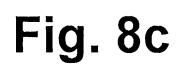


Fig. 8b



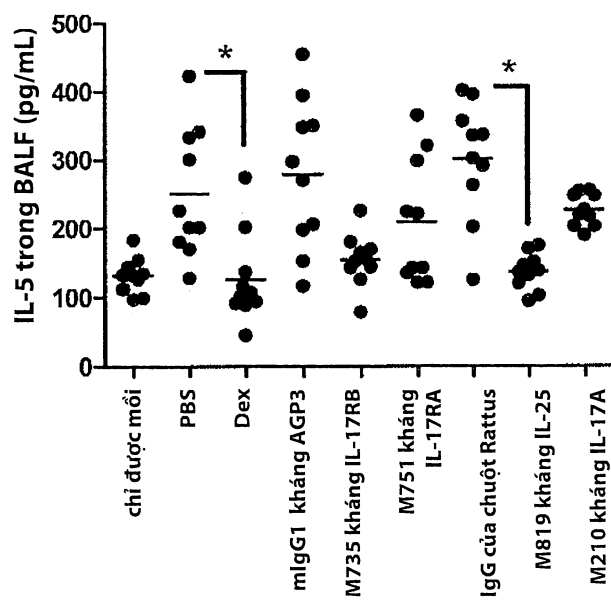


Fig. 9a

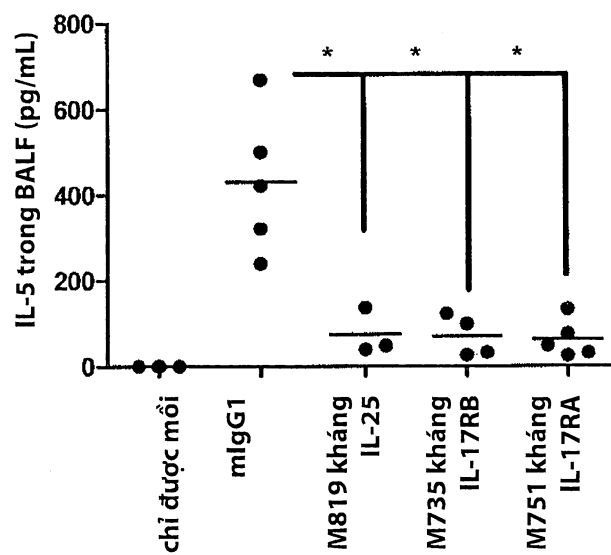


Fig. 9b

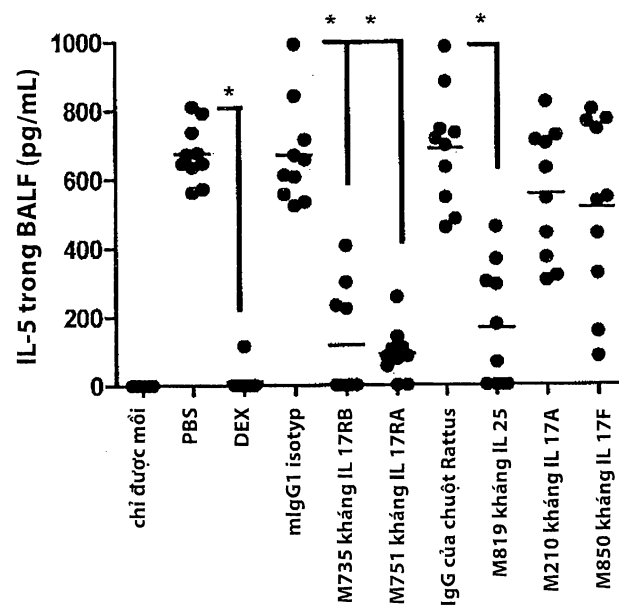


Fig. 9c

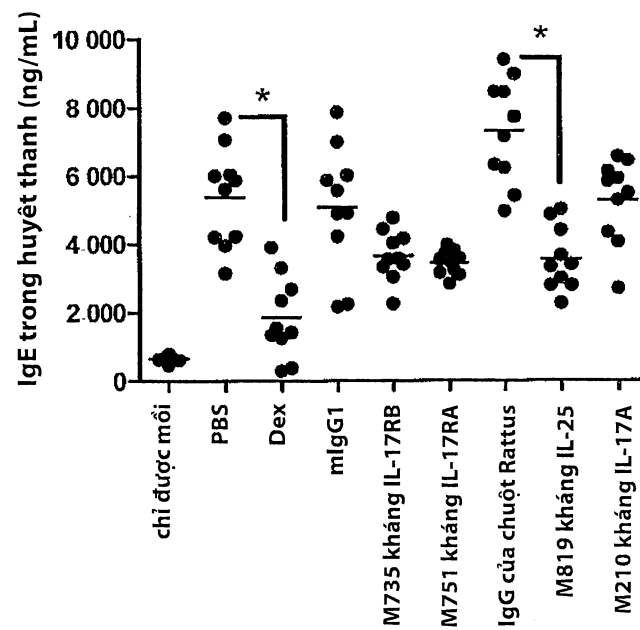


Fig. 10a

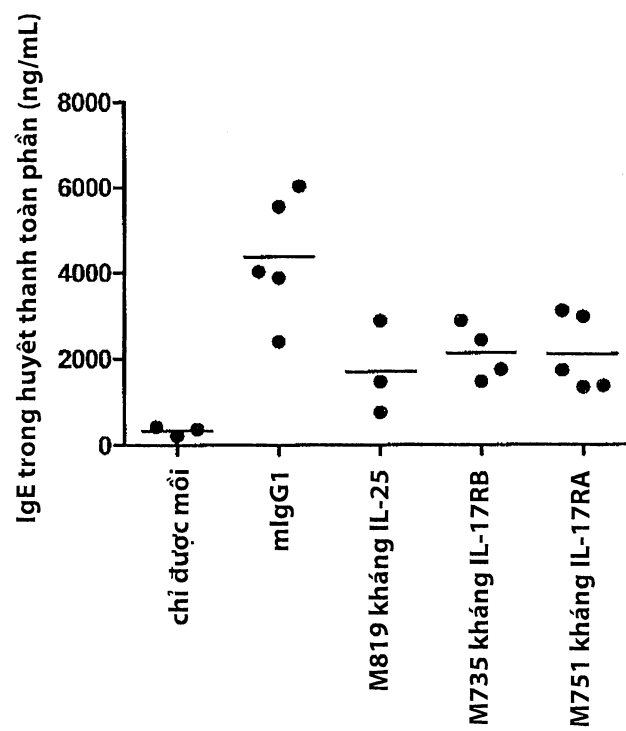


Fig. 10b

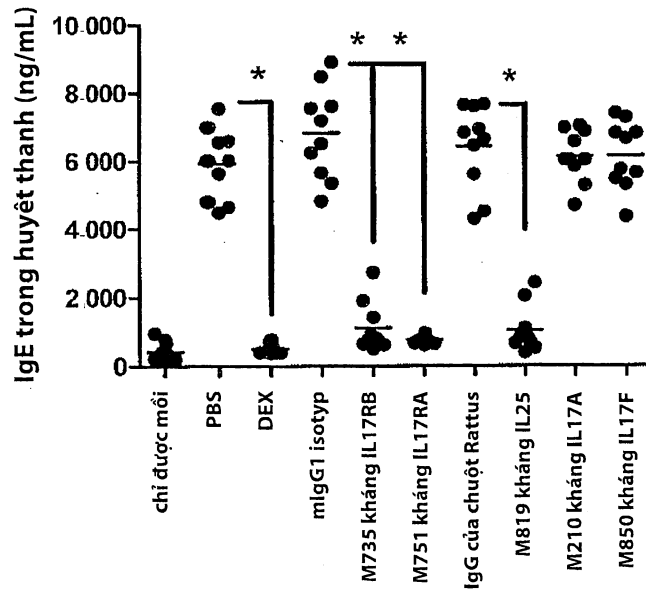


Fig. 10c

