



(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)



1-0032565

(51)⁷ C12N 15/00; A61P 11/06; C07K 16/28; (13) B
C12P 21/08; C12N 15/09; C12N 5/10;
A61K 39/395; C07K 16/46

(21) 1-2016-00483

(22) 08/08/2014

(86) PCT/JP2014/071008 08/08/2014

(87) WO 2015/020193 A1 12/02/2015

(30) 2013-165676 09/08/2013 JP

(45) 25/07/2022 412

(43) 27/06/2016 339A

(73) Astellas Pharma Inc. (JP)

5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038411 (JP)

(72) Hiromu SATO (JP); Daisuke YAMAJUKU (JP); Kazunori ARAI (JP); Mako OGINO (JP).

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

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG THỤ THỂ LYMPHOPOIETIN CHẤT NỀN TUYẾN ỨC (TSLP) Ở NGƯỜI, POLYNUCLEOTIT, VECTƠ BIỂU HIỆN, VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng thụ thể lymphopoietin chất nền tuyến ức (Thymic stromal lymphopoietin -TSLP) ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với thụ thể TSLP ở người và ức chế tác dụng của TSLP ở người thông qua thụ thể TSLP ở người. Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người đã được nghiên cứu bởi các tác giả sáng chế, và kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người được đề xuất bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3. Sáng chế đã bộc lộ rằng kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người ức chế sự biểu hiện của mRNA TARC gây ra bởi TSLP và sự sản xuất các protein MDC, và ngăn ngừa phản ứng dị ứng theo mô hình mẫn cảm kháng nguyên giun đũa ở khỉ, và sau đó hoàn thành sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit, tế bào chủ, và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng thụ thể lymphopoietin chất nền tuyến ức (TSLP) ở người, polynucleotit, vector biểu hiện và dược phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lymphopoietin chất nền tuyến ức (Thymic stromal lymphopoietin-TSLP) là xytokin thu được từ các tế bào biểu mô, mà được tạo ra để đáp ứng các kích thích tiền viêm. Chủ yếu là, TSLP tăng cường đáp ứng viêm dị ứng thông qua sự hoạt hóa của các tế bào nhánh và các tế bào mast. Các tế bào nhánh biểu hiện thụ thể TSLP và chuỗi α của thụ thể IL-7 mà là các thành viên của họ thụ thể tạo máu, và TSLP liên kết với heterodime gồm có thụ thể TSLP và chuỗi α của thụ thể IL-7, nhờ đó hoạt hóa các tế bào nhánh. Các tế bào nhánh được hoạt hóa bởi TSLP biểu hiện các chemokin gây viêm như tuyến ức và các chemokin được điều khiển bởi sự hoạt hóa này (TARC (CCL17)), các chemokin thu được từ đại thực bào (MDC (CCL22)), và tương tự (Nat. Immunol., 2002, tập 7, các trang từ 673 đến 680). Đã biết rằng TARC và MDC là các chemokin Th2 và thu hút các tế bào Th2 vào vị trí gây viêm (Int. Immunol., 1999, tập 11, các trang từ 81 đến 88). Hơn nữa, các tế bào nhánh được hoạt hóa bởi TSLP gây ra sự biệt hóa mạnh mẽ các tế bào T non thành các tế bào Th2, và các tế bào Th2 tạo thành IL-4, IL-5, IL-13, và TNF α , và gây ra phản ứng viêm (Nat. Immunol., 2002, tập 7, các trang từ 673 đến 680).

Đã có báo cáo rằng sự hoạt hóa của các tế bào nhánh do TSLP thông qua thụ thể TSLP này liên quan đến bệnh học, bao gồm các bệnh viêm dị ứng như bệnh hen, và bệnh xơ cứng toàn thân.

Đối với bệnh hen, đã có báo cáo rằng ở chuột chuyển gen mà trong đó biểu hiện TSLP được tăng cường cụ thể ở phổi, đáp ứng viêm ở đường hô hấp được gây ra kèm theo sự tăng lượng IgE và các xytokin Th2 ở phổi, và điều này dẫn đến bệnh hen (Nat. Immunol., 2005, tập 6, các trang từ 1047 đến 1053). Hơn nữa, trong chuột bất hoạt (knockout) có thụ thể TSLP hoặc mô hình bệnh hen mà có kháng thể kháng thụ thể TSLP được đưa vào, quan sát thấy sự ngăn chặn các xytokin Th2 và sự sản xuất IgE trong máu, và sự cải thiện chức năng hô hấp (J. Exp. Med., 2005, tập 202, các trang từ 829 đến 839, và Clin. Immunol., 2008, tập 129, các trang từ 202 đến 210).

Ngoài ra, ở các bệnh nhân mắc bệnh hen, đã có báo cáo rằng các biểu hiện của TSLP, TARC, và MDC tăng lên trong các đường dẫn khí của ở bệnh nhân hen suyễn liên quan đến mức độ nghiêm trọng của bệnh (J. Immunol., 2005, tập 174, các trang từ 8183 đến 8190, và J. Immunol., 2008, tập 181, các trang từ 2790 đến 2798).

Đối với bệnh xơ cứng toàn thân, đã có báo cáo rằng TSLP được biểu hiện qua da của các bệnh nhân mắc bệnh xơ cứng toàn thân (Arthritis Rheum., 2013, tập 65, các trang từ 1335 đến 1346), và biểu hiện của IL-13 và IL-17 trong vị trí gây viêm của da hầu hết được ngăn chặn hoàn toàn và tỷ lệ collagen để mô bệnh học được cải thiện đáng kể trong mô hình bệnh cứng da được gây ra bởi bleomycin sử dụng chuột bất hoạt có thụ thể TSLP (Ann. Rheum. Dis., 2013, tập 72, các trang từ 2018 đến 2023).

Do đó, khi kháng thể đơn dòng mà liên kết đặc hiệu với thụ thể TSLP ở người và ức chế tác dụng của TSLP ở người thông qua thụ thể TSLP ở người có thể được phát triển, có kỳ vọng là kháng thể này hữu ích cho việc ngăn ngừa và điều trị các bệnh khác nhau mà trong đó TSLP ở người và thụ thể TSLP ở người liên quan đến bệnh học.

Đối với các kháng thể chống lại thụ thể TSLP ở người mà nghiên cứu đã được tiến hành cho đến nay, 13H5 là kháng thể đơn dòng ở chuột và hu13H5 là kháng thể được nhân hóa của chúng (tài liệu patent 1), 1D6.C9 là kháng thể đơn dòng ở chuột và Nv115-3B-IgG1 và NV115-3B-IgG4 là các kháng thể dạng thể khảm của chúng (tài liệu patent 2), NV164-1 và NV163-1 là các kháng thể hoàn toàn ở người (tài liệu patent 3), và TSLPR-012_141 là kháng thể đơn dòng được nhân hóa xuất phát từ chuột đồng (hamster) đã được báo cáo.

Ở 13H5, hoạt tính trung hòa đã được xác nhận trong thử nghiệm sự tăng sinh gây ra bởi TSLP sử dụng các tế bào Ba/F3 biểu hiện ổn định thụ thể TSLP ở người, nhưng hoạt tính trung hòa của hu13H5 chưa được xác nhận (tài liệu patent 1). Hơn nữa, dựa trên nội dung bộc lộ của các tài liệu patent từ 2 đến 4, giữa các kháng thể được mô tả trong các tài liệu này, nhận ra rằng TSLPR-012_141 có hoạt tính trung hòa cao nhất (các tài liệu patent từ 2 đến 4). TSLPR-012_141 đã được đánh giá thông qua các thử nghiệm khác nhau về hoạt tính trung hòa. Ví dụ, trong thử nghiệm sự tăng sinh gây ra bởi TSLP sử dụng các tế bào Ba/F3 biểu hiện ổn định thụ thể TSLP ở người, TARC gây ra bởi TSLP, MDC, và thử nghiệm sự sản xuất IL-8 sử dụng các tế bào nhánh có nguồn gốc từ máu ngoại biên ở người, thử nghiệm sản xuất xytokin Th2 gây ra bởi TSLP sử dụng các tế bào nhánh có nguồn gốc từ máu ngoại biên ở người và các

hệ thống đồng nuôi cấy tế bào T non, và tương tự, TSLPR-012_141 đã được xác nhận là thể hiện hoạt tính trung hòa (tài liệu patent 4). Tuy nhiên, mong muốn kháng thể thể hiện hoạt tính trung hòa cao để được sử dụng làm thuốc kháng thể.

Các yếu tố chính mà xác định liều lượng hữu hiệu của thuốc kháng thể bao gồm hoạt tính liên kết và hoạt tính trung hòa của kháng thể chống lại kháng nguyên cũng như lượng kháng nguyên có mặt trong cơ thể. Sự tăng hoạt tính liên kết và hoạt tính trung hòa dẫn đến giảm liều lượng, và do đó, dẫn đến giảm gánh nặng về tài chính và các chi phí về y tế cho bệnh nhân, mà đó là sự cải thiện rất có lợi.

Do đó, cần thiết thu được kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người mà có hoạt tính ưu việt so với kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người thông thường được sử dụng để ngăn ngừa và điều trị các bệnh khác nhau.

Danh mục tài liệu viện dẫn

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: WO 2009/100324

Tài liệu patent 2: WO 2007/112146

Tài liệu patent 3: WO 2008/155365

Tài liệu patent 4: WO 2012/007495

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người mà được liên kết đặc hiệu với thụ thể TSLP ở người và ức chế tác dụng của TSLP ở người thông qua thụ thể TSLP ở người.

Giải pháp để giải quyết vấn đề

Như là kết quả của nghiên cứu chuyên sâu về sự sản xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người bởi các tác giả sáng chế, kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3 đã được đề xuất. Sáng chế đã bộc lộ rằng kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người ức chế sự biểu hiện mRNA TARC và sự sản xuất các protein MDC gây ra bởi TSLP (các ví dụ 5 và 6), và ngăn ngừa phản ứng dị ứng theo mô hình mẫn cảm kháng nguyên giun đũa (*Ascaris*) ở khỉ (ví dụ 7), do đó hoàn thành sáng chế.

Nghĩa là, sáng chế bao gồm các nội dung dưới đây:

[1] Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ (1) hoặc (2) dưới đây:

(1) kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1, và vùng liên kết chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3;

(2) kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong đó axit glutamic của đầu N của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó của (1) được biến đổi thành axit pyroglutamic.

[2] Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo [1], trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

[3] Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo [1], trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, trong đó axit glutamic của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 1 được biến đổi thành axit pyroglutamic và/hoặc lysin của axit amin số 448 của SEQ ID NO: 1 được loại bỏ, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

[4]. Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo [3], trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 447 của SEQ ID NO: 1, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

[5] Polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo 1, và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo 1.

[6] Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo 1 và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo 1.

[7] Tế bào chủ được chọn từ nhóm gồm có từ (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo 1 và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP

ở người theo 1 và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo 1; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo 1,

trong đó tế bào chủ biểu hiện kháng thể nêu trên.

[8] Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được tạo ra bằng phương pháp bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ để biểu hiện kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó tế bào chủ là tế bào chủ theo [7].

[9] Dược phẩm bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo 1 và/hoặc kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo [1](2), và tá dược được dùng.

[10] Dược phẩm theo [9], trong đó dược phẩm này bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo [2] và/hoặc kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo [4], và tá dược được dùng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế liên kết với thụ thể TSLP ở người, có hoạt tính trung hòa chống lại tác dụng của TSLP ở người thông qua thụ thể TSLP ở người, và có thể được sử dụng làm tác nhân để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh gây viêm dị ứng như bệnh hen hoặc bệnh xơ cứng toàn thân.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế của T7-27 hoàn toàn ở người trên nồng độ IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa theo mô hình miễn cảm kháng nguyên giun đũa ở khỉ. Trục tung biểu diễn nồng độ IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa ở dạng huyết tương tương đối của các mẫu tương ứng khi nồng độ IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa ở dạng huyết tương ở ngày 22 của một nhóm riêng lẻ từ trong số nhóm dùng tá dược lỏng được thiết lập là 2000 U/mL. Nồng độ IgE ở ngày 1 của nhóm dùng tá dược lỏng và nhóm dùng kháng thể (trước khi cho dùng chất lỏng kháng nguyên giun

đũa được tạo huyền phù bằng gel nhôm hydroxit), nồng độ IgE ở ngày 22 của nhóm dùng tá được lỏng, và nồng độ IgE ở ngày 22 của nhóm dùng kháng thể được thể hiện.

Fig.2 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế của T7-27 hoàn toàn ở người trên phản ứng ở da đặc hiệu kháng nguyên giun đũa theo mô hình miễn cảm kháng nguyên giun đũa ở khỉ. Các kết quả của việc dùng dung dịch muối đệm phosphat (phosphate buffered saline - PBS) và dung dịch kháng nguyên giun đũa 100 µg/mL ở ngày 22 được thể hiện. Trục tung biểu diễn trị số (delta cm) mà trong đó đường kính của vùng phản ứng ở da do PBS trừ đi đường kính của vùng phản ứng ở da do dung dịch kháng nguyên giun đũa.

Fig.3 là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế của kháng thể kháng thụ thể TSLP trên phản ứng đường hô hấp nhạy cảm hơn theo mô hình bệnh hen ở chuột. Trục tung biểu diễn trị số PenH được sử dụng làm chỉ số của chức năng hô hấp (**p < 0,01, *p < 0,05, ##p < 0,01, #p < 0,05).

Fig.4 là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế của kháng thể kháng thụ thể TSLP trên sự thâm thấu của các tế bào ưa eozin theo mô hình bệnh hen ở chuột. Trục tung biểu diễn số lượng các tế bào ưa eozin trong huyền phù tế bào BALF (**p < 0,01).

Fig.5 là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế của kháng thể kháng thụ thể TSLP trên biểu hiện của mRNA TARC theo mô hình bệnh hen ở chuột. Trục tung biểu diễn mức biểu hiện của mRNA TARC.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Có năm lớp là IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE trong kháng thể, và cấu trúc cơ sở của phân tử kháng thể được cấu tạo gồm các chuỗi nặng có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 50000 đến 70000 và các chuỗi nhẹ có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 20000 đến 30000 trong mỗi lớp chung. Chuỗi nặng thường gồm có chuỗi polypeptit bao gồm khoảng 440 axit amin, có cấu trúc phân biệt đối với mỗi lớp, và lần lượt được gọi là Igγ, Igμ, Igα, Igδ, và Igε tương ứng với IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE. Hơn nữa, bốn phân lớp là IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 có mặt trong IgG, và các chuỗi nặng lần lượt tương ứng với chúng được gọi là Igγ1, Igγ2, Igγ3, và Igγ4. Chuỗi nhẹ thường gồm có chuỗi polypeptit bao gồm 220 axit amin, hai loại của chúng, loại L và loại K được biết đến, và được gọi là Igλ và Igκ. Theo cấu trúc peptit của cấu trúc cơ sở của các kháng thể phân tử, hai chuỗi nặng tương đồng và hai chuỗi nhẹ tương đồng được liên kết bằng các liên kết disulfua (liên kết S-S) và các liên kết không cộng hóa

trị, và trọng lượng phân tử của nó là nằm trong khoảng từ 150000 đến 190000. Hai kiểu chuỗi nhẹ có thể được cặp với bất kỳ chuỗi nặng. Các phân tử kháng thể tương ứng thông thường gồm có hai chuỗi nhẹ tương đồng và hai chuỗi nặng tương đồng.

Đối với các liên kết S-S nội chuỗi, bốn liên kết S-S có mặt trong chuỗi nặng (năm Ig μ và Ig ϵ) và hai liên kết có mặt trong chuỗi nhẹ; một vòng được tạo thành trên từ 100 đến 110 gốc axit amin, và cấu trúc trong không gian này thì tương tự trong số các vòng và được gọi là đơn vị cấu trúc hoặc miền. Miền được nằm ở phía đầu amin (đầu N) ở cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mà trình tự axit amin của nó là không cố định ngay cả trong trường hợp của mẫu từ lớp tương tự (phân lớp) của loại động vật tương tự được gọi là vùng biến đổi, và các tương ứng miền được gọi là vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L). Trình tự axit amin của phía đầu carboxy (đầu C) từ vùng biến đổi gần như cố định ở mỗi lớp hoặc phân lớp và được gọi là vùng cố định (mỗi miền trong số các miền lần lượt được gọi là C_H1 , C_H2 , C_H3 và C_L).

Vị trí xác định kháng nguyên của kháng thể được cấu tạo gồm V_H và V_L , và tính đặc hiệu liên kết phụ thuộc vào trình tự axit amin của vị trí này. Mặt khác, các hoạt tính sinh học như liên kết với các phân tử hỗ trợ và các tế bào khác phản ánh sự khác nhau theo các cấu trúc vùng cố định giữa mỗi lớp Ig. Được hiểu rằng sự biến đổi của các vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng hầu hết được giới hạn với ba vùng siêu biến nhỏ có mặt trong cả các chuỗi và các vùng này được gọi là các vùng xác định hỗ trợ (CDR: CDR1, CDR2, và CDR3 từ phía đầu N). Phần còn lại của vùng biến đổi được gọi là vùng khung (FR) và tương đối cố định.

Hơn nữa, các loại khác của các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm V_H và V_L của kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên. Ví dụ, mảnh của vùng biến đổi chuỗi đơn (scFv), Fab, Fab', và $F(ab')_2$ thông thường được minh họa là các mảnh liên kết kháng nguyên. Mảnh Fab là mảnh liên kết kháng nguyên đơn trị mà được cấu tạo với mảnh chuỗi nhẹ và mảnh chuỗi nặng bao gồm V_H , C_H1 , và một phần vùng mối nối. Mảnh Fab' là mảnh liên kết kháng nguyên đơn trị mà được cấu tạo với mảnh chuỗi nhẹ và chuỗi nặng bao gồm V_H , C_H1 , và một phần vùng mối nối, và gốc cystein cấu thành liên kết S-S liên chuỗi nặng được bao gồm một phần vùng mối nối. Mảnh $F(ab')_2$ là mảnh liên kết kháng nguyên thể lưỡng trị có cấu trúc đối xứng hai bên mà trong đó hai mảnh Fab' liên kết lẫn nhau qua liên kết S-S liên chuỗi nặng theo vùng mối nối. Mảnh scFv là mảnh liên kết kháng nguyên đơn trị mà được cấu tạo có V_H và V_L được liên kết với peptit của mối liên kết.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có các dấu hiệu kỹ thuật sau đây.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3.

Tốt hơn là, kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có các dấu hiệu kỹ thuật được mô tả ở trên và còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nhẹ. Đối với vùng cố định, các phân lớp bất kỳ của vùng cố định (ví dụ, vùng cố định Igy1, Igy2, Igy3, hoặc Igy4 là vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định Igl hoặc Igk là vùng cố định chuỗi nhẹ) có thể được chọn, nhưng vùng cố định Igy1 ở người tốt hơn là vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định Igk ở người tốt hơn là vùng cố định chuỗi nhẹ.

Vùng cố định Igy1 ở người bao gồm, ví dụ, vùng cố định Igy1 ở người gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 119 đến 448 của SEQ ID NO: 1.

Vùng cố định Igk ở người bao gồm, ví dụ, vùng cố định Igk ở người gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 109 đến 214 của SEQ ID NO: 3.

Đối với kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được mô tả ở trên và vùng biến đổi chuỗi nhẹ và tốt hơn nữa là trong đó vùng cố định chuỗi nặng là vùng cố định Igy1 ở người và vùng cố định chuỗi nhẹ là vùng cố định Igk ở người.

Theo một phương án, mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế là scFv, Fab, Fab', hoặc F(ab')₂.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này bất kỳ có thể tạo ra sự dung hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và peptit hoặc protein khác và cũng có thể tạo ra sự biến đổi có tác nhân gây biến đổi được liên kết vào đó, sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó ở dạng dung hợp hoặc sự biến đổi này. Ví dụ, kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng

gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3 bao gồm dung hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và peptit hoặc protein khác, và sự biến đổi có tác nhân gây biến đổi được liên kết vào đó. Peptit hoặc protein khác được sử dụng để sự dung hợp không bị giới hạn cụ thể, miễn là không làm giảm hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; các ví dụ của nó bao gồm albumin huyết thanh ở người, đuôi peptit khác nhau, peptit có mô hình xoắn nhân tạo, protein liên kết maltoza, glutathion S transferaza, độc tố khác nhau, peptit khác nhau hoặc protein có khả năng thúc đẩy sự đa phân hóa, và tương tự. Tác nhân gây biến đổi được sử dụng cho sự biến đổi không bị giới hạn đặc biệt, miễn là nó không giảm hoạt tính liên kết của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; các ví dụ của chúng bao gồm polyetylen glycol, chuỗi đường, phospholipid, liposom, hợp chất phân tử thấp và tương tự.

Theo một phương án, kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế là kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người có các đặc điểm sau đây.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

Trong trường hợp mà kháng thể được biểu hiện trong các tế bào, thì được biết là kháng thể được biến đổi sau khi dịch mã. Các ví dụ về sự biến đổi dịch mã bao gồm cắt lysin ở đầu C của chuỗi nặng bằng carboxypeptidaza, sự biến đổi axit pyroglutamic do sự pyroglutamyl hóa của axit glutamic hoặc glutamin của đầu N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, và tương tự. Được biết đến rằng lysin ở đầu C của chuỗi nặng bị loại bỏ hoặc phần lớn glutamin ở đầu N của chuỗi nặng được biến đổi thành axit pyroglutamic (JouARNI of Pharmaceutical Sciences, 2008, tập 97, trang 2426). Hơn nữa, cũng được biết đến rằng sự biến đổi sau khi dịch mã không ảnh hưởng đến hoạt tính của kháng thể trong lĩnh vực của sáng chế (Analytical Biochemistry, 2006, tập 348, các trang từ 24 đến 39).

Kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể được biến đổi sau khi dịch mã trong quá trình biểu hiện trong các tế bào như kháng thể bao gồm chuỗi nặng thiếu lysin ở đầu C, kháng thể mà trong đó glutamin hoặc axit glutamic ở đầu N của chuỗi nặng được biến đổi thành axit pyroglutamic do sự pyroglutamyl hóa, và tương tự bên cạnh kháng thể bao gồm chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng. Hơn nữa, mảnh liên kết

kháng nguyên theo sáng chế bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên được biến đổi sau khi dịch mã trong quá trình biểu hiện trong các tế bào như mảnh liên kết kháng nguyên mà trong đó glutamin hoặc axit glutamic ở đầu N của chuỗi nặng được biến đổi thành axit pyroglutamic do sự pyroglutamyl hóa.

Ví dụ, kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người được mô tả dưới đây.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, mà trong đó axit glutamic của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 1 được biến đổi thành axit pyroglutamic và/hoặc lysin của axit amin số 448 của SEQ ID NO: 1 được loại bỏ, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có các đặc điểm sau đây.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 31 đến 35 của SEQ ID NO: 1, CDR2 gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 50 đến 66 của SEQ ID NO: 1, và CDR3 gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 99 đến 107 của SEQ ID NO: 1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 24 đến 34 của SEQ ID NO: 3, CDR2 gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 50 đến 56 của SEQ ID NO: 3, và CDR3 gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 89 đến 97 của SEQ ID NO: 3.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế liên kết với thụ thể TSLP ở người. Hoặc là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể TSLP ở người được xác nhận bằng cách sử dụng phương pháp đo hoạt tính liên kết liên quan đến lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về phương pháp đo hoạt tính liên kết bao gồm phương pháp thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay) hoặc phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR – Surface plasmon resonance). Trong trường hợp sử dụng ELISA, theo phương pháp ví dụ, protein dung hợp của thụ thể TSLP ở người và Fc ở người (protein dung hợp Fc ở người - thụ thể TSLP ở người (được mã hóa bởi trình tự bazơ của SEQ ID NO: 5)) được cố định trên tấm ELISA, và bổ sung kháng thể thử nghiệm vào đó để được phản ứng. Sau khi phản ứng, kháng thể

thứ cấp như kháng thể kháng IgG hoặc tương tự được đánh dấu với enzym như peroxidaza củ cải ngựa (HRP – Horseradish peroxidase) được phản ứng, và được làm sạch, và sau đó có thể xác nhận liệu kháng thể thử nghiệm có liên kết thụ thể TSLP ở người với sự đo hoạt tính sử dụng chất phản ứng loại bỏ hoạt tính (ví dụ, trong trường hợp đánh dấu HRP, nền ELISA phát quang hóa BM (POD) (Roche Diagnostics. Inc.)). Trong trường hợp sử dụng SPR, ví dụ, có thể sử dụng Biacore (nhãn hiệu đã được đăng ký) 2000 (GE Healthcare Japan Corporation). Theo phương pháp ví dụ, bổ sung kháng thể thử nghiệm được cố định trên bề mặt của chip cảm biến và protein dung hợp của thụ thể TSLP ở người và Fc ở chuột (protein dung hợp Fc ở chuột - thụ thể TSLP ở người (được mã hóa bởi trình tự bazơ của SEQ ID NO: 6)) vào đường dòng chảy. Có thể xác nhận liệu kháng thể thử nghiệm liên kết với thụ thể TSLP ở người bằng cách phân tích hằng số tốc độ liên kết (k_a), hằng số tốc độ phân ly (k_d), và hằng số phân ly (KD) giữa kháng thể và thụ thể TSLP ở người hay không.

Hơn nữa, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể TSLP có nguồn gốc từ các loài động vật khác (ví dụ, thụ thể TSLP ở khỉ) và hoạt tính liên kết đối với các thụ thể có thể được đo sử dụng phương pháp tương tự.

Tốt hơn là, kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế liên kết với thụ thể TSLP ở người và có hoạt tính trung hòa đối với thụ thể TSLP ở người. Hoạt tính trung hòa đối với thụ thể TSLP ở người nghĩa là hoạt tính ức chế hoạt tính sinh học bất kỳ do TSLP ở người bằng cách liên kết với thụ thể TSLP ở người, và có thể được đánh giá dựa trên một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của TSLP ở người thông qua thụ thể TSLP ở người làm chỉ số. Các ví dụ về hoạt tính trung hòa này bao gồm hoạt tính ức chế đối với sự biểu hiện mRNA TARC gây ra bởi TSLP và hoạt tính ức chế đối với sự sản xuất protein MDC gây ra bởi TSLP sử dụng các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi ở người (PBMC - human peripheral blood mononuclear cell), và các phương pháp được mô tả trong các ví dụ 5 và 6 dưới đây có thể được sử dụng làm phương pháp đánh giá đặc hiệu của hoạt tính.

Đối với các hiệu quả đánh giá của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chi tiết hơn, có thể sử dụng thử nghiệm trong cơ thể sống (*in vivo*). Ví dụ, như được mô tả trong ví dụ 7 dưới đây, có thể đánh giá các tác dụng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người trong thử nghiệm

in vivo với thử nghiệm phản ứng kháng dị ứng sử dụng mô hình miễn cảm kháng nguyên giun đũa ở khi.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được tạo ra dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đến trong lĩnh vực theo sáng chế dựa vào thông tin trình tự trên vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế mà được bộc lộ trong bản mô tả này. Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế không được giới hạn cụ thể, nhưng có thể được sản xuất theo phương pháp được mô tả trong phần <Phương pháp sản xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế> dưới đây.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được tinh chế tiếp khi cần và được bào chế theo phương pháp thông thường. Có thể được sử dụng để ngăn chặn hoặc điều trị các bệnh mà trong đó TSLP ở người và thụ thể TSLP ở người liên quan đến bệnh học, bao gồm các bệnh gây viêm dị ứng như bệnh hen, và bệnh xơ cứng toàn thân.

Polynucleotit theo sáng chế

Polynucleotit theo sáng chế bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế.

Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1.

Polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện bằng trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1 bao gồm, ví dụ, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ từ các số bazơ từ 1 đến 354 của SEQ ID NO: 2.

Theo phương án được ưu tiên, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế là polynucleotit gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1.

Polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 bao gồm, ví dụ, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3.

Polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3 bao gồm, ví dụ, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ từ các số bazơ từ số 1 đến 324 của SEQ ID NO: 4.

Theo phương án được ưu tiên, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

Polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 bao gồm, ví dụ, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4.

Polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sử dụng phương pháp được biết đến trong lĩnh vực theo sáng chế dựa trên trình tự bazơ. Ví dụ, polynucleotit theo sáng chế có thể được tổng hợp sử dụng phương pháp tổng hợp gen được biết đến trong lĩnh vực theo sáng chế. Phương pháp tổng hợp gen bao gồm, ví dụ, các phương pháp khác được biết đến bởi người trong lĩnh vực kỹ thuật như phương pháp tổng hợp các gen kháng thể được bộc lộ trong WO90/07861.

Vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế, phương pháp sản xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế, và kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người được tạo ra bằng phương pháp này

Vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và/hoặc polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế.

Các vector biểu hiện được ưu tiên theo sáng chế bao gồm vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ

thể TSLP ở người theo sáng chế, vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế, hoặc vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể.

Vector biểu hiện được sử dụng để biểu hiện polynucleotit theo sáng chế không được giới hạn cụ thể miễn là polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và/hoặc polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế có thể được biểu hiện trong các tế bào chủ khác của các tế bào có nhân chuẩn (ví dụ, các tế bào của động vật, các tế bào côn trùng, các tế bào thực vật, và men) và/hoặc các tế bào nhân sơ (ví dụ, vi khuẩn đại tràng), và các polypeptit được mã hóa bằng các vùng này có thể được sản xuất. Các ví dụ của vector biểu hiện bao gồm các vector plasmid, các vector virus (ví dụ, adenovirus hoặc retrovirus), và tương tự. Tốt hơn là pEE6.4 hoặc pEE12.4 (Lonza, Inc.) có thể được sử dụng. Hơn nữa, các gen kháng thể có thể được biểu hiện trước bằng cách chuyển mảnh gen ở vùng biến đổi vào các vector biểu hiện bao gồm các gen ở vùng cố định Ig ở người như AG- γ 1 or AG- κ (ví dụ, xem WO94/20632).

Vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm vùng khởi đầu mà được liên kết tác dụng polynucleotit theo sáng chế. Các ví dụ của vùng khởi đầu cho biểu hiện polynucleotit theo sáng chế với các tế bào của động vật bao gồm hoạt hóa vùng khởi đầu dẫn xuất bởi virus như CMV, RSV, hoặc SV40, vùng khởi đầu actin, vùng khởi đầu EF (nhân tố kéo dài) 1 α , và vùng khởi đầu sốc nhiệt. Các ví dụ về các vùng khởi đầu do vi khuẩn biểu hiện (ví dụ, Vi khuẩn hình que) bao gồm vùng khởi đầu trp, vùng khởi đầu lac, vùng khởi đầu λ P_L, và vùng khởi đầu tac. Hơn nữa, các ví dụ về các vùng khởi đầu do nấm men biểu hiện bao gồm vùng khởi đầu GAL1, vùng khởi đầu GAL10, vùng khởi đầu PH05, vùng khởi đầu PGK, vùng khởi đầu GAP, và vùng khởi đầu ADH.

Tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế bao gồm tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế mà được chọn từ nhóm gồm có từ (a) đến (d) sau đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở

người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế là tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế mà được chọn từ nhóm gồm có từ (a) đến (d) sau đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế.

Trong trường hợp sử dụng tế bào của động vật, tế bào côn trùng, hoặc nấm men làm tế bào chủ, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm mã mở đầu và mã kết thúc. Trong trường hợp này, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm trình tự tăng cường, vùng không được dịch mã trên đầu 5' và đầu 3' của các gen mã hóa kháng thể theo sáng chế hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ vùng biến đổi, trình

tự tiết, tiếp hợp ghép nối, vị trí polyadenyl hóa, hoặc đơn vị sao chép. Khi vi khuẩn đại tràng được sử dụng làm tế bào chủ, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm mã mở đầu, mã kết thúc, vùng kết thúc, và đơn vị sao chép. Trong trường hợp này, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm chỉ thị chọn lọc (ví dụ, các gen kháng tetracyclin, gen kháng ampicilin, gen kháng kanamycin, gen kháng neomycin, hoặc gen reductaza dihydrofolat) mà thông thường được sử dụng khi cần.

Các ví dụ được ưu tiên hơn của tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế bao gồm tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể.

Tế bào chủ được biến nạp không được giới hạn cụ thể miễn là tế bào chủ thích hợp để vector biểu hiện được sử dụng, được biến nạp với vector biểu hiện, và có thể biểu hiện kháng thể. Các ví dụ của tế bào chủ được biến nạp bao gồm khác nhau các tế bào như các tế bào tự nhiên hoặc các tế bào nhân tạo mà thông thường được sử dụng trong lĩnh vực theo sáng chế (ví dụ, các tế bào động vật (ví dụ, các tế bào CHO-K1SV), các tế bào côn trùng (ví dụ, Sf9), vi khuẩn (ví dụ, vi khuẩn hình que), nấm men (ví dụ, *Saccharomyces* hoặc *Pichia*) hoặc tương tự). Tốt hơn là các tế bào nuôi cấy như các tế bào CHO-K1SV, các tế bào CHO-DG 44, các tế bào 293, hoặc các tế bào NS0 có thể được sử dụng.

Phương pháp biến nạp tế bào chủ không được giới hạn cụ thể, nhưng, ví dụ, phương pháp canxi phosphat hoặc phương pháp xung điện có thể được sử dụng.

Các phương pháp sản xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm phương pháp sản xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được tạo ra bằng phương pháp sản xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế không được giới hạn cụ thể miễn là phương pháp bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Tế bào chủ được sử dụng theo phương pháp tốt hơn là bao gồm tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế mà được mô tả ở trên là ví dụ được ưu tiên hơn.

Tế bào chủ được biến nạp có thể được nuôi cấy bằng các phương pháp đã được biết đến. Các điều kiện nuôi cấy, ví dụ, nhiệt độ, độ pH của môi trường nuôi cấy, và thời gian nuôi cấy được chọn lọc thích hợp. Trong trường hợp mà tế bào chủ là tế bào của động vật, các ví dụ của môi trường nuôi cấy bao gồm môi trường nuôi cấy MEM được bổ sung với khoảng từ 5% đến 20% huyết thanh thai bò (Science, 1959, tập 130, No. 3373, các trang từ 432 đến 7), môi trường nuôi cấy DMEM (Virology, 1959, tập 8, trang 396), và môi trường nuôi cấy RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, tập 199, trang 519), môi trường nuôi cấy 199 (Exp. Biol. Med., 1950, tập 73, các trang từ 1 đến 8). Độ pH của môi trường nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6 đến 8, và việc nuôi cấy thông thường được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 40°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 15 giờ đến 72 giờ trong khi thông không khí và khuấy nếu cần thiết. Trong trường hợp mà tế bào chủ là tế bào của côn trùng, làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường nuôi cấy của Grace (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, tập 82, trang 8404) được bổ sung với huyết thanh thai bò có thể được sử dụng. Độ pH của môi trường nuôi cấy tốt hơn là xấp xỉ nằm trong khoảng từ 5 đến 8, và việc nuôi cấy thông thường được thực hiện ở nhiệt độ xấp xỉ từ 20°C đến 40°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 15 giờ đến 100 giờ trong khi thông không khí và khuấy nếu cần thiết. Trong trường hợp mà tế bào chủ là vi khuẩn đại tràng hoặc nấm men, làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường nuôi cấy lỏng được bổ sung bằng nguồn dinh dưỡng thích hợp. Tốt hơn là môi trường nuôi cấy dinh dưỡng bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ vô cơ, hoặc nguồn nitơ hữu cơ cần thiết để phát triển tế bào chủ được biến nạp. Các ví dụ về nguồn cacbon bao gồm glucoza, dextran, tinh bột hòa tan, và sucroza và các ví dụ về nguồn nitơ vô cơ hoặc nguồn bao nitơ hữu cơ gồm các muối amoni, các muối nitrat, axit amin, dịch chiết ngô cô đặc, pepton, casein, dịch chiết từ thịt, bột đậu tương, và dịch chiết từ khoai tây. Các chất dinh dưỡng khác (ví dụ, các muối vô cơ (ví dụ, canxi clorua, natri dihydrophosphat, và magie clorua), các vitamin), và có thể bao gồm các chất kháng sinh (ví dụ, tetracyclin, neomycin, ampicillin, và kanamycin)

như mong muốn. Độ pH của môi trường nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 8. Trong trường hợp mà tế bào chủ là vi khuẩn đại tràng, các ví dụ được ưu tiên hơn của môi trường nuôi cấy bao gồm môi trường nuôi cấy LB và môi trường nuôi cấy M9 (Mol. Clo., Cold Spring Harbor Laboratory, tập 3, A2.2). Việc nuôi cấy thông thường được thực hiện ở nhiệt độ xấp xỉ từ 14°C đến 43°C trong thời gian xấp xỉ từ 3 giờ đến 24 giờ trong khi thông không khí và khuấy nếu cần thiết. Trong trường hợp mà tế bào chủ là nấm men, làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường cơ sở Burkholder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, tập 77, trang 4505) có thể được sử dụng. Việc nuôi cấy thông thường được thực hiện ở nhiệt độ xấp xỉ từ 20°C đến 35°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 14 giờ đến 144 giờ trong khi thông không khí và khuấy nếu cần thiết. Bằng việc thực hiện nuôi cấy theo phương pháp được mô tả ở trên, có thể biểu hiện kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể bao gồm việc phục hồi, tốt hơn là phân lập hoặc làm sạch kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ tế bào chủ được biến nạp bên cạnh việc nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Các ví dụ về phương pháp phân lập hoặc làm sạch bao gồm các phương pháp sử dụng độ hòa tan như loại muối và phương pháp kết tủa bằng dung môi, các phương pháp sử dụng sự khác nhau về trọng lượng phân tử như thẩm tách, lọc qua máy siêu lọc, và lọc bằng gel, các phương pháp sử dụng điện tích như sắc ký trao đổi ion và sắc ký hydroxylapatit, các phương pháp sử dụng ái lực đặc hiệu như sắc ký ái lực, các phương pháp sử dụng sự khác nhau về tính kỵ nước như sắc ký lỏng hiệu năng cao pha lỏng, và các phương pháp sử dụng sự khác nhau về điểm đẳng điện tích như điện di hội tụ đẳng điện tích. Tốt hơn là, kháng thể được tích trữ trong dịch nuôi cấy có thể được tinh chế bằng các phép sắc ký khác nhau, ví dụ, sắc ký cột sử dụng cột Protein A hoặc Protein G.

Dược phẩm theo sáng chế

Các dược phẩm theo sáng chế bao gồm dược phẩm gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và các tá dược được dùng. Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng phương pháp thông thường được sử dụng với các tá dược, nghĩa là, các tá dược dùng cho dược chất

hoặc các chất mang dùng cho dược chất thông thường được sử dụng trong lĩnh vực theo sáng chế. Các ví dụ về các dạng liều của các dược phẩm bao gồm thuốc ngoài đường tiêu hóa như thuốc tiêm và thuốc truyền nhỏ giọt, và các dạng liều này có thể được dùng bằng cách dùng qua đường tĩnh mạch, dùng dưới da, hoặc tương tự. Trong việc bào chế thuốc, các tá dược, các chất mang, và các chất phụ gia theo các dạng liều có thể được sử dụng nằm trong phạm vi có thể chấp nhận được về mặt dược học.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm nhiều loại kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Ví dụ, sáng chế bao gồm dược phẩm gồm kháng thể mà trong đó lysin của đầu C của chuỗi nặng bị loại bỏ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó với sự biến đổi dịch mã ở đầu N, kháng thể mà trong đó lysin của đầu C của chuỗi nặng bị loại bỏ và tạo ra sự biến đổi dịch mã ở đầu N, và/hoặc kháng thể mà có lysin ở đầu C của chuỗi nặng và không có sự biến đổi dịch mã ở đầu N.

Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế gồm dược phẩm bao gồm hai hoặc nhiều loại kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người từ (1) đến (4) dưới đây.

(1) Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người, bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 447 của SEQ ID NO: 1, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

(2) Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người, bao gồm chuỗi nặng mà gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 mà trong đó axit glutamic của axit amin số 1 được biến đổi thành axit pyroglutamic và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

(3) Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người, bao gồm chuỗi nặng mà gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 447 của SEQ ID NO: 1 mà trong đó axit glutamic của axit amin số 1 được biến đổi thành axit pyroglutamic và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

(4) Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người, bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

Lượng bổ sung kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế trong việc bào chế thuốc phụ thuộc khác nhau vào mức độ của các triệu chứng của người bệnh, tuổi người bệnh, dạng liều của thuốc

được sử dụng, độ chuẩn liên kết của kháng thể, hoặc tương tự, và ví dụ, có thể sử dụng lượng bổ sung xấp xỉ nằm trong khoảng từ 0,001 mg/kg đến 100 mg/kg.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh mà trong đó TSLP ở người và thụ thể TSLP ở người liên quan đến bệnh học, như bệnh hen.

Sáng chế bao gồm dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hen gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Hơn nữa, sáng chế bao gồm phương pháp để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hen, gồm việc dùng lượng hữu hiệu để điều trị kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, để sử dụng trong việc phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hen. Ngoài ra, sáng chế bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế cho việc sản xuất dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hen.

Sáng chế đã được mô tả tổng quát và các ví dụ cụ thể được đề cập đến để hiểu tốt hơn sẽ được đưa ra, nhưng đây chỉ đơn thuần là các ví dụ và sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Đối với các phần sử dụng các bộ kit hoặc các chất phản ứng sẵn có trên thị trường, các thử nghiệm được thực hiện theo các quy ước kèm theo trừ khi được ghi chú khác. Hơn nữa, để thuận tiện, nồng độ mol/L được biểu diễn là M. Ví dụ, dung dịch natri hydroxit trong nước 1 M nghĩa là dung dịch natri hydroxit trong nước nồng độ 1 mol/L.

Ví dụ 1: Thu nhận protein dung hợp Fc-thụ thể TSLP)

Đối với sự đánh giá hoạt tính liên kết của kháng thể, protein dung hợp thụ thể TSLP ở người và Fc ở người (protein dung hợp Fc ở người - thụ thể TSLP ở người), protein dung hợp thụ thể TSLP ở người và Fc ở chuột (protein dung hợp Fc ở chuột - thụ thể TSLP ở người), và protein dung hợp thụ thể TSLP ở khí và Fc ở người (protein dung hợp Fc ở người - thụ thể TSLP ở khí) được thu. Gen dung hợp Fc ở người – thụ thể TSLP ở người (SEQ ID NO: 5), gen dung hợp Fc ở chuột – thụ thể TSLP ở người (SEQ ID NO: 6), và gen dung hợp Fc ở người – thụ thể TSLP ở khí (SEQ ID NO: 7) lần lượt được tái tổ hợp với các vector biểu hiện tế bào của động vật có vú, các vector

GS (Lonza, Inc.) pEE12.4. Các vector được chuẩn bị được chuyển gen thành các tế bào FreeStyle 293 (Life technologies, Inc) sử dụng chất chuyển gen fectin 293 (Life technologies, Inc), và các tế bào được nuôi cấy bằng hệ nuôi cấy không có huyết thanh sử dụng môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (Life technologies, Inc) trong thời gian một tuần, và sau đó lần lượt thu được các dịch nổi nuôi cấy bao gồm protein dung hợp Fc ở người – thụ thể TSLP ở người, protein dung hợp Fc ở chuột - thụ thể TSLP ở người, và protein dung hợp Fc ở người – thụ thể TSLP ở khỉ. Các protein dung hợp Fc-thụ thể TSLP tương ứng được tinh chế sử dụng cột tinh chế protein Protein G column (GE Healthcare Japan Corporation) từ các dịch nổi nuôi cấy thu được.

Ví dụ 2: Thu nhận các protein TSLP đột biến- Flag

Đối với việc đánh giá hoạt tính trung hòa của kháng thể, protein đột biến TSLP ở người với đuôi Flag (các protein đột biến TSLP ở người- Flag) và protein đột biến TSLP ở khỉ với đuôi Flag (protein đột biến TSLP ở khỉ- Flag) được thu nhận. Gen đột biến TSLP ở khỉ hoặc ở người –Flag (SEQ ID NO: 8 hoặc 9 (để ngăn chặn hoạt tính khỏi bị mất do bị cắt thông qua furin proteaza, các trình tự axit amin của TSLP kiểu ở khỉ hoang dã hoặc ở người mà trong đó sự đột biến được chèn vào điểm cắt lần lượt được mã hóa) lần lượt được tái tổ hợp với các vector GS pEE12.4. Các vector được chuẩn bị được chuyển gen vào các tế bào FreeStyle 293 sử dụng fectin 293, và các tế bào được nuôi cấy bằng hệ nuôi cấy không có huyết thanh sử dụng môi trường biểu hiện FreeStyle 293 trong một tuần, và sau đó lần lượt thu được các dịch nổi nuôi cấy bao gồm các protein đột biến TSLP ở người- Flag hoặc các protein đột biến TSLP ở khỉ- Flag. Các protein đột biến TSLP- Flag lần lượt được tinh chế sử dụng gel ái lực kháng thể kháng M2 FLAG (Sigma, Inc.) từ các dịch nổi nuôi cấy thu được.

Ví dụ 3: Chuẩn bị kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoàn toàn ở người

Công nghệ phát triển kháng thể đơn dòng ở người “VelocImmune” (VelocImmune antibody technology : Regeneron, Inc. (US Patent No. 6596541), chuột được gây miễn dịch bằng tá dược để gây ra phản ứng miễn dịch, thụ thể TSLP ở người-Fc (R&D, Inc.), và các tế bào Ba/F3 biểu hiện thụ thể TSLP ở người (được chuẩn bị bằng cách chuyển các vector mã hóa các gen thụ thể TSLP ở người (SEQ ID NO: 10) và các gen chuỗi α thụ thể IL-7 ở người (SEQ ID NO: 11) và các tế bào Ba/F3 ở chuột (RIKEN: RCB0805)). Theo phương pháp thông thường, tách lá lách hoặc hạch bạch huyết của chuột đã được gây miễn dịch, thu gom các tế bào lympho, và dung hợp tế bào với các tế bào u tủy SP2/0 ở chuột (ATCC CRL-1581), do đó tạo ra

tế bào lai. Tế bào lai được tách dòng đơn, và sau đó nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào lai CD (Life technologies, Inc.) mà là môi trường không có huyết thanh. Kháng thể được tinh chế sử dụng bộ kit tinh chế kháng thể Protein G Purification kit (Proteus, Inc.) từ các dịch nổi nuôi cấy thu được.

Đối với sự đánh giá hoạt tính liên kết của kháng thể, ELISA sử dụng protein dung hợp Fc ở người - thụ thể TSLP ở người và protein dung hợp Fc ở người – thụ thể TSLP ở khỉ được chuẩn bị ở ví dụ 1 lần lượt được thực hiện. Hơn nữa, đối với sự đánh giá hoạt tính trung hòa của kháng thể, thử nghiệm ức chế sự phát triển tế bào của thụ thể TSLP ở người biểu hiện các tế bào Ba/F3 bằng sự kích thích của các protein Flag - đột biến TSLP ở khỉ được chuẩn bị ở ví dụ 2 và thử nghiệm ức chế sự sản xuất protein MDC trên máu toàn phần của khỉ bởi sự kích thích của các protein TSLP đột biến-Flag ở khỉ được chuẩn bị ở ví dụ 2 được thực hiện.

Từ các thử nghiệm được mô tả ở trên, đã bộc lộ rằng kháng thể (kháng thể ở thể khảm) được gọi là T7-27 có hoạt tính liên kết và hoạt tính trung hòa đối với các thụ thể TSLP ở người và ở khỉ. Các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể từ tế bào lai sản xuất T7-27 được tách dòng và sự xác định trình tự được thực hiện.

Ở kháng thể được mô tả ở trên, vùng biến đổi thu được từ ở người và vùng cố định thu được ở chuột. Vì lý do này, nên các vector biểu hiện bao gồm cả các gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được cấu trúc sử dụng các vector GS và kháng thể hoàn toàn ở người được tạo ra. Cụ thể, các gen mã hóa báo hiệu các trình tự (Nigel Whittle et al., Protein Engineering 1987; 1(6): các trang từ 499 đến 505.) được nối với đầu 5' của các gen vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể T7-27 và các gen vùng cố định (gồm có trình tự bazơ của các số bazơ từ 355 đến 1344 của SEQ ID NO: 2) của Igy1 ở người được nối với đầu 3' của chúng, và sau đó các gen chuỗi nặng được chèn vào vector GS pEE6.4. Hơn nữa, các gen mã hóa báo hiệu các trình tự (Nigel Whittle et al., được đề cập ở trên) được nối với đầu của các gen vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể và các gen vùng cố định (gồm có trình tự bazơ của các số bazơ từ 325 đến 642 của SEQ ID NO: 4) của Igk ở người được nối với đầu 3' của chúng, và sau đó các gen chuỗi nhẹ được chèn vào vector GS pEE12.4.

Trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể hoàn toàn ở người của T7-27 được điều chế (T7-27 hoàn toàn ở người) được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, trình tự axit amin được mã hóa bằng trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, và trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4, và trình tự axit

amin được mã hóa bằng trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3. Vùng biến đổi chuỗi nặng của T7-27 hoàn toàn ở người gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1, và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 31 đến 35, từ 50 đến 66, và từ 99 đến 107 của SEQ ID NO: 1. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của T7-27 hoàn toàn ở người gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3, và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 24 đến 34, từ 50 đến 56, và từ 89 đến 97 của SEQ ID NO: 3.

Kháng thể được biểu hiện sử dụng hai loại phương pháp là biểu hiện tạm thời và biểu hiện liên tục với các vector GS được mô tả ở trên mà lần lượt chèn các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Đối với biểu hiện tạm thời, các vector biểu hiện của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được biến nạp sử dụng fectin 293 đối với các tế bào nuôi cấy FreeStyle 293 khoảng 1,000,000 các tế bào/mL trong môi trường biểu hiện FreeStyle 293, và sau đó nuôi cấy trong thời gian 7 ngày. Ngoài ra, các vector biểu hiện của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả ở trên được biến nạp bằng cách sử dụng phương pháp xung điện phương pháp đối với khoảng 10.000.000 tế bào CHO-K1SV (Lonza, Inc.), và sau đó nuôi cấy trong môi trường CD-CHO (Life technologies, Inc.) trong thời gian 7 ngày. Các dịch nổi nuôi cấy được tinh chế sử dụng cột Protein A hoặc cột Protein G (GE Healthcare Japan Corporation) và thu được kháng thể được tinh chế của kháng thể hoàn toàn ở người. Đối với biểu hiện liên tục, các vector GS mà các gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể lần lượt được chèn vào đó được cắt với enzym hạn chế bằng NotI và PvuI, và thực hiện thất sử dụng bộ kit Ligation-Convenience Kit để thất (NIPPONGENE, Inc.) hoặc chất thất Ligation-high (TOYOBO, Inc.), và sau đó vector GS mà cả các gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chèn vào đó được cấu trúc. Các vector biểu hiện được mã hóa chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và kháng thể được biểu hiện bằng sự chuyển nạp trong các tế bào CHO-K1SV. Các dịch nổi nuôi cấy được tinh chế với cột Protein A hoặc cột Protein G (GE Healthcare Japan Corporation) và thu được kháng thể được tinh chế của kháng thể hoàn toàn ở người. Đối với kết quả phân tích sự biến đổi axit amin của T7-27 hoàn toàn ở người được tinh chế, sự loại bỏ lysin ở đầu C của chuỗi nặng được xảy ra ở phần lớn của kháng thể được tinh chế.

Ví dụ 4: Đánh giá hoạt tính liên kết bằng phân tích SPR

Đối với việc đo chi tiết hoạt tính liên kết của T7-27 hoàn toàn ở người, phân tích SPR được thực hiện. Theo ví dụ sáng chế, kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người TSLPR-012_141 (tài liệu patent 4) được sử dụng làm kháng thể so sánh.

Theo phân tích SPR, việc phân tích được thực hiện sử dụng Biacore (nhãn hiệu đã được đăng ký) 2000 (GE Healthcare Japan Corporation). Các kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người tương ứng được cố định trên bề mặt của chip cảm biến CM5 sử dụng bộ kit bắt giữ kháng thể ở người và bộ kit ghép cặp amin (GE Healthcare Japan Corporation). Protein dung hợp Fc ở chuột – thụ thể TSLP ở người thu được ở ví dụ 1 được pha loãng liên tiếp với dung dịch HBS-EP (GE Healthcare Japan Corporation), và bổ sung 100 μL dung dịch này vào đường dòng chảy ở tốc độ dòng là 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Bằng hệ đo này, hằng số tốc độ liên kết (k_a), hằng số tốc độ phân ly (k_d), và hằng số phân ly (K_D) của protein dung hợp Fc ở chuột – thụ thể TSLP ở người và kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người được tính toán sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu (Đánh giá BIA) (Bảng 1).

Bảng 1: Hoạt tính liên kết đối với thụ thể TSLP ở người bằng phân tích SPR

	KD (M)	Kd (1/s)
T7-27 hoàn toàn ở người	$0,41 \times 10^{-8}$	$1,25 \times 10^{-4}$
TSLPR-012_141	$1,26 \times 10^{-8}$	$3,38 \times 10^{-4}$

Kết quả là, rõ ràng là T7-27 hoàn toàn ở người có hoạt tính liên kết xấp xỉ mạnh hơn 3 lần so với TSLPR-012_141.

Ví dụ 5: Đánh giá về ức chế sự biểu hiện mARN TARC gây ra bởi TSLP sử dụng PBMC ở người

Đối với sự đánh giá của hoạt tính trung hòa của T7-27 hoàn toàn ở người, sự ức chế biểu hiện mARN TARC gây ra bởi TSLP trong các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi ở người (PBMC) được đánh giá. Vì PBMC ở người bao gồm các tế bào nhánh biểu hiện thụ thể TSLP, nên PBMC ở người có thể được sử dụng để đánh giá kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người. Đối với kháng thể so sánh, TSLPR-012_141 được sử dụng. Từ kết quả của ví dụ thử nghiệm 1 được mô tả dưới đây, do sự tương quan giữa sự cải thiện về bệnh lý của mô hình bệnh hen và sự ức chế của biểu hiện mARN TARC trong máu sử dụng kháng thể kháng thụ thể TSLP được phát hiện, hệ thống đánh giá hiện tại là hệ thống đánh giá chỉ ra hiệu quả về bệnh lý.

200.000 tế bào của PBMC ở người (AllCells, Inc.) mỗi giếng trong các đĩa có 96 giếng (Gleiner, Inc.) được đưa vào 160 μL môi trường nuôi cấy RPMI1640 (Life technologies, Inc.). Chuỗi dịch pha loãng (7 mức nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1 ng/mL đến 100 ng/mL) của các protein đột biến TSLP ở người-Flag đột biến được chuẩn bị ở ví dụ 2 được chuẩn bị ở môi trường nuôi cấy RPMI164 và bổ sung 20 μL dung dịch này vào dung dịch nuôi cấy, tiếp theo ủ trong thời gian 24 giờ trong máy ủ CO_2 mà có nhiệt độ được đặt ở 37°C . Sau đó, chuẩn bị các kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người tương ứng trong môi trường RPMI1640 sao cho nồng độ cuối đạt 0,3 $\mu\text{g/mL}$, và bổ sung vào dung dịch nuôi cấy với lượng là 20 μL , và ủ thêm trong thời gian 72 giờ. Đối với mẫu đối chứng, lần lượt chuẩn bị giếng mà môi trường nuôi cấy RPMI1640 được bổ sung vào thay vì các protein đột biến TSLP ở người-Flag và giếng mà môi trường nuôi cấy RPMI1640 được bổ sung vào thay vì kháng thể. Loại bỏ 200 μL dịch nuôi cấy, và sau đó chiết tách ARN tổng số với 30 μL nước sử dụng bộ kit RNeasy 96 (Qiagen, Inc.) để tinh chế ARN. Sau đó, đưa 10 μL ARN vào phản ứng sao chép ngược sử dụng bộ kit cho sự sao chép ngược, High Capacity cADN Reverse Transcription Kit (Life technologies, Inc.). Tiếp theo, đo mức biểu hiện mARN TARC bằng phương pháp TaqMan PCR sử dụng đoạn dò TaqMan của TARC (Ccl17, Hs00171074, Life technologies, Inc), đoạn dò TaqMan của β actin (Actb, Hs99999903, Life technologies, Inc.), biểu hiện qPCR SuperMix (A10313, Life technologies, Inc.) và 2 μL cADN. Thử nghiệm được lặp lại đối với các kháng thể tương ứng, và phân tích kết quả đo sử dụng phương pháp CT so sánh, và sau đó tính mức biểu hiện của mARN TARC. Sau đó, tính toán tỷ lệ ức chế của kháng thể trong mỗi nồng độ TSLP. Tỷ lệ ức chế của mà môi trường nuôi cấy RPMI1640 được bổ sung vào thay vì các protein đột biến TSLP ở người-Flag được thiết lập là 100% và trị số trung bình của giếng mà 30 ng/ml và 100 ng/ml của các protein đột biến TSLP ở người-Flag lần lượt được bổ sung vào thì được thiết lập tỷ lệ ức chế là 0%. Phân tích tỷ lệ ức chế tính được, và tính nồng độ TSLP có 50% là tỷ lệ ức chế của 0,3 $\mu\text{g/mL}$ kháng thể (bảng 2) bằng cách điều chỉnh đường cong logistic ba thông số. Khi nồng độ TSLP càng cao, hoạt tính trung hòa đối với TSLP của kháng thể thử nghiệm trở nên càng lớn.

Bảng 2: Hoạt tính ức chế sự biểu hiện mARN TARC gây ra bởi TSLP sử dụng PBMC ở người

	nồng độ TSLP (ng/mL)
T7-27 hoàn toàn ở người	1,25
TSLPR-012_141	0,08

Kết quả là, rõ ràng là T7-27 hoàn toàn ở người có hoạt tính ức chế đối với biểu hiện mARN TARC do TSLP ở người gây ra cao hơn xấp xỉ 12 lần so với TSLPR-012_141.

Ví dụ 6: Đánh giá về ức chế sản xuất các protein MDC gây ra bởi TSLP sử dụng PBMC ở người

Sự ức chế sản xuất các protein MDC gây ra bởi TSLP theo PBMC ở người được đánh giá để đánh giá hoạt tính trung hòa của T7-27 hoàn toàn ở người. Đối với kháng thể so sánh, sử dụng TSLPR-012_141.

Pha loãng máu của người với cùng một lượng PBS, và phân lớp với cùng một lượng Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Japan Corporation), và sau đó đưa vào xử lý ly tâm dưới các điều kiện nhiệt độ trong phòng, lực ly tâm 400 x g, và trong thời gian 30 phút, nhờ đó tạo ra PBMC ở người. Xấp xỉ 300.000 tế bào PBMC ở người cho mỗi giếng trong các đĩa 96 giếng (Greiner, Inc.) được đưa vào 100 μ L môi trường nuôi cấy RPMI1640 (Life technologies, Inc.). Protein đột biến TSLP ở người - Flag được chuẩn bị ở ví dụ 2 được chuẩn bị vào môi trường nuôi cấy RPMI1640 sao cho nồng độ cuối của dung dịch này đạt 5 ng/mL, và bổ sung vào dung dịch nuôi cấy một lượng 10 μ L dung dịch này, tiếp theo ủ trong thời gian 24 giờ trong máy ủ CO₂ mà nhiệt độ của nó đạt 37°C. Sau đó, chuẩn bị chuỗi dịch pha loãng (5 mức nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1 ng/mL đến 10 μ g/mL) của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người tương ứng ở môi trường nuôi cấy RPMI164 và bổ sung 10 μ L dung dịch này vào dung dịch nuôi cấy, tiếp theo ủ trong thời gian 5 ngày. Đối với mẫu đối chứng, lần lượt chuẩn bị giếng mà môi trường nuôi cấy RPMI1640 được bổ sung vào thay vì các protein đột biến TSLP ở người-Flag và giếng mà môi trường nuôi cấy RPMI1640 được bổ sung thay vì các kháng thể. Sau đó, thu gom các dịch nuôi cấy và đánh giá sự sản xuất lượng MDC sử dụng bộ kit Human CCL22/MDC Quantikine ELISA Kit (R&D, Inc.) với các dịch nổi được pha loãng gấp 20 lần PBS (Life technologies, Inc.). Thử nghiệm được lặp lại đối với các kháng thể tương ứng, và tính tỷ lệ ức chế trong mỗi nồng độ

nồng độ kháng thể. Tỷ lệ ức chế của giếng mà môi trường nuôi cấy RPMI1640 được bổ sung vào thay vì các protein đột biến TSLP ở người-Flag được thiết lập là 100% và tỷ lệ ức chế của giếng mà môi trường nuôi cấy RPMI1640 được bổ sung vào thay vì kháng thể được thiết lập là 0%. Nồng độ kháng thể có tỷ lệ ức chế 50% là IC 50 (bảng 3) bằng cách điều chỉnh đường cong logit ba thông số.

Bảng 3: Đánh giá về ức chế sự sản xuất các protein MDC gây ra bởi TSLP sử dụng PBMC ở người

	IC50 (ng/mL)
T7-27 hoàn toàn ở người	0,12
TSLPR-012_141	1,10

Kết quả là, rõ ràng là T7-27 hoàn toàn ở người có hoạt tính ức chế cao hơn xấp xỉ gấp 9 lần đối với sự sản xuất các protein MDC gây ra bởi TSLP so với TSLPR-012_141.

Ví dụ 7: Đánh giá về T7-27 hoàn toàn ở người theo mô hình miễn cảm kháng nguyên giun đũa ở khỉ

IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa được cảm ứng bằng cách cho phép khỉ được miễn cảm với kháng nguyên giun đũa, và phản ứng ở da được gây ra là phản ứng dị ứng.

Chất lỏng kháng nguyên giun đũa (DNP-Ascaris (LSL, Inc.)) được tạo huyền phù bằng gel peroxit nhôm (sau đây, được gọi là Alum) (0,5 mg/mL DNP-Ascaris được tạo huyền phù trong PBS ở nồng độ Alum 50 mg/mL, sau đây, được gọi là chất lỏng Alum kháng nguyên giun đũa) được dùng trong ngày 1, ngày 8, và ngày 15 cho khỉ xynomolgus đực với lượng 3,6 mL/kg dùng trong ổ bụng và lượng 0,4 mL/kg dùng trong cơ để gây miễn cảm. Ngoài ra, đối với các nhóm được xử lý, bố trí nhóm bình thường (nhóm không được xử lý, n=2), nhóm dùng tá được lỏng (nhóm mà dung môi (dung dịch đệm natri xitrat 20 mM / NaCl 120 mM (pH 6,0)) được dùng trong tĩnh mạch trước một ngày bị tạo miễn cảm, n=3) và nhóm dùng kháng thể (nhóm mà 10 mg/kg T7-27 hoàn toàn ở người (hòa tan bởi dung môi) được dùng trong tĩnh mạch trước một ngày bị tạo miễn cảm, n=3) được thiết lập tương ứng.

Ngoài ra, Alum được điều chế bằng phương pháp sau đây.

Nhôm sulfat (từ 14 đến 18 hydrat) (Wako, Inc.) được hòa tan trong nước siêu tinh khiết tạo ra dung dịch 1M, và lọc dung dịch bằng phễu lọc 0,22 μ m, và sau đó bổ

sung natri hydroxit 1M (Nacalai Tesque) vào đó cho đến khi không tạo ra kết tủa trắng. Loại bỏ dịch nổi, làm sạch bằng nước siêu tinh khiết 5 lần, và sau đó làm sạch thêm bằng PBS (WAKO, Inc.) ba lần. Nghiền nhỏ kết tủa trắng được làm sạch bằng máy nghiền mẫu (CH-6010, KINEMATICA, Inc.) trong nước đá, tiếp theo ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 5 phút sử dụng máy ly tâm (himac CR21, Hitachi, Ltd.). Tiếp theo, loại bỏ các dịch nổi, và làm sạch bằng hai lần PBS. Tạo huyền phù chất kết tủa thu được trong PBS để thu được Alum.

Phép đo huyết tương IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa

Thu gom máu liên tục từ khi xynomolagus được mô tả ở trên ở ngày 1 (trước khi dùng chất lỏng Alum kháng nguyên giun đũa), ngày 8, ngày 15, và ngày 22, và thu gom huyết tương sau khi ly tâm (1800 x g, 4°C, 10 phút). Đo nồng độ của IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa trong huyết tương sử dụng phương pháp sau đây.

Điều chế DNP-Ascaris bằng PBS sao cho nồng độ của chúng đạt 100 µg/mL, và bổ sung lượng là 100 µL vào đĩa rắn 96 giếng Nunc-Immuno™ MicroWell™ (Nunc Inc.), và sau đó giữ yên ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Bổ sung lượng là 200 µL chất phong bế (Blocking One: Nacalai Tesque) vào đó, và để giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, và loại bỏ dung dịch. Sau đó, bổ sung huyết tương được thu hồi và mẫu theo đường cong hiệu chỉnh với lượng là 100 µL. Như mẫu của đường cong hiệu chỉnh, điều chỉnh nồng độ huyết tương IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa của một trong số nhóm dùng tá được lỏng ở ngày 22 đến 2000 U/mL và điều chế dãy pha loãng (từ 2000 U/mL đến 16 U/mL) bằng các dung dịch pha loãng (5% Blocking One chứa PBS) và sử dụng. Thực hiện việc ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, tiếp theo làm sạch 5 lần trong T-PBS (0,05% Tween-20 chứa PBS), và sau đó pha loãng kháng thể phát hiện IgE ở người được đánh dấu HRP (A80-108P: Bethyl, Inc.) gấp 10000 lần đối với dung dịch pha loãng được bổ sung lượng là 100 µL vào đó. Hơn nữa, thực hiện ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, tiếp theo làm sạch 5 lần với T-PBS. Cuối cùng, thực hiện đo sử dụng bộ kit phát triển màu peroxidaza (ML-1120T: SUMILON, Inc.). Đo khả năng hút sử dụng SpectraMax (Molecular Devices, Inc.). Các kết quả của ngày 1 và ngày 22 được thể hiện trong Fig.1.

Thử nghiệm trên da

Vào ngày 22, PBS, dung dịch kháng nguyên giun đũa 1, 10, và 100 µg/mL (dung dịch mà trong đó DNP-Ascaris được tạo huyền phù bằng PBS) được dùng ngoài

da tại hai điểm tương ứng (tổng 8 điểm trên một cá thể) trên vùng bụng được cạo lông của cùng một cá thể của nhóm dùng tá dược lỏng và nhóm dùng kháng thể với lượng 100 μ L. Đối với nhóm bình thường, PBS và dung dịch kháng nguyên giun đũa 100 μ g/mL được dùng ngoài da lần lượt tại 4 điểm (tổng 8 điểm trên một cá thể) trên vùng bụng được cạo lông của cùng một cá thể. Sau 20 phút gây nhạy cảm cho da, quan sát phản ứng ở da bằng cách đo đường kính vùng sử dụng thước cặp cơ. Trong mỗi cá thể, đặt trị số mà trong đó đường kính của vùng phản ứng ở da do dùng PBS trừ đi đường kính của phản ứng da do dùng dung dịch kháng nguyên giun đũa là delta cm. Các kết quả của 100 μ g/mL dung dịch kháng nguyên giun đũa được thể hiện trên Fig.2. Hơn nữa, trong trường hợp mà dùng 1 và 10 μ g/mL dung dịch kháng nguyên giun đũa, không tạo ra phản ứng da đủ để đánh giá kháng thể thử nghiệm.

Trị số trung bình và sai số chuẩn của mỗi nhóm được thu lại, và tỷ lệ ức chế được thu bằng cách thiết lập trị số ở ngày 1 (trị số trước khi dùng chất lỏng Alum kháng nguyên giun đũa) là 100% và nhóm dùng tá dược lỏng ở ngày 22 là 0% trong việc đo huyết tương IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa.

Như được thể hiện trên Fig.1, T7-27 hoàn toàn ở người làm giảm (97% sự ức chế) nồng độ IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa trong mô hình miễn cảm kháng nguyên giun đũa ở khi so với nhóm dùng tá dược lỏng.

Như được thể hiện trên Fig.2, T7-27 hoàn toàn ở người làm giảm phản ứng da kháng nguyên giun đũa ở 100 μ g/mL dung dịch kháng nguyên giun đũa trong mô hình miễn cảm kháng nguyên giun đũa ở khi so với nhóm dùng tá dược lỏng.

Từ các kết quả được mô tả ở trên, rõ ràng là T7-27 hoàn toàn ở người ngăn ngừa phản ứng dị ứng được gây ra bởi IgE đặc hiệu kháng nguyên giun đũa trong mô hình miễn cảm kháng nguyên giun đũa ở khi.

Ví dụ thử nghiệm 1: Đánh giá kháng thể kháng thụ thể TSLP ở mô hình bệnh hen miễn cảm kháng nguyên ở chuột

Mô hình miễn cảm kháng nguyên ở chuột được biết đến là mô hình bệnh hen và các điều kiện bệnh lý bao gồm sự tăng khả năng phản ứng của đường hô hấp và sự thâm thấu các tế bào ưa eozin vào sự rửa phế quản phế nang.

Thực hiện tạo miễn cảm bằng cách đưa kháng nguyên ở mặt theo đường trong bụng (Dp) (LSL, Inc.) vào chuột NC/Nga (Charles River, Inc.) với liều lượng là 100 μ g Dp/0,5 mL muối sinh lý/chuột ở ngày 0 (ở thời điểm tạo miễn cảm ban đầu) và ngày 5. Quá trình viêm của đường hô hấp được gây ra bởi việc dùng bằng đường mũi của

kháng nguyên ở mặt với liều lượng là 100 µg Dp/50 µL nước muối sinh lý/chuột ở ngày 12 và ngày 19. Đưa kháng thể kháng thụ thể TSLP ở chuột (WAKO, Inc.) được hòa tan trong PBS (WAKO, Inc.) vào nhóm dùng kháng thể theo đường dưới da với liều lượng (0,1;1;10 mg/kg) ở ngày 1, ngày 2, ngày 5, ngày 8, ngày 11, ngày 14, và ngày 18 (ngày dùng kháng thể) một lần mỗi ngày. Nhóm dùng dexametason (nhóm Dex) được tạo ra là nhóm đối chứng dương. Đưa dexametason được hòa tan trong PBS vào nhóm Dex theo đường trong bụng với liều lượng là 3 mg/kg từ ngày 12 đến ngày 19 một lần một ngày. Các nhóm đã xử lý được thiết lập là các nhóm sau đây.

Các nhóm đã xử lý

Nhóm bình thường (n = 10):

Không được xử lý

Nhóm dùng nước muối (n = 6):

Kháng nguyên ở mặt được dùng theo đường trong bụng ở ngày 0 và ngày 5, nước muối sinh lý được dùng theo đường mũi ở ngày 12 và ngày 19, và PBS được dùng theo đường dưới da ở ngày dùng kháng thể.

Nhóm dùng PBS (n = 10):

Kháng nguyên ở mặt được dùng theo đường trong bụng ở ngày 0 và ngày 5, kháng nguyên ở mặt được dùng theo đường mũi ở ngày 12 và ngày 19, và PBS được dùng theo đường dưới da ở ngày dùng kháng thể.

Nhóm dùng kháng thể (0,1, 1, 10 mg/kg) (n = 10 cho mỗi liều lượng):

Kháng nguyên ở mặt được dùng theo đường trong bụng ở ngày 0 và ngày 5, kháng nguyên ở mặt được dùng theo đường mũi ở ngày 12 và ngày 19, và kháng thể được dùng theo đường dưới da ở ngày dùng kháng thể.

Nhóm dùng Dex (n = 10):

Kháng nguyên ở mặt được dùng theo đường trong bụng ở ngày 0 và ngày 5, kháng nguyên ở mặt được dùng theo đường mũi ở ngày 12 và ngày 19, và dexametason được dùng theo đường trong bụng từ ngày 12 đến ngày 19.

Chuột được đưa vào khoang không bị kiểm soát dành riêng cho các cá thể chuột ở ngày 20. Gắn bộ biến đổi sử dụng ghi lưu tốc khí hô hấp vào khoang, và nối với máy phân tích chức năng hô hấp BioSystem XA (Buxco, Inc.), và nhận thấy sự thay đổi áp suất bên trong khoang đối với áp suất không khí sử dụng bộ biến đổi. Do đó làm tăng nồng độ Axetyl-β-metyl colin clorua (Sigma, Inc.) (0,25, 0,5, 1, 2, 4 mg/mL) được hòa tan trong nước muối sinh lý và tiếp theo đưa vào phổi nhiễm qua

đường hô hấp sử dụng thiết bị xông khí dung siêu âm để nghiên cứu khả năng phản ứng của đường dẫn khí. PenH được tính toán cơ học từ sự thay đổi áp suất bên trong khoang được sử dụng làm chỉ số của chức năng hô hấp. Các kết quả đo được thể hiện trong Fig.3.

Tiếp theo, sau khi thu gom máu của chuột từ tĩnh mạch chủ ở bụng, chuột được làm chết nhân đạo bằng cách làm kiệt máu. Ống thông được luồn ống vào trong khí quản, và làm sạch việc rửa phế quản phế nang với 0,1% huyết thanh thai bò (BioWest, Inc.) chứa dung dịch PBS, và sau đó thu gom chất lỏng rửa phế quản phế nang (BALF). Ly tâm BALF, loại bỏ dịch nổi, tạo huyền phù chất lắng trong 500 μ L nước muối sinh lý, và điều chế huyền phù tế bào BALF. Đo các tế bào ưa eozin trong huyền phù tế bào BALF sử dụng máy phân tích tế bào máu tự động đa chỉ số XT-2000i (SYSMEX, Inc.). Các kết quả đo được thể hiện trong Fig.4.

Pha loãng máu thu được gấp 10 lần với môi trường nuôi cấy RPMI1640 (Life technologies, Inc.). Cây 1 mL máu được pha loãng vào tấm (IWAKI Co. Ltd.). Pha loãng TSLP ở chuột (R&D, Inc.) bằng PBS sao cho nồng độ cuối của nó đạt 0 hoặc 10 ng/mL, và bổ sung 100 μ L dung dịch này. Thực hiện ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ với 5% CO₂, và chiết tách ARN tổng với 30 μ L nước sử dụng bộ kit RNeasy 96 Kit (Qiagen, Inc.). Tiếp theo, đưa 10 μ L ARN vào phản ứng phiên mã ngược sử dụng bộ kit phiên mã ngược cADN năng suất cao (Life technologies, Inc.). Sau đó, đo mức biểu hiện mARN TARC sử dụng phương pháp TaqMan PCR sử dụng đoạn dò TaqMan của TARC (Ccl17, Mn01244826 g1, Life technologies, Inc.), đoạn dò TaqMan của β -actin (Actb, Mm00607939 s1, Life technologies, Inc.), qPCR SuperMix biểu hiện (A10313, Life technologies, Inc.), và 2 μ L cADN. Tính toán mức biểu hiện bằng cách phân tích kết quả đo sử dụng phương pháp CT so sánh. Các kết quả ở 10 ng/mL TSLP được thể hiện trong Fig.5.

Đạt được các trị số trung bình và các sai số chuẩn của tương ứng với các nhóm. Sử dụng lần lượt thử nghiệm Student's-t cho thử nghiệm khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm PBS và nhóm bình thường, nhóm nước muối, và nhóm Dex, lần lượt. Đối với thử nghiệm khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm PBS và nhóm dùng kháng thể, sử dụng so sánh kép của Dunnett. Trong cả các trường hợp, có mặt các sự khác biệt có ý nghĩa trong trường hợp $p < 0,05$.

Như được thể hiện trên Fig.3, ở nhóm dùng kháng thể, tác dụng ức chế trên tăng phản ứng đường hô hấp gây ra bởi 1 mg/mL axetyn- β -metyl colin clorua đã được

phát hiện trong mô hình bệnh hen ở chuột so với nhóm PBS. Rõ ràng là kháng thể kháng thụ thể TSLP cải thiện chức năng hô hấp theo mô hình bệnh hen.

Như được thể hiện trên Fig.4, theo nhóm dùng kháng thể, tác dụng ức chế trên sự thâm thấu các tế bào ưa eozin vào sự rửa phế quản phế nang được tìm thấy so với nhóm PBS.

Như được thể hiện trên Fig.5, theo nhóm dùng kháng thể, tác dụng ức chế trên biểu hiện của mARN TARC được tìm thấy so với nhóm PBS.

Được xác nhận rằng kháng thể kháng thụ thể TSLP cải thiện điều kiện bệnh lý của mô hình bệnh hen từ các kết quả của Fig.3 và Fig.4. Hơn nữa, sự tương quan giữa sự cải thiện của điều kiện bệnh lý và sự ức chế của biểu hiện mARN TARC do kháng thể kháng thụ thể TSLP được tìm thấy từ các kết quả trên các hình vẽ từ Fig.3 đến Fig.5 và rõ ràng là các hiệu quả cải thiện điều kiện bệnh lý có thể được đánh giá sử dụng hiệu quả ức chế biểu hiện của mARN TARC làm chỉ số.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo sáng chế hữu dụng để phòng ngừa và điều trị các bệnh khác nhau mà trong đó TSLP ở người và thụ thể TSLP ở người liên quan đến bệnh học. Hơn nữa, các phương pháp sản xuất polynucleotit, các vector biểu hiện, và tế bào chủ theo sáng chế hữu ích để tạo ra kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người.

Chú thích trong danh mục trình tự

Ở số đề mục <223> của danh mục trình tự, mô tả “Trình tự nhân tạo” được thực hiện. Cụ thể, các trình tự bazơ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 4 của danh mục trình tự lần lượt là trình tự bazơ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của T7-27 hoàn toàn ở người, và các trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 3 là trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lần lượt được mã hóa bởi SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 4. Các trình tự bazơ được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, và 9 của danh mục trình tự lần lượt là trình tự bazơ mã hóa thụ thể TSLP ở người-Fc ở người dung hợp protein, protein dung hợp Fc ở chuột - thụ thể TSLP ở người, protein dung hợp Fc ở người - thụ thể TSLP ở khỉ, protein đột biến TSLP ở người-Flag, và protein Flag - đột biến TSLP ở khỉ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng thụ thể lymphopietin chất nền tuyến ức (Thymic stromal lymphopietin -TSLP) ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ (1) hoặc (2) dưới đây:

(1) kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 118 của SEQ ID NO: 1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 108 của SEQ ID NO: 3;

(2) kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong đó axit glutamic của đầu N của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó của (1) được biến đổi thành axit pyroglutamic.

2. Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

3. Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, trong đó axit glutamic của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 1 được biến đổi thành axit pyroglutamic và/hoặc lysin của axit amin số 448 của SEQ ID NO: 1 được loại bỏ, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

4. Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 3, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm các axit amin từ 1 đến 447 của SEQ ID NO: 1, và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

5. Polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo điểm 1 (1), và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo điểm 1 (1).

6. Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo điểm 1 (1) và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo điểm 1 (1).

7. Tế bào chủ được chọn từ nhóm gồm có từ (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 1 (1) và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 1 (1) và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 1 (1); và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 1 (1),

trong đó tế bào chủ biểu hiện kháng thể nêu trên.

8. Kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được tạo ra bằng phương pháp bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ để biểu hiện kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó tế bào chủ là tế bào chủ theo điểm 7.

9. Dược phẩm bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 (1) và/hoặc kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 (2), và tá dược được dụng.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này bao gồm kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 2 và/hoặc kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người theo điểm 4, và tá dược được dụng.

Fig. 1

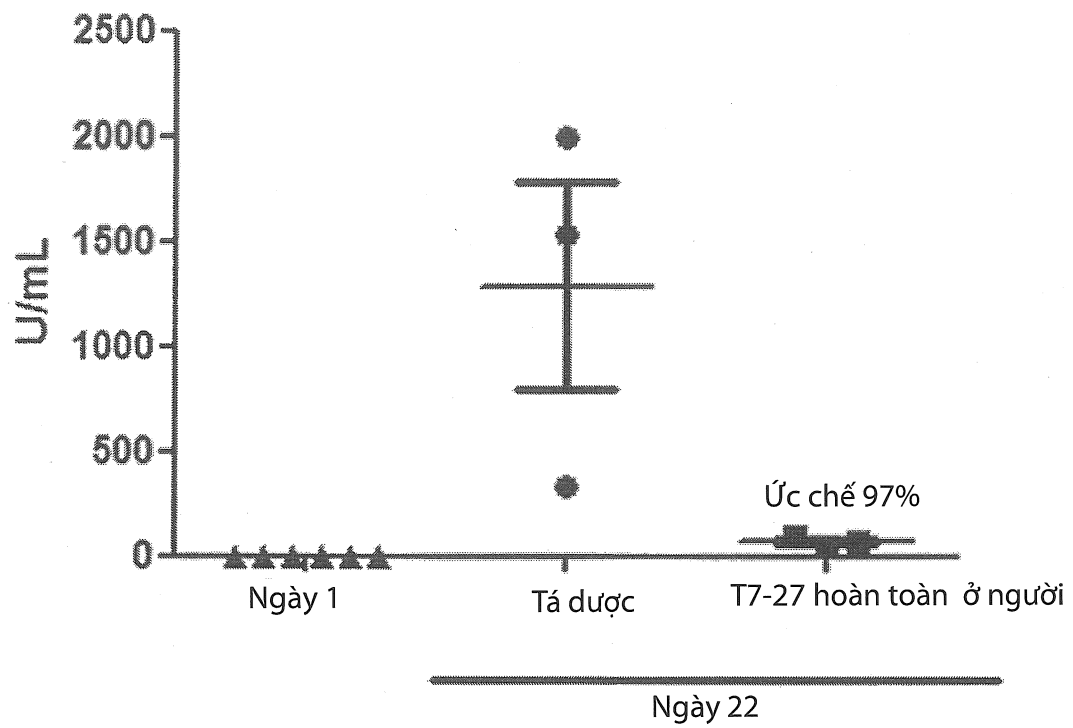


Fig. 2

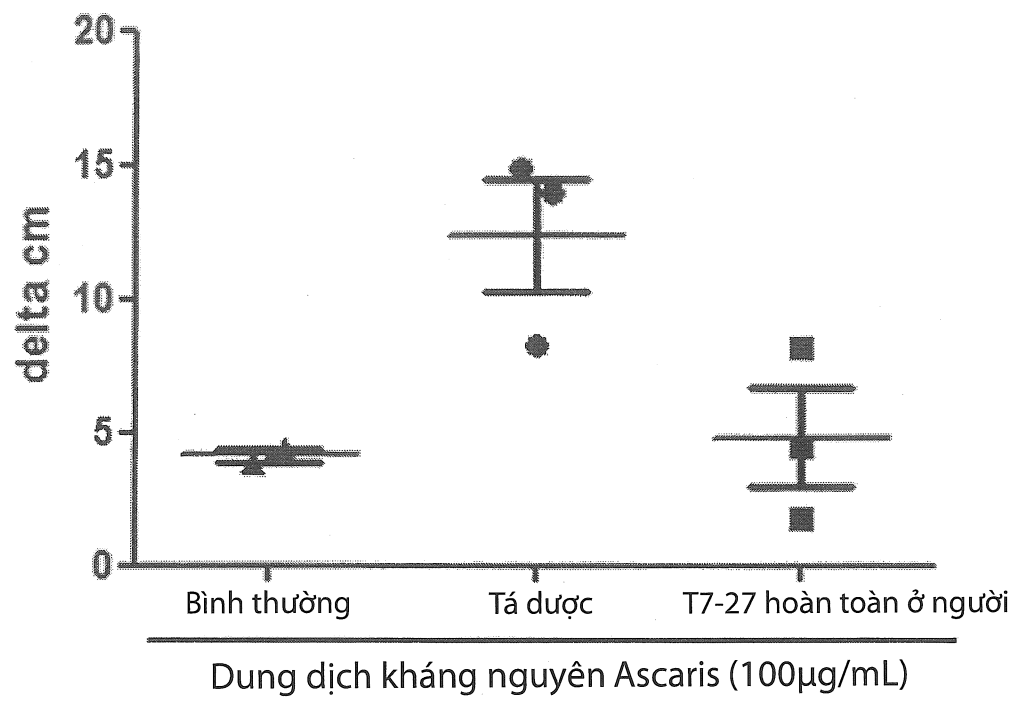


Fig. 3

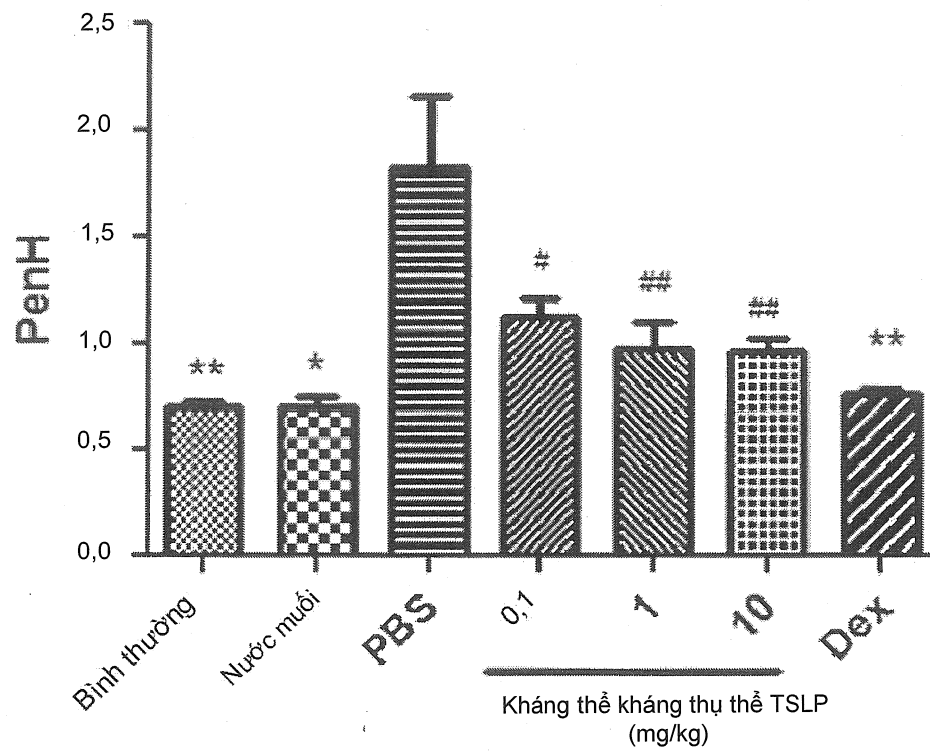


Fig. 4

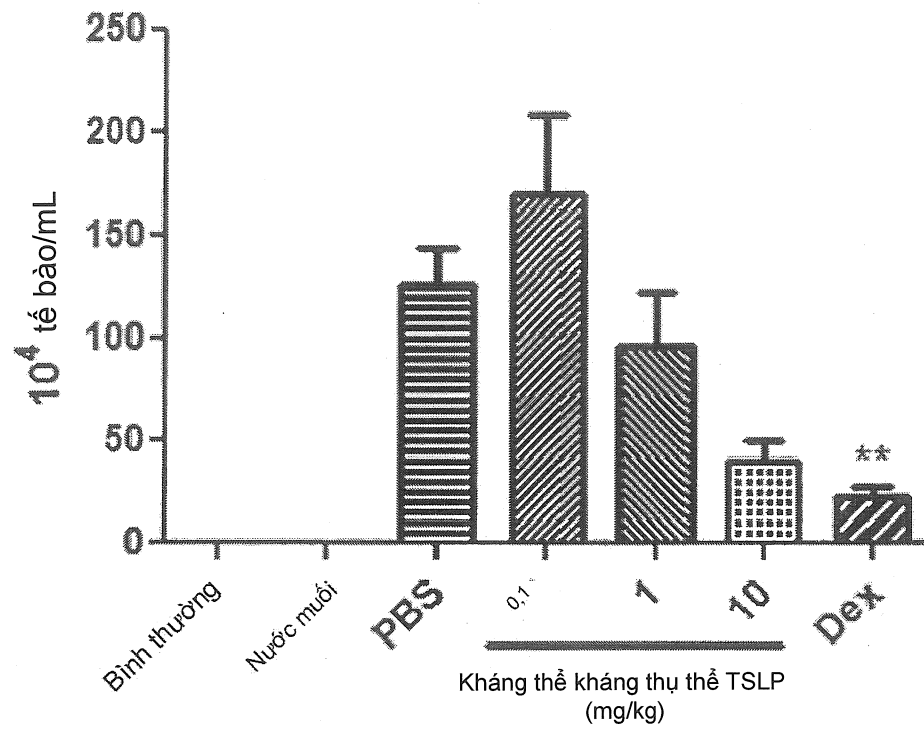
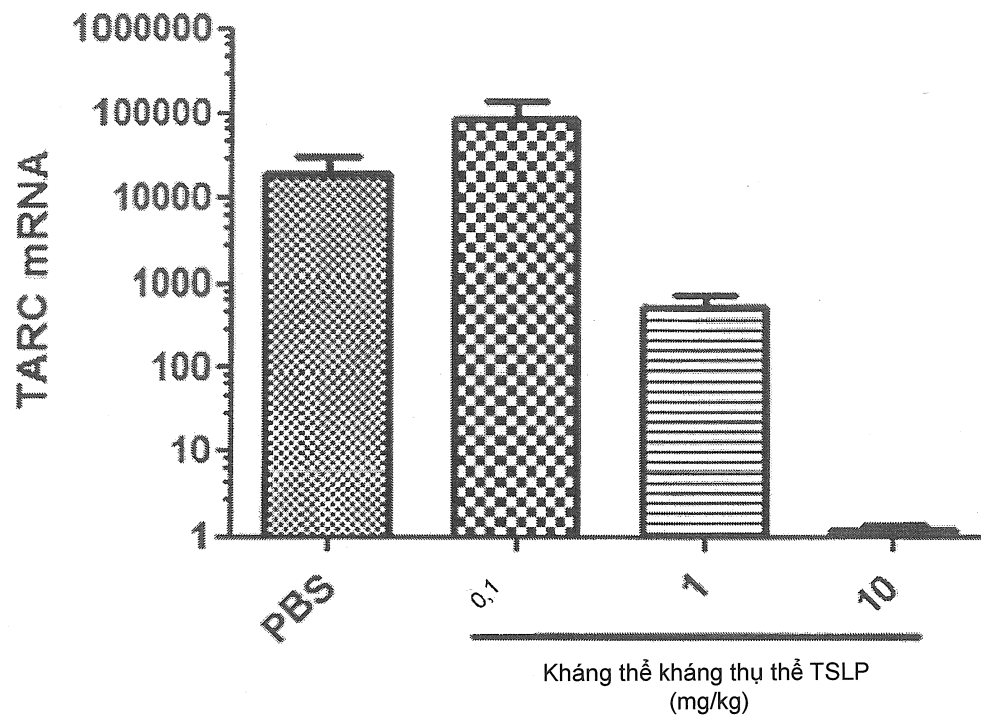


Fig. 5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Astellas Pharma Inc.
 <120> Kháng thể kháng thụ thể lymphopoietin chất nền tuyến ức (TSLP) ở người, polynucleotit, vector biểu hiện và dược phẩm chứa kháng thể này
 <130>
 <150> JP2013-165676
 <151> 2013-08-09
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi H của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người
 <400> 1

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

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

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

Ser Ser Val Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Val Lys Glu Gly Gly Ser Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 2
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen chuỗi H của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người

<400> 2
 gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggggggctc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttcgc agctctgcc tgcattgggt cggccaggct 120
 ccagggaagg gactgaaatg ggtctcaagt gttagtggca gtggtgctgg aacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcagagaca atcccaagaa tacactgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgt gaaagaaggg 300
 ggcagccggg gttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcggtctt ccccttgga cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctta gtagcgtggt gaccgtgcc tcagcagct tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
 tgtgacaaaa ctcacacatg ccacacgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720
 gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc 780

acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atccagcga catgcctgtg 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
 agcctctccc tgtctcggg taaatga 1347

<210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi L của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người
 <400> 3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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
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> 4
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen chuỗi L của kháng thể kháng thụ thể TSLP ở người

<400> 4	
gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgtc gggcgagtca ggacattagc aattatttag cctggtttca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagtcctt gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatcttt atcctccgac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaatcaa acggactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gogaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 5
 <211> 1395
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen của thụ thể TSLP ở người-Fc ở người

<400> 5
 atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cccccgtgt 60
 ggagcagcag aaggagtaca gattcagatc atctacttca atttagaaac cgtgcagggtg 120
 acatggaatg ccagcaaata ctccaggacc aacctgactt tccactacag attcaacggt 180
 gatgaggcct atgaccagtg caccaactac cttctccagg aaggtcacac ttccgggtgc 240
 ctcttagacg cagagcagcg agacgacatt ctctatttct ccatcaggaa tgggacgcac 300
 cccgttttca ccgcaagtcg ctggatggtt tattacctga aaccagttc cccgaagcac 360
 gtgagatttt cgtggcatca ggatgcagtg acggtgacgt gttctgacct gtccctacggg 420
 gatctcctct atgaggttca gtaccggagc cccttcgaca ccgagtggca gtccaaacag 480
 gaaaatacct gcaacgtcac catagaaggc ttggatgccg agaagtgtta ctctttctgg 540
 gtcagggtga aggctatgga ggatgtatat gggccagaca cataccaag cgactgggtca 600
 gaggtgacat gctggcagag aggcgagatt cgggatgcct gtgcagagac accaacgcct 660
 cccaaaccaa agctgtccaa aatcgaaggc aggatggacc ccaaattctg tgacaaaact 720
 cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctcttggggg gaccgtcagt ctctctcttc 780
 ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccgagccc ctgaggtcac atgcgtgggtg 840
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagtcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 960
 agcgtctctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1140
 agcctgacct gcctggtcaa aggtttctat ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260

ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	1320
tcattgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg	1380
tctccgggta aatga	1395

<210> 6
 <211> 1437
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen của thụ thể TSLP ở người-Fc ở chuột

<400> 6	
atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggcagacaga cgcgcgtgt	60
caggcagtgc acgccgcaca tgcagaaatc aacgaaggag cagcagaagg agtacagatt	120
cagatcatct acttcaattt agaaaccgtg caggtgacat ggaatgccag caaatactcc	180
aggaccaacc tgactttcca ctacagattc aacggatgat aggcctatga ccagtgcacc	240
aactaccttc tccaggaagg tcacacttcg gggatgcctcc tagacgcaga gcagcgagac	300
gacattctct atttctccat caggaatggg acgcaccccg ttttcaccgc aagtcgctgg	360
atggtttatt acctgaaacc cagttccccc aagcacgtga gattttcgtg gcattcaggat	420
gcagtgcagg tgacgtgttc tgacctgtcc tacggggatc tcctctatga ggttcagtac	480
cggagcccct tcgacaccga gtggcagtc aaacaggaaa atacctgcaa cgtcaccata	540
gaaggcttgg atgccgagaa gtgttactct ttctgggtca gggatgaaggc tatggaggat	600
gtatatgggc cagacacata cccaagcgac tggatcagagg tgacatgctg gcagagaggc	660
gagattcggg atgcctgtgc agagacacca acgcctccca aaccaaagct gtccaaaatc	720
gaaggcagga tggacgagcc tcgaggtcct acaatcaagc cgtgtccacc ttgtaagtgc	780
cccgcgccaa atctgctggg tggtccttct gtattcatat ttccgcccga gataaaagat	840
gtcttgatga tctctttgtc tcgatcgta acgtgcgtgg tcgtggatgt gtccgaagat	900
gacctgacg ttcagatttc atggtttgtc aacaacgtgg aagtgcatac ggctcagact	960
cagaccacc gagaggatta caattccact ctgagagttg tgagcgtct tccgatccag	1020
caccaagatt ggatgagcgg gaaagaattt aagtgcaaag tgaacaataa ggaccttccc	1080
gcgcctatcg aaagaacat atctaagcca aagggatccg tgcgagctcc acaggtgtac	1140
gtgctgcctc cgccagagga ggaaatgact aagaaacagg tgacctcac atgcatggta	1200
accgacttca tgcctgaaga tatttacgtg gaatggacca acaacggaaa aaccgaactc	1260

aactacaaaa acacagagcc cgttctggac tccgacggga gctacttcat gtactccaaa 1320
 ctgagggtgg agaaaaagaa ttgggtggaa cgaaatagtt attcatgcag tgtagtccat 1380
 gaggggctgc ataatcacca taccacaaag tctttcagca gaacccttgg gaaatga 1437

<210> 7

<211> 1395

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen của thụ thể TSLP ở xynomolgus- Fc ở người

<400> 7

atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cgcccgtgt 60
 gcaacaggag aaggactaca gattcagatc atctacttta atctagaaac ggtgcaggtg 120
 acatggaatg ccagccacta cccagaggat aacctgagtt tccactacaa attcagtcga 180
 gatgaggcct atgaccagt caccgtctac attctccagg aaggtcacac ctcggggtgc 240
 ctcttagacg cagagcagca agacgatatt ctgtatttct ccatcaggaa cgggacgcac 300
 cccgttttca ccgccagtgc ctggatcttt tattacctga agcccagttc tccgaagcag 360
 gtgagctttt cgtggcatca ggacgcgggtg acagtgcagt gctctgacct gtcctacagg 420
 ggtctcctct atgaggttca gtaccggagc cccttcgaca cggagtggca gtccaaacag 480
 gaaaatacct gcaatgtcac tatagaagac ttggatgccg agaagtgtta tgctttccgg 540
 gcccggtga aggccatgga ggatgcgtat gggccggaca cgtaccgag cgactggtca 600
 gaggtgacgt gctggcagag aggcgagact cgcgattcgt gccagagcc tcgcacgcct 660
 cccaaaccga agctgtccaa aatcgaaggc aggatggacc ccaaattctg tgacaaaact 720
 cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc 780
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgata tcccggacct ctgaggtcac atgcgtggtg 840
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 960
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1140
 agcctgacct gcctggtcaa aggccttctat ccagcgaca tcgcgtgga gtgggagagc 1200

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260
 ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
 tctccgggta aatga 1395

<210> 8
 <211> 483
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen của đột biến TSLP ở người-Flag

<400> 8
 atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cggccgctgt 60
 tacgacttca ctaactgtga ctttgagaag attaaagcag cctatctcag tactatttct 120
 aaagacctga ttacatatat gaggggacc aaaagtactg agttcaacaa caccgtctct 180
 tgtagcaatc ggccacattg ccttactgaa atccagagcc taaccttcaa tcccaccgcc 240
 ggctgcgcgt cgctcgccaa agaatgttc gccatgaaaa ctaaggctgc cttagctatc 300
 tgggtgccag gctattcgga aactcagata aatgctactc aggcaatgaa gaagaggaga 360
 aaagccaaag tcacaaccaa taaatgtctg gaacaagtgt cacaattaca aggattgtgg 420
 cgctgccttca atcgaccttt actgaaacaa caggactaca aggacgacga tgacaaatga 480
 taa 483

<210> 9
 <211> 498
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen của đột biến TSLP ở xynomolgus-Flag

<400> 9
 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccaccggt 60
 tacgacttca ctaactgtga ctttcagaag attgaagcag actatctccg tactatttct 120
 aaagacctga ttacatatat gaggggact aaaagtaccg acttcaacaa caccgtctcc 180
 tgtagcaatc ggccacactg ccttactgaa atccagagcc taaccttcaa tcccaccccc 240
 cgctgcgcgt cgctcgccaa ggaaatgttc gccaggaaaa ctaaggctac cctcgctctc 300
 tgggtgccag gctattcgga aactcagata aatgctactc aggcaatgaa gaagaggaga 360

aaagccaaag tcacaaccaa taaatgtctg gaacaagtgt cacaattact aggattgtgg 420
 cgtcgcttca ttcgaacttt actgaaacaa cagcaccacc accaccacca tgactataaa 480
 gacgatgacg acaaatga 498

<210> 10
 <211> 1116
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 atggggcggc tggttctgct gtggggagct gccgtctttc tgctgggagg ctggatggct 60
 ttggggcaag gaggagcagc agaaggagta cagattcaga tcatctactt caatttagaa 120
 accgtgcagg tgacatggaa tgccagcaaa tactccagga ccaacctgac ttccactac 180
 agattcaacg gtgatgaggc ctatgaccag tgcaccaact accttctcca ggaaggtcac 240
 acttcggggt gcctcctaga cgcagagcag cgagacgaca ttctctatit ctccatcagg 300
 aatgggacgc acccgtttt caccgcaagt cgctggatgg ttattacct gaaaccagct 360
 tccccgaagc acgtgagatt ttctgtgcat caggatgcag tgacgggtgac gtgttctgac 420
 ctgtcctacg gggatctcct ctatgagggt cagtaccgga gcccttctga caccgagtg 480
 cagtcctaac aggaaaatac ctgcaacgtc accatagaag gcttggatgc cgagaagtgt 540
 tactctttct gggtcagggt gaaggctatg gaggatgtat atgggccaga cacataccca 600
 agcgactggt cagaggtgac atgtctggcag agaggcgaga ttccgggatgc ctgtgcagag 660
 acaccaacgc ctcccaaacc aaagctgtcc aaatttatit taatttccag cctggccatc 720
 cttctgatgg tgtctctcct ccttctgtct ttatggaaat tatggagagt gaggaagttt 780
 ctcatcccca gcgtgccaga cccgaaatcc atcttccccg ggctctttga gatacaccaa 840
 gggaacttcc aggagtggat cacagacacc cagaacgtgg ccacactcca caagatggca 900
 ggtgcagagc aagaaagtgg ccccgaggag cccctggtag tccagttggc caagactgaa 960
 gccgagtctc ccaggatgct ggaccacacag accgaggaga aagaggcctc tgggggatcc 1020
 ctccagcttc ccaccagcc cctccaaggt ggtgatgtgg tcacaatcgg gggcttcacc 1080
 tttgtgatga atgaccgctc ctacgtggcg ttgtga 1116

<210> 11
 <211> 1380
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11

atgacaattc taggtacaac ttttggcatg gttttttctt tacttcaagt cgtttctgga	60
gaaagtggct atgctcaaaa tggagacttg gaagatgcag aactggatga ctactcattc	120
tcattgctata gccagttgga agtgaatgga tcgcagcact cactgacctg tgcttttgag	180
gacccagatg tcaacatcac caatctggaa tttgaaatat gtggggccct cgtggaggta	240
aagtgcctga atttcaggaa actacaagag atatatttca tcgagacaaa gaaattctta	300
ctgattggaa agagcaatat atgtgtgaag gttggagaaa agagtotaac ctgcaaaaaa	360
atagacctaa ccactatagt taaacctgag gctccttttg acctgagtgt cgtctatcgg	420
gaaggagcca atgactttgt ggtgacattt aatacatcac acttgcaaaa gaagtatgta	480
aaagttttta tgcacgatgt agcttaccgc caggaaaagg atgaaaacaa atggacgcat	540
gtgaatttat ccagcacaaa gctgacactc ctgcagagaa agtccaacc ggcagcaatg	600
tatgagatta aagttcgatc catccctgat cactatttta aaggcttctg gagtgaatgg	660
agtccaagtt attacttcag aactccagag atcaataata gtcagggga gatggatcct	720
atottactaa ccatcagcat tttgagtttt ttctctgtcg ctctgttggt catcttggcc	780
tgtgtgttat ggaaaaaag gattaagcct atcgtatggc ccagtctccc cgatcataag	840
aagactctgg aacatctttg taagaaacca agaaaaatt taaatgtgag tttcaatcct	900
gaaagtttcc tggactgcca gattcatagg gtggatgaca ttcaagctag agatgaagtg	960
gaaggttttc tgcaagatac gtttcctcag caactagaag aatctgagaa gcagaggctt	1020
ggaggggatg tgcagagccc caactgccc tctgaggatg tagtcatcac tccagaaagc	1080
tttgaagag attcatccct cacatgcctg gctgggaatg tcagtgcattg tgacgccct	1140
attctctcct cttccaggtc cctagactgc agggagagtg gcaagaatgg gcctcatgtg	1200
taccaggacc tcctgcttag ccttgggact acaaacagca cgctgcccc tccattttct	1260
ctccaatctg gaatcctgac attgaaccca gttgctcagg gtcagcccat tcttacttcc	1320
ctgggatcaa atcaagaaga agcatatgtc accatgtcca gttctacca aaaccagtga	1380