



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

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

(11)



1-0023721

(51)⁷ C07K 16/24; A61K 39/395

(13) B

(21) 1-2012-02801

(22) 30/03/2011

(86) PCT/US2011/030469 30/03/2011

(87) WO2011/123507 06/10/2011

(30) 61/341,458 30/03/2010 US; 61/319,260 31/03/2010 US

(45) 25/05/2020 386

(43) 25/06/2013 303A

(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)

800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, USA

(72) ALMAGRO, Juan, Carlos (US); BRANIGAN, Patrick (US); KANE, Colleen (US); STROHL, William (US); TAUDTE, Susann (US); TORNETTA, Mark (US); WHEELER, John (US)

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT VỚI INTERLEUKIN-25 VÀ CHẾ PHẨM CHỨA
KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các thành phần liên kết đích (ví dụ, các kháng thể) có chức năng liên kết epitop được chỉ ra của IL-25 người. Sáng chế còn đề cập đến các thành phần liên kết đích (ví dụ, kháng thể) mà bao gồm một hoặc nhiều trình tự miền VL của kháng thể được làm giống như của người và liên kết IL-25. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa các thành phần liên kết đích (ví dụ, kháng thể) có chức năng liên kết IL-25, các phương pháp sản xuất thành phần liên kết đích như vậy, và các thành phần liên kết đích này được sử dụng cho việc điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh và tình trạng bệnh lý (ví dụ, bệnh hen, bệnh viêm ruột). Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa các thành phần liên kết đích nêu trên, các vector biểu hiện axit nucleic này và tế bào vật chủ mang vector này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các thành phần liên kết đích (ví dụ, các kháng thể) có chức năng liên kết epitop được chỉ ra của IL-25 người. Sáng chế còn đề cập đến các thành phần liên kết đích (ví dụ, kháng thể) mà bao gồm một hoặc nhiều trình tự miền VL của kháng thể được làm giống như của người và liên kết IL-25. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa các thành phần liên kết đích (ví dụ, kháng thể) có chức năng liên kết IL-25, các phương pháp sản xuất thành phần liên kết đích như vậy, và các thành phần liên kết đích này được sử dụng cho việc điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh và tình trạng bệnh lý (ví dụ, bệnh hen, bệnh viêm ruột). Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa các thành phần liên kết đích nêu trên, các vectơ biểu hiện axit nucleic và tế bào vật chủ mang vectơ này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin-25 (Interleukin-25: IL-25), còn được gọi là IL-17E, là xytokin thuộc họ xytokin IL-17 và được tiết bởi các tế bào T hỗ trợ typ 2 (Th2) và các dưỡng bào. IL-25 kích thích quá trình sản xuất các xytokin khác, trong đó có IL-4, IL-5 và IL-13, trong nhiều mô và kích thích sự tăng lên của bạch cầu ưa axit.

IL-25 được chỉ ra là có liên quan đến viêm mạn tính gắn liền với đường dạ dày-ruột và gen IL-25 đã được nhận diện trong vùng nhiễm sắc thể gắn liền với bệnh tự miễn ở ruột, như bệnh viêm ruột (IBD). Các liệu pháp thông thường để điều trị IBD bao gồm hoặc các chất kháng sinh hoặc các thuốc được dẫn xuất từ steroid; tuy nhiên những loại này hiện không thành công trong việc kích thích hoặc duy trì tình trạng thuyên giảm về lâm sàng ở bệnh nhân.

Cũng đã được chứng minh rằng IL-25 được điều hòa tăng trong các mẫu từ các bệnh nhân mắc bệnh hen, một tình trạng bệnh lý được ước tính là gây ảnh hưởng cho hơn 300 triệu người trên toàn thế giới, gợi ý rằng tình trạng biểu hiện quá mức của xytokin này góp phần vào bệnh lý học của bệnh hen và các tình trạng bệnh lý có liên quan.

Các kháng thể IL-25 được mô tả trong WO2008/129263, WO2009/136976, EP2163625, Ballantyne et al. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*

120(6):1324-1331 và Angkasekwinai et al *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119(1):S134.

Vì vậy, có nhu cầu về các chất đối kháng IL-25 hữu hiệu mà hữu ích trong việc điều trị các bệnh và tình trạng bệnh lý được đặc trưng bởi tình trạng biểu hiện quá mức của IL-25, trong đó có bệnh hen và bệnh viêm ruột.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể và các đoạn liên kết của chúng, được hướng đến interleukin 25 (IL-25).

Sáng chế còn đề cập đến các biến thể của RH2.5_R71V, một phiên bản được làm giống như của người (được ghép CDR) của kháng thể 2C3 chuột, còn được đề cập ở đây bằng cách sử dụng các thuật ngữ “huDDG91” và “M9”. Ở đây một biến thể như vậy được gọi là “kháng thể M6,” hoặc “M6.” M6 thể hiện một số thuộc tính có lợi *in vitro* và *in vivo*, trong đó có, ví dụ, ái lực liên kết được nâng cao đối với IL-25 so với kháng thể huDDG91 mẹ, khả năng được cải thiện để ức chế thụ thể IL-25 trong thử nghiệm trên cơ sở thụ thể và thử nghiệm trên cơ sở tế bào so với kháng thể huDDG91 mẹ và các đặc điểm khác, như mức biểu hiện cao, tính tan cao, thiếu sự kết tụ protein đáng kể khi tinh chế, và sự vắng mặt của các cải biến sau dịch mã không mong muốn, các tương tác protein-protein và oxy hóa khi tinh chế.

Sáng chế còn đề cập đến thành phần liên kết đích có tác dụng liên kết với IL-25, trong đó thành phần liên kết đích liên kết một hoặc nhiều trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 46-63 của SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 66-84 của SEQ ID NO: 17 và các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO: 17. Trong một trường hợp, thành phần liên kết đích liên kết với các gốc axit amin 56-63 của SEQ ID NO: 17 và các gốc axit amin 66-74 của SEQ ID NO: 17. Theo phương án khác, thành phần liên kết đích bao gồm miền VL của kháng thể bao gồm CDR3 có trình tự axit amin QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8).

Sáng chế đề cập kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết IL-25, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

a) miền VL của kháng thể bao gồm CDR1 có trình tự axit amin SASQGISNYLN (SEQ ID NO:6), CDR2 có trình tự axit amin YTSSLHS (SEQ ID NO:7) và CDR3 có trình tự axit amin QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8); và

b) miền VH của kháng thể bao gồm CDR1 có trình tự axit amin GYTMN (SEQ ID NO: 10), CDR2 có trình tự axit amin LINPYNGGTSYNQNFKG (SEQ ID NO: 11) và CDR3 có trình tự axit amin EDYDGYLYFAMDY (SEQ ID NO: 12), trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ái lực liên kết đối với IL-25 nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 53pM.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền VL bao gồm SEQ ID NO:5 và miền VH bao gồm SEQ ID NO:9.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế còn đề cập đến axit nucleic được phân lập mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, vectơ biểu hiện bao gồm các axit nucleic này và tế bào chủ mang các vectơ biểu hiện này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ của sáng chế dưới điều kiện dùng cho việc sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến các chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến cách sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ, ở dạng dược phẩm, dùng cho việc điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh lý, trong đó có các tình trạng viêm như bệnh hen (trong đó có bệnh hen dị ứng), và bệnh viêm ruột (ví dụ, bệnh Crohn và viêm loét ruột kết).

Sáng chế còn đề cập đến thành phần liên kết đích cạnh tranh trong việc liên kết với IL-25 với thành phần liên kết đích có tác dụng liên kết một hoặc nhiều trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 46-63 của SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 66-84 của SEQ ID NO: 17 và các gốc axit amin 129- 135 của SEQ ID NO: 17. Theo một phương án cụ thể, thành phần liên kết đích có ái lực liên kết đối với IL-25 người mà nhỏ hơn hoặc bằng 50pM.

Sáng chế còn đề cập đến thành phần liên kết đích bao gồm:

a) miền VL của kháng thể bao gồm trình tự axit amin có từ 1 đến 20 thay thế axit amin so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:5;

- b) miền VH của kháng thể bao gồm trình tự axit amin có từ 1 đến 20 thay thế axit amin so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:9; hoặc
- c) dạng kết hợp của chúng.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó kháng IL-25, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có ái lực liên kết đối với IL-25 nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 53pM và liên kết một hoặc nhiều trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 56-63 của trình tự SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 66-74 của trình tự SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 129-135 của trình tự SEQ ID NO: 17, bao gồm:

- (a) tạo danh mục ban đầu gồm các axit nucleic mã hóa miền VL trong đó các axit nucleic hoặc bao gồm vùng mã hóa CDR3 sẽ được thay thế hoặc thiếu vùng mã hóa CDR3;

kết hợp danh mục ban đầu với axit nucleic người cho mã hóa CDR3 của VL có trình tự axit amin QQYLAFPYTF (SEQ ID NO: 8), trong đó axit nucleic người cho được lồng vào một hoặc nhiều axit nucleic trong danh mục để tạo ra danh mục sản phẩm của các axit nucleic mã hóa miền VL bao gồm CDR3 của VL có trình tự axit amin QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8);

- (c) biểu hiện các axit nucleic của danh mục sản phẩm để tạo thành các thành phần liên kết đích;

- (d) lựa chọn thành phần liên kết đích có tác dụng liên kết một cách đặc hiệu một hoặc nhiều trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 56-63 của SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 66-74 của SEQ ID NO: 17 và các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO:17; và

- (e) thu hồi thành phần liên kết đích hoặc axit nucleic mã hóa thành phần liên kết đích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Tập tin Patent hoặc đơn này chứa ít nhất một hình vẽ được thực hiện bằng màu. Các bản sao của Patent này hoặc Công bố Đơn yêu cầu cấp Patent này với (các) hình vẽ màu sẽ được cung cấp bởi Văn phòng khi có yêu cầu và trả phí cần thiết.

Fig.1 biểu thị nucleotit chuỗi nhẹ kappa (SEQ ID NO: 1) và trình tự axit amin (SEQ ID NO:2) của kháng thể huDDG91/RH2.5_R71V. Gạch dưới trong trình tự axit amin biểu đạt các CDR. Trình tự dẫn đầu thì không được bao hàm.

Fig.2 biểu thị nucleotit chuỗi nặng (SEQ ID NO:3) và trình tự axit amin (SEQ ID NO:4) của kháng thể huDDG91/ RH2.5_R71V. Gạch dưới trong trình tự axit amin biểu đạt các CDR. Trình tự dẫn đầu thì không được bao hàm.

Fig.3 là bảng biểu thị các thuộc tính của 9 kháng thể đơn dòng ứng viên, trong đó có M6, kháng thể này được nhận diện bằng cách sàng lọc thư viện tổ hợp 25 thành phần trên cơ sở kháng thể huDDG91/RH2.5_R71V. Chữ in nghiêng biểu đạt các con số thu được từ bộ dữ liệu khác. R71V G1 được dùng để chỉ kháng thể huDDG91. Hai hàng R71V G1 là những số đo từ hai bộ dữ liệu khác nhau. Các góc có tính kỵ nước tăng lên được tô đậm bằng màu vàng.

Fig.4A biểu thị các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể M6 (SEQ ID NO:5) và các CDR của nó (SEQ ID NO: 6-8). Gạch dưới trong trình tự axit amin biểu đạt các vị trí của các CDR. Trình tự dẫn đầu thì không được bao hàm. Các góc axit amin ở dạng phong chữ đỏ đậm biểu đạt những thay thế axit amin so với trình tự huDDG91/RH2.5_R71V mẹ.

Fig.4B biểu thị các trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể M6 (SEQ ID NO:9) và các CDR của nó (SEQ ID NOs: 10-12). Gạch dưới trong trình tự axit amin biểu đạt các vị trí của các CDR. Trình tự dẫn đầu thì không được bao hàm.

Fig.5 là biểu đồ biểu thị M6 ức chế quá trình sản xuất IL-5 do IL-4/IL25 gây ra bởi các tế bào T CD4+ non của người mà được kích thích trong 4 ngày bằng các tế bào đuôi gai tự thân với sự có mặt của rhIL-4 và rhIL-25 đến đến mức độ lớn hơn kháng thể huDDG91 (M9). Kháng thể isotyp IgG1 (iso) đóng vai trò đối chứng. n=4 người cho.

Các Fig.6A và 6B là những biểu đồ biểu thị mức ức chế được nâng cao đối với quá trình sản xuất GROa do IL-25 gây ra bởi kháng thể M6 so với kháng thể huDDG91 (M9) trong các tế bào LS174T mà được kích thích bằng IL-25 tái tổ hợp của người trong 24 giờ. Các biểu đồ trong các Fig.6A và 6B thể hiện dữ liệu từ hai thử nghiệm tách biệt.

Fig.7A biểu thị bản đồ diện bao phủ trình tự của các gốc axit amin 1-78 của IL-25 người (SEQ ID NO: 13) với việc phân giải nhờ pepsin, với việc dập tắt bằng ure 2M, TCEP 1M, ở độ pH 3,0. Đường màu đen là peptit đã quan sát được.

Fig.7B biểu thị bản đồ diện bao phủ trình tự của các gốc axit amin 79-146 của IL-25 người (SEQ ID NO: 14) với việc phân giải nhờ pepsin, với việc dập tắt bằng ure 2M, TCEP 1M, ở độ pH 3,0. Đường màu đen là peptit đã quan sát được.

Các Fig. 8A và 8B cho thấy những khác biệt về mức đoteri hóa của các đoạn khác nhau của protein IL-25 người (SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16) khi liên kết kháng thể M6 trong các thử nghiệm trao đổi H/D. Mỗi khối là một peptit IL-25 người và chứa dữ liệu của sáu thời điểm, 150 giây và 500 giây ở độ pH 6, cũng như 150 giây, 500 giây, 1.500 giây và 5.000 giây ở độ pH 7. Màu xanh lam đậm biểu thị là không có sự bảo vệ nào khi liên kết kháng thể M6. Các màu khác biểu thị rằng có nhiều đoteri sau phản ứng trao đổi thuận trong dung dịch/phản ứng trao đổi nghịch trong cột hơn sau phản ứng trao đổi thuận trong cột/phản ứng trao đổi nghịch trong cột như được thể hiện trong phần chèn vào bên phải. Đoteri được gắn kết vào một trong hai gốc axit amin thứ nhất của mỗi ion bị mất trong suốt quá trình phân tích (phép phân tích phân giải/tách/khối lượng trong môi trường nước), chịu trách nhiệm về những khoảng trống nhỏ trong mẫu hình H/D-Ex.

Các Fig.9A-9F là những biểu đồ biểu thị hàm lượng đoteri trong các đoạn khác nhau của IL-25 người sau phản ứng trao đổi thuận/nghịch ở độ pH 6 và pH 7 ở 3°C với cột kháng thể M6. Màu xanh lam, trao đổi thuận trong dung dịch/trao đổi nghịch trong cột và màu tím, trao đổi thuận trong cột/trao đổi nghịch trong cột. Tất cả các lần trao đổi được chuyển đổi thành đương lượng độ pH 7 ở 23°C (ví dụ, 150 giây ở độ pH 6 ở 3°C là bằng 1,85 giây ở độ pH 7 ở 23°C). Các gốc IL-25 người được trình bày trong mỗi đoạn được biểu thị ở phần trên cùng của mỗi đồ thị.

Fig.10 biểu thị trình tự axit amin của IL-25 người (SEQ ID NO: 17).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế dựa, một phần, trên việc nhận diện kháng thể IL-25 người ái lực cao, ở đây được gọi là “M6” (xem ví dụ 1), và việc nhận diện các gốc axit amin trong IL-25 người mà được liên kết bởi kháng thể M6, như được xác định bằng phép đo phổ khối trao đổi hydro/đoteri (H/D) (xem ví dụ 3). Do vậy, sáng chế đề cập đến thành phần liên kết đích có tác dụng liên kết với IL-25, trong đó thành phần

liên kết đích liên kết một hoặc nhiều trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 46-63, 66-84 và 129-135 của IL-25 người (SEQ ID NO: 17). Vì vậy, thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây có thể liên kết các gốc axit amin 46-63 của SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 66-84 của SEQ ID NO: 17, hoặc các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO: 17, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án, các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây liên kết các axit amin 56-63 của SEQ ID NO: 17 và các axit amin 66-74 của SEQ ID NO: 17.

Như được sử dụng ở đây, “thành phần liên kết đích” được dùng để chỉ protein hoặc peptit bất kỳ chứa phân tử bao gồm ít nhất một phần của phân tử globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một vùng quyết định tính bổ sung (CDR) của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, hoặc phần liên kết phối tử của nó, có tác dụng liên kết một cách đặc hiệu protein IL-25 động vật có vú (ví dụ, người), hoặc một phần của nó. Các thành phần liên kết đích như vậy có thể còn bao gồm ít nhất một phần của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, ít nhất một phần của vùng cố định chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, ít nhất một phần của vùng khung của kháng thể, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Các thành phần liên kết đích như vậy điều biến, làm giảm, đối kháng, làm yếu, ngăn chặn, ức chế, triệt tiêu và/hoặc gây trở ngại cho ít nhất một hoạt tính IL-25 hoặc sự liên kết, hoặc gây trở ngại cho hoạt tính thụ thể IL-25 hoặc sự liên kết, *in vitro*, *in situ* và/hoặc *in vivo*. Thành phần liên kết đích thích hợp được bộc lộ ở đây có thể liên kết với ái lực cao với epitop ức chế và/hoặc trung hòa của IL-25 người được nhận biết bởi kháng thể M6 được mô tả ở đây.

Các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây không bị giới hạn ở những loại mà liên kết chỉ các gốc axit amin 46-63, các gốc axit amin 66-84, và/hoặc các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO: 17. Vì vậy, theo một số phương án, các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây còn có thể liên kết vào một hoặc nhiều phần khác của IL-25 người mà không bao gồm các gốc axit amin 46-63, các gốc axit amin 66-84, và/hoặc các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO: 17. Trong các trường hợp khác, các thành phần liên kết đích của sáng chế còn có thể liên kết vào một hoặc nhiều gốc axit amin trong IL-25 người mà nằm bên sườn các gốc axit amin 46-63, các gốc axit amin 66-84, và/hoặc các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO: 17.

Còn được bộc lộ ở đây là các thành phần liên kết đích có tác dụng liên kết một hoặc nhiều phần của IL-25 người mà được bao hàm trong các gốc axit amin 46-63, các gốc axit amin 66-84, và/hoặc các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO:17, như, ví dụ, các phần của IL-25 bao gồm ít nhất 5 axit amin của các gốc axit amin 46-63, các gốc axit amin 66-84, và/hoặc các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO: 17. Các phần tiêu biểu của IL-25 mà có thể được liên kết bởi các thành phần liên kết đích bao gồm các axit amin 56-63 và/hoặc các axit amin 66-74 của SEQ ID NO: 17.

Vùng của IL-25, hoặc epitop, được liên kết bởi thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong số một số kỹ thuật lập bản đồ epitop tiêu chuẩn đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật như vậy bao gồm, ví dụ, quá trình tạo đột biến hướng vị trí được kết hợp với thử nghiệm liên kết, lập bản đồ epitop bằng các chốt peptit (ví dụ, Geysen *et al.*, Peptides: Chemistry and Biological, Proceedings of Twelfth American Peptide Symposium, trang 519-523, biên tập, G.R. Marshall, Escom, Leiden, 1988), tinh thể học X quang, và kỹ thuật trao đổi hydro/đơteri (H/D) (ví dụ, phép đo phổ khối trao đổi H/D).

Như được mô tả ở đây, phép đo phổ khối trao đổi H/D được sử dụng để xác định (các) epitop trong IL-25 người mà được nhận biết và được liên kết bởi kháng thể M6 (xem ví dụ 3 và các Fig.8A, 8B và 9A-9F). Khi chuyển từ nước sang hệ dung môi trên cơ sở đơteri (nước nặng), protein sẽ trải qua quá trình tăng về khối lượng khi nguyên tử hydro của protein dần dần được thay bởi đơteron (các chất đồng vị nặng hơn của hydro). Khả năng xảy ra sự biến trao đổi hydro/đơteri phần lớn được xác định bằng cấu trúc protein và khả năng tiếp cận dung môi. Phép đo phổ khối trao đổi H/D được sử dụng để đo sự trao đổi và, kết quả là, cấu trúc protein và khả năng tiếp cận dung môi. Khi phân tử nhỏ hoặc thành viên liên kết protein liên kết vào đích protein, đích đó trải qua những thay đổi có thể quan sát được bằng thử nghiệm về tốc độ trao đổi của nó. Các vùng bề mặt mà loại trừ dung môi khi tạo phức trao đổi chậm hơn nhiều. Các vùng loại trừ dung môi thì hữu ích cho việc suy diễn ra vị trí của vị trí liên kết. Ví dụ, trong trường hợp tương tác kháng nguyên-kháng thể, những thay đổi này làm nổi bật vị trí của epitop.

Thông thường, thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây sẽ bao gồm vùng biến đổi (VL) chuỗi nhẹ của kháng thể được kết cặp với vùng biến đổi (VH) chuỗi nặng của kháng thể để đem lại miễn liên kết IL-25. Trong khi thực hiện sáng chế được mô tả ở đây, đã phát hiện được rằng ái lực liên kết của kháng thể huDDG91 được cải thiện bằng cách thay đổi vùng quyết định tính bổ sung (CDR) trong miền VL của kháng thể huDDG91 (SEQ ID NO: 1), cụ thể là vùng CDR3, thành QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8). Do vậy, phần bộc lộ được mô tả ở đây dự liệu các miền VL bao gồm SEQ ID NO:8 và các thành phần liên kết đích bao gồm các miền VL này. Các miền VL trong các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây còn bao gồm vùng CDR1 (SASQGISNYLN (SEQ ID NO:6)) và vùng CDR2 (YTSSLHS (SEQ ID NO:7)) từ kháng thể M6 và kháng thể huDDG91. Các vùng CDR VL thích hợp khác để đưa vào trong các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng bất kỳ trong các vùng CDR1 VL được biểu thị trong Fig.3. Theo một phương án, các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây bao gồm SEQ ID NO:5, miền VL của kháng thể M6.

Theo một số phương án, các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây còn bao gồm miền VH mà bao gồm SEQ ID NOs: 10-12, tương ứng với các vùng CDR của kháng thể M6 và kháng thể huDDG91. Các vùng CDR VH thích hợp khác để đưa vào trong các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng bất kỳ trong số các vùng CDR3 VH được biểu thị trong Fig.3. Theo một phương án ưu tiên, các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây bao gồm SEQ ID NO:9, miền VH của kháng thể M6 và kháng thể huDDG91. Miền VH có thể được kết cặp với một số miền VL không phải là miền VL của kháng thể M6 (SEQ ID NO:5). Tốt hơn, nếu miền VH được kết cặp với miền VL bao gồm vùng CDR3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8.

Các trình tự của các CDR của kháng thể M6 được mô tả ở đây có thể được cải biến bằng các đoạn chèn, các đoạn thay thế và các đoạn xóa bỏ và được bao hàm trong thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây đến mức mà thành phần liên kết đích (ví dụ, kháng thể) có (các) CDR được cải biến duy trì khả năng liên kết vào và ức chế IL-25 người.

Người có hiểu biết trong lĩnh vực này có thể xác định được việc duy trì hoạt tính này bằng cách thực hiện thử nghiệm chức năng được mô tả ở đây. CDR trong

thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây có thể có, ví dụ, từ 50% đến 100% tính tương đồng, tốt hơn, nếu là từ 80% đến 100% tính tương đồng, càng tốt hơn, nếu là từ 90% đến 100% tính tương đồng với CDR M6 tương ứng được trình bày bằng SEQ ID NO:6, 7, 8, 10, 11 hoặc 12. CDR trong thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây có thể có độ tương đồng với CDR M6 là khoảng 100% được trình bày bằng SEQ ID NO:6, 7, 8, 10, 11 hoặc 12.

Thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây có thể liên kết IL-25 với ái lực về cơ bản tương tự với, hoặc lớn hơn, ái lực của kháng thể M6 được mô tả ở đây. Ví dụ, thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây có thể có ái lực liên kết đối với IL-25 (ví dụ, IL-25 người) là 50pM (ví dụ, 53pM) trở xuống, như, ví dụ, 45pM, 40pM, 35pM, 30pM, 25pM hoặc 20pM. Thành phần liên kết đích thường đặc hiệu với IL-25.

Vì vậy, thành phần liên kết đích sẽ không thể hiện sự liên kết đáng kể bất kỳ vào các phân tử không phải là (các) thành viên liên kết đặc hiệu của nó. Ví dụ, phát hiện được rằng kháng thể M6 được mô tả ở đây không phản ứng chéo với IL- 17A, IL- 17C, IL- 17D hoặc IL- 17F. Việc tránh tính phản ứng chéo như vậy với các xytokin khác liên can đến bệnh hen và các quy trình tương tự là đặc tính thích hợp của các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây.

Ái lực hoặc độ bền liên kết của thành phần liên kết đích kháng nguyên có thể được xác định bằng thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. (xem, ví dụ, Berzofsky et al., "Antibodies-Antigen Interactions," trong *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis, Immunology, W. H. Freeman và Company: New York, N.Y. (1992); và các phương pháp được mô tả ở đây). Ái lực được đo của một tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể có thể thay đổi nếu được đo dưới các điều kiện khác nhau (ví dụ, nồng độ muối, độ pH). Vì vậy, tốt hơn, nếu những phép đo của ái lực và các thông số liên kết kháng nguyên khác (ví dụ, KD, K_a , K_d) được thực hiện với dung dịch đã được chuẩn hóa của kháng thể và kháng nguyên, và chất đệm đã được chuẩn hóa, như chất đệm được mô tả ở đây.

Ví dụ, tính đặc hiệu có thể được xác định bằng thử nghiệm liên kết như ELISA sử dụng bằng các kháng nguyên, thử nghiệm Biacore và/hoặc thử nghiệm Octet, trong số những loại khác. Thành phần liên kết đích có thể nhận biết IL-25 và

không nhận biết các thành phần khác của họ IL-17, cụ thể là một thành phần bất kỳ của IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D và IL-17F; theo một phương án, tất cả năm trong số các phân tử này. Sự liên kết thành phần liên kết đích với IL-25 có thể bị triệt tiêu bởi sự cạnh tranh với IL-25 tái tổ hợp. Có thể so sánh ái lực liên kết và khả năng trung hòa của các thành phần liên kết đích khác nhau dưới những điều kiện thích hợp.

Ngoài ra, còn được bộc lộ ở đây là thành phần liên kết đích có tác dụng cạnh tranh để liên kết vào IL-25 với thành phần liên kết đích có tác dụng liên kết một hoặc nhiều trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 46-63 của SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 66-84 của SEQ ID NO: 17 và các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO: 17). Theo một phương án cụ thể, thành phần liên kết đích có ái lực liên kết đối với IL-25 người mà nhỏ hơn hoặc bằng 50pM.

Các thử nghiệm cạnh tranh có thể được thực hiện với thành phần liên kết đích (ví dụ, kháng thể) để xác định các protein, các kháng thể, và các chất đối kháng khác nào cạnh tranh để liên kết vào IL-25 với thành phần liên kết đích và/hoặc có chung vùng epitop. Như người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng biết được, những thử nghiệm này đánh giá sự cạnh tranh giữa các chất đối kháng hoặc các phối tử của một con số hạn chế các vị trí liên kết trên protein, ví dụ, IL-25. Protein và/hoặc kháng thể được giữ cố định hoặc chuyển thành dạng không tan trước khi hoặc sau khi cạnh tranh và mẫu đã được liên kết vào protein IL-25 được tách khỏi mẫu không được liên kết, ví dụ, bằng cách lắng gạn (trong đó protein/thành phần liên kết đích được chuyển thành dạng không tan trước) hoặc bằng cách quay ly tâm (trong đó protein/kháng thể được kết tủa sau phản ứng cạnh tranh). Đồng thời, có thể xác định tình trạng liên kết cạnh tranh qua tình trạng chức năng có bị thay đổi hay không bằng sự liên kết hoặc thiếu liên kết của thành phần liên kết đích vào protein, ví dụ, thành phần liên kết đích phân tử ức chế hay làm tăng hoạt tính enzym của, ví dụ, nguyên tử đánh dấu. ELISA và các thử nghiệm chức năng khác có thể được sử dụng, như đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các kháng thể

Tốt hơn, nếu thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây là phân tử kháng thể.

Thuật ngữ “kháng thể” là có ý bao hàm các kháng thể nguyên, các đoạn phân giải, các phần đặc hiệu và các biến thể của chúng, trong đó có các chất giả kháng thể hoặc các phần của các kháng thể có chức năng bắt chước cấu trúc và/hoặc chức năng của kháng thể hoặc đoạn đặc hiệu hoặc phần của chúng, trong đó có các kháng thể mạch đơn và các đoạn của chúng; mỗi loại chứa ít nhất một CDR. Các đoạn chức năng bao gồm các đoạn liên kết kháng nguyên có tác dụng liên kết vào IL-25 động vật có vú. Ví dụ, các mảnh kháng thể có khả năng liên kết vào IL-25 hoặc các phần của chúng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đoạn Fab (ví dụ, bởi sự phân giải nhờ enzym papain), Fab' (ví dụ, bởi sự phân giải nhờ pepsin và khử một phần) và F(ab')₂ (ví dụ, bởi sự phân giải nhờ pepsin), facb (ví dụ, bởi sự phân giải nhờ plasmin), pFc' (ví dụ, bởi sự phân giải nhờ pepsin hoặc plasmin), Fd (ví dụ, bởi sự phân giải nhờ pepsin, khử một phần và tái kết tụ), Fv hoặc scFv (ví dụ, bởi các kỹ thuật sinh học phân tử), được bao hàm bởi sáng chế (xem, ví dụ, Colligan, et al., biên tập, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994 2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997 2001)’;).

Có thể tạo ra các đoạn như vậy nhờ sự phân cắt bằng enzym, tổng hợp hoặc các kỹ thuật tái tổ hợp, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và/hoặc như được mô tả ở đây. Cũng có thể tạo ra các kháng thể theo một loạt dạng được cắt bằng cách sử dụng các gen kháng thể mà trong đó một hoặc nhiều codon mã hóa đầu cuối đã được đưa vào phía đầu nguồn của vị trí đầu cuối tự nhiên. Ví dụ, gen kết hợp mã hóa các phần chuỗi nặng F(ab')₂ có thể được thiết kế đến bao gồm các trình tự ADN mã hóa miền CH₁ và/hoặc vùng bản lề của chuỗi nặng. Các phần khác nhau của các kháng thể có thể được nối kết với nhau về phương diện hóa học bởi các kỹ thuật thông thường, hoặc có thể được điều chế ở dạng protein tiếp cận bằng cách sử dụng kỹ thuật thao tác gen.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” cũng có ý bao hàm kháng thể “thể khảm”, và các kháng thể “được làm giống như của người” hoặc “được ghép CDR” mà bao gồm dạng kết hợp bất kỳ của các CDR M6 được mô tả ở đây với một hoặc nhiều protein hoặc các peptit được dẫn xuất từ kháng thể không phải của chuột, tốt hơn, nếu là kháng thể người. Theo sáng chế, các kháng thể được làm giống như của người được tạo ra, trong đó các CDR được bắt nguồn từ kháng thể

M6. Các kháng thể khảm cũng được bộc lộ, trong đó các CDR được bắt nguồn từ kháng thể M6. Vì vậy, phần bắt nguồn từ người của kháng thể này có thể bao gồm các vùng mà về cơ bản không gây miễn dịch nơi con người. Các vùng của kháng thể mà được dẫn xuất từ các kháng thể người không cần có 100% tính đồng nhất với các kháng thể người. Theo một phương án ưu tiên, càng nhiều gốc axit amin người càng tốt được giữ lại để cho tính sinh miễn dịch là không đáng kể, nhưng các gốc của người có thể được cải biến khi cần thiết để hỗ trợ vị trí liên kết kháng nguyên được tạo bởi các CDR trong khi đồng thời, tối đa hóa mức được làm giống như của người của kháng thể. Tùy ý, tốt hơn, nếu những thay đổi hoặc biến đổi như vậy giữ lại hoặc làm giảm tính sinh miễn dịch nơi con người hoặc các loài khác so với các kháng thể không được cải biến. Có thể tạo ra kháng thể được làm giống như của người bằng tế bào động vật không phải người hoặc tế bào nhân sơ hoặc tế bào có nhân thực mà có khả năng biểu hiện các gen globulin miễn dịch người được tái sắp xếp theo chức năng (ví dụ, chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ). Ngoài ra, khi kháng thể là kháng thể mạch đơn, nó có thể bao gồm peptit liên kết mà không được tìm thấy nơi các kháng thể người nguyên thể. Ví dụ, Fv có thể bao gồm peptit liên kết, như hai đến tám glyxin hoặc các gốc axit amin khác, gốc này kết nối vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Các peptit liên kết như vậy được coi là có nguồn gốc từ người.

Theo cách khác, toàn bộ vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể M6 trong các Fig.4A và 4B (SEQ ID NOs: 5 và 9) có thể được kết hợp với vùng cố định và vùng khung của người để tạo ra kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Các gen của người mã hóa các vùng cố định (C) của thành phần liên kết đích của sáng chế có thể được dẫn xuất từ thư viện gen thai nhi người, bởi các phương pháp đã biết. Các gen vùng C của người có thể được dẫn xuất từ tế bào người bất kỳ trong đó có những loại biểu hiện và tạo ra các globulin miễn dịch người. Vùng CH người có thể được dẫn xuất từ phần tử bất kỳ trong số những nhóm hoặc isotyp đã biết của các chuỗi H của người, trong đó có gamma, mu., alpha., delta., epsilon, và các phân nhóm của chúng, như G1, G2, G3 và G4. Vì isotyp chuỗi H chịu trách nhiệm về các chức năng kích động khác nhau của kháng thể, sự chọn lựa vùng CH

sẽ được hướng dẫn bởi các chức năng kích động mong muốn, như cố định bổ thể, hoặc hoạt tính trong độc tính đối với tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC). Theo một phương án, vùng CH được dẫn xuất từ gamma 1 (IgG1).

Vùng CL của người có thể được dẫn xuất từ hoặc isotyp chuỗi L của người, kapa hoặc lambda, tốt hơn, nếu là kapa.

Có thể thu được gen mã hóa vùng C globulin miễn dịch người từ tế bào người bằng các kỹ thuật nhân dòng tiêu chuẩn (ví dụ, Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ấn bản thứ hai, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) và Ausubel et al., biên tập, *Current Protocols in Molecular Biology* (1987, 1993)). Các gen vùng C của người thì dễ dàng có được từ các dòng vô tính đã biết chứa gen đại diện cho hai nhóm của chuỗi L, năm nhóm của các chuỗi H và các phân nhóm của chúng. Mảnh kháng thể thể khảm, như $F(ab_1)_2$ và Fab, có thể được điều chế bằng cách thiết kế gen chuỗi H thể khảm mà được cắt cụt một cách thích hợp. Ví dụ, gen thể khảm mã hóa phần chuỗi H của đoạn $F(ab_1)_2$ sẽ bao gồm các trình tự ADN mã hóa miền CH_1 và vùng bản lề của chuỗi H, sau đó là codon kết thúc dịch mã để thu được phân tử bị cắt cụt.

Nhìn chung, trong một ví dụ, các kháng thể thể khảm, các đoạn và các vùng được bộc lộ ở đây được sản xuất bằng cách nhân dòng các đoạn ADN mã hóa vùng liên kết kháng nguyên chuỗi H và L của kháng thể M6, và nối kết các đoạn ADN này lần lượt vào các đoạn ADN mã hóa vùng CH và vùng CL, để tạo ra gen mã hóa globulin miễn dịch thể khảm.

Vì vậy, theo một phương án, gen thể khảm được dung hợp được tạo ra mà bao gồm đoạn ADN thứ nhất có chức năng mã hóa ít nhất là vùng liên kết kháng nguyên có nguồn gốc không phải từ người, như vùng V được tái sắp xếp về chức năng với đoạn liên kết (J), được liên kết vào đoạn ADN thứ hai mã hóa ít nhất một phần của vùng C của người.

Các trình tự của các vùng biến đổi của kháng thể M6 có thể được cải biến bằng các đoạn chèn, các đoạn thay thế và các đoạn xóa bỏ đến mức mà thành phần liên kết đích duy trì được khả năng liên kết vào và ức chế IL-25 người.

Vì sự thuận tiện, sơ đồ đánh số của Kabat *et al.*, đã được sử dụng ở đây.

Các gốc được ghi bằng các chữ số thường hoặc dấu gạch nối khi cần thiết để làm cho các trình tự này phù hợp với các trình tự được đánh số theo sơ đồ Kabat tiêu chuẩn.

Trong trường hợp của kháng thể được ghép CDR hoặc kháng thể được làm giống như của người, trong đó vùng CDR của kháng thể M6 được kết hợp với vùng có nguồn gốc từ người, có thể giữ lại các gốc trong vùng FR đặc thù với kháng thể mẹ, ví dụ, M6. Các gốc mà đã được chứng minh là quan trọng trong quá trình được làm giống như của người các kháng thể khác cũng có thể được giữ lại. Có thể tuân thủ những hướng dẫn này đến mức cần thiết để hỗ trợ vị trí liên kết kháng nguyên được tạo bởi các CDR trong khi đồng thời, tối đa hóa mức được làm giống như của người của kháng thể.

Cũng có thể sử dụng các phương pháp thao tác hoặc được làm giống như của người kháng thể không phải của người hoặc kháng thể người và những phương pháp này thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhìn chung, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể được thao tác có một hoặc nhiều gốc axit amin từ nguồn không phải của người, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuột, chuột cống, thỏ, linh trưởng không phải là người hoặc động vật có vú khác. Các gốc axit amin người này thường được gọi là các gốc “nhập khẩu”, gốc này thường được lấy từ miền biến đổi, miền ổn định hoặc miền “nhập khẩu” khác của trình tự người đã biết. Các trình tự Ig người đã biết được bộc lộ, ví dụ, trong một số cơ sở dữ liệu công cộng như cơ sở dữ liệu NCBI của National Institute of Health hoặc các xuất bản phẩm như Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983).

Có thể sử dụng những trình tự được nhập khẩu này để làm giảm tính sinh miễn dịch hoặc làm giảm, nâng cao hoặc cải biến sự liên kết, ái lực, tỷ lệ kết hợp, tỷ lệ phân ly, độ bền liên kết, tính đặc hiệu, thời gian bán hủy, hoặc các đặc điểm thích hợp bất kỳ khác, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhìn chung, có thể duy trì một phần hoặc tất cả các trình tự CDR của người hoặc không phải của người trong khi các trình tự không phải của người của vùng biến đổi và vùng cố định được thay thế bằng axit amin của người hoặc các axit amin khác.

Tùy ý, các kháng thể cũng có thể được làm giống như của người với việc giữ lại ái lực cao đối với kháng nguyên và các thuộc tính sinh học thuận lợi khác. Để đạt

được mục đích này, các kháng thể được làm giống như của người có thể được tùy ý điều chế bằng quy trình phân tích các trình tự mẹ và các sản phẩm được làm giống như của người khác nhau bằng cách sử dụng mô hình ba chiều của trình tự mẹ và trình tự được làm giống như của người. Các mô hình globulin miễn dịch ba chiều thì thường sẵn có và thân thuộc với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các chương trình máy vi tính thì sẵn có, những chương trình này minh họa và thể hiện các cấu trúc hình thể ba chiều có thể có của các trình tự globulin miễn dịch ứng viên được chọn. Việc kiểm tra những sự thể hiện này cho phép phân tích vai trò có thể có của các gốc trong hoạt động chức năng của trình tự globulin miễn dịch ứng viên, tức là, phân tích các gốc ảnh hưởng đến khả năng của globulin miễn dịch ứng viên trong việc liên kết kháng nguyên của nó. Bằng cách này, các gốc FR có thể được chọn và kết hợp từ trình tự liên ứng và trình tự nhập khẩu sao cho thu được đặc điểm kháng thể mong muốn, như ái lực tăng đối với (các) kháng nguyên đích. Nhìn chung, gốc CDR có liên can một cách trực tiếp và chủ yếu nhất đến quá trình gây ảnh hưởng đến sự liên kết kháng nguyên. Việc được làm giống như của người hoặc thao tác các kháng thể của sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết bất kỳ, như, nhưng không chỉ giới hạn ở những loại được mô tả trong, (Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534 (1988)), Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151 : 2296 (1993); Chothia và Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623 (1993), Patent Mỹ các số 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, PCT/US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246.

Vùng cố định bắt nguồn từ người của thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây có thể thuộc nhóm (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, v.v.) hoặc isotyp bất kỳ và có thể bao gồm chuỗi nhẹ kappa hoặc chuỗi nhẹ lambda. Theo một phương án, vùng cố định bắt nguồn từ người bao gồm chuỗi nặng IgG hoặc đoạn được xác định, ví dụ, ít nhất một trong các isotyp, IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Theo phương án khác, thành phần liên kết đích bao gồm chuỗi nặng IgG1 và chuỗi nhẹ IgG1 K. Thành

phần liên kết đích đã được phân lập được bộc lộ ở đây có thể bao gồm các trình tự axit amin kháng thể được bộc lộ ở đây được mã hóa bởi polynucleotit thích hợp bất kỳ. Tốt hơn, nếu thành phần liên kết đích liên kết IL-25 người và nhờ đó, trung hòa một phần hoặc về cơ bản ít nhất một hoạt tính sinh học của protein này. Thành phần liên kết đích, hoặc phần đặc hiệu hoặc biến thể của nó, một phần hoặc tốt hơn, nếu trung hòa về cơ bản ít nhất một hoạt tính sinh học của ít nhất một protein IL-25 hoặc đoạn và nhờ đó, ức chế các hoạt tính được tác động thông qua sự liên kết của IL-25 vào thụ thể IL-25 hoặc thông qua cơ chế phụ thuộc IL-25 hoặc cơ chế do IL-25 gây ra. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể trung hòa” được dùng để chỉ kháng thể mà có thể ức chế hoạt tính phụ thuộc IL-25 là 20-100%, tốt hơn, nếu bằng ít nhất là từ 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% trở lên tùy thuộc vào thử nghiệm này. Tốt hơn, nếu khả năng của thành phần liên kết đích trong việc ức chế hoạt tính phụ thuộc IL-25 được đánh giá bằng ít nhất một thử nghiệm protein IL-25 hoặc thử nghiệm thụ thể IL-25 thích hợp, như được mô tả ở đây và/hoặc như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ít nhất một kháng thể của sáng chế liên kết ít nhất một epitop được chỉ ra ở đây mà kháng thể M6 liên kết vào đó. Ít nhất một epitop có thể bao gồm ít nhất một vùng liên kết kháng thể mà bao gồm ít nhất một phần của protein, tốt hơn, nếu epitop này bao gồm ít nhất một phần ngoại bào, hòa tan được, ưa nước, bên ngoài hoặc phần tế bào chất của protein này. Nhìn chung, thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây sẽ bao gồm vùng liên kết kháng nguyên mà bao gồm ít nhất một vùng quyết định tính bổ sung (CDR1, CDR2 và CDR3) của SEQ ID các số 10, 11 và 12 hoặc biến thể của ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nặng và ít nhất một vùng quyết định tính bổ sung người (CDR1, CDR2 và CDR3) (SEQ ID NO 6, 7 và 8) hoặc biến thể của ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Các thành phần liên kết đích có tác dụng liên kết vào IL-25 người và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc các vùng CDR có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp, như thể hiện thể thực khuẩn (Katsube, Y., *et al.*, *Int J. Mol. Med.*, 1(5):863 868 (1998)) hoặc các phương pháp mà sử dụng các động vật chuyển gen, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và/hoặc như được mô tả ở đây. Ví dụ, kháng thể, phần được chỉ ra hoặc

biến thể có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng axit nucleic mã hóa hoặc phần của nó trong tế bào chủ thích hợp.

Sáng chế còn đề cập đến các kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên, chuỗi globulin miễn dịch và các CDR bao gồm các axit amin trong trình tự mà về cơ bản giống với trình tự axit amin M6 được mô tả ở đây. Kháng thể kháng IL-25 như vậy có thể bao gồm một hoặc nhiều đoạn thay thế axit amin, đoạn xóa bỏ axit amin hoặc đoạn thêm axit amin, hoặc từ những đột biến tự nhiên hoặc sự thao tác của con người, như được chỉ ra ở đây. Tốt hơn, nếu các kháng thể như vậy hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên và các kháng thể bao gồm những chuỗi như vậy hoặc các CDR có thể liên kết IL-25 người bằng ái lực cao (ví dụ, KD nhỏ hơn hoặc bằng 10-9M). Các trình tự axit amin mà về cơ bản là tương tự với các trình tự được mô tả ở đây bao gồm các trình tự bao gồm sự thay thế axit amin kiểu bảo toàn, cũng như sự xóa bỏ axit amin và/hoặc chèn axit amin. Sự thay thế axit amin kiểu bảo toàn được dùng để chỉ sự thay thế axit amin thứ nhất bằng axit amin thứ hai có thuộc tính hóa học và/hoặc thuộc tính vật lý (ví dụ, tích điện, cấu trúc, tính phân cực, tính kỵ nước/tính ưa nước) mà tương tự với những thuộc tính của axit amin thứ nhất. Sự thay thế kiểu bảo toàn bao gồm sự thay thế axit amin này bằng axit amin khác trong phạm vi các nhóm dưới đây: lysin (K), arginin (R) và histidin (H); aspartat (D) và glutamat (E); asparagin (N), glutamin (Q), serin (S), threonin (T), tyrosin (Y), K, R, H, D và E; alanin (A), valin (V), leuxin (L), isoleuxin (I), prolin (P), phenylalanin (F), tryptophan (W), metionin (M), xystein (C) và glyxin (G); F, W và Y; C, S và T.

Con số đoạn thay thế axit amin mà người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ thực hiện phụ thuộc vào nhiều nhân tố, trong đó có những loại được mô tả trên đây. Nói chung, con số đoạn thay thế, chèn hoặc xóa bỏ axit amin dùng cho kháng thể kháng-IL-25, đoạn hoặc biến thể đã cho bất kỳ sẽ không nhiều hơn 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1, như 1-30 hoặc khoảng hoặc trị số bất kỳ trong đó, như được chỉ ra ở đây.

Các axit amin trong thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây mà thiết yếu cho chức năng có thể được nhận diện bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như tạo đột biến hướng vị trí hoặc tạo đột biến nhờ quét vào alanin (ví dụ, Ausubel, trên đây, các chương 8, 15; *Cunningham and Wells, Science* 244: 1081-1085 (1989)). Quy trình sau đưa những đột biến alanin đơn lẻ ở mọi góc vào phân

tử. Sau đó, các phân tử đột biến thu được kiểm tra về hoạt tính sinh học, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một hoạt tính trung hòa IL-25. Các vị trí mà quan trọng đối với sự liên kết kháng thể cũng có thể được nhận diện bằng phép phân tích cấu trúc như kết tinh, cộng hưởng từ hạt nhân hoặc dán nhãn ái lực quang (Smith, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:899 904 (1992) và de Vos, *et al.*, *Science* 255:306 312(1992)).

Các thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một phần, trình tự hoặc dạng kết hợp được chọn từ 5 đến tất cả các axit amin tiếp cận của ít nhất một trong số SEQ ID các số từ:5-12.

Thành phần liên kết đích còn có thể tùy ý bao gồm polypeptit của ít nhất một trong số 70-100% các axit amin tiếp cận của ít nhất một trong các SEQ ID NO:5 hoặc 9.

Theo một phương án, trình tự axit amin của chuỗi globulin miễn dịch, hoặc phần của nó (ví dụ, vùng biến đổi, CDR) có 70-100% tính đồng nhất (ví dụ, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 hoặc khoảng hoặc trị số bất kỳ trong đó) với trình tự axit amin của chuỗi tương ứng của ít nhất một trong các SEQ ID NO:5 hoặc 9. Ví dụ, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có thể được so sánh với trình tự có SEQ ID NO:5, hoặc trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng có thể được so sánh với SEQ ID NO:9. Tốt hơn, nếu 70-100% tính đồng nhất axit amin (tức là, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 hoặc khoảng hoặc trị số bất kỳ trong đó) được xác định bằng cách sử dụng thuật toán vi tính thích hợp, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ được đưa ra trong SEQ ID NOs:5 và 9. Các thành phần liên kết đích của sáng chế, hoặc các biến thể được chỉ ra của chúng, có thể bao gồm con số bất kỳ của các gốc axit amin tiếp cận từ kháng thể của sáng chế, trong đó con số đó được chọn từ nhóm của các số nguyên bao gồm từ 10-100% con số các gốc tiếp cận trong thành phần liên kết đích. Tùy ý, trình tự con này của các axit amin tiếp cận có chiều dài ít nhất bằng từ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 axit amin trở lên, hoặc khoảng hoặc trị số bất kỳ trong đó. Ngoài ra, con số các trình tự con như vậy có thể là số nguyên bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 20, như ít nhất là 2, 3, 4, hoặc 5.

Như người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng, sáng chế bao gồm ít nhất một kháng thể có hoạt tính sinh học của sáng chế. Kháng thể có hoạt tính sinh học có hoạt tính đặc hiệu ít nhất bằng 20%, 30%, hoặc 40%, và tốt hơn, nếu là ít nhất bằng 50%, 60%, hoặc 70%, và tốt hơn cả, nếu là ít nhất bằng 80%, 90%, hoặc 95%, 100% hoạt tính đặc hiệu của kháng thể nguyên thể (không phải tổng hợp), nội sinh hoặc kháng thể đã biết và có liên quan. Các phương pháp thử nghiệm và các phép đo định lượng hoạt tính enzym và tính đặc hiệu trên cơ chất thì chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ.

Ngoài ra, các thành phần liên kết đích cũng được bộc lộ ở đây, những thành phần này được cải biến bằng việc gắn cộng hóa trị đối với gốc hữu cơ. Sự cải biến như vậy có thể tạo ra kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên có các thuộc tính được động được cải thiện (ví dụ, thời gian bán hủy trong huyết thanh *in vivo* tăng). Gốc hữu cơ có thể là nhóm polyme ưa nước mạch thẳng hoặc phân nhánh, nhóm axit béo, hoặc nhóm este của axit béo. Theo các phương án cụ thể, nhóm polyme ưa nước có thể có trọng lượng phân tử là 800 đến 120.000 Dalton và có thể là nhóm polyalkan glycol (ví dụ, polyetylen glycol (PEG), polypropylen glycol (PPG)), polyme carbohydrat, polyme axit amin hoặc polyvinyl pyrrolidon, và axit béo hoặc nhóm este của axit béo có thể bao gồm từ tám đến bốn mươi nguyên tử carbon.

Các thành phần liên kết đích được cải biến của sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc hữu cơ mà được liên kết cộng hóa trị, một cách trực tiếp hoặc một cách gián tiếp, vào kháng thể. Mỗi gốc hữu cơ mà được liên kết vào kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của sáng chế độc lập có thể là nhóm polyme ưa nước, nhóm axit béo hoặc nhóm este của axit béo. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “axit béo” bao hàm các axit monocarboxylic và các axit di-carboxylic. “Nhóm polyme ưa nước,” trong vai trò là thuật ngữ được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ một polyme hữu cơ tan được trong nước nhiều hơn trong octan.

Ví dụ, polylysin thì tan được trong nước nhiều hơn trong octan. Vì vậy, kháng thể được cải biến bằng gắn kết cộng hóa trị đối với polylysin được bao hàm bởi sáng chế.

Các polyme ưa nước thích hợp cho việc cải biến các kháng thể của sáng chế có thể là mạch thẳng hoặc phân nhánh và bao gồm, ví dụ, các polyalkan glycol (ví dụ, PEG, monometoxy-polyetylen glycol (mPEG), PPG và các chất tương tự),

carbohydrat (ví dụ, dextran, xenluloza, oligosacarit, polysacarit và các chất tương tự), các polyme của axit amin ưa nước (ví dụ, polylysin, polyarginin, polyaspartat và các chất tương tự), polyalkan oxit (ví dụ, polyetylen oxit, polypropylen oxit và các chất tương tự) và polyvinyl pyrolidon.

Tốt hơn, nếu polyme ưa nước có tác dụng cải biến kháng thể của sáng chế có trọng lượng phân tử là 800 đến 150.000 Dalton ở dạng thực thể phân tử tách biệt.

Ví dụ, PEG₅₀₀₀ và PEG_{20.000}, trong đó chỉ số dưới là trọng lượng phân tử trung bình của polyme tính bằng Dalton, có thể được sử dụng. Nhóm polyme ưa nước có thể được thể bằng một đến sáu nhóm alkyl, axit béo hoặc nhóm este của axit béo. Các polyme ưa nước mà được thể bằng nhóm axit béo hoặc nhóm este của axit béo có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp. Ví dụ, polyme bao gồm nhóm amin có thể được kết cặp với carboxylat của axit béo hoặc este của axit béo, và carboxylat đã được hoạt hóa (ví dụ, được hoạt hóa bằng N,N-carbonyl diimidazol) trên axit béo hoặc este của axit béo có thể được kết cặp với nhóm hydroxyl trên polyme.

Các axit béo và các este của axit béo thích hợp cho việc cải biến các kháng thể của sáng chế có thể là no hoặc có thể chứa một hoặc nhiều đơn vị chưa no. Các axit béo thích hợp cho việc cải biến các kháng thể của sáng chế bao gồm, ví dụ, n-dodecanoat (C12, laurat), n-tetradecanoat (C14, myristat), n-octadecanoat (C18, stearat), n-eicosanoat (C20, arachidat), n-docosanoat (C22, behenat), n-triacontanoat (C30), n-tetracontanoat (C40), cis-DELTA9-octadecanoat (C18, oleat), tất cả cis-DELTAS5,8,11,14-eicosatetraenoat (C20, arachidonat), axit octanedioic, axit tetradecanedioic, axit octadecanedioic, axit docosanedioic và các chất tương tự.

Các este của axit béo thích hợp bao gồm mono-este của các axit dicarboxylic mà bao gồm nhóm alkyl thấp mạch thẳng hoặc phân nhánh. Nhóm alkyl thấp có thể bao gồm từ một đến mười hai, tốt hơn, nếu là từ một đến sáu, nguyên tử cacbon.

Các thành phần liên kết đích được cải biến có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp, như bằng phản ứng với một hoặc nhiều tác nhân cải biến. Thuật ngữ “tác nhân cải biến” được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ nhóm hữu cơ thích hợp (ví dụ, polyme ưa nước, axit béo, este của axit béo) mà bao gồm nhóm hoạt hóa. “Nhóm hoạt hóa” là gốc hóa học hoặc nhóm chức mà có thể, dưới những điều kiện thích hợp, phản ứng với nhóm hóa học thứ hai, nhờ đó tạo ra liên

kết cộng hóa trị giữa tác nhân cải biến và nhóm hóa học thứ hai. Ví dụ, các nhóm hoạt hóa có tính phản ứng với amin bao gồm các nhóm ái điện tử như tosylat, 1, halo (clo, brom, flo, iot), N-hydroxysuxinimidyl este (NHS) và các chất tương tự. Các nhóm hoạt hóa mà có thể phản ứng với thiol bao gồm, ví dụ, maleimit, iodoaxetyl, acryloyl, pyridyl disulfua, thiol của axit 5-thiol- 2-nitrobenzoic (TNB-thiol) và các chất tương tự. Nhóm chức aldehyt có thể được kết cặp đến phân tử chứa amin hoặc phân tử chứa hydrazit, và nhóm azit có thể phản ứng với nhóm phosphor hóa trị ba để tạo liên kết phosphoramidat hoặc liên kết phosphorimit.

Các phương pháp thích hợp để đưa các nhóm hoạt hóa vào phân tử thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)). Nhóm hoạt hóa có thể được liên kết một cách trực tiếp vào nhóm hữu cơ (ví dụ, polyme ưa nước, axit béo, este của axit béo), hoặc thông qua gốc liên kết, ví dụ, nhóm C₁ C₁₂ hóa trị hai trong đó một hoặc nhiều nguyên tử carbon có thể được thay thế bằng một nguyên tử khác loại như oxy, nito hoặc lưu huỳnh. Các gốc liên kết thích hợp bao gồm, ví dụ, tetraetylen glycol, --(CH₂)₃--, --NH--(CH₂)₆--NH--, --(CH₂)₂--NH-- và --CH₂--O--CH₂--CH₂--O--CH₂--CH₂--O--CH--NH. Tác nhân cải biến mà bao gồm gốc liên kết có thể được sản xuất, ví dụ, bằng cách cho một mono-Boc-alkyldiamin (ví dụ, mono-Boc-etylendiamin, mono-Boc-diaminohexan) phản ứng với axit béo với sự có mặt của 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) carbodiimit (EDC) để tạo liên kết amit giữa amin tự do và carboxylat của axit béo. Nhóm bảo vệ Boc có thể được loại bỏ khỏi sản phẩm bằng cách xử lý với axit trifloaxetic (TFA) để để lộ amin bậc nhất mà có thể được kết cặp với một carboxylat khác như được mô tả, hoặc có thể được cho phản ứng với anhydrit của maleic và sản phẩm thu được tạo vòng để tạo ra dẫn xuất maleimido được hoạt hóa của axit béo. (xem, ví dụ, Thompson, *et al.*, WO92/16221).

Các thành phần liên kết đích được cải biến được bộc lộ ở đây có thể được sản xuất bằng cách cho kháng thể người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên phản ứng với tác nhân cải biến. Ví dụ, gốc hữu cơ có thể được liên kết vào kháng thể theo phương thức không đặc hiệu vị trí bằng cách sử dụng tác nhân cải biến có tính phản ứng với amin, ví dụ, NHS este của PEG. Cũng có thể điều chế đoạn liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể người được cải biến bằng cách khử cầu liên kết disulfua (ví dụ, cầu

liên kết disulfua trong chuỗi) của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên. Sau đó, có thể cho kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên được khử phản ứng với tác nhân cải biến có tính phản ứng với thiol để tạo ra kháng thể được cải biến của sáng chế. Đoạn liên kết kháng nguyên và kháng thể người được cải biến bao gồm gốc hữu cơ mà được liên kết vào các vị trí đặc hiệu của kháng thể của sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp, như thủy phân protein thuận nghịch (Fisch *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3: 147 153 (1992); Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:411 417 (1 994); Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10):2233 224 1 (1 997); Itoh *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59 68 (1996); Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456 463 (1997)), và các phương pháp được mô tả trong Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996).

Các thành phần liên kết đích hữu ích trong các phương pháp và các chế phẩm được bộc lộ ở đây được đặc trưng bởi sự liên kết ái lực cao vào IL-25 và tùy ý có tính độc thấp. Cụ thể, thành phần liên kết đích được bộc lộ ở đây, trong đó các hợp phần riêng biệt, như vùng biến đổi, vùng cố định và khung, xét riêng và/hoặc xét chung thì, tùy ý và tốt hơn, nếu sở hữu tính sinh miễn dịch thấp, thì hữu ích. Các thành phần liên kết đích mà có thể được sử dụng tùy ý là được đặc trưng bởi khả năng của chúng trong việc điều trị các bệnh nhân trong các khoảng thời gian kéo dài với tình trạng thuyên giảm có thể đo được của các triệu chứng và tính độc thấp và/hoặc có thể chấp nhận được. Tính sinh miễn dịch thấp và/hoặc có thể chấp nhận được và/hoặc ái lực cao, cũng như các thuộc tính thích hợp khác, can có thể đóng góp vào các kết quả điều trị thu được. “Tính sinh miễn dịch thấp” được định nghĩa ở đây là làm tăng các đáp ứng HAHA, HACA hoặc HAMA đáng kể nơi ít hơn 75%, hoặc tốt hơn, nếu ít hơn 50% số bệnh nhân được điều trị và/hoặc làm tăng hiệu giá thấp nơi bệnh nhân được điều trị (ít hơn 300, tốt hơn, nếu ít hơn 100 được đo bằng thử nghiệm miễn dịch enzym kháng nguyên kép) Elliott *et al.*, *Lancet* 344: 1125 1127 (1994).

Cũng có thể sử dụng kháng thể hai đặc hiệu, dị đặc hiệu, dị liên hợp hoặc các kháng thể tương tự là những kháng thể đơn dòng, được làm giống như của người, mà có tính đặc hiệu liên kết đối với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau. Trong trường hợp này, một trong các tính đặc hiệu liên kết là đối với ít nhất một protein IL-25, tính

đặc hiệu liên kết còn lại là đối với kháng nguyên bất kỳ khác. Các phương pháp sản xuất kháng thể hai đặc hiệu thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo truyền thống, sản xuất tái tổ hợp các kháng thể hai đặc hiệu là trên cơ sở sự đồng biểu hiện của hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, trong đó hai chuỗi nặng có tính đặc hiệu khác nhau (Milstein và Cuello, *Nature* 305:537 (1983)). Bởi vì của sự phân loại ngẫu nhiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, các khối tế bào lai (khối tế bào lai bốn) này tạo ra hỗn hợp tiềm năng của 10 phân tử kháng thể khác nhau, trong số đó, chỉ có một phân tử là có cấu trúc hai đặc hiệu chính xác.

Việc tinh chế phân tử chính xác, công việc mà thường được thực hiện bằng các bước sắc ký ái lực, thì khá nặng nề, và sản lượng sản phẩm là thấp. Các quy trình tương tự được bộc lộ, ví dụ, trong WO93/08829, Patent Mỹ các số 6,210,668, 6,193,967, 6,132,992, 6,106,833, 6,060,285, 6,037,453, 6,010,902, 5,989,530, 5,959,084, 5,959,083, 5,932,448, 5,833,985, 5,821,333, 5,807,706, 5,643,759, 5,601,819, 5,582,996, 5,496,549, 4,676,980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655 (1991), Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

IL-25

IL-25, còn được biết đến trong lĩnh vực này là IL-17E, là sẵn có từ các nguồn thương mại (ví dụ, R&D Systems, MN, Mỹ) hoặc có thể được nhân dòng hoặc được tổng hợp bằng cách tham chiếu các trình tự của IL-25 sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trình tự của IL-25 người (SEQ ID NO: 17) được thể hiện trong Fig.3. Đối với việc sản xuất kháng thể hoặc sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch, có thể sử dụng đoạn hoặc dạng kết hợp bất kỳ của các đoạn của protein IL-25 (ví dụ, protein IL-25 tái tổ hợp), cụ thể những loại được cắt đứt ở đầu cuối N. Ví dụ, IL-25 tái tổ hợp của người có trên thị trường (IL-17E) bao gồm trình tự protein hoàn chỉnh của Tyr 33-Gly 177 có số truy cập Q9H293) và IL-25 của chuột có bán trên thị trường bao gồm các gốc Val 17-Ala 169 của IL-17E chuột (Số truy cập NP_542767).

Các phân tử axit nucleic

Bằng cách sử dụng thông tin được đưa ra ở đây, có thể thu được phân tử axit nucleic theo sáng chế mã hóa ít nhất một kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng

nguyên của nó theo sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây hoặc như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các phân tử axit nucleic của sáng chế có thể ở dạng ARN, như ARN thông tin, ARN có nhân không đồng nhất, ARN vận chuyển hoặc dạng bất kỳ khác, hoặc ở dạng ADN, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ADN bổ trợ và ADN hệ gen thu được bằng cách nhân dòng hoặc được sản xuất bằng cách tổng hợp, hoặc các dạng kết hợp bất kỳ của chúng. ADN có thể là dài bội ba, dài kép hoặc dài đơn, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Phần bất kỳ của ít nhất một dài của ADN hoặc ARN có thể là dài ghi mã, còn được gọi là dài có nghĩa, hoặc nó có thể là dài không ghi mã, còn được gọi là dài đối nghĩa.

Các phân tử axit nucleic được phân lập của sáng chế có thể bao gồm các phân tử axit nucleic bao gồm khuôn đọc hở (ORF), tùy ý có một hoặc nhiều vùng nội, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một phần được chỉ ra của ít nhất một CDR, ở dạng CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 của ít nhất một chuỗi nặng (ví dụ, SEQ ID NOs: 10-12) hoặc chuỗi nhẹ (ví dụ, SEQ ID NOs:6-8); các phân tử axit nucleic bao gồm trình tự ghi mã của vùng biến đổi kháng IL-25 (ví dụ, SEQ ID NOs:5 hoặc 9); và các phân tử axit nucleic mà bao gồm trình tự nucleotit về cơ bản khác với những loại được mô tả trên đây nhưng phân tử này, do sự suy thoái của mã di truyền, vẫn mã hóa ít nhất một kháng thể kháng-IL-25 như được mô tả ở đây và/hoặc như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tất nhiên, mã di truyền thì đã biết rõ trong lĩnh vực này. Vì vậy, đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, việc đề tạo ra các biến thể axit nucleic suy biến mà ghi mã cho kháng thể kháng-IL-25 đặc hiệu của sáng chế là việc thường làm. Xem, ví dụ, Ausubel, *et al.*, trên đây, và các biến thể axit nucleic như vậy được bao hàm trong sáng chế.

Như được nêu ở đây, các phân tử axit nucleic của sáng chế mà bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể kháng-IL-25 có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, những loại mã hóa trình tự axit amin của chính mảnh kháng thể; trình tự ghi mã của toàn kháng thể hoặc một phần của nó; trình tự ghi mã của kháng thể, đoạn hoặc phần, cũng như các trình tự bổ sung, như trình tự ghi mã của ít nhất một peptit dung hợp hoặc dẫn đầu thông tin, có hoặc không có các trình tự ghi mã bổ sung được đề cập trên đây, như ít nhất một vùng nội, cùng với các trình tự không ghi mã, bổ sung, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự 5' và 3' không ghi mã, như các

trình tự được phiên mã, không được dịch mã mà đóng vai trò quan trọng trong quá trình phiên mã, xử lý ARN thông tin, trong đó có các tín hiệu tách vùng nội và polyadenyl hóa (ví dụ--liên kết ribosom và tính ổn định của ARN thông tin); trình tự ghi mã bổ sung có chức năng ghi mã cho các axit amin bổ sung, như những loại đem lại các chức năng bổ sung.

Vì vậy, trình tự mã hóa kháng thể có thể được dung hợp với trình tự gen đánh dấu, như trình tự mã hóa peptit tạo thuận lợi cho việc tinh chế kháng thể được dung hợp bao gồm phần hoặc mảnh kháng thể.

Các polynucleotit lai một cách chọn lọc với polynucleotit nào đó

Sáng chế đề cập đến các axit nucleic được phân lập có chức năng lai dưới các điều kiện lai chọn lọc thành polynucleotit được bộc lộ ở đây. Vì vậy, các polynucleotit của phương án này có thể được sử dụng để phân lập, phát hiện, và/hoặc định lượng các axit nucleic bao gồm các polynucleotit như vậy. Ví dụ, các polynucleotit của sáng chế có thể được sử dụng để nhận diện, phân lập, hoặc khuếch đại những dòng vô tính một phần hoặc dòng vô tính có độ dài đầy đủ trong thư viện được kết tụ. Theo một số phương án, polynucleotit là trình tự ADN hệ gen hoặc trình tự ADN bổ trợ được phân lập, hoặc bổ sung cho, ADN bổ trợ từ thư viện axit nucleic của người hoặc của động vật có vú.

Tốt hơn, nếu thư viện ADN bổ trợ bao gồm ít nhất 80% trình tự có độ dài đầy đủ, tốt hơn, nếu là ít nhất bằng 85% hoặc 90% trình tự có độ dài đầy đủ, và càng tốt hơn, nếu là ít nhất bằng 95% trình tự có độ dài đầy đủ. Thư viện ADN bổ trợ có thể được chuẩn hóa để làm tăng khả năng trình diện của các trình tự hiếm. Các điều kiện lai có tính chặt chẽ thấp hoặc vừa phải thì thường, nhưng không loại trừ, được sử dụng với các trình tự có tính đồng nhất trình tự được giảm xuống so với các trình tự bổ sung. Các điều kiện có tính chặt chẽ vừa phải và cao có thể được tùy ý sử dụng cho các trình tự có tính đồng nhất cao hơn. Các điều kiện có tính chặt chẽ thấp cho phép có sự lai chọn lọc các trình tự có 70% tính đồng nhất trình tự và có thể được sử dụng để nhận diện trình tự di truyền thẳng hoặc không thẳng.

Tùy ý, các polynucleotit của sáng chế này có thể mã hóa ít nhất một phần của kháng thể được mã hóa bởi các polynucleotit được mô tả ở đây. Các polynucleotit của sáng chế này bao hàm các trình tự axit nucleic mà có thể được sử dụng cho quá

trình lai chọn lọc thành polynucleotit mã hóa kháng thể của sáng chế. Xem, ví dụ, Ausubel, trên đây; Colligan, trên đây.

Cấu trúc axit nucleic

Có thể tạo ra axit nucleic được phân lập của sáng chế bằng cách sử dụng (a) các phương pháp tái tổ hợp, (b) các kỹ thuật tổng hợp, (c) các kỹ thuật tinh chế, các dạng kết hợp của chúng, như đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuận tiện là, các axit nucleic có thể bao gồm các trình tự ngoài polynucleotit của sáng chế ra. Ví dụ, vị trí đa vô tính bao gồm một hoặc nhiều vị trí giới hạn endonucleaza có thể được lồng vào axit nucleic để hỗ trợ việc phân lập polynucleotit. Đồng thời, các trình tự có thể dịch mã có thể được chèn vào để hỗ trợ việc phân lập polynucleotit được dịch mã của sáng chế. Ví dụ, trình tự gen đánh dấu hexahistidin đem lại phương tiện thuận tiện để tinh chế các protein của sáng chế. Axit nucleic của sáng chế--không kể trình tự ghi mã--tùy ý là vectơ, đoạn làm thích ứng, hoặc gốc liên kết để nhân dòng và/hoặc sự biểu hiện của polynucleotit của sáng chế.

Có thể bổ sung các trình tự bổ sung vào trình tự nhân dòng và/hoặc trình tự biểu hiện như vậy để tối ưu hóa chức năng của chúng trong việc nhân dòng và/hoặc biểu hiện, để hỗ trợ việc phân lập polynucleotit, hoặc để cải thiện việc đưa polynucleotit vào tế bào. Cách sử dụng vectơ nhân dòng, vectơ biểu hiện, đoạn làm thích ứng, và gốc liên kết thì đã biết rõ trong lĩnh vực này. (xem, ví dụ, Ausubel, trên đây; hoặc Sambrook, trên đây).

Các phương pháp tái tổ hợp dùng để cấu trúc axit nucleic

Các chế phẩm axit nucleic được phân lập của sáng chế này, như ARN, ADN bổ trợ, ADN hệ gen, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng, có thể thu được từ nguồn sinh học bằng cách sử dụng con số bất kỳ của các phương pháp nhân dòng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, các đoạn oligonucleotit mà lai một cách chọn lọc, dưới các điều kiện chặt chẽ, thành các polynucleotit của sáng chế được sử dụng để nhận diện trình tự mong muốn trong thư viện ADN bổ trợ hoặc ADN hệ gen. Việc phân lập ARN, và cấu trúc ADN bổ trợ và các thư viện hệ gen, thì đã biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. (Xem, ví dụ, Ausubel, trên đây; hoặc Sambrook, trên đây)

Sàng lọc axit nucleic và các phương pháp phân lập

Thư viện ADN bổ trợ hoặc thư viện ADN hệ gen có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng đoạn dò trên cơ sở trình tự của polynucleotit của sáng chế, như những loại được bộc lộ ở đây. Các đoạn dò có thể được sử dụng để lai với các trình tự ADN hệ gen hoặc ADN bổ trợ để phân lập gen tương đồng trong cùng một sinh vật hoặc trong các sinh vật khác nhau. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ nhìn nhận rằng độ chặt chẽ khác nhau của việc lai có thể được sử dụng trong thử nghiệm này; và hoặc việc lai hoặc môi trường rửa có thể là chặt chẽ. Khi các điều kiện của việc lai trở nên chặt chẽ hơn, thì phải có độ bổ sung cao hơn giữa đoạn dò và đích dùng cho việc tạo đoạn lặp kép xảy ra. Độ chặt chẽ có thể được kiểm soát bằng một hoặc nhiều yếu tố trong số nhiệt độ, lực ion, độ pH và sự có mặt của dung môi gây biến tính một phần như formamit. Ví dụ, sự chặt chẽ của việc lai được thay đổi một cách thuận tiện bằng cách thay đổi tính phân cực của dung dịch chất phản ứng thông qua, ví dụ, việc điều chỉnh nồng độ của formamit trong khoảng từ 0% đến 50%. Độ bổ sung (tính đồng nhất trình tự) cần thiết cho tình trạng liên kết có thể phát hiện được sẽ thay đổi theo mức chặt chẽ của môi trường lai và/hoặc môi trường rửa. Tối ưu, độ bổ sung sẽ là 100%, hoặc 70 đến 100%, hoặc khoảng hoặc trị số bất kỳ trong đó. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng những thay đổi trình tự nhẹ trong các đoạn dò và đoạn môi có thể được bù bằng cách làm giảm mức chặt chẽ của việc lai và/hoặc môi trường rửa.

Phương pháp khuếch đại ARN hoặc ADN thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng theo sáng chế mà không cần thực hiện thử nghiệm quá mức, trên cơ sở sự chỉ bảo và hướng dẫn được trình bày ở đây. Các phương pháp đã biết của việc khuếch đại ADN hoặc ARN bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và các quy trình khuếch đại có liên quan (xem, ví dụ, Patent Mỹ các số 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, cấp cho Mullis, *et al.*; Patent Mỹ các số 4,795,699 và 4,921,794 cấp cho Tabor, *et al.*; Patent Mỹ số 5,142,033 cấp cho Innis; Patent Mỹ số 5,122,464 cấp cho Wilson, *et al.*; Patent Mỹ số 5,091,310 cấp cho Innis; Patent Mỹ số 5,066,584 cấp cho Gyllensten, *et al.*; Patent Mỹ số 4,889,818 cấp cho Gelfand, *et al.*; Patent Mỹ số 4,994,370 cấp cho Silver, *et al.*; Patent Mỹ số 4,766,067 cấp cho Biswas; Patent Mỹ số 4,656,134 cấp cho Ringold) và khuếch đại qua trung gian ARN mà sử dụng ARN đối nghĩa đối với trình tự đích trong vai trò là khuôn mẫu cho phép tổng hợp ADN dài kép

(Patent Mỹ số 5,130,238 cấp cho Malek, *et al*, với tên thương mại là NASBA), (Xem, ví dụ, Ausubel, trên đây; hoặc Sambrook, trên đây).

Chẳng hạn, có thể sử dụng công nghệ phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để khuếch đại các trình tự của các polynucleotit của sáng chế và các gen có liên quan một cách trực tiếp từ thư viện ADN hệ gen hoặc thư viện ADN bổ trợ. PCR và các phương pháp khuếch đại *in vitro* khác cũng có thể hữu ích, ví dụ, trong việc nhân dòng các trình tự axit nucleic có chức năng ghi mã cho protein sẽ được biểu hiện, để tạo các axit nucleic để sử dụng làm đoạn dò nhằm phát hiện sự có mặt của ARN thông tin mong muốn trong các mẫu, cho việc giải trình tự axit nucleic, hoặc cho các mục đích khác. Các ví dụ về kỹ thuật đủ để hướng dẫn người có hiểu biết trong lĩnh vực này thông qua các phương pháp khuếch đại *in vitro* được tìm thấy trong Berger, trên đây, Sambrook, trên đây, và Ausubel, trên đây, cũng như Mullis, *et al.*, Patent Mỹ số 4,683,202 (1987); và Innis, *et al.*, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, biên tập, Academic Press Inc., San Diego, Calif. (1990). Các kit có bán trên thị trường dùng cho sự khuếch đại bằng PCR hệ gen thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Ưu điểm-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Ngoài ra, ví dụ, protein gen 32 của T4 (Boehringer Mannheim) có thể được sử dụng để cải thiện hiệu suất của các sản phẩm PCR dài.

Các phương pháp tổng hợp dùng để cấu trúc axit nucleic

Cũng có thể điều chế các axit nucleic được phân lập của sáng chế bằng phép tổng hợp hóa học trực tiếp theo các phương pháp đã biết (xem, ví dụ, Ausubel, *et al.*, trên đây). Phép tổng hợp hóa học thường tạo ra oligonucleotit dài đơn, oligonucleotit này có thể được chuyển hóa thành ADN dài kép bằng việc lai với trình tự bổ sung, hoặc bằng sự polyme hóa với ADN polymeraza bằng cách sử dụng dài đơn làm khuôn mẫu. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhìn nhận rằng trong khi phép tổng hợp hóa học đối với ADN có thể bị giới hạn vào các trình tự có độ dài từ 100 bazơ trở lên, thì có thể thu được các trình tự dài hơn bằng cách buộc các trình tự ngắn hơn.

Catxet biểu hiện tái tổ hợp

Sáng chế còn đề cập đến catxet biểu hiện tái tổ hợp bao gồm axit nucleic của sáng chế. Trình tự axit nucleic của sáng chế, ví dụ, ADN bổ trợ hoặc trình tự hệ gen mã hóa kháng thể của sáng chế, có thể được sử dụng để cấu trúc catxet biểu hiện tái

tổ hợp mà có thể được đưa vào ít nhất một tế bào chủ mong muốn. Catxet biểu hiện tái tổ hợp thường bao gồm polynucleotit của sáng chế được liên kết theo kiểu có thể chỉ huy vào các trình tự điều hòa khởi mào phiên mã mà sẽ dẫn dắt quá trình phiên mã của polynucleotit trong tế bào chủ dự định. Cả các gen khởi đầu dị tương đồng và phi dị tương đồng (tức là, nội sinh) có thể được sử dụng để dẫn dắt quá trình biểu hiện của các axit nucleic của sáng chế.

Theo một số phương án, axit nucleic được phân lập mà đóng vai trò là gen khởi đầu, gen tăng cường, hoặc các phần tử khác có thể được đưa vào vị trí thích hợp (đầu nguồn, cuối nguồn hoặc trong vùng nội) của dạng phi dị tương đồng của polynucleotit của sáng chế để điều hòa thuận hoặc điều hòa ngược sự biểu hiện của polynucleotit của sáng chế. Ví dụ, các gen khởi đầu nội sinh có thể được thay đổi *in vivo* hoặc *in vitro* bằng đột biến, xóa bỏ và/hoặc thay thế.

Vectơ và tế bào vật chủ

Sáng chế còn đề cập đến các vectơ bao gồm các phân tử axit nucleic được phân lập của sáng chế, các tế bào chủ mà được thao tác về mặt di truyền với các vectơ tái tổ hợp, và việc sản xuất ít nhất một kháng thể kháng-IL-25 bởi các kỹ thuật tái tổ hợp, thì đã biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Sambrook, *et al.*, trên đây; Ausubel, *et al.*, trên đây.

Các polynucleotit nó có thể được tùy ý liên kết vào vectơ chứa gen đánh dấu có thể chọn lựa được để phát tán trong vật chủ. Nhìn chung, vectơ plasmit được đưa vào một chất kết tủa, như chất kết tủa canxi phosphat, hoặc vào phức chất có lipit mang điện. Nếu vectơ là virus, thì nó có thể được đóng gói *in vitro* bằng cách sử dụng dòng tế bào đóng gói thích hợp và sau đó, được tải nạp vào các tế bào vật chủ.

Vật chèn ADN cần phải được liên kết theo kiểu có thể chỉ huy vào gen khởi đầu thích hợp. Các cấu trúc biểu hiện sẽ chứa các vị trí dùng cho việc khởi đầu phiên mã, kết thúc phiên mã và, trong vùng được phiên mã, vị trí liên kết ribosom dùng cho việc dịch mã. Tốt hơn, nếu phần ghi mã của sản phẩm phiên mã đầy đủ được biểu hiện bởi các cấu trúc bao gồm sự dịch mã khởi đầu ở phần đầu và codon kết thúc (ví dụ, UAA, UGA hoặc UAG) được định vị một cách thích hợp ở đầu mút của ARN thông tin sẽ được dịch mã, với UAA và UAG được ưu tiên cho quá trình biểu hiện tế bào động vật có vú hoặc biểu hiện tế bào có nhân thực.

Tốt hơn, nhưng tùy ý, nếu vectơ biểu hiện bao gồm ít nhất một gen đánh dấu có thể chọn lựa được. Gen đánh dấu như vậy bao gồm, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, metotrexat (MTX), dihydrofolat reductaza (DHFR, Patent Mỹ các số 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017, ampixilin, neomycin (G418), axit mycophenolic, hoặc glutamin syntetaza (GS, Patent Mỹ các số 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739) gen kháng dùng cho nuôi cấy tế bào có nhân thực, và các gen kháng tetracyclin hoặc ampixilin dùng để nuôi cấy trong *E. coli* và các vi khuẩn khác hoặc sinh vật nhân sơ (các Patent trên đây được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Điều kiện và môi trường nuôi cấy thích hợp tế bào CHO chủ được mô tả trên đây thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vectơ thích hợp thì người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng nhận biết. Có thể thực hiện việc đưa cấu trúc vectơ vào tế bào chủ bằng chuyển nhiễm canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-dextran, chuyển nhiễm qua trung gian lipit cation, mở lỗ bằng xung điện, tải nạp, gây nhiễm hoặc các phương pháp đã biết khác. Các phương pháp như vậy được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này, như Sambrook, trên đây, các chương 14 và 16, 18; Ausubel, trên đây, các chương 1, 9, 13, 15, 16.

Ít nhất một kháng thể của sáng chế có thể được biểu hiện ở dạng được cải biến, như protein dung hợp, và có thể bao gồm không chỉ tín hiệu tiết, mà còn vùng chức năng dị tương đồng bổ sung. Ví dụ, vùng của các axit amin bổ sung, cụ thể là các axit amin mang điện, có thể được bổ sung vào đầu cuối N của kháng thể để cải thiện tính ổn định và sự tồn tại trong tế bào chủ này, trong suốt tinh chế, hoặc trong suốt quá trình vận chuyển và lưu trữ kế tiếp. Đồng thời, các gốc peptit có thể được bổ sung vào kháng thể của sáng chế để tạo thuận lợi cho việc tinh chế. Các vùng này có thể được loại bỏ trước bước điều chế kháng thể cuối cùng hoặc ít nhất một đoạn của nó. Các phương pháp như vậy được mô tả trong nhiều sổ tay phòng thí nghiệm tiêu chuẩn, như Sambrook, trên đây, các chương 17.29 17.42 và 18.1 18.74; Ausubel, trên đây, các chương 16, 17 và 18.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này thì thông thạo nhiều hệ thống biểu hiện khác nhau sẵn có cho việc biểu hiện axit nucleic mã hóa protein của sáng chế.

Theo cách khác, các axit nucleic của sáng chế có thể được biểu hiện trong tế bào chủ bằng cách khởi động (bằng thao tác) trong tế bào chủ chứa ADN nội sinh mã hóa kháng thể của sáng chế. Các phương pháp như vậy thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, như được mô tả trong Patent Mỹ các số 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746, và 5,733,761.

Mình họa cho sự nuôi cấy tế bào hữu ích cho việc sản xuất các kháng thể, các phần đặc hiệu hoặc các biến thể của chúng, là các tế bào động vật có vú. Các hệ thống tế bào động vật có vú thường ở dạng lớp đơn của các tế bào mặc dầu các huyền phù tế bào động vật có vú hoặc các thiết bị phản ứng sinh học cũng có thể được sử dụng. Một số dòng tế bào chủ thích hợp có khả năng biểu hiện protein được glycosyl hóa nguyên vẹn đã được phát triển trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm các dòng tế bào COS-1 (ví dụ, ATCC CRL 1650), COS-7 (ví dụ, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (ví dụ, ATCC CRL-10), CHO (ví dụ, ATCC CRL 1610) và BSC-1 (ví dụ, ATCC CRL-26), tế bào Cos-7, tế bào CHO, tế bào hep G2, P3X63Ag8.653, tế bào SP2/0-Ag14,293, tế bào HeLa và các loại tương tự, những loại này thì dễ dàng có được từ, ví dụ, American Type Culture Collection, Manassas, Va. ([world wide web.atcc.org](http://world.wide.web.atcc.org)). Các tế bào vật chủ được ưu tiên bao gồm các tế bào có nguồn gốc bạch huyết như tế bào u tủy và tế bào u bạch huyết. Các tế bào chủ được đặc biệt ưu tiên là tế bào P3X63Ag8.653 (ATCC Accession Number CRL-1580) và tế bào SP2/0-Ag14 (ATCC Accession Number CRL-1851). Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, tế bào tái tổ hợp là tế bào P3X63Ab8.653 hoặc tế bào SP2/0-Ag14.

Các vector biểu hiện dùng cho các tế bào này có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự kiểm soát sự biểu hiện dưới đây, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, điểm khởi đầu sao chép; gen khởi đầu (ví dụ, gen khởi đầu SV40 muộn hoặc sớm, gen khởi đầu CMV (Patent Mỹ các số 5,168,062; 5,385,839), gen khởi đầu HSV tk, gen khởi đầu pgk (phosphoglyxerat kinaza), gen khởi đầu EF-1 alpha (Patent Mỹ số 5,266,491), ít nhất một gen khởi đầu globulin miễn dịch của người; gen tăng cường, và/hoặc vị trí xử lý thông tin, như các vị trí liên kết ribosom, vị trí tách ARN vùng nội, vị trí polyadenyl hóa (ví dụ, vị trí bổ sung poly A kháng nguyên T virus 40 của khi), và trình tự kết thúc quá trình phiên mã. Xem, ví dụ, Ausubel *et al.*, trên đây;

Sambrook, *et al.*, trên đây. Các tế bào khác hữu ích cho việc sản xuất các axit nucleic hoặc protein của sáng chế thì đã biết và/hoặc sẵn có, ví dụ, từ American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org) hoặc các nguồn đã biết hoặc nguồn thương mại khác.

Khi tế bào chủ nhân thực được sử dụng, các trình tự kết thúc phiên mã hoặc polyadenyl hóa thường được sát nhập vào vector. Một ví dụ về trình tự gen kết thúc là trình tự polyadenyl hóa từ gen hormon sinh trưởng bò. Cũng có thể bao gồm cả các trình tự dùng cho việc tách vùng nội chính xác các sản phẩm phiên mã. Một ví dụ về trình tự tách vùng nội là vùng nội VP1 từ SV40 (Sprague, *et al.*, J. Virol. 45:773

781 (1983)). Ngoài ra, các trình tự gen kiểm soát quá trình sao chép trong tế bào chủ có thể được sát nhập vào vector, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chế phẩm

Sáng chế còn đề cập đến ít nhất một chế phẩm thành phần liên kết đích bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất từ sáu thành phần liên kết đích trở lên, như được mô tả ở đây và/hoặc như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này mà được tạo ra trong dạng, hỗn hợp hoặc chế phẩm không có trong tự nhiên. Tỷ lệ phần trăm chế phẩm như vậy là theo trọng lượng, thể tích, nồng độ, nồng độ phân tử gam thể tích, hoặc nồng độ phân tử gam trọng lượng ở dạng dung dịch lỏng hoặc dung dịch khô, hỗn hợp, huyền phù, nhũ tương hoặc dung dịch keo, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được mô tả ở đây.

Các chế phẩm theo sáng chế còn có thể chứa ít nhất một trong số lượng hữu hiệu và thích hợp của chế phẩm hoặc dược phẩm chứa ít nhất một thành phần liên kết đích kháng IL-25 cho tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân cần đến sự điều biến, điều trị hoặc liệu pháp như vậy, tùy ý còn bao gồm ít nhất một chất được chọn từ ít nhất một chất đối kháng TNF (ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, đoạn hoặc kháng thể TNF, đoạn hoặc thụ thể TNF hòa tan được, protein dung hợp của chúng, hoặc chất đối kháng TNF phân tử nhỏ), chất chống thấp khớp (ví dụ, metotrexat, auranofin, aurothioglucosa, azathioprin, etanercept, vàng natri thiomalat, hydroxycloquin sulfat, leflunomide, sulfasalzin), chất làm giãn cơ, chất gây ngủ, thuốc chống viêm không steroid (NSAID), chất giảm đau, chất gây tê, thuốc an thần, chất gây tê cục bộ, chất chẹn thần kinh-cơ, chất chống vi sinh vật (ví

dụ, aminoglycosit, chất chống nấm, chất chống ký sinh trùng, chất chống virus, carbapenem, cephalosporin, floquinolon, macrolit, penixilin, sulfonamid, tetracyclin, một chất chống vi sinh vật khác), chất trị bệnh vẩy nến, corticosteroid, steroid đồng hóa, chất liên quan đến bệnh đái tháo đường, chất khoáng, chất dinh dưỡng, tác nhân tuyến giáp, vitamin, hormon liên quan đến canxi, chất chống tiêu chảy, chất chống ho, chất chống nôn, chất chống loét, chất nhuận tràng, chất chống đông, erythropoietin (ví dụ, epoetin alpha), filgrastim (ví dụ, G-CSF, Neupogen), sargramostim (GM-CSF, Leukine), chất tạo miễn dịch, globulin miễn dịch, chất ức chế miễn dịch (ví dụ, basiliximab, cyclosporin, daclizumab), hormon sinh trưởng, thuốc thay thế hormon, chất điều biến thụ thể estrogen, thuốc giãn đồng tử, tác nhân làm liệt cơ thể mi, chất alkyl hóa, chất chống chuyển hóa, chất ức chế gián phân, dược phẩm xạ trị, chất chống trầm cảm, chất chống hưng cảm, thuốc chống loạn tâm thần, chất chống chứng bồn chồn lo lắng, thuốc ngủ, tác nhân thần kinh giao cảm, chất kích thích, donepezil, tacrin, thuốc chữa hen, chất chủ vận beta, thuốc xông steroid, chất ức chế leukotrien, methylxantin, cromolyn, epinephrin hoặc các chất đồng đẳng, dornase alpha (Pulmozyme), xytokin hoặc chất đối kháng xytokin. Các ví dụ không hạn chế về xytokin như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, loại bất kỳ trong số IL-1 đến IL-23. Các dạng liều dùng thích hợp thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Wells *et al.*, biên tập, Pharmacotherapy Handbook, ấn bản thứ hai, Appleton và Lange, Stamford, Conn. (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000).

Thuốc chống ung thư hoặc thuốc chống truyền nhiễm như vậy có thể còn bao gồm các phân tử độc tố gắn liền với, được liên kết, đồng bào chế hoặc đồng cung cấp với ít nhất một kháng thể của sáng chế. Độc tố có thể tùy ý hoạt động để tiêu diệt một cách chọn lọc mô hoặc tế bào gây bệnh. Tế bào gây bệnh có thể là tế bào ung thư hoặc tế bào khác. Các độc tố như vậy có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, độc tố tái tổ hợp hoặc độc tố được tinh chế hoặc đoạn độc tố bao gồm ít nhất một miền gây độc tế bào chức năng của độc tố, ví dụ, được chọn từ ít nhất một loại trong số rixin, độc tố bệnh bạch hầu, độc tố nọc độc, hoặc độc tố vi khuẩn. Thuật ngữ độc tố còn bao gồm cả nội độc tố và ngoại độc tố được sản xuất bởi virus hoặc vi khuẩn tái tổ hợp, đột biến hoặc có trong tự nhiên bất kỳ mà có thể gây ra tình trạng bệnh lý

bất kỳ nơi con người và các động vật có vú khác, trong đó có sốc độc tố, hiện tượng này có thể gây tử vong. Các độc tố như vậy có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, độc tố ruột non không bền nhiệt *E. coli* tạo độc tố cho niêm mạc ruột (LT), độc tố đường ruột có tính ổn định nhiệt (ST), độc tố gây độc tế bào *Shigella*, độc tố ruột non *Aeromonas*, độc tố gây hội chứng sốc độc tố-1 (TSST-1), độc tố đường ruột tụ cầu khuẩn A (SEA), B (SEB), hoặc C (SEC), các độc tố đường ruột liên cầu khuẩn và các chất tương tự. Các vi khuẩn như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chủng của loài *E. coli* tạo độc tố cho niêm mạc ruột (ETEC), *E. coli* gây chảy máu ruột non (ví dụ, các chủng của typ huyết thanh 0157:H7), các loài tụ cầu khuẩn (ví dụ, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), các loài *Shigella* (ví dụ, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, và *Shigella sonnei*), các loài *Salmonella* (ví dụ, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*), các loài *Clostridium* (ví dụ, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), các loài *Camphlobacter* (ví dụ, *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), các loài *Heliobacter*, (ví dụ, *Heliobacter pylori*), các loài *Aeromonas* (ví dụ, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, các loài *Vibrios* (ví dụ, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), các loài *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Streptococci*. Xem, ví dụ, Stein, biên tập, INTERNAL MEDICINE, ấn bản thứ ba, trang 113, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans *et al.*, biên tập, Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, ấn bản lần thứ hai, trang 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell *et al*, Principles and Practice of Infectious Diseases, ấn bản thứ ba, Churchill Livingstone, N.Y. (1990); Berkow *et al*, biên tập, The Merck Manual, ấn bản thứ 16, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood *et al*, FEMS Microbiology Immunology, 76: 121-134 (1991); Marrack *et al*, Science, 248:705-711 (1990).

Các chế phẩm theo sáng chế còn có thể chứa ít nhất một chất phụ trợ thích hợp bất kỳ, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất pha loãng, chất kết dính, chất làm ổn định, các chất đệm, các muối, dung môi ưa mỡ, chất bảo quản, chất phụ trợ hoặc các chất tương tự. Các chất phụ trợ được dụng thì được ưu tiên. Các ví dụ không hạn chế về, và các phương pháp điều chế các dung dịch tiệt trùng như vậy thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, Gennaro, biên

tập, Remington's Pharmaceutical Sciences, ấn bản thứ 18, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990. Có thể chọn lựa theo lệ thường các chất mang dược dụng mà thích hợp cho phương thức dùng thuốc, tính tan và/hoặc tính ổn định của thành phần liên kết đích kháng IL-25, đoạn hoặc chế phẩm biến thể như đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được mô tả ở đây.

Các tá dược dược dụng và các chất phụ gia hữu ích trong chế phẩm này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở protein, peptit, axit amin, lipid, và carbohydrat (ví dụ, đường, trong đó có monosacarit, disacarit, trisacarit, tetrasacarit và oligosacarit; đường được dẫn xuất như alditol, axit aldonic, đường được este hóa và các chất tương tự; và các polysacarit hoặc các polyme đường), những chất này có thể có mặt riêng lẻ hoặc ở dạng kết hợp, bao gồm một mình hoặc ở dạng kết hợp 1 99,99% theo trọng lượng hoặc thể tích. Các tá dược protein tiêu biểu bao gồm anbumin huyết thanh như anbumin huyết thanh người (HSA), anbumin người tái tổ hợp (rHA), gelatin, casein và các chất tương tự. Các hợp phần kháng thể/axit amin tiêu biểu, hợp phần này cũng có thể hoạt động trong khả năng đệm, bao gồm alanin, glyxin, arginin, betain, histidin, axit glutamic, axit aspartic, xystein, lysin, leuxin, isoleuxin, valin, metionin, phenylalanin, aspartam và các chất tương tự. Một axit amin được ưu tiên là glyxin.

Các tá dược carbohydrat thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm, ví dụ, các monosacarit như fructoza, maltoza, galactoza, glucoza, D-mannoza, sorboza, và các chất tương tự; disacarit, như lactoza, sucroza, trehaloza, cellobioza, và các chất tương tự; các polysacarit, như rafinoza, meleziotoza, maltodextrin, dextran, tinh bột, và các chất tương tự; và alditol, như manitol, xylitol, maltitol, lactitol, xylitol sorbitol (gluxitol), myoinositol và các chất tương tự. Các tá dược carbohydrat được ưu tiên để sử dụng trong sáng chế là manitol, trehaloza, và rafinoza.

Các chế phẩm này có thể còn chứa chất đệm hoặc chất điều chỉnh độ pH; Thông thường, chất đệm là muối được điều chế từ một bazơ hoặc axit hữu cơ. Các chất đệm tiêu biểu bao gồm các muối của axit hữu cơ như các muối của axit xitric, axit ascorbic, axit gluconic, axit carbonic, axit tartaric, axit succinic, axit axetic, hoặc axit phthalic; chất đệm Tris, tromethamin hydroclorua, hoặc các chất đệm phosphat. Các chất đệm được ưu tiên để sử dụng trong các chế phẩm này là các muối của axit hữu cơ như xitrat.

Ngoài ra, các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các chất phụ gia/tá dược polyme như polyvinylpyrrolidon, ficoll (đường polyme), dextrat (ví dụ, xyclodextrin, như 2-hydroxypropyl-.beta.-cyclodextrin), polyetylen glycol, chất tạo hương vị, chất chống vi sinh vật, chất làm ngọt, chất chống oxy hóa, chất chống tĩnh điện, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, các polysorbat như “TWEEN 20” và “TWEEN 80”), lipit (ví dụ, phospholipit, axit béo), các steroid (ví dụ, cholesterol), và các chất tạo chelat (ví dụ, EDTA).

Những chất này và các tá dược được dụng và/hoặc các chất phụ gia bổ sung đã biết thích hợp cho việc sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, như được liệt kê trong “Remington: The Science & Practice of Pharmacy”, ấn bản thứ 19, Williams & Williams, (1995), và trong “Physian’s Desk Reference”, ấn bản thứ 52, Medical Economics, Montvale, N.J. (1998). Các chất tá dược hoặc chất mang được ưu tiên là carbohydrat (ví dụ, các sacarit và alditol) và các chất đệm (ví dụ, xitrat) hoặc các chất polyme.

Các ứng dụng điều trị

Sáng chế, theo một khía cạnh, đề cập đến phương pháp phòng ngừa hoặc làm giảm hiện tượng tăng tính đáp ứng khí đạo ở một đối tượng (ví dụ, con người) cần đến việc điều trị bao gồm việc cung cấp cho đối tượng đó thành phần liên kết đích, cụ thể là phân tử kháng thể, có tác dụng liên kết IL-25. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa, làm giảm hoặc điều trị bệnh hen ở một đối tượng cần đến việc điều trị bao gồm việc cung cấp cho đối tượng đó thành phần liên kết đích, cụ thể là phân tử kháng thể, có tác dụng liên kết IL-25. Bệnh hen bao gồm bệnh hen dị ứng.

Các phương pháp trên đây có thể được thực hiện với các thành phần liên kết đích (trong đó có các chế phẩm của chúng) theo sáng chế, chế phẩm này là hữu ích trong việc liên kết vào và tốt hơn, nếu là tác dụng đối kháng của IL 25, có hiệu quả chữa trị trong các rối loạn và bệnh khác nhau mà trong đó IL-25 có đóng một vai trò nào đó. Ngoài bệnh hen ra, các bệnh như vậy bao gồm các tình trạng bệnh lý khác gắn liền với viêm, như bệnh viêm đường ruột (IBD), ví dụ, bệnh Crohn và viêm loét ruột kết. Cũng có thể thực hiện các phương pháp này với các thành phần liên kết đích khác (trong đó có các chế phẩm của chúng) chế phẩm này liên kết IL-25 mà có thể thu được như được mô tả dưới đây trong các ví dụ đi kèm.

Các thành phần liên kết đích (trong đó có các chế phẩm của chúng) theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị (trong đó có điều trị dự phòng) hoặc chẩn đoán nơi đối tượng là người hoặc động vật. Phương pháp điều trị hoặc chẩn đoán như vậy (phương pháp này có thể bao gồm điều trị dự phòng) có thể bao gồm việc cung cấp cho đối tượng đã nêu lượng hữu hiệu của thành phần liên kết đích của sáng chế. Các bệnh và rối loạn tiêu biểu thì được bàn thêm dưới đây.

Cũng được đề cập đến là cách sử dụng thành phần liên kết đích (trong đó có các chế phẩm của chúng) của sáng chế trong việc sản xuất dược phẩm để cung cấp cho, đối tượng là người hoặc động vật.

Các dấu hiệu lâm sàng mà trong đó thành phần liên kết đích kháng IL-25 có thể được sử dụng để đem lại lợi ích chữa trị bao gồm tình trạng bất kỳ mà trong đó IL-25 có hậu quả bệnh lý. Vì vậy, nhìn chung, thành phần liên kết đích của sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị tình trạng bệnh lý bất kỳ gắn liền với đáp ứng Th2 hoặc đáp ứng typ-2 không mong muốn. Ví dụ, thành phần liên kết đích của sáng chế có thể được sử dụng cho việc điều trị dị ứng và bệnh hen, cụ thể là bệnh hen.

Có thể thực hiện việc điều trị kháng IL-25 bằng phương pháp tiêm (ví dụ, vào tĩnh mạch) hoặc bằng các phương pháp phân phối cục bộ. Kháng IL-25 có thể được phân phối bằng các công nghệ qua trung gian gen. Các chiến lược bào chế thay thế khác có thể đem lại chế phẩm thích hợp cho đường miệng hoặc đường hậu môn. Đường dùng thuốc có thể được xác định theo các đặc điểm lý hóa của sự điều trị, theo những cân nhắc đặc biệt đối với bệnh, để tối ưu hóa tính hiệu quả hoặc để giảm thiểu phản ứng phụ.

Theo sáng chế, chế phẩm được tạo ra có thể được cung cấp cho các cá thể. Tốt hơn, nếu phương thức dùng thuốc là theo “lượng hữu hiệu điều trị”, lượng này là đủ để thể hiện lợi ích cho bệnh nhân. Lợi ích này có thể là ít nhất là làm giảm ít nhất một triệu chứng. Lượng thực tế được cung cấp, và tốc độ và tiến trình-thời gian của việc dùng thuốc, sẽ phụ thuộc vào bản chất và mức độ trầm trọng của những gì đang được điều trị. Việc kê toa phương pháp điều trị, ví dụ, quyết định về liều lượng v.v. là trong phạm vi trách nhiệm của bác sĩ đa khoa và bác sĩ y khoa khác. Các liều lượng thích hợp của kháng thể thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này; xem

Ledermann J.A. *et al.* (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; Bagshawe K.D. *et al.* (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922.

Liều lượng chính xác sẽ phụ thuộc vào một số yếu tố, trong đó có kháng thể là để chẩn đoán hay để điều trị, kích cỡ và vị trí của vùng sẽ được điều trị, bản chất chính xác của kháng thể (ví dụ, kháng thể nguyên, đoạn hoặc song thể), và bản chất của chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử có thể phát hiện được bất kỳ khác được gắn kết vào kháng thể. Liều lượng kháng thể tiêu biểu sẽ nằm trong khoảng từ 0,5mg -1,0g, và kháng thể này có thể được cung cấp vào tĩnh mạch ở dạng liều lớn dùng một thể hoặc ở dạng tiêm truyền trong vài giờ khi thích hợp để thu được liều lượng cần thiết. Các phương thức dùng thuốc khác bao gồm tiêm truyền vào tĩnh mạch trong vài giờ, để đạt được tổng liều lượng tích lũy tương tự. Đây là liều lượng cho một lần điều trị bệnh nhân người lớn, liều lượng này có thể được điều chỉnh theo tỷ lệ cho trẻ em và trẻ sơ sinh, và đồng thời được điều chỉnh cho các định dạng kháng thể khác tỷ lệ với trọng lượng phân tử. Có thể lặp lại các phương thức điều trị ở khoảng gián cách là hàng ngày, hai lần một tuần, hàng tuần hoặc hàng tháng, theo ý muốn của thầy thuốc.

Một phương thức dùng thuốc khác nữa sử dụng phương pháp bao sơ bộ, hoặc sát nhập vào, thiết bị đặt vào trong, mà nhờ chúng, lượng tối ưu của kháng thể sẽ được xác định bằng những thử nghiệm thích hợp.

Phân tử kháng thể theo một số phương án được ưu tiên của sáng chế là đoạn monome, như F(ab) hoặc scFv. Các mảnh kháng thể này có thể có ưu điểm của thời gian bán hủy tương đối ngắn và ít nguy cơ hoạt hóa tiểu cầu hơn, nguy cơ này có thể là do hiện tượng kết cụm thụ thể gây ra. Hiện tượng kết cụm gây ra tình trạng hoạt hóa tiểu cầu có thể là hoặc của phân tử IL-25 hoặc của IL-25 với các phân tử FcγRII.

Nếu kháng thể nguyên, được sử dụng, thì tốt hơn, nếu nó ở dạng mà không thể hoạt hóa và/hoặc phá hủy tiểu cầu. Isotyp IgG4 hoặc theo cách khác, isotyp “nhà thiết kế” được dẫn xuất từ khung chính IgG1 (cấu trúc gen Fc mới WO99/58572, Clark, Armour, Williamson) là những lựa chọn được ưu tiên. Các mảnh kháng thể nhỏ hơn có thể được sử dụng, như F(ab')₂. Ngoài ra, có thể sử dụng các kháng thể nguyên hoặc các đoạn (ví dụ, F(ab')₂ hoặc các song thể) có tính đặc hiệu epitop kép (ví dụ, đối với epitop được nhận biết bởi scFv 2C3). Mặc dầu một phương án như

vậy có thể thúc đẩy quá trình kết cụm thụ thể, tốc độ kết hợp cao vào các thụ thể riêng biệt có thể loại trừ vấn đề này.

Các thành phần liên kết đích của sáng chế thường được cung cấp ở dạng dược phẩm, dược phẩm này có thể bao gồm ít nhất một hợp phần ngoài thành phần liên kết đích ra.

Thành phần liên kết đích của sáng chế có thể được cung cấp một mình hoặc kết hợp với các phương thức điều trị khác, hoặc đồng thời hoặc một cách liên tiếp phụ thuộc vào tình trạng bệnh lý cần được điều trị. Các phương thức điều trị khác có thể bao gồm việc cung cấp các liều lượng thích hợp của các thuốc giảm đau như thuốc chống viêm không steroid (ví dụ, aspirin, paracetamol, ibuprofen hoặc ketoprofen) hoặc các chế phẩm có thuốc phiện như morphin; việc cung cấp thuốc chống nôn; hoặc việc cung cấp ít nhất một hợp chất khác có hoạt tính chống lại bệnh hen, thường là chất làm giãn phế quản có tác dụng tạo ra hiện tượng giãn khí đạo hoặc nâng cao mức làm sạch dịch nhầy, ví dụ, một chất chủ vận beta (ví dụ, salbutamol, salmeterol), dinatri cromoglycat, các steroid hoặc chất ức chế của PDEIV.

Các phương pháp thử nghiệm

Sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm việc gây ra hoặc cho phép có sự liên kết của thành phần liên kết đích như được đề cập ở đây vào IL-25. Như đã được lưu ý, sự liên kết này có thể diễn ra *in vivo*, ví dụ, sau khi cung cấp thành phần liên kết đích, hoặc axit nucleic mã hóa thành phần liên kết đích, hoặc nó có thể diễn ra *in vitro*, ví dụ, trong thử nghiệm ELISA, thử nghiệm Biacore, thử nghiệm Octet, thẩm tách phương Tây, hóa tế bào miễn dịch, kết tủa miễn dịch hoặc sắc ký ái lực.

Lượng liên kết của thành phần liên kết đích vào IL-25 có thể được xác định. Việc định lượng có thể liên quan đến lượng của kháng nguyên trong mẫu thử nghiệm, mẫu này có thể có lợi ích chẩn đoán.

Tính phản ứng của các kháng thể trên mẫu có thể được xác định bằng phương tiện thích hợp bất kỳ. Thử nghiệm miễn dịch bằng phóng xạ (RIA) là một khả năng. Kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ được trộn với kháng nguyên không được đánh dấu (mẫu thử nghiệm) và được phép liên kết vào kháng thể. Kháng nguyên được liên kết được tách về phương diện vật lý từ kháng nguyên không được liên kết và lượng của kháng nguyên có hoạt tính phóng xạ được liên kết

vào kháng thể được xác định. Càng có nhiều kháng nguyên trong mẫu thử nghiệm, thì càng có ít kháng nguyên có hoạt tính phóng xạ liên kết vào kháng thể. Thử nghiệm liên kết cạnh tranh cũng có thể được sử dụng với kháng nguyên không có hoạt tính phóng xạ, bằng cách sử dụng kháng nguyên hoặc chất đồng đẳng được liên kết vào phân tử thông tin. Phân tử thông tin có thể là chất gây huỳnh quang, chất phát quang hoặc thuốc nhuộm laze có đặc điểm phát xạ hoặc hấp thụ được phân lập về phương diện phổ. Chất gây huỳnh quang thích hợp bao gồm fluorescein, rodamin, phycoerythrin và Texas Red. Các thuốc nhuộm tạo màu thích hợp bao gồm diaminobenzidin.

Các chất thông tin khác bao gồm hạt keo đại phân tử hoặc chất liệu dạng hạt như hạt nhựa mủ được tạo màu, có từ tính hoặc thuận từ, và các chất có hoạt tính về mặt sinh học hoặc hóa học mà có thể một cách trực tiếp hoặc gián tiếp làm cho các tín hiệu có thể phát hiện được có thể quan sát thấy được bằng mắt, được phát hiện bằng phương tiện điện tử hoặc được ghi lại. Các phân tử này có thể là những enzym có tác dụng xúc tác các phản ứng mà phát triển hoặc thay đổi màu sắc hoặc gây ra những thay đổi về các thuộc tính điện tử. Chúng có thể là dễ bị kích thích về phương diện phân tử, sao cho sự chuyển tiếp điện tử giữa các trạng thái năng lượng đem lại tình trạng phát xạ hoặc hấp thụ phổ đặc trưng. Chúng có thể bao gồm các thực thể hóa học được sử dụng cùng với cảm biến sinh học. Biotin/avidin hoặc biotin/streptavidin và các hệ thống phát hiện phosphatase kiềm có thể được dùng đến.

Các tín hiệu được các thể tiếp hợp kháng thể-chất thông tin riêng biệt tạo ra có thể được sử dụng để rút ra dữ liệu tuyệt đối hoặc tương đối có thể định lượng được của sự liên kết kháng thể liên quan trong các mẫu (bình thường và thử nghiệm).

Sáng chế còn đề cập đến cách sử dụng thành phần liên kết đích như trên đây dùng để đo các mức kháng nguyên trong thử nghiệm cạnh tranh, nói cách khác, phương pháp đo mức kháng nguyên trong mẫu bằng cách sử dụng thành phần liên kết đích như được đề cập bởi sáng chế trong thử nghiệm cạnh tranh. Đây có thể là trường hợp mà sự tách vật lý kháng nguyên được liên kết từ kháng nguyên không được liên kết không cần thiết. Liên kết phân tử thông tin vào thành phần liên kết đích sao cho sự thay đổi về quang học hoặc thay đổi về vật lý xảy ra khi liên kết là

một khả năng. Phân tử thông tin có thể trực tiếp hoặc gián tiếp tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được, và tốt hơn, nếu là tín hiệu có thể đo được. Liên kết các phân tử thông tin có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp, cộng hóa trị, ví dụ, thông qua liên kết peptit hoặc không phải cộng hóa trị. Liên kết thông qua liên kết peptit có thể là kết quả của sự biểu hiện tái tổ hợp của sự dung hợp gen mã hóa kháng thể và phân tử thông tin.

Phần mô tả còn bộc lộ Sáng chế còn đề cập đến phương pháp đo các mức kháng nguyên một cách trực tiếp, bằng cách sử dụng thành phần liên kết đích theo sáng chế, ví dụ, trong hệ thống cảm biến sinh học.

Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể chọn phương thức hoặc dạng liên kết thích hợp theo kiến thức chung và sự ưu tiên của mình.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mô tả các phương án ví dụ của sáng chế như sau.

Ví dụ 1 : Tạo ra M6, kháng thể IL-25 được làm giống như của người có ái lực cao

huDDG91, phiên bản được làm giống như của người (được ghép CDR) của kháng thể kháng IL25 đơn dòng 2C3 của chuột, được chọn làm phân tử mẹ để tạo ra các biến thể có ái lực liên kết được cải thiện đối với IL-25. Trình tự chuỗi nhẹ kappa của huDDG91, không bao gồm trình tự dẫn đầu của nó, được thể hiện trong Fig.1 (SEQ ID NO:2), trong đó trình tự axit amin của vòng lặp CDR, như được xác định bởi Kabat, được gạch dưới. Trình tự của chuỗi nặng huDDG91 (SEQ ID NO:4) được thể hiện trong Fig.2, trong đó trình tự axit amin của các CDR, như được xác định bởi Kabat, được gạch dưới. HuDDG91 còn được gọi là RH2.5_R71V. Việc tạo ra và xác định đặc điểm của kháng thể kháng IL25 đơn dòng 2C3 của chuột thì được mô tả trong Đơn Quốc tế số: PCT/GB2008/001365, được công bố ngày 30 tháng 10, 2008 là WO2008/129263.

Để tạo ra các biến thể của huDDG91, các thư viện thể hiện thể thực khuẩn trên cơ sở trình tự huDDG91 được cấu trúc bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn. Các thư viện Fab được sàng lọc với IL-25 được biotin hóa. Fab thể hiện sự liên kết có thể so sánh được với hoặc tốt hơn huDDG91 (IgG4) bằng ELISA được lựa chọn.

Các Fab được chuyển hóa thành các mAb (các kháng thể đơn dòng) như sau. Thư viện tổ hợp của 5 chuỗi nhẹ khác nhau và 5 chuỗi nặng khác nhau (trong đó có

chuỗi nặng và chuỗi nhẹ huDDG91) được thiết kế. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được sử dụng trong thư viện khác biệt với nhau trong trình tự axit amin CDR1 và CDR3 chuỗi nhẹ và trình tự CDR3 chuỗi nặng. Sử dụng những chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này, tổng cộng 25 mAb (IgG1) được cấu trúc, được biểu hiện trong tế bào HEK293 ở quy mô nhỏ và được tinh chế. Mỗi phần tử trong số các mAb được kiểm tra về ái lực liên kết IL-25, sự ức chế tế bào, và sự ức chế thụ thể như sau:

- Ái lực liên kết IL-25 được xác định bằng cách sử dụng ELISA IL-25 tiêu chuẩn và các thử nghiệm liên kết Biacore. Các ứng viên có KD là nhỏ hơn 50pM đối với IL-25 người và KD là lớn hơn 100nm đối với IL-17A, C, D và F của người được lựa chọn;
- Sự ức chế tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm trên cơ sở tế bào canxinom thận người TK-10 tiêu chuẩn (tính đáp ứng với IL-25; IL-25 và chỉ báo IL-8; có khả năng nhận biết sự khác biệt giữa IL-25R hòa tan được và mAb mẹ) và thử nghiệm trên cơ sở tế bào T CD4+. Đối với thử nghiệm TK-10, các mAb thể hiện IC50 mà thấp hơn kháng thể huDDG91 mẹ và mức ức chế >90% của sự giải phóng IL-25 ở nồng độ mAb 10nM được lựa chọn. Đối với thử nghiệm tế bào T CD4+, thì chọn các mAb gây ra tình trạng ức chế mức sản xuất IL-5 mà lớn hơn hoặc bằng mức ức chế được thể hiện bởi huDDG91 mẹ;
- Sự ức chế thụ thể được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang trên cơ sở hạt được cải biến (ECLIA). Các ứng viên gây ra mức giảm lớn hơn 3 lần về IC50 của IL-25 liên kết vào thụ thể so với kháng thể huDDG91 mẹ ở nồng độ mAb 10nM được lựa chọn.

Trên cơ sở những tiêu chí này, 9 mAb ứng viên được lựa chọn (Fig.3). Tất cả các ứng viên thể hiện mức biểu hiện có thể chấp nhận được và thể hiện đặc tính SE-HPLC và SDS-PAGE thích hợp khi được biểu hiện trong HEK293 và được tinh chế bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn.

Sau đó, 9 ứng viên này được biểu hiện tạm thời ở thang 10L trong tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (CHO), được tinh chế bằng cách sử dụng Mab Select SuRe (GE Healthcare Life Sciences),

chất đệm được trao đổi thành dung dịch muối được đệm phosphat (PBS) và được cô. Ái lực liên kết IL-25 của mỗi kháng thể trong số 9 mAb ứng viên đã được cải thiện một cách đáng kể so với huDDG91. Mỗi phần tử trong số các mAb cũng được

kiểm tra về mức biểu hiện, tính đồng nhất (SDS-PAGE), tính tan, sự kết tụ (SE-HPLC), các cải biến sau dịch mã, tương tác protein-protein và oxy hóa bằng cách sử dụng các thử nghiệm và kỹ thuật thông thường. Một vài kháng thể trong số mAb ứng viên đã thể hiện hiện tượng kết tụ trong suốt quá trình cô, hiệu suất thấp và/hoặc đặc tính SDS-PAGE và SE-HPLC không mong muốn khi được biểu hiện trong CHO, được tinh chế, và chế biến dưới các điều kiện tiêu chuẩn.

Một mAb, được ký hiệu là M6, được chọn cho các nghiên cứu khác nữa trên cơ sở mức biểu hiện cao hơn, tính tan cao, thiếu sự kết tụ protein đáng kể khi tinh chế, và sự vắng mặt của các cải biến sau dịch mã không mong muốn, các tương tác protein-protein và oxy hóa khi tinh chế.

Ví dụ 2: Xác định đặc điểm của kháng thể M6

Vật liệu và phương pháp

Thử nghiệm tế bào biểu mô ruột kết LS 174T của người

Dòng tế bào biểu mô ruột kết LS 174T của người (CL-188) là thu được từ ATCC (Manassas, VA) và được duy trì trong Môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) được bổ sung FBS 10%, penixilin và streptomycin ở 37°C dưới CO₂ 5%. Các tế bào được ươm trong đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ ở mật độ là 1x10⁵ tế bào/ml trong tổng thể tích là 100µl và được phép gắn kết qua đêm. Kháng thể IL-25 (M6 và M9) được tạo phức sơ bộ với protein IL-25 tái tổ hợp của người (Centocor) với lượng ổn định của protein IL-25 (nồng độ cuối 10ng/ml) được trộn với những lượng khác nhau của kháng thể kháng-IL-25 được chuẩn độ theo dãy pha loãng ba lần hoặc dãy pha loãng nửa logarit và được ủ ở 37°C trong 1 giờ. Môi trường nuôi cấy tế bào được hút nhẹ và được thay bằng phức hợp protein IL-25 / kháng thể IL-25 và sau đó, các tế bào được ủ qua đêm trong 18-22 giờ. Sau đó, các đĩa nuôi cấy được quay ly tâm ở mức 1200 vòng/phút trong 2 phút để loại bỏ dạng tồn dư của các mảnh vỡ tế bào và sau đó, dịch nổi ở trên được gom và được thử nghiệm về GROα bằng cách sử dụng định dạng ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Kết quả

Phép phân tích trình tự đối với M6 đã cho thấy tổng số ba đoạn thay thế axit amin so với trình tự huDDG91, tất cả những đoạn đó có mặt trong CDR3 của chuỗi

nhẹ (xem Fig.3). Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:5) và chuỗi nặng (SEQ ID NO:9) của M6 và các CDR của chúng được thể hiện trong Fig.4.

M6 được xác định bằng Biacore để có ái lực liên kết đối với IL-25 người mà cao hơn 3-5 lần so với ái lực của huDDG91 đối với IL25 người (Fig.3). Ngoài ra, M6 là có tính chọn lọc với IL-25, khi mà nó đã không liên kết IL-17A, C, D hoặc F người. Tính phản ứng chéo các loài của M6 được đánh giá trên khi đầu chó 12-25 cynoIL-25 và động vật gặm nhấm (chuột) IL-25. Tính phản ứng chéo các loài với cynoIL-25 được thể hiện bằng ái lực trong phạm vi 5 lần của IL-25 người, mức ức chế trong thử nghiệm trên cơ sở phổi tử thụ thể và thử nghiệm trên cơ sở tế bào TK-10. Sử dụng những tiêu chí này, xác định được rằng M6 đã liên kết vào cả cynoIL-25 và IL-25 chuột.

Sử dụng thử nghiệm trên cơ sở tế bào được mô tả trong ví dụ 1, M6 đã cho thấy là thể hiện mức ức chế thụ thể tăng lên so với huDDG91, thể hiện mức giảm hơn 3 lần về IC50 so với huDDG91 (Fig.3). Ngoài ra, sử dụng thử nghiệm trên cơ sở tế bào được mô tả trong ví dụ 1, M6 đã thể hiện mức ức chế tế bào đối với IL25 người tăng so với huDDG91 (các Fig.3 và 5). Kết quả này được xác nhận bằng thử nghiệm tế bào biểu mô ruột kết LS 174T của người (các Fig.6A và 6B), được thực hiện như được mô tả trên đây.

Ví dụ 3: Lập bản đồ trao đổi H/D của epitop trong IL-25 người được nhận biết bởi M6

Tổng kết

Epitop giả định trong IL-25 người được nhận biết bởi kháng thể M6 được lập bản đồ bằng cách sử dụng phép đo phổ khối trao đổi hydro/deuteri ExSar™ được thực hiện bởi ExSar Corporation (Monmouth Junction, New Jersey).

Vật liệu và phương pháp

I. Tối ưu hóa việc tách/phân giải IL-25

- (1) IL-25 được rã đông trên đá lạnh
- (2) Được tách thành các phần phân ước 18 x 100µl và làm đông lạnh chúng ngoại trừ một phần
- (3) Trộn 10µl của 0,28 mg/ml (16,6µM) của IL-25 với 30µl của PBS, độ pH 7,0 trong nước → [IL-25] = 0,07 mg/ml (4,2µM)
- (4) Trộn 40µl của (3) với các dung dịch tôi khác nhau

- (5) Bơm 55 μ l vào hệ thống ExSAR
- (6) Di chuyển mẫu trên cột pepsin được giữ cố định ở mức 200 μ l/phút trong chất đệm A (0,05% TFA trong H₂O)
- (7) Các đoạn pepsin được chất lên cột bẫy pha đảo và được khử muối bằng chất đệm A ở mức 200 μ l/phút trong 3 phút
- (8) Các peptit pepsin được tách bằng cột C18 với gradien tuyến tính là 13% → 40% Chất đệm B (95% axetonitril, 5% H₂O, 0,0025% TFA) trong 23 phút
- (9) các peptit được phát hiện bằng phép đo phổ khối

II. Giữ cố định M6

4.1. Quy trình thử nghiệm để giữ cố định M6

<Sự tiếp hợp kháng thể trên nhựa>

- (1) Rã đông 1,5ml của 0,96 mg/ml M6 trên đá lạnh
- (2) Sử dụng 400 μ l (tái đông lạnh vật liệu chưa được sử dụng)
- (3) Bổ sung 4mg NaCNBH₃ (87,5 μ mol) vào lọ có nắp vặn ở đỉnh 1,5ml → 40mg NaCNBH₃ cho mỗi 1g của POROS AL
- (4) Bổ sung 400 μ l dung dịch kháng thể vào lọ
- (5) Đảm bảo rằng NaCNBH₃ hòa tan trước khi bổ sung nhựa POROS AL
- (6) Đặt 100mg POROS AL vào trong lọ
- (7) Ủ phản ứng liên hợp ở nhiệt độ trong phòng trong khi vẫn lắc trong 3 giờ
- (8) Bổ sung tổng thể tích là 400 μ l của Na₂SO₄ 2,8M vào các phần 5 x 80 μ l, một phần trong mỗi giờ → [kháng thể] = 0,48 mg/ml, [NaCNBH₃] = 5,0 mg/ml [Na₂SO₄] = 1,4 M.
- (9) Hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ trong phòng qua đêm
- (10) Rửa hỗn hợp này bằng lượng dồi dào của chất đệm PBS, độ pH 7,0 bằng cách sử dụng phễu lọc

<Gắn mũ>

- (11) Điều chế dung dịch gắn mũ bằng cách trộn 250 μ l etanolamin (FW = 61,08, tỷ trọng = 1,012 g/ml, 8,3mmol, ~ 1M) vào 3,5ml PBS, độ pH 7,0 và điều chỉnh độ pH của dung dịch này đến độ pH 7,2 bằng axit axetic bằng (~200 μ l). Thể tích cuối của dung dịch là gần với 4ml.
- (12) 4mg NaCNBH₃ được làm tan trong 500 μ l dung dịch gắn mũ → [NaCNBH₃] = 8 mg/ml, [etanolamin] = ~1M.

(13) Tái tạo huyền phù nhựa đã được rửa và được làm khô trong dung dịch NaCNBH_3

(14) Lắc trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng

(15) Hỗn hợp được lọc và rửa bằng lượng dồi dào của PBS, độ pH 7,0 bằng cách sử dụng phễu lọc.

(16) Tái tạo huyền phù bánh nhựa trong 0,75ml chất đệm PBS, độ pH 7,0.

(17) Bảo quản vật liệu đã được tiếp hợp trong tủ lạnh ở 4°C .

III. Quy trình thử nghiệm dùng cho thử nghiệm khả năng liên kết của cột M6

<Điều chế chất đệm>

(1) Điều chế xitrat 50mM, độ pH 6,0 trong nước

(2) Điều chế xitrat 50mM, Foscholine-12 2mM, độ pH 6,0 trong nước

(3) Điều chế PBS, độ pH 7,0 trong nước

(4) Hoặc (1), (2) hoặc (3) được sử dụng làm “chất đệm H”

<Thử nghiệm khả năng liên kết>

(5) Cột mAb (104 μl) được nạp 600 μl M6 được bắt cặp với nhựa POROS bằng cách sử dụng dòng chảy 500 μl /phút của chất đệm A (0,05% TFA trong H_2O) và giá đỡ cột bằng thép không gỉ 2,1mm x 30mm

(6) Cột kháng thể được đặt trong bể chứa của đơn vị làm lạnh được ấn định đến 3°C có các đường được ấn định để phân tán và bắt giữ chất phản ứng vào và ra khỏi cột. Phôi liệu thủy tinh micromet A2 được đặt ngang bằng với đường vào dùng để lọc chất phản ứng và mẫu.

(7) cột kháng thể được làm cân bằng bằng 2 x 250 μl “chất đệm H”. Sử dụng giấy đo độ pH để kiểm tra độ pH của dung dịch ở đầu mút của đường này để đảm bảo độ pH là trung tính.

(8) Trộn 10 μl của 0,28 mg/ml (16,6 μM) của IL-25 với 30 μl “chất đệm H” $\rightarrow$ [IL-25] = 4,1 μM (tương đương với 166 pmol)

(9) Bơm hỗn hợp trên đây lên cột kháng thể đã được làm cân bằng.

(10) 200 μl “chất đệm H” (được để trong bơm tiêm Hamilton 500 μl) được phân phối vào cột ở 3°C bằng cách sử dụng bơm tiêm và các phần 5 x 40 μl được thu gom.

(11) 200 μl của axit formic 0,8% được phân phối vào cột bằng cách sử dụng bơm tiêm ở 3°C và các phần 5 x 40 μl được thu gom.

- (12) Dung dịch tiêm đối chứng được điều chế trong vật chèn thủy tinh bằng cách trộn 10 μ l của 0,28 mg/ml (16,6 μ M) của IL-25 với 30 μ l “chất đệm H”
- (13) Quay ly tâm tất cả các vật chèn chứa các phần hoặc mẫu đối chứng để quay xuống tất cả chất lỏng trên thành của vật chèn. Gắn nắp và gắn nhãn các lọ bằng các vật chèn bên trong.
- (14) Giữ các phần trung tính và phần axit cũng như mẫu đối chứng trong khay chống mát 4 từ 3 đến 23 ở các vị trí lẻ theo trật tự của mẫu đối chứng, chất rửa trung tính 1, 2, 3, 4, 5 và chất rửa axit 1, 2, 3, 4, 5.
- (15) mười một lọ trống đã được gắn nắp được đặt ở khay chống mát 4 từ 4 đến 24 ở các vị trí chẵn.
- (16) Trộn mỗi phần bằng 20 μ l ure 2M, TCEP 1M, độ pH 3,0.
- (17) Bơm 55 μ l dung dịch đã được tôi vào hệ thống của ExSAR không có cột pepsin.
- (18) Mẫu này được chất lên cột bẫy ở 200 μ l/phút trong chất đệm A (0,05% TFA), được khử muối trong 3 phút, và được rửa giải bằng gradien tuyến tính là 13% đến 40% chất đệm B (95% axetonitril, 5% H₂O, 0,0025% TFA) trong 23 phút.
- (19) Nước giải hấp được phân tích bằng phép đo phổ khối trong MS1: phương thức Centroid.

IV. Quy trình thử nghiệm dùng cho phản ứng trao đổi thuận trong dung dịch/phản ứng trao đổi nghịch trong cột

<Điều chế chất đệm>

- (1) Điều chế xitrat 50mM, Foscholine-12 2mM, độ pH 6,0 trong H₂O
- (2) Điều chế PBS, Foscholine-12 2mM, độ pH 7,0 trong H₂O
- (3) Điều chế PBS, độ pH 7,0 trong H₂O
- (4) Sử dụng (1) - (3) làm “chất trao đổi H”
- (5) Điều chế “chất trao đổi H/D” bằng cách trộn 1 phần PBS, độ pH 7,0 trong H₂O và 3 phần “chất trao đổi H”
- (6) Điều chế xitrat 50mM, Foscholine-12 2mM, pH 6,0 trong D₂O
- (7) Điều chế PBS, Foscholine-12 2mM, độ pH 7,0 trong D₂O
- (8) Điều chế PBS, độ pH 7,0 trong D₂O
- (9) Sử dụng (6) - (8) làm “chất trao đổi D”
- (10) Điều chế “chất trao đổi HD” bằng cách trộn 1 phần PBS, độ pH 7,0 trong H₂O và 3 phần “chất trao đổi D”

<Phản ứng trao đổi thuận trong dung dịch>

- (1) Đặt và làm cân bằng cột mAb (thể tích tầng 104 μ l) bên trong hộp mát ở 3°C
- (2) Làm sạch cột mAb bằng 2 x 250 μ l của axit formic 0,8%
- (3) Rửa cột mAb bằng 2 x 250 μ l “chất trao đổi HD” để làm cân bằng cột
- (4) Trộn 10 μ l của 0,28 mg/ml (16,6 μ M) của IL-25 với 30 μ l “chất trao đổi D” ở 3°C
 $\rightarrow$ [IL-25] = 0,07 mg/ml (4,2 μ M), [D2O] = 75% (Khởi động thiết bị hẹn giờ cho phản ứng trao đổi thuận)
- (5) Ủ hỗn hợp trong 150, 500, 1.500 hoặc 5.000 giây ở 3°C
- (6) Bơm hỗn hợp (40 μ l) lên cột mAb
- (7) Rửa cột mAb bằng 100 μ l “chất trao đổi HD” ở 3°C

<Phản ứng trao đổi nghịch trong cột>

- (8) Rửa cột mAb bằng 200 μ l của “chất trao đổi HH” đã được làm lạnh (ngừng thời gian trao đổi thuận và bắt đầu thời gian trao đổi nghịch ngay khi H₂O chạm đến cột)
- (9) Ủ ở 23°C trong 75, 250, 750 hoặc 2.500 giây

<Sự giải hấp>

- (10) Bơm 120 μ l axit formic 0,8% đã được làm lạnh lên cột mAb (ngừng thời gian trao đổi nghịch ngay khi axit được đưa vào cột)
- (11) Bơm 40 μ l bổ sung của axit formic 0,8% đã được làm lạnh để giải hấp kháng nguyên khỏi cột mAb
- (12) Thu gom phần 40 μ l này bằng cách sử dụng vật chèn thủy tinh

<Phép phân tích>

- (13) Bổ sung 20 μ l ure 2M đã được làm lạnh, TCEP 1M, độ pH 3,0 vào phần 40 μ l
- (14) Bơm 55 μ l mẫu đã trao đổi và được tôi vào hệ thống ExSAR có cột pepsin và cột C18 (cột pepsin thể tích tầng 104 μ l; tốc độ dòng trên cột pepsin 200 μ l/phút; C18 gradient 13% - 40% chất đệm B trong 23 phút). Ấn định thời gian phân giải là 3 phút.
- (15) Nước giải hấp được phân tích bằng phổ khối theo MS 1 :Profile

V. Quy trình thử nghiệm dùng cho phản ứng trao đổi thuận trong cột/phản ứng trao đổi nghịch trong cột

<Phản ứng trao đổi thuận trong cột>

- (1) Đặt và làm cân bằng cột mAb (thể tích tầng 104 μ l) bên trong hộp mát ở 23°C
- (2) Làm sạch cột mAb bằng 2 x 250 μ l axit formic 0,8%

- (3) Rửa cột mAb bằng “chất trao đổi HH” để làm cân bằng cột
 - (4) Trộn 10 μ l của 0,28 mg/ml (16,6 μ M) của IL-25 với 30 μ l “chất trao đổi H” ở 3°C
→ [IL-25] = 0,07 mg/ml (4,2 μ M), [D₂O] = 0%
 - (5) Bơm hỗn hợp trên cột mAb
 - (6) Rửa bằng 100 μ l “chất trao đổi HH”
 - (7) Phản ứng trao đổi thuận được khởi đầu bằng cách di chuyển 200 μ l “chất trao đổi HD” trên cột mAb (bắt đầu thời gian trao đổi thuận)
 - (8) Ủ cột mAb trong 150, 500, 1.500 hoặc 5.000 giây ở 3°C
- <Phản ứng trao đổi nghịch trong cột> Giống như 5.2
- <Sự giải hấp> Giống như quy trình IV, các bước 10-14 trên đây.
- <Phép phân tích> Giống như quy trình IV, bước 15 trên đây.

VI. Quy trình thử nghiệm dùng cho thử nghiệm đoteri hóa đầy đủ

<Điều chế mẫu được đoteri hóa đầy đủ>

- (1) Trộn 10 μ l của 0,28 mg/ml (16,6 μ M) của IL-25 với 30 μ l “chất trao đổi D”,
 - (2) Gia nhiệt hỗn hợp ở 60°C trong 3 giờ
 - (3) Làm nguội nó xuống nhiệt độ trong phòng
 - (4) Chắt hỗn hợp 40 μ l vào cột mAb
 - (5) Bơm 100 μ l “chất trao đổi HD” vào cột mAb
- <Sự giải hấp> Giống như quy trình IV, các bước 10-14 trên đây.
- <Phép phân tích> Giống như quy trình IV, bước 15 trên đây.

Đoteri được gắn kết trên hai gốc axit amin thứ nhất của mỗi ion bị mất trong suốt quá trình phân tích (phân giải/tách/phân tích khối lượng trong môi trường nước). Hiện tượng này chịu trách nhiệm về những khe hở nhỏ trong mẫu hình H/D-Ex trong các Fig.8A và 8B. Các thử nghiệm không được đoteri hóa, các thử nghiệm phản ứng trao đổi thuận, và các thử nghiệm được đoteri hóa đầy đủ được chạy đối với mỗi protein. Các thử nghiệm không được đoteri hóa là để nhận diện các ion cũng như m/z chính xác của mỗi ion mà không có đoteri. Các thử nghiệm được đoteri hóa đầy đủ nhận diện sự tổn hao đoteri đối với mỗi ion trong suốt quá trình phân tích (phân giải/tách/phân tích khối lượng trong môi trường nước). Trong các loại thử nghiệm này, con số đoteri trước khi phân tích LCMS và sau phản ứng trao đổi thuận hoặc nghịch có thể được tính ngược. Đối với các thử nghiệm trao đổi thuận-nghịch, thời gian trao đổi nghịch là một nửa thời gian trao đổi thuận. Đây là

do thực tế là tốc độ trao đổi $H \rightarrow D$ nội tại là một nửa của tốc độ trao đổi $D \rightarrow H$ nội tại đối với cùng một chỉ số pH.

Kết quả

Phân giải IL-25

IL-25 được phân giải bởi pepsin với các điều kiện khác nhau. Sự phân giải tốt nhất đối với IL-25 bằng pepsin là thu được khi 2 phần của dung dịch IL-25 được pha loãng được tối bằng 1 phần của ure 2M, TCEP 1M, độ pH 3,0 và được phân giải bằng cột pepsin ở mức 200 μ l/phút. Điều kiện tách tốt nhất là cột C18 với gradien tuyến tính là 13% đến 40% chất đệm B (95% axetonitril, 5% H_2O , và 0,0025% TFA) trong chất đệm A trong 23 phút. Sự che phủ trình tự của IL-25 sau khi phân giải pepsin là 100% (= 146 / 146; các Fig. 7A và 7B).

Giữ cố định M6 và thử nghiệm khả năng liên kết của cột M6

Mẫu IL-25 không có sự phân giải pepsin đã thể hiện một đỉnh sắc ký vào thời điểm 8,5 phút. Mẫu thể hiện là sạch. M6 được tiếp hợp thành công trên nhựa POROS AL bằng hóa học bazơ của Schiff. ExSAR đã kiểm tra khả năng liên kết của cột M6 trong ba điều kiện khác nhau như được thể hiện trong bảng 1. Một đỉnh nguyên vẹn với $m/z = 1875 (+18)$ và $1985 (+17)$ được tuân thủ. Trong tất cả các điều kiện liên kết được kiểm tra, không có IL-25 nào được giải hấp ra trong quá trình rửa trung tính, chứng tỏ rằng tất cả IL-25 được chất (166 μ mol) liên kết vào cột M6 ở các điều kiện trung tính. IL-25 có thể bám vào cột M6 một cách không đặc hiệu. Chỉ 17-18% của IL-25 đã được chất là được thu hồi trong quá trình rửa bằng axit với sự vắng mặt của thuốc tẩy. Đồng thời, đối áp suất của cột M6 dần dần tăng khi IL-25 được chất lặp đi lặp lại. Quá trình thu hồi được cải thiện bằng cách bổ sung Foscholine-12.

Bảng 1. Các điều kiện được dùng để kiểm tra khả năng liên kết của cột kháng thể M6

	Chất đệm H	Nhiệt độ	Pepsin	Trung tính	Axit
(a)	Xitrat 50mM, độ pH 6	3°C	-	0%	18%
(b)	Xitrat 50mM, Foscholine-12 2mM, độ pH 6	3°C	-	0%	24%

(c)	PBS, độ pH 7	3°C1	-	0%	17%
-----	--------------	------	---	----	-----

Cột giữa “nhiệt độ” và “trung tính” được đặt tiêu đề là “pepsin”.

Nhận diện epitop

<Các thử nghiệm trao đổi thuận của IL-25 trong dung dịch>

5 Các thử nghiệm trao đổi thuận của IL-25 trong dung dịch được thực hiện ở 23°C ở độ pH 7.

IL-25 đã thể hiện là một protein tương đối linh động.

<các thử nghiệm trao đổi thuận/nghịch của IL-25 có hoặc không có cột M6>

Đã quan sát thấy những khả năng bảo vệ mạnh nhất ở các đoạn bao gồm các gốc axit amin 56-63 và 66-74 (các Fig.8A và 9C; bảng 2). Các đoạn tương tự bao gồm các gốc axit amin 46-63 và 66-84 đã thể hiện những khả năng bảo vệ yếu đều (các Fig.8A, 9C và 9D; bảng 2). Đã quan sát thấy sự bảo vệ đường biên đối với các đoạn bao gồm các gốc axit amin 129- 135 (các Fig.8B, 9E và 9F; bảng 2).

Bảng 2. Những khác biệt về mức đơteri hóa trong các đoạn khác nhau của IL-25 người sau các thử nghiệm phản ứng trao đổi thuận/nghịch ở độ pH 7 và pH 8 ở 23°C.

Bắt đầu	Kết thúc	Mé liệu	Độ pH 6 150	Độ pH 6 150	Độ pH 7 150	Độ pH 7 500	Độ pH 7 1.500	Độ pH 7 5.000	Trung bình
3	9	1	-3%	2%	-1%	-1%	-1%	5%	0%
3	15	2	-3%	-5%	1%	0%	-3%	-1%	-2%
3	20	2	1%	0%	2%	1%	-3%	-1%	0%
12	20	1	0%	4%	-1%	0%	0%	1%	1%
23	42	2	3%	1%	1%	0%	-1%	3%	1%
23	43	2	3%	1%	1%	0%	-1%	0%	0%
23	45	3	2%	1%	2%	1%	1%	-2%	1%
23	53	3	2%	1%	0%	1%	1%	-1%	1%
46	53	1	2%	-1%	2%	1%	0%	0%	1%
46	63	3	8%	5%	11%	7%	1%	0%	5%
56	63	1	7%	7%	9%	8%	6%	2%	6%

66	74	2	6%	10%	11%	13%	7%	0%	8%
66	84	2	9%	2%	5%	7%	6%	-2%	4%
77	84	2	-	-	-	-	-2%	-2%	-2%
87	101	2	3%	2%	1%	3%	-2%	1%	1%
90	101	2	2%	0%	3%	3%	0%	1%	1%
104	109	1	2%	0%	0%	1%	0%	-2%	0%
105	109	1	0%	0%	0%	1%	4%	0%	1%
112	126	2	3%	2%	3%	2%	1%	0%	2%
112	127	2	7%	-4%	1%	4%	-3%	1%	1%
129	135	2	3%	6%	8%	4%	8%	0%	5%
133	135	1	-2%	3%	7%	5%	5%	2%	3%
138	146	1	1%	1%	-1%	-2%	0%	1%	0%
140	146	1	-1%	7%	3%	-2%	-2%	2%	1%

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với interleukin-25 (IL-25), trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

a) miền VL của kháng thể bao gồm CDR1 có trình tự axit amin SASQGISNYLN (SEQ ID NO:6), CDR2 có trình tự axit amin YTSSLHS (SEQ ID NO:7) và CDR3 có trình tự axit amin QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8); và

b) miền VH của kháng thể bao gồm CDR1 có trình tự axit amin GYTMN (SEQ ID NO: 10), CDR2 có trình tự axit amin LINPYNGGTSYNQNFKG (SEQ ID NO: 11) và CDR3 có trình tự axit amin EDYDGYLYFAMDY (SEQ ID NO: 12),

trong đó, kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có ái lực liên kết đối với IL-25 nhỏ hơn hoặc bằng 53pM khi được xác định trong thử nghiệm Biacore.

2. Kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có ái lực liên kết đối với IL-25 nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 50pM, khoảng 45pM, khoảng 40pM, khoảng 35pM, khoảng 30pM, khoảng 25pM, khoảng 20pM.

3. Kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền VL của chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự SEQ ID NO: 5.

4. Kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền VH của chuỗi nặng của kháng thể có trình tự SEQ ID NO: 9.

5. Kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm mảnh kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm các mảnh kháng thể Fab, Fab', F(ab')₂Fv và scFv.

6. Kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng cố định của người, tùy ý là trong đó vùng

cổ định của người này bao gồm chuỗi nặng IgG, như là IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

7. Axit nucleic được phân lập chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.

8. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 7, trong đó axit nucleic được liên kết theo kiểu có thể điều khiển với vùng khởi đầu.

9. Tế bào chủ mang vector biểu hiện theo điểm 8.

10. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 9 dưới các điều kiện để sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, tùy ý là còn bao gồm:

(i) phân lập kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; hoặc

(ii) bào chế kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó thành chế phẩm bao gồm ít nhất là một thành phần bổ sung.

11. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-6 và chất mang được dụng, tùy ý là trong đó chế phẩm này chứa bột được đông khô.

12. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó kháng IL-25, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có ái lực liên kết đối với IL-25 nhỏ hơn hoặc bằng 53pM và liên kết với một hoặc nhiều trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 56-63 của trình tự SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 66-74 của trình tự SEQ ID NO: 17 và các gốc axit amin 129-135 của trình tự SEQ ID NO: 17, bao gồm:

(a) tạo danh mục ban đầu của các axit nucleic mã hóa miền VL, trong đó các axit nucleic hoặc bao gồm vùng mã hóa CDR3 sẽ được thay thế hoặc thiếu vùng mã hóa CDR3;

(b) kết hợp danh mục ban đầu với axit nucleic cho mã hóa CDR3 của VL có trình tự axit amin QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8), trong đó axit nucleic cho được chèn vào một hoặc nhiều axit nucleic trong danh mục này để tạo ra danh mục sản phẩm của các axit nucleic mã hóa miền VL bao gồm CDR3 của VL có trình tự axit amin QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8);

- (c) biểu hiện các axit nucleic của danh mục sản phẩm để tạo ra các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng;
- (d) chọn lọc kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết một cách đặc hiệu với một hoặc nhiều trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 56-63 của SEQ ID NO: 17, các gốc axit amin 66-74 của SEQ ID NO: 17 và các gốc axit amin 129-135 của SEQ ID NO:17; và
- (e) thu hồi kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể đã nêu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, tùy ý là trong đó các axit nucleic của danh mục sản phẩm đã nêu được đồng biểu hiện với các axit nucleic mã hóa miền VH, như là trong đó miền VH bao gồm SEQ ID NO:9.

FIG. 1

GATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCATCCCAGGGC
ATTAGCAATTATCTGAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG
AAAGTTCCTAAACTCCTGATCTATTACACATCAAGTTTAC
ACTCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAGCGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATAGCAA
GCTGCCGTACACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAA (SEQ ID NO:1)

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCSASQGISNYLNWYQQKP
GKVPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPE
DVATYYCQQYSKLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:2)

FIG. 2

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGAGCGGAGCCGAGGT
GAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAAGGTGTCCTG
CAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCTCCGGCTACAC
CATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCCAGAG
GCTGGAATGGATGGGCCTGATCAACCCCTACAAC
GGCGGCACCAGCTACAACCAGAACTTCAAGGGC
AGGGTGACACTGACCGTGGATACCAGCGCCAGC
ACCGCCTACCTGGAAGTGAACAGCCTGAGAAGC
GAGGACACCGGCGTGTACTACTGCGCCAGAGAG
GACTACGACGGCTACCTGTACTTCGCCATGGACT
ACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGC
(SEQ ID NO:3)

EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYTM
NWVRQAPGQRLEWMGLINPYNGGTSYNQNFKGR
VTLTVDTSASTAYLELNSLRSED¹GVYYCARE²DYDG
YLYFAMDYWGQGTLVTVS (SEQ ID NO:4)

FIG. 4A

Trình tự Axit Amin chuỗi nhẹ (LC) của M6

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKP
 GKVPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DVATYYCQQYLAFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:5)

LC CDR 1: SASQGISNYLN (SEQ ID NO:6)

LC CDR 2: YTSSLHS (SEQ ID NO:7)

LC CDR 3: QQYLAFPYT (SEQ ID NO:8)

FIG. 4B

Trình tự Axit Amin chuỗi nặng (HC) của M6

EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYTMNWVRQ
 APGQRLEWMGLINPYNGGTSYNQNFKGRVTLTVDTASTA
 YLELNSLRSEDTGVYYCAREDYDGYLYFAMDYWGQGTLLT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
 QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9)

HC CDR 1: GYTMN (SEQ ID NO:10)

HC CDR 2: LINPYNGGTSYNQNFKG (SEQ ID NO:11)

HC CDR 3: EDYDGYLYFAMDY (SEQ ID NO:12)

FIG. 5

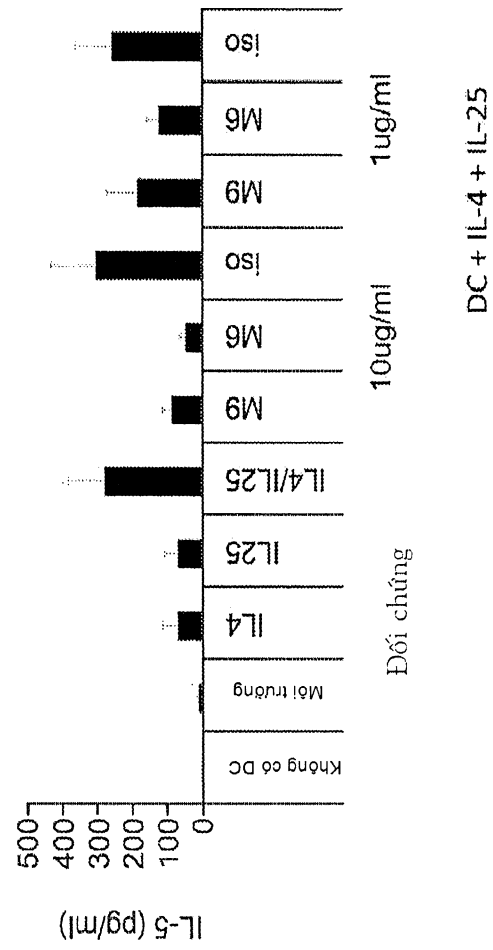
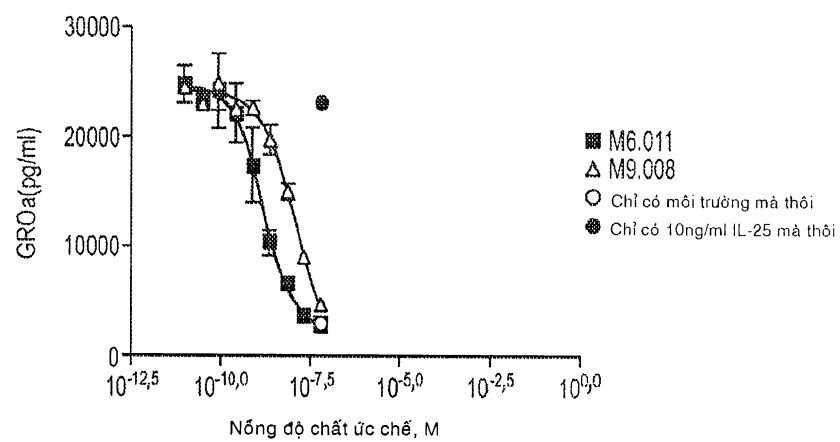


FIG. 6A

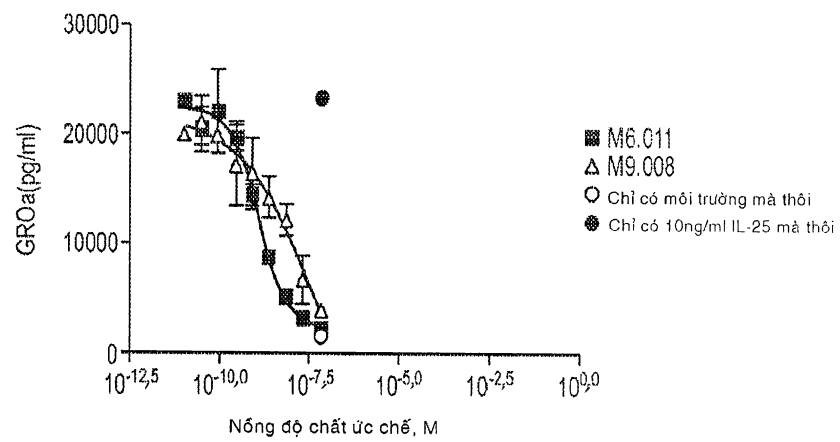
IL-25 của người và mAb được sàng lọc trong tế bào LS174T
12-01-09



	M6.011	M9.008
EC50	1,55e-009	1,17e-008

FIG. 6B

IL-25 của người và mAb được sàng lọc trong tế bào LS174T
20-01-2010



	M6.011	M9.008
EC50	1,26e-009	4,57e-008

FIG. 7A

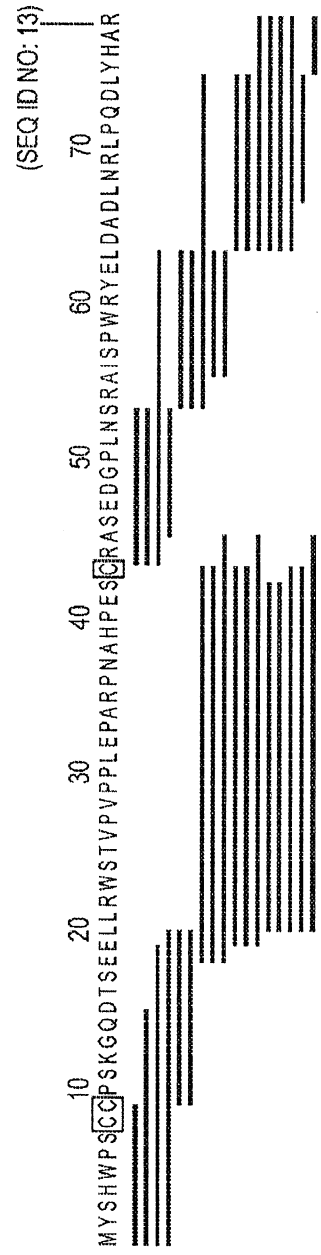


FIG. 7B

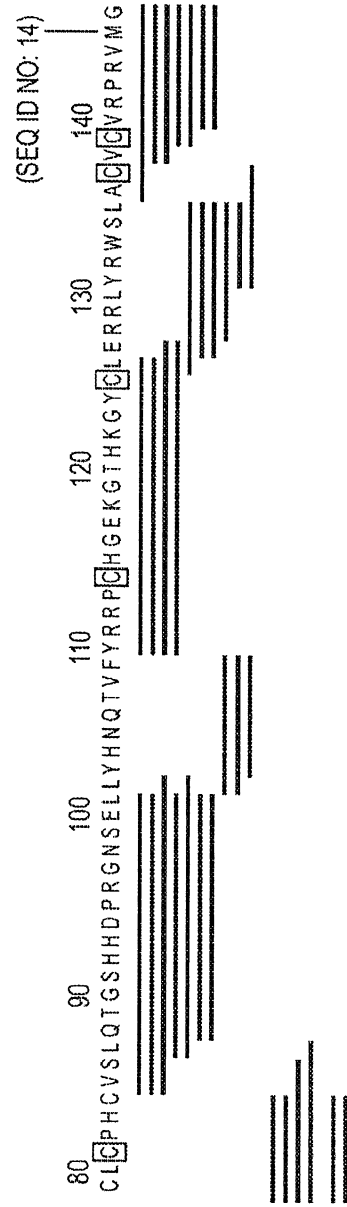


FIG. 8A

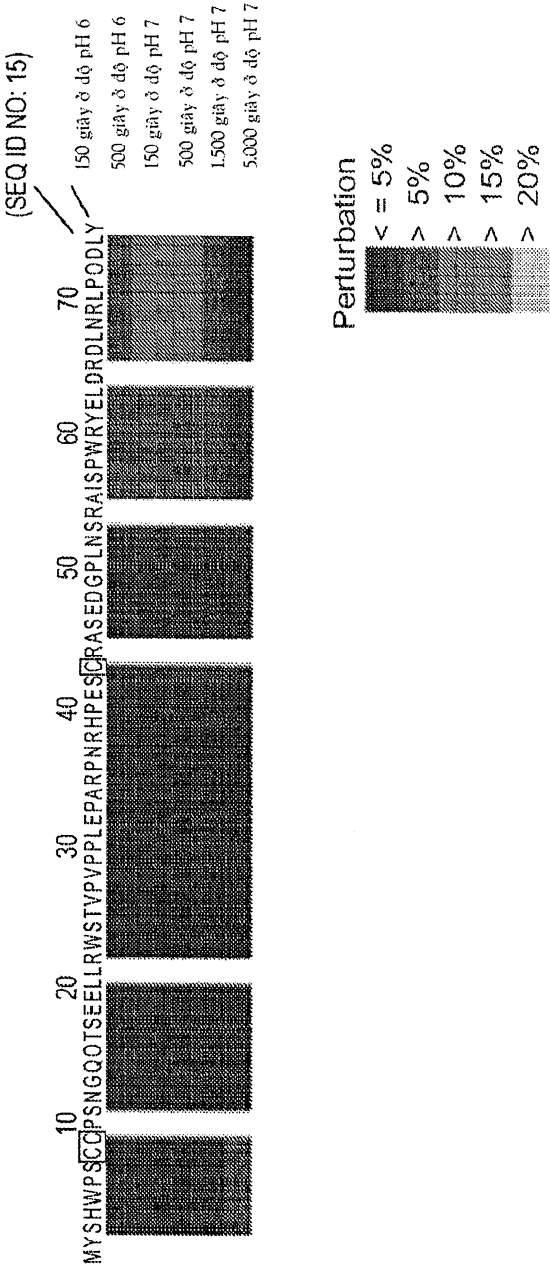


FIG. 8B

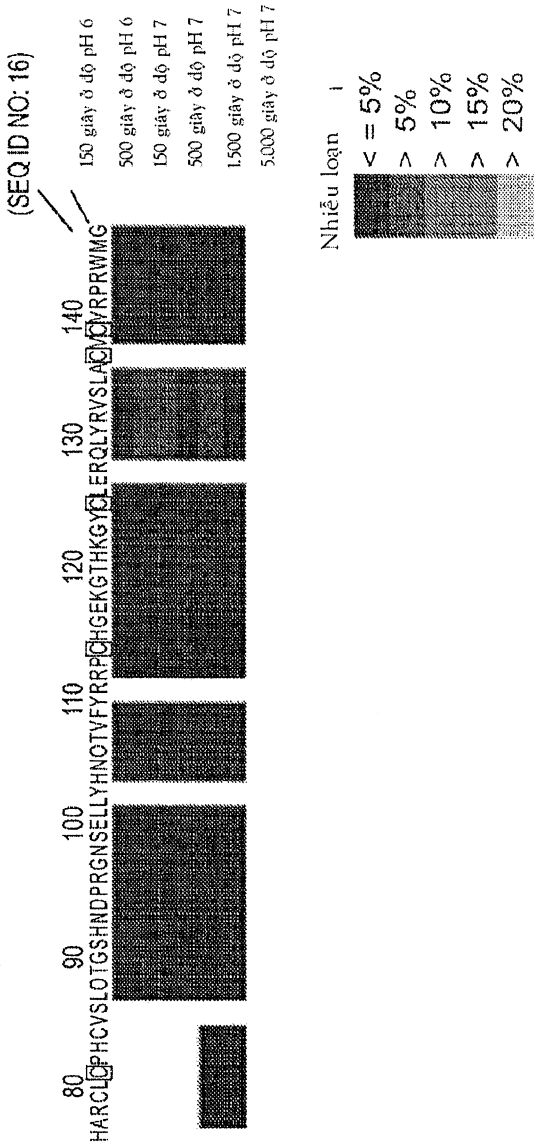


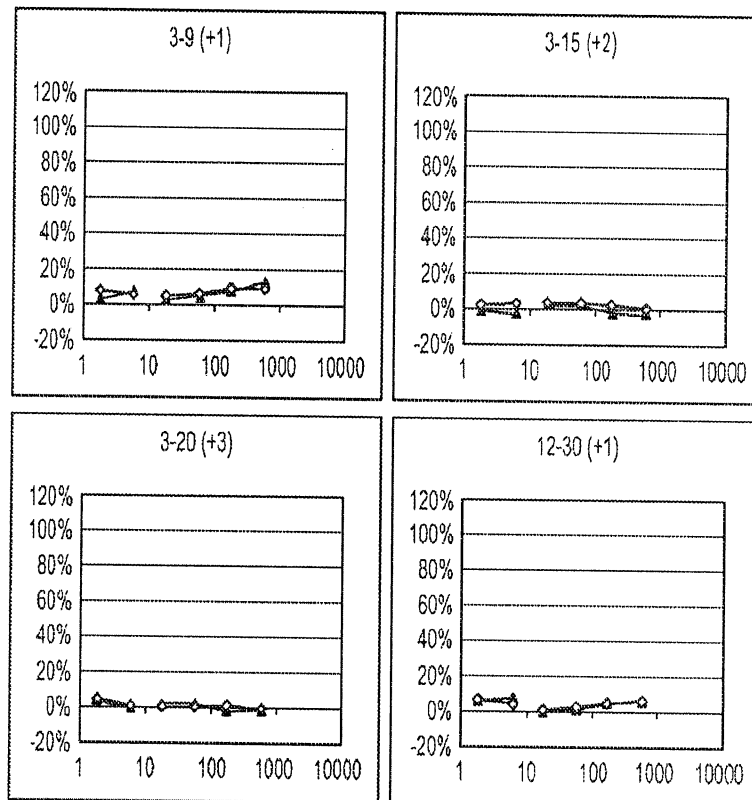
FIG. 9A

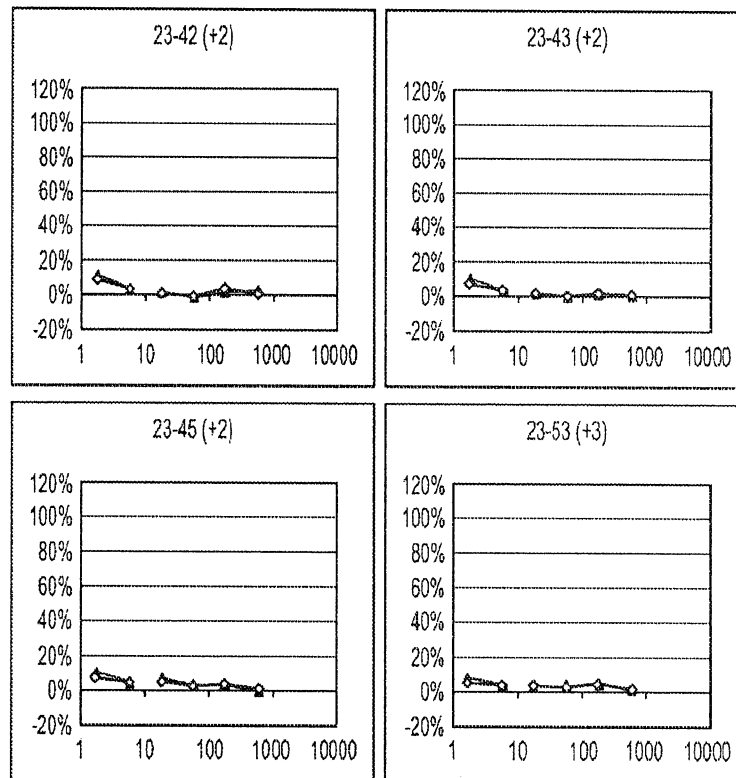
FIG. 9B

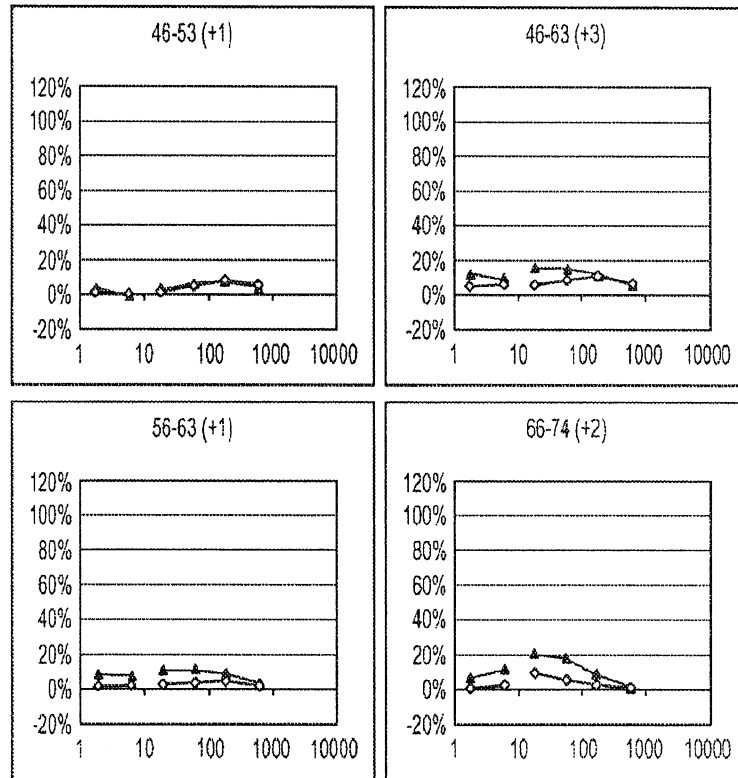
FIG. 9C

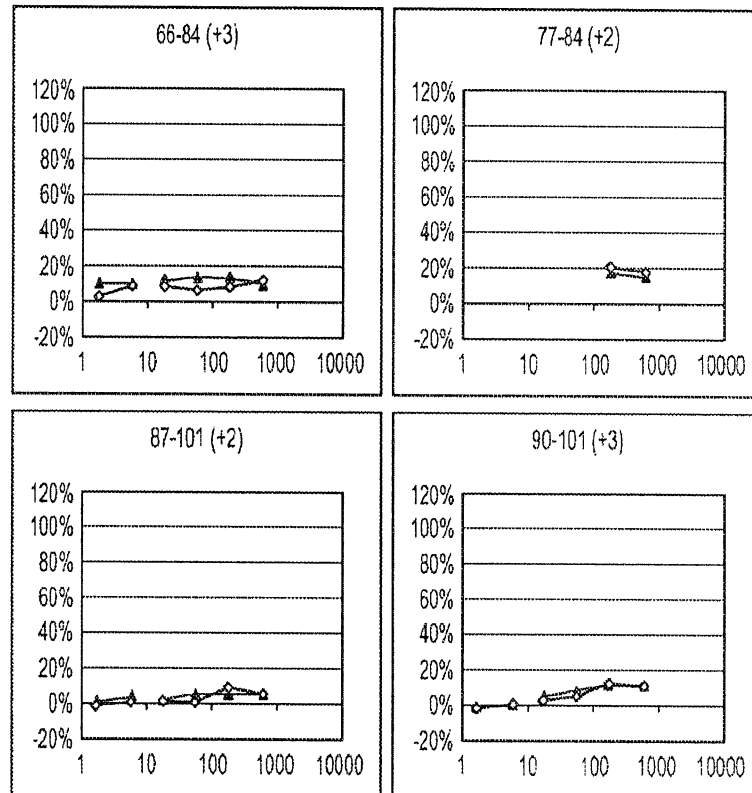
FIG. 9D

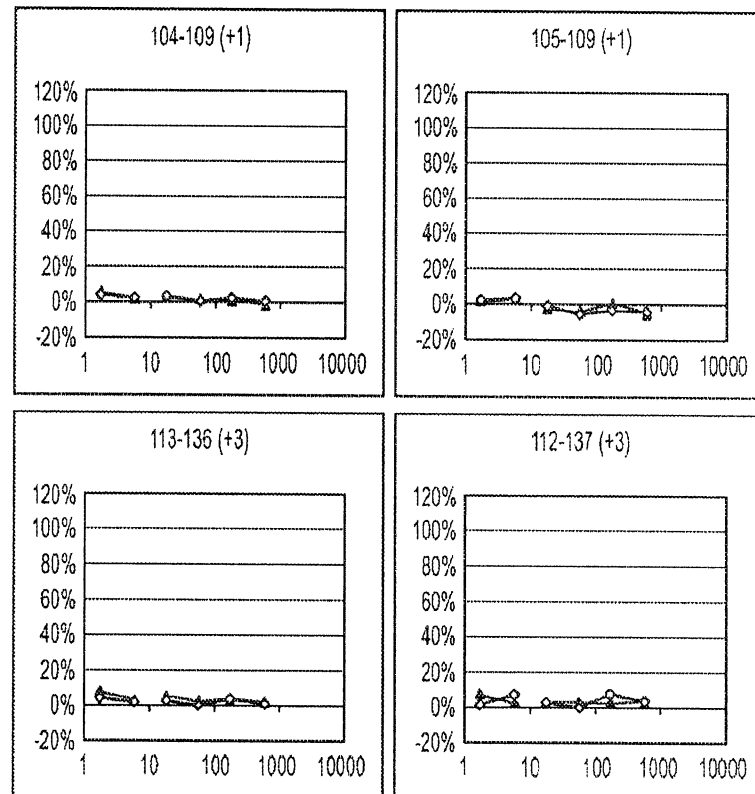
FIG. 9E

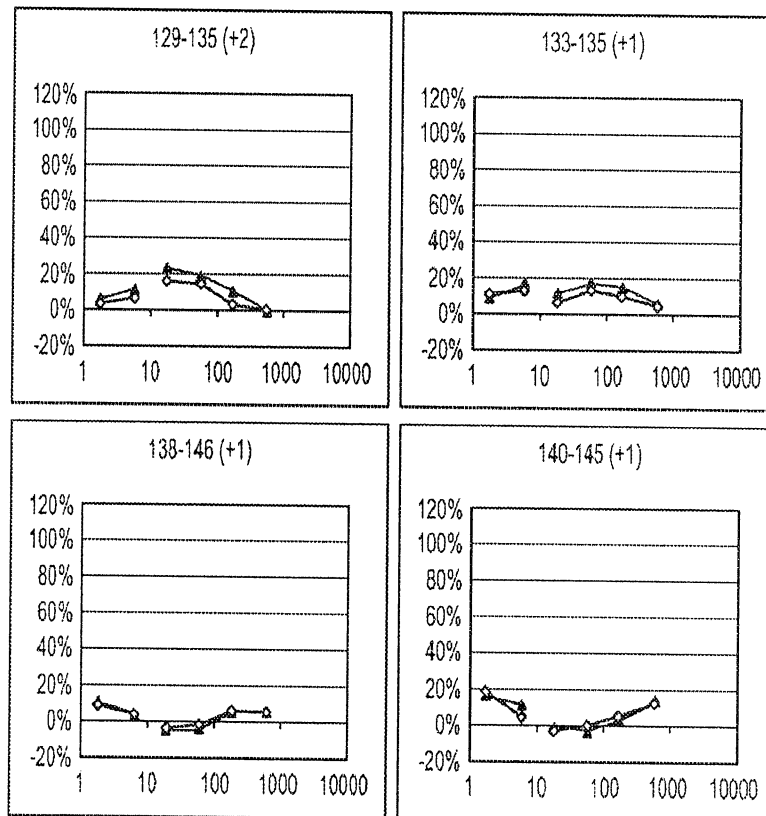
FIG. 9F

FIG. 10

MYSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPP
LEPARPNRHPESCRASEDGPLNSRAISPWR
YELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTG
SHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGT
HKGYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMG (SEQ ID
NO:17)

Danh mục trình tự

<110> JANSSEN BIOTECH, INC.

<120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT VỚI INTERLEUKIN-25 VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> SPC5341PCT

<140> JANSSEN BIOTECH, INC.

<141> Ngày 28/03/2010

<150> 61/341458

<151> Ngày 30/03/2010

<150> 61/319260

<151> Ngày 31/03/2010

<160> 17

<170> Trình tự nhanh cho phiên bản Windows 4.0

<210> 1

<211> 313

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gatgaccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gacagagtc ccatcacttg 60
cagtgcattc cagggcatta gcaattatct gaattggtat cagcagaaac cagggaaagt 120
tcctaaactc ctgatctatt acacatcaag ttacactca ggggtcccat ctcggttcag 180
cggcagtggg tctgggacag atttcactct caccatcagc agcctgcagc ctgaagatgt 240
tgcaacttat tactgtcagc agtatagcaa gctgccgtac acgtttggcc aggggaccaa 300
gctggagatc aaa                                     313

```

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

```

<400> 3
gaggtgcagc tggtcgagag cggagccgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta cagcttctcc ggctacacca tgaactgggt gcggcaggcc 120
ccaggccaga ggctggaatg gatgggcctg atcaaccctt acaacggcgg caccagctac 180
aaccagaact tcaagggcag ggtgacctg accgtggata ccagcgccag caccgcctac 240
ctggaactga acagcctgag aagcgaggac accggcgtgt actactgcgc cagagaggac 300
tacgacggct acctgtactt cgccatggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg 360
agc 363

```

```

<210> 4
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Ser Gly Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

```

```

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 5
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His 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 Gln Tyr Leu Ala Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

```

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

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

<400> 7
 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Gln Gln Tyr Leu Ala Phe Pro Tyr Thr Phe
 1 5 10

<210> 9
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 Ser Pro Gly Lys
 165 170 175
 180 185 190
 195 200 205
 210 215 220
 225 230 235
 240 245 250
 255 260 265
 270 275 280
 285 290 295
 300 305 310
 315 320 325
 330 335 340
 345 350 355
 360 365 370
 375 380 385
 390 395 400
 405 410 415
 420 425 430
 435 440 445
 450

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Gly Tyr Thr Met Asn
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 12
 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 13

<211> 78

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

<210> 14

<211> 68

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp
 1 5 10 15
 Pro Arg Gly Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr
 20 25 30
 Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu
 35 40 45
 Glu Arg Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro
 50 55 60
 Arg Val Met Gly
 65

<210> 15

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

<210> 16

<211> 71
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 His Ala Arg Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser
 1 5 10 15
 His Met Asp Pro Arg Gly Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr
 20 25 30
 Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly
 35 40 45
 Tyr Cys Leu Glu Arg Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys
 50 55 60
 Val Arg Pro Arg Val Met Gly
 65 70

<210> 17
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Met Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr
 1 5 10 15
 Ser Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu
 20 25 30
 Pro Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp
 35 40 45
 Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp
 50 55 60
 Arg Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu
 65 70 75 80
 Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg
 85 90 95
 Gly Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg
 100 105 110
 Pro Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg
 115 120 125
 Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val
 130 135 140
 Met Gly
 145