



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

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

(11)



1-0032578

(51)⁷ C07K 16/24; A61P 37/08; A61K 9/00; (13) B
A61P 11/06

(21) 1-2018-01480

(22) 07/09/2016

(86) PCT/IB2016/055336 07/09/2016

(87) WO 2017/042701 16/03/2017

(30) 62/216,050 09/09/2015 US; 62/342,511 27/05/2016 US

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/07/2018 364A

(73) NOVARTIS AG (CH)

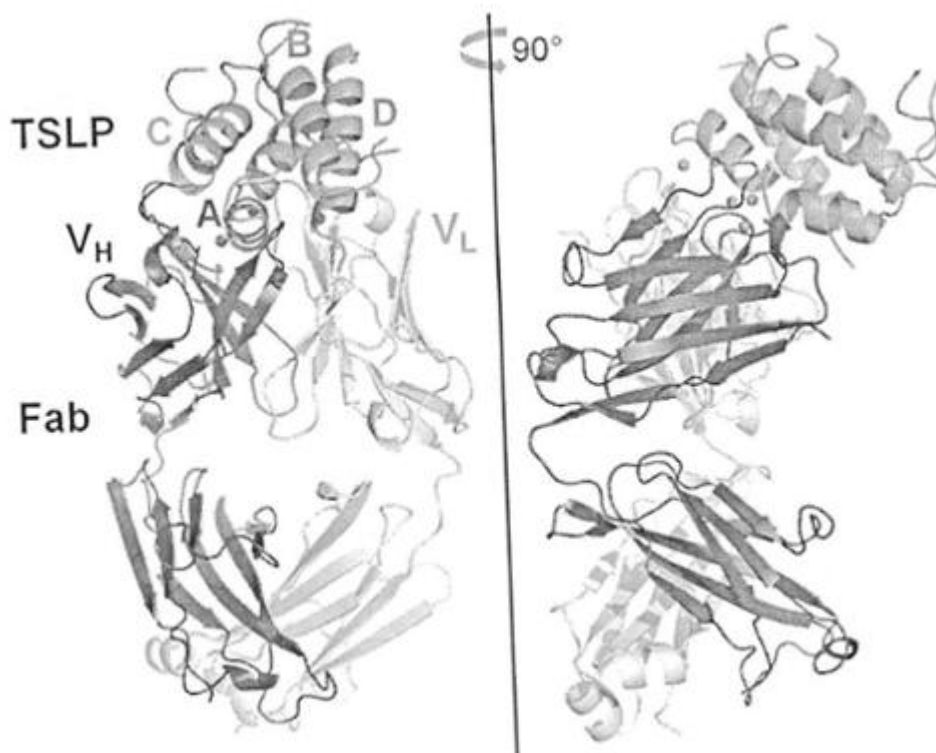
Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland

(72) RONDEAU, Jean-Michel Rene (FR); EDWARDS, Matthew John (GB); MILLER, Danforth (US); HUANG, Daniel (US); HEMMIG, Rene (CH); KNOPF, Hans-Peter (DE); GUPTA, Kapil (US); VAN HEEKE, Gino Anselmus (GB); HAUBST, Nicole (DE); ANDLAUER, Barbara (DE).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) PHÂN TỬ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI LYMPHOPOIETIN MÔ ĐỆM TUYẾN ỨC (TSLP) CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất phân tử, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh kháng thể, mà gắn kết đặc hiệu với lymphopoietin mô đệm tuyến ức (TSLP) và dược phẩm chứa những phân tử này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các phân tử, ví dụ, các kháng thể hoặc mảnh kháng thể gắn kết đặc hiệu với lymphopoietin mô đệm tuyến ức (Thymic Stromal Lymphopoietin - TSLP), được phẩm chứa các phân tử này và phương pháp tạo ra các phân tử này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lymphopoietin mô đệm tuyến ức (TSLP) là xytokin truyền tín hiệu qua thụ thể heterodime bao gồm tiểu đơn vị IL-7R α và TSLP-R, thành phần duy nhất có tính tương đồng với chuỗi giống như thụ thể γ chung (Pandey *et al.*, Nat. Immunol. 2000, 1(1):59-64). TSLP được biểu hiện bởi các tế bào biểu mô trong tuyến ức, phổi, da, ruột, và amidan, cũng như các tế bào cơ trơn đường dẫn khí, nguyên bào sợi phổi, và các tế bào mô đệm (Edwards, 2008, Drug news & perspectives 21, 312-316; He và Geha, 2010, Annals of the New York Academy of Sciences 1183, 13-24; Reche *et al.*, 2001, Journal of immunology 167, 336-343). Các tế bào này tạo TSLP để đáp ứng kích thích gây viêm, và TSLP gây ra những đáp ứng viêm dị ứng thông qua hoạt động của nó trên một số tế bào miễn dịch bẩm sinh, bao gồm các tế bào đuôi gai (Soumelis *et al.*, 2002, Nature immunology 3, 673-680), các tế bào bạch cầu đơn nhân (Reche *et al.*, 2001, Journal of immunology 167, 336-343), và các dưỡng bào (mast cells) (Allakhverdi *et al.*, 2007, The Journal of Experimental Medicine 204, 253-258). Các quần thể tế bào với biểu hiện được biết đến nhiều nhất của cả TSLP-R và IL-7R α là các tế bào đuôi gai dạng tủy (Reche *et al.*, 2001, Journal of immunology 167, 336-343).

TSLP có thể thúc đẩy sự tăng sinh của các tế bào T non và thúc đẩy biệt hóa của chúng vào các tế bào Th2 biểu hiện mức độ cao IL-4, IL-5, và IL-13 (Omori and Ziegler, 2007, Journal of immunology 178, 1396-1404). Mức độ biểu hiện TSLP cao được phát hiện trong các tế bào biểu mô phổi mắc bệnh hen và các tổn thương do viêm da cơ địa mạn tính, cho thấy vai trò của TSLP trong viêm dị ứng (Ziegler and Artis, 2010, Nature immunology 11, 289-293). Gần đây, ngày càng nhiều bằng chứng cho thấy vai trò của TSLP trong sự biệt hóa các tế bào Th17 và các quy trình gây viêm do

Th17 (Hartgring *et al.*, 2011, Arthritis and rheumatism 63, 1878-1887; Tanaka *et al.*, 2009, Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 39, 89-100; Wu *et al.*, 2014, Journal of molecular and cellular cardiology 76, 33-45). Bệnh hen phế quản (tạng dị ứng) dị ứng mạn tính thường đặc trưng bởi viêm kiểu Th2, trong khi viêm hen không dị ứng chủ yếu là ưa bạch cầu trung tính với môi trường trộn lẫn cytokin Th1 và Th17. Hệ quả của viêm mạn tính ở bệnh hen suyễn bao gồm tính siêu phản ứng phế quản (bronchial hyper-reactivity - BHR), sản xuất thừa chất nhầy, tái tạo thành đường dẫn khí và làm hẹp đường dẫn khí (Lambrecht and Hammad, 2014, Nature immunology 16, 45-56). TSLP được chỉ ra là có liên quan trong việc bắt đầu và duy trì/tăng cường đáp ứng hen dị ứng (Wang *et al.*, 2006, Immunity 24, 827-838). Gần đây, truyền tín hiệu TSLP cũng được nhận thấy là cần thiết cho đáp ứng thu hồi các tế bào T nhớ đối với thách thức kháng nguyên cục bộ (Wang *et al.*, 2015, The Journal of allergy and clinical immunology 135, 781-791 e783).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các phân tử, ví dụ, các kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh kháng thể của chúng chẳng hạn như Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, minibody, hoặc diabody, chúng gắn kết đặc hiệu với lymphopietin mô đệm tuyến ức (TSLP) của người. Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này có thể chứa: vùng quyết định bổ sung trên chuỗi nặng 1 (HCDR1) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; vùng quyết định bổ sung trên chuỗi nặng 2 (HCDR2) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; vùng quyết định bổ sung trên chuỗi nặng 3 (HCDR3) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; vùng quyết định bổ sung trên chuỗi nhẹ 1 (LCDR1) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11; vùng quyết định bổ sung trên chuỗi nhẹ 2 (LCDR2) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và vùng quyết định bổ sung trên chuỗi nhẹ 3 (LCDR3) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13. Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này có thể chứa: phân tử mà có chứa: HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án cụ thể, phân tử này chứa mảnh kháng thể gắn kết với TSLP của người và chứa HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13. Theo các phương án cụ thể khác, phân tử này chứa mảnh kháng thể mà gắn kết với TSLP của người và chứa HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này có thể chứa: vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này có thể chứa: chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22, và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này có thể chứa: chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này có thể chứa paratop chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất 10, ít nhất 11, ít nhất 12, ít nhất 13, ít nhất 14, ít nhất 15, ít nhất 16, ít nhất 17, ít nhất 18, ít nhất 19, hoặc tất cả các gốc sau đây: Thr28, Asp31, Tyr32, Trp33, Asp56, Glu101, Ile102, Tyr103, Tyr104, Tyr105 của trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:22 hoặc Gly28, Ser29, Lys30, Tyr31, Tyr48, Asp50, Asn51, Glu52, Asn65, và Trp92 của trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:25.

Theo một số phương án, được đề xuất ở đây là các phân tử gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất 10, ít nhất 11, ít nhất 12, ít nhất 13, ít nhất 14, ít nhất 15, hoặc tất cả các gốc sau đây: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, Gln145, và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38. Theo một số phương

án, các phân tử này gắn kết epitop chứa ít nhất một trong số các bộ gốc sau đây nêu trong SEQ ID NO: 38: (a) Lys49 và Ile52, (b) Gly57 và Lys59, (c) Lys101, hoặc (d) Gln145 và Arg149.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này là các globulin miễn dịch của người gắn kết đặc hiệu với TSLP của người. Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này là các kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của kháng thể được chọn từ Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, minibody, hoặc diabody. Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này là Fab, ví dụ, Fab của người hoặc Fab được làm giống như của người, mà gắn kết đặc hiệu với TSLP của người.

Theo một số phương án, các phân tử được mô tả ở đây gắn kết với TSLP của người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 100pM. Theo một số phương án, các phân tử được mô tả ở đây gắn kết với TSLP của người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 10pM.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa ít nhất một phân tử gắn kết TSLP được mô tả ở đây và ít nhất một tá dược dược dụng. Theo một số phương án, tỉ lệ khối lượng tá dược này: phân tử gắn kết TSLP lớn hơn 0,5. Theo một số phương án, phân tử gắn kết TSLP này chiếm khoảng 5% đến khoảng 95%, hoặc khoảng 10% đến khoảng 90%, hoặc khoảng 15% đến khoảng 85%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 80%, hoặc khoảng 25% đến khoảng 75%, hoặc khoảng 30% đến khoảng 70%, hoặc khoảng 40% đến khoảng 60%, hoặc khoảng 40-50% (khối lượng/ khối lượng) dược phẩm. Theo một số phương án, các dược phẩm này chứa chất tạo vỏ, chẳng hạn như trileuxin hoặc leuxin. Theo một số phương án, trileuxin hoặc leuxin chiếm khoảng 10-75% (khối lượng/ khối lượng) dược phẩm. Theo một số phương án, trileuxin chiếm khoảng 10-30% (khối lượng/ khối lượng) dược phẩm. Theo phương án khác, leuxin chiếm khoảng 50-75% (khối lượng/ khối lượng) dược phẩm. Theo một số phương án, các dược phẩm này chứa ít nhất một tá dược tạo trạng thái thủy tinh, trong đó tá dược tạo trạng thái thủy tinh này được chọn từ histidin, trehaloza, manitol, sucroza, hoặc natri xitrat. Theo một số phương án, ít nhất một tá dược tạo trạng thái thủy tinh là trehaloza hoặc hỗn hợp của trehaloza và manitol. Theo một số phương án, tá dược tạo trạng thái thủy tinh chiếm khoảng 15-35% (khối lượng/ khối lượng) dược phẩm. Theo một số phương án, các dược phẩm này chứa đệm, chẳng hạn như đệm

histidin, glyxin, axetat, hoặc phosphat. Theo một số phương án, đệm này chiếm khoảng 5-13% dược phẩm.

Theo một số phương án, các dược phẩm được đề xuất ở đây được bào chế dưới dạng chế phẩm bào chế dạng bột khô, ví dụ, chế phẩm bào chế dạng bột khô thích hợp để xông hít.

Theo một số phương án, các dược phẩm được đề xuất ở đây chứa các hạt được sấy phun bao gồm phần vỏ và phần lõi, trong đó phần vỏ chứa trileuxin hoặc leuxin, và phần lõi chứa: (i) phân tử gắn kết TSLP, trehaloza, manitol và đệm; hoặc (ii) phân tử gắn kết TSLP, trehaloza, đệm, và HCl. Đệm có thể là đệm histidin, glyxin, axetat, hoặc phosphat.

Theo một số phương án, các dược phẩm được đề xuất ở đây chứa các hạt được sấy phun bao gồm: (i) phần vỏ chứa trileuxin hoặc leuxin; và (ii) phần lõi chứa trehaloza, manitol, histidin, và phân tử gắn kết TSLP, hoặc phần lõi chứa trehaloza, histidin, HCl, và phân tử gắn kết TSLP, trong đó phân tử gắn kết TSLP là mảnh kháng thể Fab chứa: (a) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13; hoặc (b) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án, các dược phẩm được đề xuất ở đây chứa:

(a) 40% (khối lượng/ khối lượng) phân tử gắn kết TSLP, 25% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, 30% (khối lượng/ khối lượng) trọng lượng kết hợp của trehaloza và manitol, và 5% (khối lượng/ khối lượng) histidin;

b) 50% (khối lượng/ khối lượng) phân tử gắn kết TSLP, 15% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, 2,6% (khối lượng/ khối lượng) HCl, 5,6% (khối lượng/ khối lượng) histidin, và 26,8% (khối lượng/ khối lượng) trọng lượng kết hợp của trehaloza và bazơ; hoặc

c) 50% (khối lượng/ khối lượng) phân tử gắn kết TSLP, 15% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, 19,4% (khối lượng/ khối lượng) trehaloza, 13,04% (khối lượng/ khối lượng) histidin, và 2,56% (khối lượng/ khối lượng) HCl.

Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa phân tử gắn kết TSLP bất kỳ được mô tả ở đây, các vectơ chứa các axit nucleic này, và các tế bào chủ chứa axit nucleic này hoặc vectơ này.

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sản xuất phân tử gắn kết TSLP được mô tả ở đây. Các phương pháp này có thể bao gồm bước (a) nuôi cấy tế bào chủ biểu hiện axit nucleic mã hóa phân tử; và (b) thu thập phân tử từ môi trường nuôi cấy.

Theo khía cạnh khác, được đề xuất ở đây là kit chứa ít nhất một phân tử gắn kết TSLP hoặc dược phẩm được mô tả ở đây, và thiết bị để vận chuyển phân tử hoặc dược phẩm này đến đối tượng. Theo một số phương án, thiết bị này có thể vận chuyển phân tử hoặc dược phẩm này ở dạng được sol khí hóa. Theo một số phương án, thiết bị là máy xông hít bột khô.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị tình trạng liên quan đến TSLP ở đối tượng cần điều trị, ví dụ, bệnh nhân là người, bằng cách dùng cho đối tượng lượng có hiệu quả điều trị của phân tử gắn kết TSLP bất kỳ hoặc dược phẩm được mô tả ở đây. Cũng được đề xuất là các phân tử hoặc các dược phẩm như được mô tả ở đây để sử dụng trong điều trị tình trạng liên quan đến TSLP ở đối tượng cần điều trị. Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng các phân tử gắn kết TSLP hoặc dược phẩm được mô tả ở đây để điều trị tình trạng liên quan đến TSLP ở đối tượng cần điều trị. Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng phân tử được mô tả ở đây trong sản xuất thuốc để sử dụng trong điều trị tình trạng liên quan đến TSLP ở đối tượng cần điều trị.

Tình trạng viêm có liên quan đến TSLP có thể là tình trạng bất kỳ trong số bệnh hen suyễn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm xoang mũi dị ứng, bệnh viêm kết mạc dị ứng, bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ái toan, hoặc bệnh viêm da dị ứng. Theo một số phương án, tình trạng viêm liên quan đến TSLP là bệnh hen suyễn. Theo một số phương án, phân tử gắn kết TSLP được bào chế dưới dạng chế phẩm bào chế dạng bột khô thích hợp để xông hít. Theo một số phương án, phân tử gắn kết TSLP được dùng cho đối tượng theo đường miệng hoặc theo

đường trong mũi, ví dụ, ở dạng được sol khí hóa. Theo một số phương án, phân tử gắn kết TSLP được dùng cho đối tượng bằng máy xông hít bột khô.

Theo một số phương án, các phương pháp điều trị tình trạng liên quan đến TSLP hoặc việc sử dụng phân tử gắn kết TSLP còn bao gồm dùng chất thứ hai cho đối tượng cần điều trị. Chất thứ hai này có thể là corticosteroid, bronchodilator, antihistamin, antileukotrien, hoặc chất ức chế PDE-4.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp điều chế chế phẩm bào chế dạng bột khô chứa phân tử gắn kết TSLP được mô tả ở đây. Các phương pháp này có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số các bước sau: (a) cung cấp dung dịch chứa nước chứa phân tử gắn kết TSLP như được mô tả ở đây, trileuxin hoặc leuxin, tá dược tạo trạng thái thủy tinh, và đệm; (b) sấy phun dung dịch chứa nước ở bước (a) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 120°C đến 200°C (đầu vào) và 55°C đến khoảng 75°C (đầu ra) để tạo ra các hạt bột khô; và (c) thu lấy các hạt bột khô. Theo một số phương án, đệm được chọn từ histidin, glyxin, axetat, hoặc đệm phosphat. Theo một số phương án, tá dược tạo trạng thái thủy tinh được chọn từ histidin, histidin HCl, trehaloza, manitol, sucroza, hoặc natri xitrat.

Chi tiết của một hoặc nhiều phương án theo sáng chế được nêu ra trong phần hình vẽ đi kèm và phần mô tả dưới đây. Các dấu hiệu, mục đích, và thuận lợi khác của sáng chế sẽ rõ ràng qua phần mô tả và hình vẽ, và qua các yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1A thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng của Fab1 kháng TSLP của người (SEQ ID NO: 22) với các CDR được gạch chân (như được xác định bởi Kabat), và các gốc được đặt ở giao diện kháng thể-kháng nguyên được gắn dấu *. FIG. 1B thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của Fab1 kháng TSLP của người (SEQ ID NO: 25) với các CDR được gạch chân (như được xác định bởi Kabat), và các gốc được đặt ở giao diện kháng thể-kháng nguyên được gắn dấu *.

FIG. 2 thể hiện trình tự axit amin của TSLP của người tái tổ hợp được sử dụng trong các nghiên cứu về tinh thể học (SEQ ID NO: 38), với các yếu tố cấu trúc bậc hai được thể hiện bên dưới trình tự axit amin. Các ô biểu diễn các xoắn α_A , α_B , α_C và α_D , và các đường kẻ dày biểu diễn các vùng cuộn. TSLP của người trưởng thành bắt đầu từ Tyr29. Cấu trúc được sử dụng ở đây có đuôi hexahistidin đầu N (các gốc 15-20) sau

đó là vị trí nhận biết HRV-3C proteaza (PreScission) (các gốc 21-28) và các gốc 11-14 là kết quả từ việc tách dòng. Asn64 và Asn119 là các vị trí glycosyl hóa liên kết N tiềm năng; và các gốc 127-130 tạo thành vị trí phân cắt furin.

FIG. 3 là biểu đồ cột thể hiện tác dụng của việc trung hòa TSLP lên bệnh viêm phổi ở chuột nhạy cảm với ovalbumin đã được thử thách với kháng nguyên. Chuột nhạy cảm với ovalbumin (OVA) hoặc nước muối có thêm phèn, được cho dùng TSLP kháng chuột hoặc kháng thể đối chứng isotyp trong tĩnh mạch ở thời điểm 1h trước khi gây nhạy cảm. Tất cả chuột đã được thử thách OVA vào ngày 21 và được lọc ra lúc 24h. Các giá trị đại diện cho tổng giá trị trung bình $\pm$ SEM (trung bình sai số chuẩn) và số lần đếm tế bào biệt hóa bên trong BAL. Tiến hành phân tích thống kê sử dụng kiểm định kiểm định T student không ghép cặp. Phương sai có ý nghĩa giữa chuột đã được gây nhạy bằng nước muối đã được xử lý isotyp và chuột đã được gây nhạy bằng OVA ở $p < 0,05$ được biểu thị bằng dấu (*) và $p < 0,01$ được biểu thị bằng (**). Phương sai giữa isotyp và chuột được gây nhạy bằng OVA được xử lý với kháng thể kháng TSLP ở $p < 0,05$ được biểu thị bằng dấu (#). [PMN: Polymorphonuclear cells - các tế bào bạch cầu nhân đa hình (các bạch cầu trung tính); Eos: các bạch cầu ái toan; MO: các bạch cầu đơn nhân; Lymph: các lymphô bào; TCC: Tổng số lượng tế bào.]

Các FIG. 4A-4C là một chuỗi các biểu đồ cột cho thấy rằng sự trung hòa TSLP làm giảm đáng kể mức độ của IL-13 (FIG. 4A), eotaxin-2 (CCL24, FIG. 4B) và Thymus- và Chemokin được điều hòa hoạt hóa (TARC, CCL17, FIG. 4C) bên trong phổi của chuột đã được thử thách kháng nguyên, đã được gây nhạy bằng ovalbumin. Chuột đã được gây nhạy bằng OVA (hoặc nước muối) có thêm phèn, được cho dùng TSLP kháng chuột hoặc kháng thể đối chứng isotyp trong tĩnh mạch ở thời điểm 1h trước lúc gây nhạy. Tất cả chuột đã được thử thách với OVA vào ngày 21 và được lọc ra lúc 24h. Các giá trị đại diện cho mức độ trung bình $\pm$ SEM của các chất trung gian trong BAL, được đo bằng phương pháp ELISA cụ thể. Tiến hành phân tích thống kê sử dụng kiểm định T student không ghép cặp. Phương sai có ý nghĩa giữa chuột được gây nhạy bằng nước muối được xử lý isotyp và chuột được gây nhạy bằng OVA ở $p < 0,05$ được biểu thị bằng dấu (*) và $p < 0,01$ được biểu thị bằng dấu (**). Phương sai giữa isotyp và chuột được gây nhạy bằng OVA được xử lý kháng thể kháng TSLP ở $p < 0,05$ được biểu thị bằng dấu (#).

FIG. 5 là biểu đồ dòng thể hiện profin nồng độ trung bình trong huyết thanh theo thời gian của Fab1 kháng TSLP tổng cộng ở khỉ.

Các FIG. 6A và 6B là các biểu đồ cột thể hiện nồng độ trung bình của Fab1 kháng TSLP tổng cộng ở BAL (6A) hoặc dịch đồng thể tế bào phổi (6B) ở khỉ lúc 1h (các nhóm xông hít 1, 10, 20mg /kg/ngày) hoặc 6 ngày (1mg/kg IV+nhóm xông hít 20mg /kg /ngày) sau liều cuối cùng được xông hít.

FIG. 7 minh họa tổng quan về TSLP của người tạo phức với Fab1 kháng TSLP. Các xoắn TSLP được đánh dấu A đến D từ đầu N tới đầu C.

FIG. 8 thể hiện epitop TSLP được nhắm bởi Fab1 kháng TSLP. Phần bên trên của hình này thể hiện số lần tiếp xúc liên phân tử trực tiếp giữa các nguyên tử không phải hydro trong khoảng cách 4,0Å, và phần bên dưới thể hiện sự giảm bề mặt tiếp xúc được với dung môi khi tạo thành phức chất. Trình tự axit amin của TSLP được biểu thị trên trục ngang.

FIG. 9 thể hiện hình ảnh kháng thể của epitop TSLP. TSLP được thể hiện ở dạng hoạt hình kiểu ruy băng. Tất cả các gốc axit amin tham gia tiếp xúc trực tiếp với Fab1 (ngưỡng khoảng cách 4,0Å) được biểu thị ở dạng bóng và gậy.

Các FIG. 10A và 10B thể hiện paratop chuỗi nặng (A) và chuỗi nhẹ (B) của Fab1 kháng TSLP. Phần bên trên của hình này thể hiện số lần tiếp xúc liên phân tử trực tiếp ($\leq 4,0\text{\AA}$) giữa các nguyên tử không phải hydro, phần bên dưới thể hiện sự giảm bề mặt tiếp xúc được với dung môi khi tạo thành phức chất. Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được biểu thị trên trục ngang.

Các FIG. 11A-11C thể hiện chế độ hoạt động của Fab1 kháng TSLP. FIG. 11A là hình ảnh về phức truyền tín hiệu ngoại bào ở chuột, với IL-7R α thể hiện bằng màu đen, và TSLPR thể hiện bằng màu xám sáng. FIG. 11B là hình ảnh về phức TSLP-Fab1 ở người theo cùng hướng như FIG. 11A. FIG. 11C là lớp phủ cấu trúc của hai phức, dựa trên các nguyên tử xytokin C α . Phức truyền tín hiệu ở chuột là ở màu xám sáng, phức TSLP-Fab1 ở người là ở màu đen.

FIG. 12 là biểu đồ phân tán minh họa các chế phẩm bào chế ở tỉ lệ tá dược:protein cao hơn cải thiện độ ổn định lý hóa của Fab1 kháng TSLP, như được thể hiện bởi sự giảm tỉ lệ kết tụ protein.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Như được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, các từ ở dạng số ít cũng bao gồm sự tham chiếu đến các từ số nhiều trừ phi ngữ cảnh chỉ ra điều ngược lại một cách rõ ràng. Ví dụ, thuật ngữ “tế bào” bao gồm rất nhiều tế bào, bao gồm cả hỗn hợp của chúng.

Tất cả các chỉ số, ví dụ, độ pH, nhiệt độ, thời gian, nồng độ, và trọng lượng phân tử, bao gồm các khoảng, là các giá trị xấp xỉ có thể thay đổi (+) hoặc (-) 0,1. Điều này được hiểu là, mặc dù không phải lúc nào cũng chỉ rõ nhưng tất cả các chỉ số được bắt đầu bởi thuật ngữ “khoảng.” Điều này cũng được hiểu là, mặc dù không phải lúc nào cũng chỉ rõ, nhưng các chất phản ứng được mô tả ở đây chỉ là các ví dụ và các chất tương đương của chúng được biết rõ trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, “TSLP” (cũng được biết đến như là “lymphopoietin mô đệm tuyến ức”) dùng để chỉ xytokin được tạo ra bởi các tế bào không tạo máu để đáp ứng với kích thích gây viêm. Gen TSLP ở người được ánh xạ tới vị trí nhiễm sắc thể 5q22.1, và trình tự gen của gen TSLP có thể được tìm thấy trong Ngân hàng Gen ở NC_000005.10. Do sự nối tiếp thay thế, hai dạng đồng đẳng (isoform) TSLP có mặt ở người. Trình tự protein và mARN đối với hai dạng đồng đẳng TSLP ở người được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự axit amin TSLP và mARN

Loài	Đồng đẳng	Số truy cập Ngân hàng gen	Trình tự
Người hiện đại (Homo sapiens)	axit amin của dạng đồng đẳng TSLP 1	NP_149024.1	MFPFALLYVLSVSFRKIFILQLVGL VLTYDFTNCDFEKIKAAYLSTISKD LITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRPH CLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMF AMKTKAALAIWCPGYSETQINAT QAMKKRRKRKVTTNKCLEQVSQL QGLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 27)

Homo sapiens	mARN của dạng đồng đẳng TSLP 1	NM_033035.4	GCAGCCAGAA AGCTCTGGAG CATCAGGGAG ACTCCAACCTT AAGGCAACAG CATGGGTGAA TAAGGGCTTC CTGTGGACTG GCAATGAGAG GCAAAACCTG GTGCTTGAGC ACTGGCCCCCT AAGGCAGGCC TTACAGATCT CTTACACTCG TGGTGGGAAG AGTTTAGTGT GAAACTGGGG TGGAATTGGG TGTCCACGTA TGTTCCCTTT TGCCTTACTA TATGTTCTGT CAGTTTCTTT CAGGAAAATC TTCATCTTAC AACTTGTAGG GCTGGTGTTA ACTTACGACT TCACTAACTG TGACTTTGAG AAGATTAAAG CAGCCTATCT CAGTACTATT TCTAAAGACC TGATTACATA TATGAGTGGG ACCAAAAGTA CCGAGTTCAA CAACACCGTC TCTTGTAGCA ATCGGCCACA TTGCCTTACT GAAATCCAGA GCCTAACCTT CAATCCCACC GCCGGCTGCG CGTCGCTCGC CAAAGAAATG TTCGCCATGA AAACTAAGGC TGCCTTAGCT ATCTGGTGCC CAGGCTATTC GGAAACTCAG ATAAATGCTA CTCAGGCAAT GAAGAAGAGG AGAAAAAGGA AAGTCACAAC CAATAAATGT CTGGAACAAG TGTCACAATT ACAAGGATTG TGGCGTCGCT TCAATCGACC TTTACTGAAA CAACAGTAAA CCATCTTTAT TATGGTCATA
--------------	--------------------------------	-------------	---

		TTTCACAGCA CCAAAATAAA TCATCTTTAT TAAGTAGATG AAACATTAAC TCTAACTGTG ACAAAGAAGA CCACAAATAG TTATCTTTTA ATTACAGAAG AGTTTCTTAA CTTACTTTTG TAAGTTTTTA TTGTGTAAGT TTATAATGCA GGGGAAGTAC TACTCCTCAA ATGTTGAGGG AAGCTTCCAT AACATTGATG ACTGGCTTCA TGGCAGTAAT TCTCGGCTGT AGTTGCATAA GCATTGCTCA AGAGGAAAAT CCAAAAGTGC AGCAGGAGAA CTCTTTTCCC TGAAAAAGGA AAAATATTGA ACTCAATGAT AGCACCTAAA CTTACATTTA AAAGACAGAC ATTCCTTCTA CATGTAATGA CACTTCTTGT GTTAAACTAA AAATTTACAA GAGAAGAAAG TGAAAGCAAA TGGGGTTTCA CAAATAGTTG TAAATATAGT GAAGCAATTT GAAATAATTT TCAAGCAAAG TATTGTGAAA GTATTCTAAG CCAAGTTTTA AATATTATCT AACAGACAAG AGTGGTATAT ACAAGTAGAT CCTGAGAAGT ACCTTTGTTA CAGCTACTAT AAATATACAT ATAAATTATA GAATCTACTT TAATTTATTT TGTGAACACT TTTGAAAATG TACATGTTCC TTTGTAATTG ACACTATATA TTTCTTAATA AAATAATTCT CAAATTTGTT
--	--	---

			TCTTATGAAT CATCTCTCAA ATCTAGTTAG ACAATTTGCA CACATACTTT TCTAAGGGAC ATTATCTTCC TTCAGGTTTT TACCTCCACT CATCCTTAGA GCCCCACTGAC TGCTCCCCTT TATACCTGTT GGCCCTGCCT ATAGGAGAGA ATATTTGGAG ATAGGCAGCT TCAGGATGCA TTGCAATCAT CCTTTTCTTA AATTATGTCA CTAGTCTTTT ATTTTTTCCC CTCTTGAAC TTCCTCACAC CTGGAAGAAA CAAAGTAGGA AAAAGTGAAC AGGGGATGTC AAATCGATTC TTGAATTCCC GCTGCAAGCT AGAGCCGCAG GCACCCTCTC ACTCAATTTC CACTCAGAAC CCTATAAACA CCAGTGGGAA GGGCAACCCA CTGCACGTGG GAATGCACTG ATTTTTCCTA GGAGTAGACA TGTTCCCTCTA ATTACTCCCT GAGGGTTAGT TGGGGCTAAA CCATGACAGA AGTGGGGAAG TTCAATGTCC TTAAATCCAT CTTACTTGCC AACAGGTAAG AGGAAGCTTA CATTACATGT CCAGTCCACA TTTAAAGAGC ACTTACTGTG GAACAAGCCT TCAGCCAAAC AATGGGGATA GAAAAGTAGG TAAGACTCAG CCTTTGTCCA GAGAAGCTCA GGGTATAGCT GAATAGGCAG TTTCTTTTGT CCTGAGGAAA ATCAGGACAT
--	--	--	--

			GCCTGCTTTC TAAAAATCTT CCTCTGAAGA CCTGACCCAA GCTCTTAAAT GCTATTGTAA GAGAAATTTT TTTGTCTATT AACTCCATTT TAGTAGGGAT TCACTGACTA GATTTTACTG AACTATGAAA ATAAATACAC ATAATTTTTC ACAAATTTT GGGCCCAATT CCCCTAAAAG AATTGAGGAT TAGGGAGAAA GGAGACAAC CAAAGTCATC CCATTAAGTG CAGTTTCTTT GAATCTTCTG CTTTATCTTT AAAAATTTGT ATAATTTATA TATTTTATTC TATGTGTTCC ATAGATATCT TAATGTAAAA TTAGTCATTT AAATTACACT GTCAATTAAA AGTAATGGGC AAGAGATTGC ATCATACTAA TTAGTAAGA ACGTTCCCAA ATGTTGTAAC AATGTGGATC ATACATCTCT GGTTTTTTAA ATGTATTGAG GCTTTCTTGG TGGACTAGTA TAGTATACGG TCAGTTATGT CAATGTTTCA TGGTCAATAA AAAGGAAGTT GCAAATTGT (SEQ ID NO: 28)
Người hiện đại (Homo sapiens)	axit amin của dạng đồng đẳng TSLP 2	NP_612561.2	MFAMKTKAALAIWCPGYSETQIN ATQAMKKRRKRKVTTNKCLEQVS QLQGLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 29)
Người hiện đại (Homo sapiens)	mARN của dạng đồng đẳng TSLP 2	NM_138551.4	ACCCTCGCCA CGCCCCTGCT CCCCGCGGT TGGTTCTTCC TTGCTCTACT CAACCCTGAC

		CTCTTCTCTC TGACTCTCGA CTTGTGTTCC CCGCTCCTCC CTGACCTTCC TCCCCTCCCC TTTCACTCAA TTCTCACCAA CTCTTTCTCT CTCTGGTGTT TTCTCCTTTT CTCGTAAACT TTGCCGCCTA TGAGCAGCCA CATTGCCTTA CTGAAATCCA GAGCCTAACC TTCAATCCCA CCGCCGGCTG CGCGTCGCTC GCCAAAGAAA TGTTCGCCAT GAAAATAAG GCTGCCTTAG CTATCTGGTG CCCAGGCTAT TCGGAAACTC AGATAAATGC TACTCAGGCA ATGAAGAAGA GGAGAAAAAG GAAAGTCACA ACCAATAAAT GTCTGGAACA AGTGTCACAA TTACAAGGAT TGTGGCGTCG CTTCAATCGA CCTTTACTGA AACAACAGTA AACCATCTTT ATTATGGTCA TATTTACAG CACCAAAATA AATCATCTTT ATTAAGTAGA TGAAACATTA ACTCTAACTG TGACAAAGAA GACCACAAAT AGTTATCTTT TAATTACAGA AGAGTTTCTT AACTTACTTT TGTAAGTTTT TATTGTGTAA GTTTATAATG CAGGGGAAGT ACTACTCCTC AAATGTTGAG GGAAGCTTCC ATAACATTGA TGACTGGCTT CATGGCAGTA ATTCTCGGCT GTAGTTGCAT AAGCATTGCT CAAGAGGAAA ATCCAAAAGT GCAGCAGGAG
--	--	---

			AACTCTTTTC CCTGAAAAAG GAAAAATATT GAACTCAATG ATAGCACCTA AACTTACATT TAAAAGACAG ACATTCCTTC TACATGTAAT GACACTTCTT GTGTTAAACT AAAAATTTAC AAGAGAAGAA AGTGAAAGCA AATGGGGTTT CACAAATAGT TGTAATATA GTGAAGCAAT TTGAAATAAT TTTCAAGCAA AGTATTGTGA AAGTATTCTA AGCCAAGTTT TAAATATTAT CTAACAGACA AGAGTGGTAT ATACAAGTAG ATCCTGAGAA GTACCTTTGT TACAGCTACT ATAAATATAC ATATAAATTA TAGAATCTAC TTTAATTTAT TTTGTGAACA CTTTGGAAAA TGTACATGTT CCTTTGTAAT TGACACTATA TATTTCTTAA TAAAATAATT CTCAAATTTG TTTCTTATGA ATCATCTCTC AAATCTAGTT AGACAATTTG CACACATACT TTTCTAAGGG ACATTATCTT CCTTCAGGTT TTTACCTCCA CTCATCCTTA GAGCCCACTG ACTGCTCCCC TTTATACCTG TTGGCCCTGC CTATAGGAGA GAATATTTGG AGATAGGCAG CTTCAGGATG CATTGCAATC ATCCTTTTCT TAAATTATGT CACTAGTCTT TTATTTTTTC CCCTCTTGAA CTTTCCTCAC ACCTGGAAGA AACAAAGTAG GAAAAAGTGA
--	--	--	--

			ACAGGGGATG TCAAATCGAT TCTTGAATTC CCGCTGCAAG CTAGAGCCGC AGGCACCCTC TCACTCAATT TCCACTCAGA ACCCTATAAA CACCAGTGGG AAGGGCAACC CACTGCACGT GGGAATGCAC TGATTTTCC TAGGAGTAGA CATGTTCTC TAATTACTCC CTGAGGGTTA GTTGGGGCTA AACCATGACA GAAGTGGGGA AGTTCAATGT CCTTAAATCC ATCTTACTTG CCAACAGGTA AGAGGAAGCT TACATTACAT GTCCAGTCCA CATTTAAAGA GCACTTACTG TGGAACAAGC CTCAGCCAA ACAATGGGGA TAGAAAAGTA GGTAAGACTC AGCCTTTGTC CAGAGAAGCT CAGGGTATAG CTGAATAGGC AGTTTCTTTT GTCCTGAGGA AAATCAGGAC ATGCCTGCTT TCTAAAAATC TTCCTCTGAA GACCTGACCC AAGCTCTTAA ATGCTATTGT AAGAGAAATT TCTTTGTCTA TTAACTCCAT TTTAGTAGGG ATTCACTGAC TAGATTTTAC TGAACTATGA AAATAAATAC ACATAATTTT TCACAAAATT TTGGGCCCAA TTCCCCTAAA AGAATTGAGG ATTAGGGAGA AAGGAGACAA CTCAAAGTCA TCCCATTAAG TGCAGTTTCT TTGAATCTTC TGCTTTATCT TTAAAAATTT GTATAATTTA
--	--	--	--

			TATATTTTAT TCTATGTGTT CCATAGATAT CTTAATGTAA AATTAGTCAT TTAAATTACA CTGTCAATTA AAAGTAATGG GCAAGAGATT GCATCATACT AATTTAGTAA GAACGTTCCC AAATGTTGTA ACAATGTGGA TCATACATCT CTGGTTTTTT AAATGTATTG AGGCTTTCTT GGTGGACTAG TATAGTATAC GGTCAGTTAT GTCAATGTTT CATGGTCAAT AAAAAGGAAG TTGCAAATTG T (SEQ ID NO: 30)
Khi Cynomolgus	axit amin của TSLP		YDFTNCDFEKIEADYLRTISKDLIT YMSGTKSTDFNNTVSCSNRPHCLT EIQSLTFNPTPRCASLAKEMFARKT KATLALWCPGYSETQINATQAMK KRRKRKVTTNKCLEQVSQLLGLW RRFIRTLKKQ (SEQ ID NO: 31)
Khi Cynomolgus	mARN của TSLP		TACGACTTCACCAACTGCGACTT CGAGAAGATCGAGGCCGACTAC CTGAGAACCATCAGCAAGGACCT GATCACCTACATGAGCGGCACCA AGAGCACCGACTTCAACAACACC GTGTCCTGCAGCAACAGACCCCA CTGCCTGACCGAGATCCAGAGCC TGACCTTCAACCCCAACCCCA TGTGCCAGCCTGGCCAAAGAGAT GTTCGCCAGAAAGACCAAGGCC ACCCTGGCCCTGTGGTGTCCCGG CTACAGCGAGACACAGATCAAC GCCACACAGGCCATGAAGAAGC GGCGGAAGCGGAAAGTGACCAC CAACAAGTGCCTGGAACAGGTGT

			CACAGCTGCTGGGGCTGTGGCGG CGGTTTCATCCGGACCCTGCTGAA GAAGCAG (SEQ ID NO: 32)
Chuột nhắt nhà (Mus musculus)	axit amin của dạng đồng đẳng TSLP 1	NP_067342.1	MVLLRSLFILQVLVRMGLTYNFSN CNFTSITKIYCNIFHDLTGDLKGA KFEQIEDCESKPACLLKIEYYTLNPI PGCPSLPDKTFARRTREALNDHCP GYPETERNDGTQEMAQEVQNICL NQTSQILRLWYSFMQSPE (SEQ ID NO: 33)
Chuột nhắt nhà (Mus musculus)	mARN của dạng đồng đẳng TSLP 1	NM_021367.2	CACGTTCAGG CGACAGCATG GTTCTTCTCA GGAGCCTCTT CATCCTGCAA GTACTAGTAC GGATGGGGCT AACTTACAAC TTTTCTAACT GCAACTTCAC GTCAATTACG AAAATATATT GTAACATAAT TTTTCATGAC CTGACTGGAG ATTTGAAAGG GGCTAAGTTC GAGCAAATCG AGGACTGTGA GAGCAAGCCA GCTTGTCTCC TGAAAATCGA GTACTATACT CTCAATCCTA TCCCTGGCTG CCCTTCACTC CCCGACAAAA CATTTGCCCCG GAGAACAAGA GAAGCCCTCA ATGACCACTG CCCAGGCTAC CCTGAAACTG AGAGAAATGA CGGTACTCAG GAAATGGCAC AAGAAGTCCA AAACATCTGC CTGAATCAAA CCTCACAAAT TCTAAGATTG TGGTATTCCT TCATGCAATC TCCAGAATAA AATTAGCTTT CAGCTTCTGC TATGAAAATC TCTATCTTGG

		TTTTAGTGGA CAGAATACTA AGGGTGTGAC ACTTAGAGGA CCACTGGTGT TTATTCTTTA ATTACAGAAG GGATTCTTAA CTTATTTTTT GGCATATCGC TTTTTTCAGT ATAGGTGCTT TAAATGGGAA ATGAGCAATA GACCGTTAAT GGAAATATCT GTACTGTAA TGACCAGCTT CTGAGAAGTC TTTCTCACCT CCCCTGCACA CACCTTACTC TAGGGCAAAC CTAAGTGTAG TAGGAAGAGA ATTGAAAGTA GAAAAAAAAA ATTAAAACCA ATGACAGCAT CTAAACCCTG TTTAAAAGGC AAGGATTTTT CTACCTGTAA TGATTCTTCT AACATTCCTA TGCTAAGATT TTACCAAAGA AGAAAATGAC AGTTCGGGCA GTCAGTCCA TGATGAGGTG GTCTGAAAGA AGATTGTGGA ATCTGGGAGA AACTGCTGAG ATCATATTGC AAATCCAGCT GTCAAAGGGT TCAGACCCAG GACAGTACAA TTCGTGAGCA GATCTCAAGA GCCTTGCACA TCTACGAGAT ATATATTTAA AGTTGTAGAT AATGAATTTC TAATTTATTT TGTGAGCACT TTTGGAAATA TACATGCTAC TTTGTAATGA ATACATTTCT GAATAAAGTA ATTCTCAAGT TTGAAAAAAA AAA (SEQ ID NO: 34)
--	--	--

Chuột nhắt nhà (Mus musculus)	mARN của dạng đồng đẳng TSLP 2	NR_033206.1	ACTCTTGCCA GGCACCTCCC TCCTGTGGGT TGATTCCGTT TTCCTCTTCT CAACTGACTC TGGATTCTGA TACCAGACAC CTTCCTGGTG TCTTTCCCTC CTATCCCCAT CCCCTTCCCT GTCCCTTTCA TTCAATTTTT AATATCTGGC GGGTTTTTTT TTTTTTTTCT CTCTCTCTGA ACTGTGCCGC TTGTGAGCAG CCAGCTTGTC TCCTGAAAAT CGAGTACTAT ACTCTCAATC CTATCCCTGG CTGCCCTTCA CTCCCCGACA AAACATTTGC CCGGAGAACA AGAGAAGCCC TCAATGACCA CTGCCCAGGC TACCCTGAAA CTGAGAGAAA TGACGGTACT CAGGAAATGG CACAAGAAGT CCAAAACATC TGCCTGAATC AAACCTCACA AATTCTAAGA TTGTGGTATT CCTTCATGCA ATCTCCAGAA TAAAATTAGC TTTCAGCTTC TGCTATGAAA ATCTCTATCT TGGTTTTAGT GGACAGAATA CTAAGGGTGT GACACTTAGA GGACCACTGG TGTTTATTCT TTAATTACAG AAGGGATTCT TAACTTATTT TTTGGCATAT CGCTTTTTTC AGTATAGGTG CTTTAAATGG GAAATGAGCA ATAGACCGTT AATGGAAATA TCTGTACTGT TAATGACCAG CTTCTGAGAA GTCTTTCTCA CCTCCCCTGC ACACACCTTA
-------------------------------	--------------------------------	-------------	---

			CTCTAGGGCA AACCTAACTG TAGTAGGAAG AGAATTGAAA GTAGAAAAAA AAAATTAAAA CCAATGACAG CATCTAAACC CTGTTTAAAA GGCAAGGATT TTTCTACCTG TAATGATTCT TCTAACATTC CTATGCTAAG ATTTTACCAA AGAAGAAAAT GACAGTTCGG GCAGTCACTG CCATGATGAG GTGGTCTGAA AGAAGATTGT GGAATCTGGG AGAAACTGCT GAGATCATAT TGCAAATCCA GCTGTCAAAG GGTTCAGACC CAGGACAGTA CAATTCGTGA GCAGATCTCA AGAGCCTTGC ACATCTACGA GATATATATT TAAAGTTGTA GATAATGAAT TTCTAATTTA TTTTGTGAGC ACTTTTGGAA ATATACATGC TACTTTGTAA TGAATACATT TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTTGAAAA AAAAAA (SEQ ID NO: 35)
Chuột nâu (Rattus norvegicus)	axit amin của TSLP	XP_008770274. 1	MVLFRYLFILQVVRLALTYNFSNC NFEMILRIYHATIFRDLLKDLNGIL FDQIEDCDSRTACLLKIDHHTFNPV PGCPSLPEKAFALKTKAALINYP GY SETERNGTLEMTREIRNICLNQTSQ ILGLWLSCIQS (SEQ ID NO: 36)
Chuột nâu (Rattus norvegicus)	mARN của TSLP	XM_008772052. 1	TCAGGCAACA GCATGGTTCT TTTCAGGTAC CTCTTTATCC TGCAAGTGGT ACGGCTGGCA CTAACTTACA ACTTTTCTAA

			CTGTAAGTTC GAGATGATT TGAGAATATA TCATGCAACA ATTTTTCGTG ACCTGCTTAA AGATTTGAAT GGGATCTTGT TCGACCAAAT CGAGGACTGT GACAGCAGGA CAGCTTGTCT CCTGAAAATC GACCACCATA CCTTCAATCC TGTCCCTGGC TGCCCGTCAC TCCCGAGAA AGCGTTCGCT TTGAAAACGA AAGCGGCCCT CATTAACCTAC TGCCAGGCT ACTCTGAAAC TGAGAGAAAT GGTACTCTGG AAATGACACG AGAAATCAGA AACATCTGCC TGAATCAAAC CTCACAATT CTAGGATTGT GGCTTTCCTG CATTCAATCT TGAAGAAAAA ATTAGCTTTT GGATTATATT ATGAAAATAT ATATCTTGTT TTTAGTAGAT ATAATACTAA GGGTGTGACA CTTAAAAGAA CACTAATGTT TATTCTTTAA TTATAGAAGG GATTCTTAAC TTATTTTGG CATATCGTTG TTTAGTGTAG GCGCTTTAAA TGGAAAATGA GCATTACCCC TTTAATGGAA ATAACCGTGC TGTTAATGAT TGGCTTCGGC TTCTGAGCAG TCTTCTCAC CTCACCTGAG ACACTTACT CTAGGGCAAA CCTAACTGTA GTAGGAAGAA AATCAAAAAGT AGAAAAACAG TTGAAACCAA TGACAGGATC
--	--	--	---

			TATACTCCAT TTAAAAGGCA AGAATTTTGT TACCTGTAAT GATTCTTCTA ACATTCCTAC GCTAAGATTT TACTAAAGAA GAAAATAACA GCAGAGGAAA GTGTTTCAGGC AGTCACTGCC ATGATGAAGC TGTCAGAATC TGAGAGCTAC TGCTGCAACT GATCGTGTAG TAAATCCAGC TGTAAGGGG ATCTTAACCC ACCACAGTGG GATGCACAGG CAGATCCCCA AGGGCATTGT GCAGCTGTGA GATATATATT TAAAGTTGTA TATAATGATT TTCTAATTTA TTCCGTGAGC ACCTTTGAAA ATATACATGT CGCTGTGTAA CAAATACACT TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTC (SEQ ID NO: 37)
--	--	--	---

Dạng đồng đẳng TSLP 1 dài hơn, có liên quan đến sự phát triển bệnh viêm đường hô hấp (Headley *et al.*, 2009, Journal of immunology 182, 1641-1647; Ying *et al.*, 2005, Journal of immunology 174, 8183-8190). Thuật ngữ “TSLP” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ dạng đồng đẳng TSLP 1. Như được sử dụng ở đây, protein TSLP của người cũng bao gồm các protein có độ giống trình tự trên toàn bộ chiều dài của nó ít nhất khoảng 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin có số truy cập ngân hàng gen (GenBank accession number) NP_149024.1. Trình tự axit nucleic của TSLP của người có độ giống trình tự trên toàn bộ chiều dài của nó ít nhất khoảng 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit nucleic có số truy cập ngân hàng gen NM_033035.4. Trình tự của các

protein của TSSLP ở chuột, khỉ, và động vật khác được biết rõ trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, bảng 1).

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ protein, hoặc trình tự polypeptit có nguồn gốc từ phân tử globulin miễn dịch gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Các kháng thể có thể là đa dòng hoặc đơn dòng, nhiều chuỗi hoặc đơn chuỗi, hoặc các globulin miễn dịch nguyên vẹn, và có thể có nguồn gốc từ các nguồn tự nhiên hoặc từ các nguồn tái tổ hợp. “Kháng thể” xuất hiện trong tự nhiên là glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết lẫn nhau bởi các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (ở đây được viết tắt là VH) và vùng cố định chuỗi nặng. Vùng cố định chuỗi nặng này bao gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (ở đây được viết tắt là VL) và vùng cố định chuỗi nhẹ. Vùng cố định chuỗi nhẹ bao gồm một miền, CL. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ tiếp thành vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định bổ sung (CDR), xen kẽ với các vùng được bảo toàn nhiều hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi vùng VH và VL bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền liên kết tương tác với kháng nguyên. Các vùng cố định của các kháng thể có thể làm trung gian gắn kết của globulin miễn dịch với mô hoặc các yếu tố chủ, bao gồm nhiều tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào hiệu ứng) và thành phần đầu tiên (C1q) của hệ thống bổ thể cổ điển. Kháng thể có thể là kháng thể đơn dòng, kháng thể của người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể được làm giống như của lạc đà, hoặc kháng thể thể khảm. Các kháng thể có thể là isotyp bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân lớp.

Các thuật ngữ “mảnh kháng thể”, “mảnh gắn kết kháng nguyên”, “mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng”, “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, và tương tự, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể nguyên vẹn vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên nhất định (ví dụ, TSLP). Chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi mảnh kháng thể nguyên vẹn. Các ví dụ về mảnh gắn kết được bao hàm trong thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể bao gồm mảnh Fab, mảnh đơn hóa trị bao gồm các miền

VL, VH, CL và CH1; mảnh F (ab)₂, mảnh hóa trị hai chứa hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu disulfua ở vùng bản lề; mảnh Fd bao gồm các miền VH và CH1; mảnh Fv bao gồm các miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể; mảnh kháng thể (dAb) đơn miền (Ward *et al.*, 1989 Nature 341:544-546), mảnh này bao gồm miền VH; và vùng quyết định bổ sung được phân lập (CDR). Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh Fv, VL và VH, được mã hóa cho các gen riêng biệt, chúng có thể được nối với nhau, sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng mối liên kết peptit nhân tạo mà cho phép chúng được tạo thành như là chuỗi protein đơn trong đó các vùng VL và VH ghép đôi để tạo thành các phân tử đơn hóa trị (được biết đến như là Fv đơn chuỗi (scFv); xem, ví dụ, Bird *et al.*, 1988 Science 242:423-426; và Huston *et al.*, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Các kháng thể đơn chuỗi này bao gồm một hoặc nhiều “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể. Các mảnh kháng thể này thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và các mảnh được sàng lọc để thỏa dụng theo cách giống như là các kháng thể nguyên vẹn. Phần liên kết kháng nguyên cũng có thể được kết hợp vào các kháng thể đơn miền, các maxibody, các minibody, các intrabody, các diabody, các triabody, các tetrabody, v-NAR và bis-scFv (xem, ví dụ, Hollinger và Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136). Phần liên kết kháng nguyên của các kháng thể có thể được ghép vào các giá đỡ dựa trên các polypeptit chẳng hạn như Fibronectin typ III (Fn3) (xem U.S. Pat. No. 6,703,199, tài liệu này mô tả các monobody polypeptit fibronectin). Phần liên kết kháng nguyên có thể được kết hợp vào các phân tử đơn chuỗi chứa một cặp đoạn Fv nối tiếp nhau (VH-CH1-VH-CH1) mà, cùng với các polypeptit chuỗi nhẹ bổ sung, tạo thành một cặp vùng gắn kết kháng nguyên (Zapata *et al.*, 1995 Protein Eng. 8 (10):1057-1062; và U.S. Pat. No. 5,641,870).

Thuật ngữ “epitop” bao gồm yếu tố quyết định protein bất kỳ có khả năng gắn kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc nếu không thì tương tác với một phân tử. Các yếu tố quyết định epitop nói chung bao gồm các nhóm bề mặt hoạt động hóa học của các phân tử chẳng hạn như các axit amin hoặc carbohydrat hoặc các chuỗi bên của đường và có thể có đặc điểm cấu trúc ba chiều cụ thể, cũng như các đặc điểm điện tích cụ thể. Epitop có thể là “tuyến tính” hoặc “biến đổi về cấu hình”. Các epitop biến đổi cấu hình và tuyến tính được phân biệt ở chỗ sự gắn kết với chất trước mà không phải chất sau bị mất khi có mặt các dung môi biến tính.

Định nghĩa về thuật ngữ “paratop” bắt nguồn từ định nghĩa về “epitop” ở trên bằng cách đảo ngược quan điểm. Vì vậy, thuật ngữ “paratop” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ khu vực hoặc vùng trên kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với nó, nghĩa là, tại đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể tiếp xúc vật lý với kháng nguyên.

Trong bối cảnh cấu trúc tinh thể có nguồn gốc tia X được xác định bởi các tọa độ không gian của phức nằm giữa kháng thể, ví dụ mảnh Fab, và kháng nguyên của nó, thuật ngữ paratop được định nghĩa cụ thể ở đây như là, trừ phi có quy định khác hoặc mâu thuẫn với ngữ cảnh, các gốc kháng thể đặc trưng bởi có nguyên tử nặng (nghĩa là nguyên tử không phải hydro) nằm trong khoảng cách cụ thể, ví dụ trong khoảng cách 4 angstrom, từ nguyên tử nặng trong kháng nguyên đích.

Thuật ngữ “vùng quyết định bổ sung” và “CDR” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các gốc axit amin của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên chịu trách nhiệm gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “kháng thể đơn hóa trị” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ kháng thể mà gắn kết với một epitop trên phân tử đích.

Thuật ngữ “kháng thể hóa trị hai” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ kháng thể mà gắn kết với hai epitop trên ít nhất hai phân tử đích giống nhau. Kháng thể hóa trị hai cũng có thể liên kết chéo các phân tử đích với một phân tử khác. “Kháng thể hóa trị hai” cũng dùng để chỉ kháng thể gắn kết với hai epitop khác nhau trên ít nhất hai phân tử đích giống nhau.

Thuật ngữ “kháng thể đa hóa trị” dùng để chỉ phân tử gắn kết đơn có nhiều hơn một hóa trị, trong đó “hóa trị” được mô tả là số gốc gắn kết kháng nguyên có mặt trên mỗi phân tử của cấu tạo kháng thể. Như vậy, phân tử gắn kết đơn này có thể gắn với nhiều hơn một vị trí gắn kết trên phân tử đích. Các ví dụ về các kháng thể đa hóa trị bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các kháng thể hóa trị hai, các kháng thể hóa trị ba, các kháng thể hóa trị bốn, các kháng thể hóa trị năm, và tương tự, cũng như các kháng thể đặc hiệu kép và các kháng thể hai paratop. Ví dụ, đối với TSLP, kháng thể đa hóa trị chẳng hạn như kháng thể hai paratop TSLP sẽ có gốc gắn kết mà nhận diện lần lượt hai miền khác nhau của TSLP.

Thuật ngữ “kháng thể đa hóa trị” còn dùng để chỉ phân tử gắn kết đơn có nhiều hơn một gốc gắn kết kháng nguyên đối với hai phân tử đích riêng biệt. Ví dụ, kháng thể mà gắn với TSLP và phân tử đích thứ hai không phải là TSLP. Theo một phương án, kháng thể đa hóa trị là kháng thể hóa trị bốn có bốn miền gắn kết epitop. Phân tử hóa trị bốn có thể là đặc hiệu kép và hóa trị hai đối với mỗi vị trí gắn kết trên phân tử đích đó.

Thuật ngữ “kháng thể hai paratop” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ kháng thể mà gắn với hai epitop khác nhau trên một phân tử đích. Thuật ngữ này còn bao gồm kháng thể, mà gắn kết với hai miền của ít nhất hai phân tử đích, ví dụ, kháng thể hai paratop hóa trị bốn.

Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ kháng thể mà gắn với hai hoặc nhiều epitop khác nhau trên ít nhất hai đích khác nhau.

Cụm từ “kháng thể đơn dòng” hoặc “chế phẩm kháng thể đơn dòng” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các polypeptit, bao gồm các kháng thể, các kháng thể đặc hiệu kép, v.v., có trình tự axit amin về cơ bản giống hoặc có nguồn gốc từ nguồn gen giống nhau. Thuật ngữ này còn bao gồm các chế phẩm kháng thể phân tử của chế phẩm đơn phân tử. Chế phẩm kháng thể đơn dòng biểu thị tính đặc hiệu liên kết và ái lực duy nhất đối với epitop cụ thể.

Cụm từ “kháng thể của người”, như được sử dụng ở đây, bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi trong đó cả vùng khung và vùng CDR có nguồn gốc từ các trình tự có nguồn gốc từ người. Ngoài ra, nếu kháng thể này chứa vùng cố định, vùng cố định này cũng có nguồn gốc từ các trình tự như vậy của người, ví dụ, trình tự dòng mầm của người, hoặc các phiên bản đột biến của trình tự dòng mầm của người hoặc kháng thể chứa trình tự khung hoạt động thống nhất có nguồn gốc từ phân tích trình tự khung hoạt động của người, ví dụ, như được mô tả trong Knappik, et al. (2000. *J Mol Biol* 296, 57-86). Các cấu trúc và các vị trí của các miền biến đổi globulin miễn dịch, ví dụ, CDR, có thể được xác định bằng cách sử dụng các sơ đồ đánh số đã được biết rõ, ví dụ, sơ đồ đánh số Kabat, sơ đồ đánh số Chothia, hoặc sự kết hợp của cả Kabat và Chothia (xem, ví dụ, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.; Al Lazikani *et al.*, (1997) *J. Mol. Bio.* 273:927-948); Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of*

Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia *et al.*, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia *et al.*, (1989) Nature 342:877-883; và Al-Lazikani *et al.*, (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948.

Các kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự ở người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến điểm cụ thể *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *in vivo*, hoặc sự thể bảo toàn để thúc đẩy sự ổn định hoặc sản xuất). Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể của người” như được sử dụng ở đây, không nhằm bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của loài động vật có vú khác, chẳng hạn như chuột, được ghép lên trên trình tự khung hoạt động ở người.

Cụm từ “kháng thể của người tái tổ hợp” như được sử dụng ở đây, bao gồm tất cả các kháng thể của người mà được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương tiện tái tổ hợp, chẳng hạn như các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) mà là động vật chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể đối với các gen mã hóa globulin miễn dịch của người hoặc tế bào lai được điều chế từ đó, các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ được chuyển đổi để biểu hiện kháng thể của người, ví dụ, từ tế bào transfectoma, các kháng thể được phân lập từ tái tổ hợp, thư viện kháng thể của người tái tổ hợp, và các kháng thể được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng phương tiện bất kỳ khác liên quan đến việc nối tất cả hoặc một phần gen mã hóa globulin miễn dịch của người, các trình tự với các trình tự ADN khác. Các kháng thể của người tái tổ hợp như vậy có các vùng biến đổi trong đó vùng khung và vùng CDR có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, các kháng thể của người tái tổ hợp này có thể được gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi một động vật biến đổi gen cho trình tự Ig của người được sử dụng, gây đột biến soma *in vivo*) và vì vậy các trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, trong khi bắt nguồn từ và có liên quan đến các trình tự VH và VL ở dòng mầm của người, có thể không tồn tại tự nhiên trong phạm vi dòng mầm kháng thể của người *in vivo*.

Thuật ngữ “vùng Fc” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ polypeptit chứa CH₃, CH₂ và ít nhất một phần của vùng bản lề của miền cố định của kháng thể. Một

cách tùy ý, vùng Fc có thể bao gồm miền CH4, có mặt trong một số lớp kháng thể. Vùng Fc, có thể chứa toàn bộ vùng bản lề của miền cố định của kháng thể. Theo một phương án, sáng chế bao gồm vùng Fc và vùng CH1 của kháng thể. Theo một phương án, sáng chế bao gồm vùng Fc và vùng CH3 của kháng thể. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm vùng Fc, vùng CH1 và vùng Ckappa/lambda từ miền cố định của kháng thể. Theo một phương án, phân tử gắn kết theo sáng chế chứa vùng cố định, ví dụ, vùng cố định chuỗi nặng. Theo một phương án, vùng cố định này được biến đổi so với vùng cố định của kháng thể kiểu dại. Tức là, các polypeptit theo sáng chế được bộc lộ ở đây có thể chứa các thay thế hoặc cải biến đối với một hoặc nhiều trong số ba miền cố định chuỗi nặng (CH1, CH2 hoặc CH3) và/ hoặc đối với miền cố định chuỗi nhẹ (CL). Ví dụ về các cải biến bao gồm thêm, xóa hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều miền. Những thay đổi này còn có thể được bao gồm để tối ưu hóa chức năng hiệu ứng, thời gian bán hủy, v.v.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ái lực” dùng để chỉ cường độ tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên ở các vị trí kháng nguyên đơn. Trong mỗi vị trí kháng nguyên, vùng biến đổi của “nhánh” kháng thể tương tác thông qua lực không phải lực cộng hóa trị yếu với kháng nguyên tại nhiều điểm; tương tác càng nhiều, ái lực càng lớn. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ái lực cao” đối với kháng thể IgG hoặc mảnh của nó (ví dụ, mảnh Fab) dùng để chỉ kháng thể được tạo ra do bất hoạt gen có ái lực 10^{-8}M hoặc thấp hơn, 10^{-9}M hoặc thấp hơn, hoặc 10^{-10}M , hoặc 10^{-11}M hoặc thấp hơn, hoặc 10^{-12}M hoặc thấp hơn, hoặc 10^{-13}M hoặc thấp hơn đối với kháng nguyên đích. Tuy nhiên, liên kết ái lực có thể thay đổi đối với các isotyp kháng thể khác. Ví dụ, liên kết ái lực cao đối với isotyp IgM dùng để chỉ kháng thể được tạo ra do bất hoạt gen có ái lực 10^{-7}M hoặc thấp hơn, hoặc 10^{-8}M hoặc thấp hơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “xét nghiệm ái tính (avidity)” dùng để chỉ phương pháp xác định thông tin về tính ổn định tổng thể hoặc độ bền của phức kháng thể-kháng nguyên. Nó được kiểm soát bởi ba yếu tố chính: kháng thể epitop ái lực; hóa trị của cả kháng nguyên và kháng thể; và sự sắp xếp cấu trúc của các phân tử tương tác. Cuối cùng là những yếu tố này xác định tính đặc hiệu của kháng thể, tức là, khả năng mà kháng thể cụ thể liên kết với epitop kháng nguyên chính xác.

Thuật ngữ “tính đặc hiệu liên kết” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ khả năng của một vị trí kết hợp kháng thể riêng biệt phản ứng với một yếu tố quyết định

kháng nguyên và không phản ứng với yếu tố quyết định kháng nguyên khác. Vị trí kết hợp kháng thể này được đặt trong phần Fab của phân tử và được cấu tạo từ các vùng siêu biến của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Ái lực liên kết của kháng thể là cường độ của phản ứng giữa yếu tố quyết định kháng nguyên đơn lẻ và vị trí kết hợp đơn lẻ trên kháng thể. Nó là tổng lực hút và lực đẩy hoạt động giữa yếu tố quyết định kháng nguyên và vị trí kết hợp kháng thể này.

Thuật ngữ “điều trị” và “sự điều trị” dùng để chỉ cả sự điều trị chữa bệnh và các biện pháp dự phòng hoặc phòng ngừa, trong đó mục đích là để phòng ngừa hoặc làm chậm thay đổi hoặc rối loạn sinh lý không mong muốn. Đối với mục đích này của sáng chế, các kết quả lâm sàng có lợi hoặc được mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, giảm nhẹ các triệu chứng, giảm bớt mức độ của bệnh, làm ổn định (nghĩa là, không làm xấu đi) trạng thái của bệnh, trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc xoa dịu trạng thái bệnh, và thuyên giảm (dù là một phần hay toàn bộ), dù có thể phát hiện hoặc không thể phát hiện. “Sự điều trị” còn có nghĩa là kéo dài sự sống so với sự sống được dự báo nếu không nhận sự điều trị.

Thuật ngữ “đối tượng” dùng để chỉ động vật, người hoặc không phải người, được đề xuất nhận sự điều trị theo các phương pháp của sáng chế. Các ứng dụng cho thú y và không phải thú y cũng được dự tính. Thuật ngữ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật có vú, ví dụ, người, loài linh trưởng khác, lợn, động vật gặm nhấm chẳng hạn như chuột và chuột cống, thỏ, chuột lang, chuột hamster, bò, ngựa, mèo, chó, cừu và dê. Các đối tượng thông thường bao gồm người, động vật nuôi ở nông trại, và thú cưng nuôi trong nhà chẳng hạn như mèo và chó.

“Lượng có hiệu quả” dùng để chỉ lượng đủ để đem lại kết quả có lợi hoặc kết quả mong muốn. Ví dụ, lượng điều trị là lượng mà đạt được hiệu quả điều trị mong muốn. Lượng này có thể giống hoặc khác với lượng có hiệu quả dự phòng, là lượng mà cần để ngăn ngừa sự khởi phát của bệnh hoặc triệu chứng bệnh. Lượng có hiệu quả có thể được dùng theo một hoặc nhiều cách, ứng dụng hoặc liều lượng. “Lượng có hiệu quả điều trị” của hợp chất điều trị (nghĩa là, liều có hiệu quả) phụ thuộc vào hợp chất điều trị được chọn. Chế phẩm có thể được dùng, ví dụ, từ một hoặc nhiều khoảng thời gian/ngày, đến một hoặc nhiều khoảng thời gian/tuần, đến một hoặc nhiều khoảng thời gian/tháng, đến một hoặc nhiều thời gian/năm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng nhiều yếu tố nhất định có thể làm ảnh hưởng đến

liều lượng và thời gian cần thiết để điều trị hiệu quả cho đối tượng, bao gồm nhưng không giới hạn ở, mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn, sự điều trị trước, sức khỏe tổng quát và/ hoặc tuổi của đối tượng, và sự có mặt của các bệnh khác. Hơn nữa, sự điều trị cho đối tượng với lượng có hiệu quả điều trị của các hợp chất điều trị được mô tả ở đây có thể bao gồm sự điều trị duy nhất hoặc một chuỗi điều trị.

Thuật ngữ “axit nucleic” hoặc “polynucleotit” dùng để chỉ các axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc các axit ribonucleic (ARN) và các polyme của chúng ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Trừ phi được giới hạn cụ thể, thuật ngữ này bao hàm các axit nucleic chứa các dạng nucleotit tự nhiên tương tự đã biết mà có tính chất gắn kết tương tự như axit nucleic tham chiếu và được chuyển hóa theo cách tương tự với các nucleotit xuất hiện tự nhiên. Trừ phi có chỉ định khác, trình tự axit nucleic cụ thể còn ngầm bao hàm các biến thể được cải biến bảo toàn của chúng (ví dụ, sự thể codon thoái hóa), các alen, các đồng đẳng (ortholog), các SNP, và các trình tự bổ sung cũng như trình tự được chỉ ra rõ ràng. Cụ thể là, sự thể codon thoái hóa có thể đạt được bằng cách tạo ra các trình tự trong đó vị trí thứ ba của một hoặc nhiều codon được chọn (hoặc tất cả) được thể bằng các gốc bazơ hỗn hợp và/ hoặc deoxyinosin (Batzner *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); và Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

Các thuật ngữ “peptit”, “polypeptit,” và “protein” có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và dùng để chỉ hợp chất bao gồm các gốc axit amin được liên kết đồng hóa trị bởi các liên kết peptit. Protein hoặc peptit phải chứa ít nhất hai axit amin, và không có sự giới hạn về số lượng axit amin tối đa có thể chứa trình tự protein hoặc peptit. Các polypeptit bao gồm peptit hoặc protein bất kỳ chứa hai axit amin hoặc nhiều hơn nối với nhau bằng các liên kết peptit. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ này dùng để chỉ cả các chuỗi ngắn, là các chuỗi cũng được đề cập đến phổ biến trong lĩnh vực này như là các peptit, oligopeptit và oligome, ví dụ, và đến các chuỗi dài hơn, là các chuỗi nói chung được đề cập đến trong lĩnh vực này như là các protein, trong số đó có nhiều loại. “Các polypeptit” bao gồm, ví dụ, các mảnh có hoạt tính sinh học, tương đối đồng nhất với các polypeptit, oligopeptit, homodime, heterodime, biến thể của các polypeptit, các polypeptit được cải biến, các dẫn xuất, các chất tương tự, các protein dung hợp, v.v.. Polypeptit bao gồm peptit tự nhiên, peptit tái tổ hợp, hoặc tổ hợp của chúng.

Thuật ngữ “các cải biến trình tự bảo toàn” dùng để chỉ các cải biến axit amin mà không gây ảnh hưởng đáng kể hoặc làm thay đổi đặc tính gắn kết của kháng thể hoặc mảnh kháng thể chứa trình tự axit amin. Các cải biến bảo toàn này bao gồm sự thế, thêm và xóa axit amin. Các cải biến này có thể được đưa vào kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, chẳng hạn như gây đột biến điểm định hướng và gây đột biến qua trung gian PCR. Sự thế axit amin bảo toàn là sự thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương tự. Các họ axit amin các gốc có chuỗi bên tương tự có thể được xác định trong lĩnh vực này. Các họ này bao gồm các axit amin với các chuỗi bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), các chuỗi bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), các chuỗi bên cực không tích điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein, tryptophan), các chuỗi bên không cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin), các chuỗi bên nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và các chuỗi bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Vì vậy, một hoặc nhiều các gốc axit amin nằm trong phân tử, chẳng hạn như kháng thể hoặc mảnh kháng thể, theo sáng chế có thể được thay thế bằng các gốc axit amin khác từ họ chuỗi bên giống nhau và phân tử được thay đổi có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng các thử nghiệm chức năng được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “tương đồng” hoặc “giống nhau” dùng để chỉ độ giống trình tự của tiểu đơn vị giữa hai phân tử polyme, ví dụ, giữa hai phân tử axit nucleic, chẳng hạn như, hai phân tử ADN hoặc hai phân tử ARN, hoặc giữa hai phân tử polypeptit. Khi vị trí tiểu đơn vị trong cả hai phân tử bị chiếm chỗ bởi cùng một tiểu đơn vị monome; ví dụ, nếu vị trí trong mỗi trong số hai phân tử ADN bị chiếm chỗ bởi adenin, thì chúng tương đồng hoặc giống nhau ở vị trí đó. Sự tương đồng giữa hai trình tự là chức năng trực tiếp của số các vị trí phù hợp hoặc tương đồng; ví dụ, nếu một nửa số vị trí (ví dụ, năm vị trí trong mười tiểu đơn vị polyme về chiều dài) trong hai trình tự là tương đồng, hai trình tự này tương đồng 50%; nếu 90% số vị trí (ví dụ, 9 trong 10), là phù hợp hoặc tương đồng, hai trình tự này tương đồng 90%. Phần trăm “độ giống trình tự” có thể được xác định bằng cách so sánh hai trình tự được sắp xếp thẳng hàng một cách tối ưu trên cửa sổ so sánh, trong đó mảnh của trình tự axit amin trong cửa sổ so sánh có thể bao gồm sự thêm hoặc xóa (ví dụ, khoảng trống hoặc phần nhô ra) so với trình tự tham chiếu (mà không bao gồm sự thêm hoặc xóa) để sắp xếp thẳng hàng tối ưu hai

trình tự. Phần trăm này có thể được tính bằng cách xác định số vị trí tại đó gốc axit amin giống nhau xuất hiện trong cả hai trình tự để tạo ra số vị trí phù hợp, chia số vị trí phù hợp này cho tổng số vị trí trong cửa sổ so sánh, và nhân kết quả với 100 để thu được phần trăm độ giống trình tự. Kết quả đầu ra là độ giống của trình tự của đối tượng đối với trình tự truy vấn.

Thuật ngữ “được phân lập” nghĩa là được thay đổi hoặc loại ra từ trạng thái tự nhiên. Ví dụ, axit nucleic hoặc peptit có mặt tự nhiên trong động vật sống không “được phân lập”, nhưng axit nucleic hoặc peptit giống nhau được tách riêng một phần hoặc hoàn toàn từ các vật liệu cùng tồn tại trong trạng thái tự nhiên “được phân lập”. Axit nucleic hoặc protein được phân lập có thể tồn tại ở dạng về cơ bản tinh khiết, hoặc có thể tồn tại trong môi trường không tự nhiên chẳng hạn như, ví dụ, tế bào chủ. Kháng thể được phân lập về cơ bản là không có các kháng thể khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể được phân lập gắn kết đặc hiệu với TSLP về cơ bản không chứa các kháng thể gắn kết đặc hiệu kháng nguyên ngoài TSLP). Kháng thể được phân lập gắn kết đặc hiệu với phân tử đích, tuy nhiên, có thể có khả năng phản ứng chéo với các kháng nguyên giống nhau từ các loài khác, ví dụ, kháng thể được phân lập gắn kết đặc hiệu với TSLP của người có thể gắn kết các phân tử TSLP từ các loài khác. Hơn nữa, kháng thể được phân lập về cơ bản có thể không có vật liệu và/ hoặc hóa chất ngoại bào.

Theo một số phương án, chế phẩm bột khô theo sáng chế chứa các hạt gồm hai phần lõi-vỏ chứa: tá dược tạo vỏ, và phần lõi chứa API, tá dược tạo trạng thái thủy tinh, và đệm, đôi khi còn được đề cập đến ở đây như là chế phẩm nền, hoặc chế phẩm nền lõi vỏ.

Thuật ngữ “thành phần hoạt tính”, “thành phần có hoạt tính điều trị”, “hoạt chất”, “dược chất” hoặc “chất dược chất” như được sử dụng ở đây nghĩa là thành phần hoạt tính của dược phẩm, cũng được biết đến như là thành phần dược có hoạt tính (Active Pharmaceutical Ingredient - API).

Thuật ngữ “đường kính trung bình khối lượng” hoặc “MMD” hoặc “x50” như được sử dụng ở đây nghĩa là đường kính trung bình của rất nhiều hạt, thường trong quần thể hạt đa phân tán, nghĩa là, bao gồm một loạt các kích thước hạt. Các giá trị MMD như được thông báo ở đây được xác định bằng cách nhiễu xạ laze (Sympatec

Helos, Clausthal-Zellerfeld, Germany), trừ phi ngữ cảnh chỉ định khác. Ngược lại, d_g là đường kính hình học của hạt đơn.

Thuật ngữ “tỷ trọng riêng từng hạt (tapped densities)” hoặc ρ_{tapped} , như được sử dụng ở đây dùng để chỉ tỷ trọng hạt được đo theo phương pháp I, như được mô tả, ví dụ ở www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/m99375-bulk_density_and_tapped_density_of_powders.pdf. Tỷ trọng riêng từng hạt (tapped densities) là giá trị xấp xỉ gần nhất của tỷ trọng hạt, với các giá trị được đo là thấp hơn xấp xỉ 20% so với tỷ trọng hạt thực thể.

Thuật ngữ “xù xì” như được sử dụng ở đây nghĩa là có nhiều nếp nhăn hoặc nếp gấp, nghĩa là, bị gợn hoặc nhăn.

Thuật ngữ “độ xù xì” như được sử dụng ở đây là thước đo để đánh giá độ thô bề mặt của hạt kỹ thuật. Đối với mục đích này của sáng chế, độ xù xì được tính từ diện tích bề mặt cụ thể thu được từ các phép đo BET, tỷ trọng đúng thu được từ phép đo tỷ trọng heli, và tỷ số bề mặt so với thể tích thu được bằng phép đo nhiễu xạ laze (Sympatec), tức là:

$$Rugosity = (SSA \cdot \rho_{\text{true}}) / S_v$$

(Rugosity: độ xù xì)

trong đó $S_v = 6/D_{32}$, trong đó D_{32} là đường kính trung bình dựa trên diện tích bề mặt đơn vị. Sự gia tăng độ thô bề mặt được dự tính sẽ làm giảm lực kết dính liên hạt, và cải thiện việc nhắm mục tiêu của khí dung tới phổi. Việc nhắm mục tiêu tới phổi được cải thiện được dự báo là làm giảm sự biến động giữa các bệnh nhân, và mức độ thuốc trong tuần hoàn họng miệng và toàn thân. Theo một hoặc nhiều phương án, độ xù xì S_v là từ 3 đến 20, ví dụ, từ 5 đến 10.

Thuật ngữ “đường kính khí động học trung bình của các hạt sơ cấp” hoặc D_a như được sử dụng ở đây được tính từ kích thước hình học cơ bản của các hạt được xác định thông qua nhiễu xạ laze (x50), và tỷ trọng riêng từng hạt của chúng, tức là: $D_a = x50 (\rho_{\text{tapped}})^{1/2}$.

Thuật ngữ “liều phân phối (delivered dose)” hoặc “DD” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chỉ số phân phối bột khô từ thiết bị xông hít sau sự kiện kích thích hoặc phân phối từ đơn vị bột. DD được định nghĩa như là tỷ số giữa liều được vận

chuyển bằng thiết bị xông hít với liều danh nghĩa hoặc liều được đo. DD là thông số được xác định trong thí nghiệm, và có thể được xác định bằng cách sử dụng thiết bị *in vitro* mà được thiết lập bắt buộc việc định liều cho bệnh nhân.

Thuật ngữ “đường kính khí động học trung bình khối lượng” hoặc “MMAD” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ kích thước khí động học trung bình của rất nhiều hạt, thông thường là trong quần thể đa phân tán. “Đường kính khí động học” là đường kính của hình cầu có tỷ trọng đơn vị có vận tốc lắng, nói chung là trong không khí, giống như bột và do đó là cách hữu ích để xác định đặc điểm bột khí dung hoặc hạt phân tán khác hoặc chế phẩm hạt xét về chế độ lắng của nó. Sự phân phối kích thước hạt khí động (Aerodynamic Particle Size Distributions - APSD) và MMAD được xác định ở đây bằng kỹ thuật vòi phun nổi tầng, sử dụng NEXT GENERATION IMPACTOR™. Nói chung, nếu các hạt quá lớn về mặt khí động học, thì sẽ ít hạt hơn chạm đến phần phổi sâu. Nếu các hạt quá nhỏ, một tỷ lệ lớn hơn các hạt có thể bị thở ra. Ngược lại, d_a là đường kính khí động học đối với hạt đơn.

Thuật ngữ “liều tổng cộng cho phổi” (TLD) như được sử dụng ở đây dùng để chỉ phần trăm thành phần hoạt tính không được lắng trong mô hình miệng-cổ họng Alberta lý tưởng sau khi xông hít bột từ máy xông hít bột khô ở độ giảm áp suất 4kPa. Dữ liệu có thể được biểu hiện ở dạng phần trăm liều danh nghĩa hoặc liều phân phối. AIT là phiên bản lý tưởng của đường hô hấp trên đối với đối tượng là người trung tuổi. Trừ phi có quy định khác, TLD được đo trong mô hình cổ họng lý tưởng Alberta. Thông tin trên AIT và mô tả chi tiết thiết lập thử nghiệm có thể tìm thấy tại trang: www.copleyscientific.com.

Thuật ngữ “thông số quán tính” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ thông số mà xác định đặc điểm va chạm theo quán tính trong đường hô hấp trên. Thông số này có nguồn gốc từ định luật Stoke và bằng $d_a^2 Q$, trong đó d_a là đường kính khí động học, và Q là lưu lượng thể tích.

Thuật ngữ “hàm lượng chất rắn” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ nồng độ của thành phần hoạt tính và tá dược được hòa tan hoặc phân tán trong dung dịch lỏng hoặc dịch phân tán được sấy khô bằng cách phun.

Thuật ngữ “ALR” như được sử dụng ở đây là thông số quá trình xác định tỉ lệ không khí so với chất lỏng trong máy phun. Các giá trị ALR nhỏ hơn thường tạo ra các giọt phun sương lớn hơn.

Thuật ngữ “tỷ trọng quần thể hạt”(PPD) như được sử dụng ở đây là số không thứ nguyên được tính là tích số của hàm lượng chất rắn và lưu lượng chất lỏng máy phun chia cho tổng lưu lượng khí máy sấy. PPD được nhận thấy là tương quan với kích thước hình học hạt sơ cấp.

Các phân tử gắn kết TSLP

Được đề xuất ở đây là các phân tử, ví dụ, các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể, bao gồm các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, và dAb, scFv, các kháng thể đơn miền, các maxibody, minibody, intrabody, diabody, triabody, tetrabody, v-NAR, và bis-SCFv, mà gắn kết đặc hiệu TSLP và ức chế hoạt tính TSLP. Những phân tử này hữu ích để điều trị các tình trạng viêm liên quan đến TSLP, bao gồm bệnh hen suyễn và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính. Do TSLP là xytokin nút quan trọng ngược dòng các xytokin hiệu ứng Th2, sự ức chế TSLP đồng thời có thể ngăn chặn nhiều xytokin hiệu ứng Th2 xuôi dòng (ví dụ, IL-4, IL-5, IL-13) và còn có thể tác động lên các con đường qua trung gian không phải Th2 (ví dụ, IL-17, IFN- γ). .

Các kháng thể TSLP và các mảnh kháng thể gắn kết TSLP

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các kháng thể và các mảnh kháng thể gắn kết đặc hiệu với TSLP của người. Các kháng thể TSLP và các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể đơn dòng của người và được làm giống như của người và các mảnh kháng thể được tạo ra được mô tả ở đây, bao gồm trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với TSLP của người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 100pM, ví dụ, K_D nhỏ hơn 90pM, nhỏ hơn 80pM, nhỏ hơn 70pM, nhỏ hơn 60pM, nhỏ hơn 50pM, nhỏ hơn 40pM, nhỏ hơn 30pM, nhỏ hơn 20pM, nhỏ hơn 10pM. Theo một số phương án, các kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được đề xuất ở đây gắn kết với TSLP của người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 10pM.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP được đề xuất ở đây bao gồm chuỗi nặng CDR1, chuỗi nặng CDR2, chuỗi nặng CDR3, và chuỗi nhẹ CDR1, chuỗi

nhẹ CDR2, và chuỗi nhẹ CDR3. Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP được đề xuất ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2, và CDR3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2, và CDR3. Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này được đề xuất ở đây bao gồm trình tự chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và trình tự chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, phân tử này là Fab gắn kết TSLP.

Bảng 2 liệt kê các trình tự của các kháng thể và Fab gắn kết TSLP mẫu, tất cả đều gắn kết với TSLP của người với ái lực cao. Ví dụ, Fab1 kháng TSLP gắn kết với TSLP của người tái tổ hợp với hằng số phân ly (K_D) 6pM. Theo một số phương án, Fab1 kháng TSLP gắn kết với protein TSSLP của người và của khỉ cynomolgus với các giá trị K_D lần lượt là $5,0 \pm 2,0$ pM và $1,4 \pm 0,6$ pM.

Bảng 2. Trình tự axit amin của Fab và các kháng thể kháng TSLP

mAb1 TSLP	kháng	
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (kết hợp)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (kết hợp)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (kết hợp)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YWMHWVRQAPGKGLEWVGHKSKTDAGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCAREIYYAFDSWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 8	ADN VH	GAGGTTTCAGCTGGTGGAAATCAGGCGGCGG ACTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTTAGACT

		TAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAG CGACTACTGGATGCACTGGGTAGACAGG CCCCTGGTAAAGGCTTGGAGTGGGTCGGA CACATTAAGTCTAAGACCGACGCCGGCACT ACCGACTACGCCGCTCCCGTTAAGGGCCGG TTCACTATCTCTAGGGACGACTCTAAGAAC ACCCTCTACCTTCAAATGAATAGCCTTAAG ACCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCT AGAGAAATCTACTACTACGCCTTCGATAGC TGGGGTCAAGGCACCCTCGTGACCGTGTCT AGC
SEQ ID NO: 9	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YWMHWVRQAPGKGLEWVGHISKTDAGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCAREIYYAFDSWGQGLTVTVSSA STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 10	ADN chuỗi nặng	GAGGTTCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGG ACTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTTAGACT TAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAG CGACTACTGGATGCACTGGGTAGACAGG CCCCTGGTAAAGGCTTGGAGTGGGTCGGA CACATTAAGTCTAAGACCGACGCCGGCACT ACCGACTACGCCGCTCCCGTTAAGGGCCGG TTCACTATCTCTAGGGACGACTCTAAGAAC

		ACCCTCTACCTTCAAATGAATAGCCTTAAG ACCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCT AGAGAAATCTACTACTACGCCTTCGATAGC TGGGGTCAAGGCACCCTCGTGACCGTGTCT AGCGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTT CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCC GGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTG AAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTG TCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT GACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTG GGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCACCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG ACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGT CTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGA AAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCC CCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTC TACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACA AGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAA
--	--	---

		CGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCT GAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (kết hợp)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (kết hợp)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (kết hợp)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYV HWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGIPERFSG SNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQAADWV DFYVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 18	ADN VL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGCGTT AGCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCTAGAAT CACCTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAA ATACGTTCCTGTTATCAGCAGAAGCCCGG TCAAGCCCCCGTGCTCGTGATCTACGGCGA TAACGAGCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGC GGTTTAGCGGCTCTAATAGCGGTAACACCG CTACCCTGACTATCTCTAGGGCTCAGGCCG GCGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGGCC GCCGACTGGGTGGACTTCTACGTGTTCCGGC GGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 19	Chuỗi nhẹ	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYV HWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGIPERFSG SNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQAADWV DFYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE

		LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 20	ADN chuỗi nhẹ	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGCGTT AGCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCTAGAAT CACCTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAA ATACGTTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGG TCAAGCCCCCGTGCTCGTGATCTACGGCGA TAACGAGCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGC GGTTTAGCGGCTCTAATAGCGGTAACACCG CTACCCTGACTATCTCTAGGGCTCAGGCCG GCGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGGCC GCCGACTGGGTGGACTTCTACGTGTTCCGGC GGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTCA ACCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTT CCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCA ACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCG ACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCT GGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCC GGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCA GAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCT ACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG AGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGAC CCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGACCG TGGCCCCAACCGAGTGCAGC
Fab1 kháng TSLP		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (kết hợp)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (kết hợp)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (kết hợp)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS

SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YWMHWVRQAPGKGLEWVGHISKTDAGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCAREIYYAFDSWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 21	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGCGGCGG ACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACT GAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAG CGACTACTGGATGCACTGGGTCAGACAGG CCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTCGGA CACATTAAGTCTAAGACCGACGCCGGCACT ACCGACTACGCCGCTCCTGTGAAGGGCCG GTTCACTATCTCTAGGGACGACTCTAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAA AACCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGC TAGAGAGATCTACTACTACGCCTTCGATAG CTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 22	Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YWMHWVRQAPGKGLEWVGHISKTDAGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCAREIYYAFDSWGQGTLLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSC
SEQ ID NO: 23	ADN chuỗi nặng	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGCGGCGG ACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACT GAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAG CGACTACTGGATGCACTGGGTCAGACAGG CCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTCGGA

		CACATTAAGTCTAAGACCGACGCCGGCACT ACCGACTACGCCGCTCCTGTGAAGGGCCG GTTCACTATCTCTAGGGACGACTCTAAGAA CACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAA AACCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGC TAGAGAGATCTACTACTACGCCTTCGATAG CTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTC TAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCCGTGTT CCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTC TGGCGGCACCGCTGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGT GTCCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGG CGTGACACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTC CTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGT GACAGTGCCTTCCTCCAGCCTGGGCACCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCC TTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGG AGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (kết hợp)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (kết hợp)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (kết hợp)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYV HWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGIPERFSG SNSGNTATLTISRAGDEADYYCQAADWV DFYVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 24	ADN VL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTC AGCGTGGCCCTGGGTCAGACCGCTAGAAT CACCTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAA ATACGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GTCAGGCCCCCGTGCTGGTGATCTACGGCG ATAACGAGCGGCCTAGCGGAATCCCCGAG CGGTTTAGCGGCTCTAATAGCGGTAACACC GCTACCCTGACTATCTCTAGGGCTCAGGCC GGCGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGGC CGCCGACTGGGTGGACTTCTACGTGTTCGG CGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 25	Chuỗi nhẹ	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYV HWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGIPERFSG SNSGNTATLTISRAGDEADYYCQAADWV DFYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 26	ADN chuỗi nhẹ	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTC AGCGTGGCCCTGGGTCAGACCGCTAGAAT CACCTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAA ATACGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GTCAGGCCCCCGTGCTGGTGATCTACGGCG ATAACGAGCGGCCTAGCGGAATCCCCGAG CGGTTTAGCGGCTCTAATAGCGGTAACACC GCTACCCTGACTATCTCTAGGGCTCAGGCC GGCGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGGC CGCCGACTGGGTGGACTTCTACGTGTTCGG CGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTC AGCCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGT TCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCC AACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGC GACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCC TGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGC

		CGGCGTGGAGACCACCACCCCAAGC AGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGC TACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGTGGAA GAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGA CCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACC GTGGCCCCAACCGAGTGCAGC
--	--	---

Theo một số phương án, các kháng thể bao gồm CDR của VH có trình tự axit amin là bất kỳ trong số các trình tự CDR của VH được liệt kê trong bảng 2. Cụ thể, sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein TSLP, các kháng thể nêu trên chứa (hay nói cách khác, bao gồm) một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu vùng CDR của VH có trình tự axit amin là bất kỳ trong số các trình tự CDR của VH được liệt kê trong bảng 2. Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein TSLP, các kháng thể đã nêu chứa CDR của VL có trình tự axit amin là bất kỳ trong số các trình tự CDR của VL được liệt kê trong bảng 2. Cụ thể, sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein TSLP, các kháng thể đã nêu (hay nói cách khác, bao gồm) một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu vùng CDR của VL có trình tự axit amin là bất kỳ trong số các trình tự CDR của VL được liệt kê trong bảng 2.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng (hay nói cách khác, bao gồm) trình tự axit amin của VH được liệt kê trong bảng 2, trong đó không nhiều hơn khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 axit amin trong trình tự khung hoạt động (ví dụ, trình tự mà không phải là của CDR) bị đột biến (trong đó một đột biến là, như là nhiều ví dụ không hạn chế, thêm, thế hoặc xóa).

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết đặc hiệu với TSLP, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng chứa (hay nói cách khác, bao gồm) trình tự axit amin của VL được liệt kê trong bảng 2, trong đó không nhiều hơn khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 axit amin trong trình tự khung hoạt động (ví dụ, trình tự mà không phải là CDR) bị đột biến (một đột biến là, như là nhiều ví dụ không hạn chế, thêm, thế hoặc xóa).

Các kháng thể khác và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế

bao gồm các axit amin mà bị đột biến, còn có độ giống ít nhất 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 hoặc 99 phần trăm trong các vùng CDR với các vùng CDR được miêu tả trong các trình tự được mô tả trong bảng 2 và có khả năng gắn kết với TSLP. Theo một khía cạnh, các kháng thể khác và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin đột biến trong đó không nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin bị đột biến trong các vùng CDR khi so sánh với các vùng CDR được miêu tả trong các trình tự được mô tả trong bảng 2.

Sáng chế cũng đề xuất các trình tự axit nucleic mã hóa VH, VL, chuỗi nặng chiều dài đầy đủ, và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ của các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết đặc hiệu với protein TSLP. Các trình tự axit nucleic này có thể được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào động vật có vú.

Các kháng thể TSLP khác và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm các kháng thể và mảnh trong đó các axit amin hoặc các axit nucleic mã hóa các axit amin này bị đột biến, còn có độ giống ít nhất 60, 70, 80, 90 hoặc 95 phần trăm với các trình tự được mô tả trong bảng 2. Theo một phương án, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm các trình tự axit amin đột biến trong đó không nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin bị đột biến trong các vùng biến đổi khi so sánh với các vùng biến đổi được miêu tả trong trình tự được mô tả trong bảng 2, trong khi giữ lại hoạt tính điều trị giống về cơ bản.

Do mỗi trong số các kháng thể được bộc lộ ở đây có thể gắn kết với TSLP, VH, VL, các trình tự chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ, và các trình tự chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ (các trình tự axit amin và các trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin) có thể được “trộn lẫn và kết hợp” để tạo ra các kháng thể gắn kết TSLP khác và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Các kháng thể gắn kết TSLP “trộn lẫn và kết hợp” này có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng các thử nghiệm gắn kết đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, ELISA, và các thử nghiệm khác được mô tả trong phần ví dụ). Khi những chuỗi này được trộn lẫn và kết hợp, trình tự VH từ một cặp VH/VL cụ thể phải được thay thế bằng trình tự VH tương tự về cấu trúc. Tương tự, trình tự chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ từ cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ/chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ cụ thể phải được thay thế bằng trình tự chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ tương tự về cấu trúc. Cũng như vậy, trình tự VL từ một cặp VH/VL cụ thể phải được thay thế bằng trình tự VL tương tự về cấu trúc. Tương tự, trình tự chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ

đủ từ cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ/chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ cụ thể phải được thay thế bằng trình tự chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ tương tự về cấu trúc.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết TSLP bao gồm các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được mô tả trong bảng 2, hoặc các tổ hợp của chúng. Các vùng CDR được mô tả bằng cách sử dụng hệ thống Kabat (Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), hoặc sử dụng hệ thống Chothia (Chothia et al. 1987 J. Mol. Biol. 196: 901-917; và Al-Lazikani et al. 1997 J. Mol. Biol. 273: 927-948). Các phương pháp khác để mô tả các vùng CDR có thể được sử dụng thay thế. Ví dụ, các định nghĩa về CDR của cả Kabat và Chothia có thể được kết hợp.

Khi xem xét rằng mỗi trong số các kháng thể này có thể gắn kết với TSLP và tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên được tạo ra chủ yếu bởi các vùng CDR1, 2 và 3, các trình tự CDR1, 2 và 3 của VH và các trình tự CDR1, 2 và 3 của VL có thể được “trộn lẫn và kết hợp” (nghĩa là, các CDR từ các kháng thể khác nhau có thể được trộn lẫn và kết hợp, mặc dù mỗi kháng thể phải chứa các vùng CDR1, 2 và 3 của VH và CDR1, 2 và 3 của VL để tạo ra các phân tử gắn kết TSLP theo sáng chế. Các kháng thể gắn kết TSLP “trộn lẫn và kết hợp” này có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng các thử nghiệm gắn kết đã biết trong lĩnh vực này và các thử nghiệm đã được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế (ví dụ, ELISA). Khi các trình tự CDR của VH được trộn lẫn và kết hợp, các trình tự CDR1, CDR2 và/ hoặc CDR3 từ trình tự VH cụ thể phải được thay thế bằng (các) trình tự CDR tương tự về cấu trúc. Cũng như vậy, khi các trình tự CDR của VL được trộn lẫn và kết hợp, trình tự CDR1, CDR2 và/ hoặc CDR3 từ trình tự VL cụ thể phải được thay thế bằng (các) trình tự CDR tương tự về cấu trúc. Sẽ là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là các trình tự VH và VL mới có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến một hoặc nhiều trình tự vùng CDR của VH và/ hoặc VL có các trình tự tương tự về cấu trúc từ các trình tự CDR được chỉ ra ở đây đối với các kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Theo đó, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 (HCDR1) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ được nêu trong SEQ ID NO: 1, 4, hoặc 5; vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 (HCDR2) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình

tự bất kỳ được nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc 6; vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 (HCDR3) chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3; vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 (LCDR1) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ được nêu trong SEQ ID NO: 11 hoặc 14; vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 (LCDR2) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ được nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc 15; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 (LCDR3) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ được nêu trong SEQ ID NO: 13 hoặc 16; trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể gắn kết đặc hiệu với TSLP.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể gắn kết đặc hiệu với TSLP là kháng thể hoặc mảnh kháng thể được mô tả trong bảng 2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với TSLP của người và chứa các trình tự HCDR1, HCDR2, và HCDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 4, 2, và 3, tương ứng, và các trình tự LCDR1, LCDR2, và LCDR3 được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 11, 12, và 13.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết TSLP của người và chứa các trình tự HCDR1, HCDR2, và HCDR3 nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 5, 6, và 3 và các trình tự LCDR1, LCDR2, và LCDR3 nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 14, 15, và 16.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với TSLP của người và chứa các trình tự HCDR1, HCDR2, và HCDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, và 3, tương ứng, và các trình tự LCDR1, LCDR2, và LCDR3 được nêu lần lượt trong SEQ ID NO: 11, 12, và 13.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với TSLP của người và chứa VH chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7, và VL chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với TSLP của người và chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22, và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với TSLP của người và chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19.

Như được sử dụng ở đây, kháng thể của người chứa các vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ mà là “sản phẩm của” hoặc “có nguồn gốc từ” trình tự dòng mầm cụ thể nếu các vùng biến đổi hoặc các chuỗi chiều dài đầy đủ của kháng thể thu được từ hệ thống mà sử dụng các gen mã hóa globulin miễn dịch dòng mầm của người. Các hệ thống này bao gồm gây miễn dịch chuột chuyển gen mang gen mã hóa globulin miễn dịch của người bằng kháng nguyên quan tâm hoặc sàng lọc thư viện gen mã hóa globulin miễn dịch của người được hiển thị trên thể thực khuẩn bằng kháng nguyên quan tâm. Kháng thể của người mà là “sản phẩm của” hoặc “có nguồn gốc từ” trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người có thể được xác định như vậy bằng cách so sánh trình tự axit amin của kháng thể của người với trình tự axit amin của globulin miễn dịch dòng mầm của người và chọn lọc trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người mà giống nhất về trình tự (nghĩa là, % độ giống lớn nhất) với trình tự của kháng thể của người. Kháng thể của người mà là “sản phẩm của” hoặc “có nguồn gốc từ” trình tự globulin miễn dịch dòng mầm cụ thể của người có thể chứa sự khác biệt axit amin so với trình tự dòng mầm này, bởi vì, ví dụ, đột biến soma tự nhiên hoặc sự đưa vào có chủ ý của đột biến điểm định hướng. Tuy nhiên, trong các vùng khung VH hoặc VL, kháng thể của người được chọn lọc thường giống ít nhất 90% về trình tự axit amin với trình tự axit amin được mã hóa bằng gen mã hóa globulin miễn dịch dòng mầm của người và chứa các gốc axit amin mà xác định kháng thể của người là kháng thể của người khi so với các trình tự axit amin globulin miễn dịch dòng mầm của loài khác (ví dụ, trình tự dòng mầm của chuột). Trong các trường hợp nhất định, kháng thể của người có thể giống ít nhất 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc ít nhất 95%, hoặc thậm chí ít nhất 96%, 97%, 98%, hoặc 99% về trình tự axit amin với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen mã hóa globulin miễn dịch dòng mầm. Thông thường, kháng thể của người tái tổ hợp sẽ biểu thị không nhiều hơn 10 axit amin khác với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen mã hóa globulin miễn dịch dòng mầm của người trong các vùng khung VH hoặc VL. Trong các trường hợp nhất định, kháng thể của người có thể biểu thị không nhiều hơn

5, hoặc thậm chí không nhiều hơn 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen mã hóa globulin miễn dịch dòng mầm.

Các kháng thể tương đồng

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự axit amin tương đồng với các trình tự được mô tả trong bảng 2, và kháng thể đã nêu gắn kết với TSLP, và vẫn giữ được các tính chất chức năng mong muốn của các kháng thể được mô tả trong bảng 2.

Ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH chứa trình tự axit amin giống ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 7; VL chứa trình tự axit amin giống ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 17; kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein TSLP và ức chế TSLP.

Theo một phương án, các trình tự axit amin VH và/ hoặc VL có thể giống 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự được nêu ra trong bảng 2. Theo một phương án, các trình tự axit amin VH và/ hoặc VL có thể giống hệt nhau ngoại trừ sự thay thế axit amin trong không nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 vị trí axit amin. Kháng thể có các vùng VH và VL có độ giống cao (nghĩa là, 80% hoặc hơn) với các vùng VH và VL của kháng thể được mô tả trong bảng 2 có thể thu được bằng cách gây đột biến (ví dụ, gây đột biến định hướng điểm hoặc gây đột biến qua trung gian PCR) các phân tử axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 8 hoặc 21, hoặc SEQ ID NO: 18 hoặc 24, tương ứng, sau đó bằng cách kiểm tra kháng thể bị biến đổi đã được mã hóa về chức năng được giữ lại bằng cách sử dụng các thử nghiệm được mô tả ở đây.

Theo một phương án, các trình tự axit amin chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và/ hoặc chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ có thể giống 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự được nêu ra trong bảng 2. Kháng thể có chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ có độ giống cao (nghĩa là, 80% hoặc lớn hơn) với chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ nêu trong SEQ ID NO: 9; và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ nêu trong SEQ ID NO: 19, có thể thu được bằng cách gây đột biến (ví dụ, gây đột biến định hướng điểm hoặc gây đột biến qua trung gian PCR) các phân tử axit nucleic mã hóa các polypeptit này một cách tương

ứng, sau đó bằng cách kiểm tra kháng thể bị thay đổi được mã hóa này về chức năng vẫn được giữ lại bằng cách sử dụng các thử nghiệm chức năng được mô tả ở đây.

Theo một phương án, trình tự nucleotit của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và/ hoặc chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ có thể giống 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự được nêu ra trong bảng 2.

Theo một phương án, các trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng và/ hoặc chuỗi nhẹ có thể giống 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự được nêu ra trong bảng 2.

Như được sử dụng ở đây, phần trăm độ giống giữa hai trình tự là chức năng của số vị trí giống nhau mà các trình tự có chung (nghĩa là, % độ giống bằng với số vị trí giống nhau/tổng số vị trí X 100), có tính đến số khoảng trống, và độ dài mỗi khoảng trống, cần được đưa vào để sắp xếp thẳng hàng tối ưu hai trình tự. Việc so sánh các trình tự và xác định phần trăm độ giống giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán, như được mô tả trong phần ví dụ không giới hạn dưới đây.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, trình tự protein theo sáng chế còn có thể được sử dụng làm “trình tự truy vấn” để thực hiện nghiên cứu so với các dữ liệu công khai để, ví dụ, xác định các trình tự có liên quan. Ví dụ, các nghiên cứu này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLAST (phiên bản 2.0) của Altschul, *et al.*, 1990 J. Mol. Biol. 215:403-10.

Các kháng thể chứa các cải biến bảo toàn

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3, trong đó một hoặc nhiều trong số các trình tự CDR này có thể xác định các trình tự axit amin dựa trên các kháng thể được mô tả ở đây hoặc các cải biến bảo toàn của chúng, và trong đó các kháng thể giữ được các tính chất chức năng mong muốn của các kháng thể gắn kết TSLP và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Theo đó, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3, trong đó: vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1, 4, hoặc 5, hoặc các biến thể bảo toàn của chúng; vùng biến đổi chuỗi nặng

CDR2 chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc 6, hoặc các biến thể bảo toàn của chúng; vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, hoặc các biến thể bảo toàn của chúng; vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 11 hoặc 14, hoặc các biến thể bảo toàn của chúng; vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc 15, hoặc các biến thể bảo toàn của chúng; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 13 hoặc 16, hoặc các biến thể bảo toàn của chúng; kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với TSLP và ức chế TSLP.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ xác định các trình tự axit amin dựa trên các kháng thể được mô tả ở đây hoặc các cải biến bảo toàn của chúng, và trong đó các kháng thể này giữ được các tính chất chức năng mong muốn của các kháng thể gắn kết TSLP và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Theo đó, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó: vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7, hoặc các biến thể bảo toàn của chúng; vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17, hoặc các biến thể bảo toàn của chúng; kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với TSLP và ức chế TSLP.

Các kháng thể gắn kết với cùng một epitop

Sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết với cùng một epitop giống như các kháng thể gắn kết TSLP hoặc các mảnh kháng thể được liệt kê trong bảng 2. Các kháng thể bổ sung do đó có thể được xác định dựa trên khả năng cạnh tranh chéo của chúng (ví dụ, để ức chế theo cách cạnh tranh sự gắn kết, theo cách quan trọng theo thống kê) với các kháng thể khác và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế trong các thử nghiệm gắn kết TSLP. Khả năng của kháng thể kiểm tra trong việc ức chế sự gắn kết của các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế đối với protein TSLP chứng minh rằng kháng thể kiểm tra này có thể cạnh tranh với kháng thể theo sáng chế trong sự gắn kết với TSLP; kháng thể này có thể, theo thuyết không hạn chế, gắn kết với cùng một epitop hoặc epitop có liên quan (ví

dự, tương tự về cấu trúc hoặc rất gần về không gian) trên TSLP như là kháng thể mà nó cạnh tranh với. Theo một số phương án, kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop trên TSLP như là các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng được bộc lộ ở đây là kháng thể đơn dòng ở người. Các kháng thể đơn dòng ở người này có thể được điều chế và được phân lập như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop trên TSLP như là các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế là kháng thể đơn dòng ở chuột. Theo các phương án nhất định, kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop trên TSLP như là các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng được bộc lộ ở đây, là kháng thể đơn dòng được làm giống như của người có nguồn gốc từ các kháng thể đơn dòng của chuột. Theo phương án nhất định, kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop trên TSLP như là các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng được bộc lộ ở đây là kháng thể đơn dòng được làm giống như của người. Các kháng thể đơn dòng được làm giống như của người này có thể được điều chế và được phân lập như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa một hoặc nhiều trong số các gốc sau: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, Gln145, và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất mười, ít nhất mười một, ít nhất mười hai, ít nhất mười ba, ít nhất mười bốn, ít nhất mười lăm, hoặc tất cả các gốc sau đây: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, Gln145, và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, hoặc tất cả các gốc sau đây: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, và Thr53 nêu trong SEQ ID NO: 38. Epitop của kháng thể

đơn dòng này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số các gốc sau đây: Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, Gln145, và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc tất cả các gốc sau đây: Ser56, Gly57, Thr58, và Lys59 nêu trong SEQ ID NO: 38. Epitop của kháng thể đơn dòng này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số các gốc sau đây: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Lys101, Gln145, và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa Lys101 nêu trong SEQ ID NO: 38. Epitop của kháng thể đơn dòng này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số các gốc sau đây: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Gln145, và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa Gln145 hoặc Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa Gln145 và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38. Epitop của kháng thể đơn dòng này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số các gốc sau đây: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, và Lys101 nêu trong SEQ ID NO: 38.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, hoặc tất cả các gốc sau đây: Lys49, Ile52, Gly57, Lys59, Lys101, Gln145, và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa tất cả các gốc sau đây: Lys49, Ile52,

Gly57, Lys59, Lys101, Gln145, và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa ít nhất một trong số các bộ gốc sau đây nêu trong SEQ ID NO: 38: (a) Lys49 và Ile52, (b) Gly57 và Lys59, (c) Lys101, (d) Gln145 và Arg149. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa Lys49 và Ile52 nêu trong SEQ ID NO: 38. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa Gly57 và Lys59 nêu trong SEQ ID NO: 38. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa Lys101 nêu trong SEQ ID NO: 38. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được đề xuất ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với epitop trong TSLP của người, trong đó epitop này chứa Gln145 và Arg149 nêu trong SEQ ID NO: 38.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết TSLP này có thể chứa paratop chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, ít nhất 10, ít nhất 11, ít nhất 12, ít nhất 13, ít nhất 14, ít nhất 15, ít nhất 16, ít nhất 17, ít nhất 18, ít nhất 19, hoặc tất cả các gốc sau đây: Thr28, Asp31, Tyr32, Trp33, Asp56, Glu101, Ile102, Tyr103, Tyr104, Tyr105 của trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:22 hoặc Gly28, Ser29, Lys30, Tyr31, Tyr48, Asp50, Asn51, Glu52, Asn65, và Trp92 của trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:25.

Khi epitop mong muốn trên kháng nguyên được xác định, có thể tạo ra các kháng thể đối với epitop đó, ví dụ, sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong sáng chế. Theo cách khác, trong quá trình tìm kiếm, việc tạo ra và xác định đặc điểm của các kháng thể có thể làm rõ thông tin về các epitop mong muốn. Từ thông tin này, nhờ đó có thể sàng lọc cạnh tranh các kháng thể để gắn kết với cùng một epitop. Cách tiếp cận để đạt được điều này là thực hiện các nghiên cứu cạnh tranh chéo để tìm ra các kháng thể gắn kết cạnh tranh với kháng thể khác, ví dụ, các kháng thể cạnh tranh để gắn kết với kháng nguyên. Quá trình năng suất cao để “loại trừ (binning)” các kháng thể dựa trên sự cạnh tranh chéo của chúng được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số

WO 2003/48731. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ thừa nhận rằng, theo thực tế bất kỳ cái gì mà kháng thể có thể gắn kết đặc hiệu với có thể là epitop. Epitop có thể chứa các gốc mà kháng thể gắn kết vào.

Nói chung, các kháng thể cụ thể đối với kháng nguyên nhắm đích cụ thể sẽ ưu tiên nhận diện epitop trên kháng nguyên đích trong hỗn hợp phức của protein và/ hoặc các đại phân tử.

Các vùng của polypeptit nhất định mà bao gồm epitop có thể được xác định bằng cách sử dụng số lượng bất kỳ các kỹ thuật lập bản đồ epitop, đã biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Epitop Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Nguoia Press, Totowa, New Jersey. Ví dụ, các epitop tuyến tính có thể có thể được xác định bằng ví dụ, đồng thời tổng hợp số lượng lớn peptit trên các chất hỗ trợ rắn, các peptit tương ứng với các phần của phân tử protein, và cho các peptit phản ứng với các kháng thể trong khi các peptit này vẫn được gắn vào các chất hỗ trợ. Các kỹ thuật này đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 4,708,871; Geysen *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:3998-4002; Geysen *et al.*, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:78-182; Geysen *et al.*, (1986) Mol. Immunol. 23:709-715. Tương tự, các epitop cấu hình dễ dàng được xác định bằng cách xác định cấu hình không gian của các axit amin TSLP chẳng hạn như bằng, ví dụ, trao đổi hydro/deteri, cộng hưởng từ hạt nhân tinh thể tia x và hai chiều. Xem, ví dụ, Epitop Mapping Protocols, ở trên. Các vùng kháng nguyên của các protein cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng các biểu đồ tính kháng nguyên tiêu chuẩn và biểu đồ sử dụng nước (hydropathy plot), chẳng hạn như các biểu đồ được tính toán bằng cách sử dụng, ví dụ, chương trình phần mềm Omega phiên bản 1.0 sẵn có từ Oxford Molecular Group. Chương trình máy tính này sử dụng phương pháp Hopp/Woods, Hopp *et al.*, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:3824-3828; để xác định đặc tính kháng nguyên, và kỹ thuật Kyte-Doolittle, Kyte *et al.*, (1982) J.Mol. Biol. 157:105-132; đối với biểu đồ sử dụng nước.

Các kháng thể được thiết kế và cải biến

Kháng thể theo sáng chế còn có thể được điều chế bằng cách sử dụng kháng thể có một hoặc nhiều trong số các trình tự VH và/ hoặc VL làm vật liệu khởi đầu để thiết kế kháng thể được cải biến, kháng thể cải biến này có thể có các tính chất thay đổi so với kháng thể ban đầu. Kháng thể có thể được thiết kế bằng cách cải biến một hoặc

nhiều các gốc nằm trong một hoặc cả hai vùng biến đổi (nghĩa là, VH và/ hoặc VL), ví dụ nằm trong một hoặc nhiều vùng CDR và/ hoặc nằm trong một hoặc nhiều vùng khung. Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể có thể được thiết kế bằng cách cải biến các gốc nằm trong (các) vùng cố định, ví dụ để thay đổi (các) chức năng hiệu ứng của kháng thể.

Một loại trong số các kỹ thuật thiết kế vùng biến đổi có thể được thực hiện là ghép CDR. Các kháng thể tương tác với các kháng nguyên đích chủ yếu thông qua các gốc axit amin được đặt trong sáu vùng quyết định bổ sung của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (CDR). Vì lý do này, các trình tự axit amin nằm trong CDR đa dạng hơn giữa các kháng thể riêng biệt hơn là các trình tự nằm ngoài CDR. Vì các trình tự CDR chịu trách nhiệm cho hầu hết các tương tác kháng thể-kháng nguyên, nó có thể biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp mà bắt chước các tính chất của các kháng thể tự nhiên cụ thể bằng cách xây dựng các vector biểu hiện bao gồm các trình tự CDR từ kháng thể tự nhiên cụ thể được ghép lên trên các trình tự khung hoạt động từ kháng thể khác có các tính chất khác (xem, ví dụ, Riechmann, L. *et al.*, 1998 *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.*, 1986 *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.*, 1989 *Proc. Natl. Acad., U.S.A.* 86:10029-10033; bằng sáng chế Mỹ số 5,225,539 cấp cho Winter, và bằng sáng chế Mỹ số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 cấp cho Queen *et al.*).

Các trình tự khung hoạt động này có thể thu được từ cơ sở dữ liệu ADN công khai hoặc tài liệu tham khảo đã được xuất bản bao gồm các trình tự gen kháng thể dòng mầm hoặc các trình tự gen kháng thể được sắp xếp lại. Ví dụ, các trình tự ADN dòng mầm đối với các gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người "VBase" (sẵn có trên mạng Internet ở trang www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), cũng như trong Kabat, E. A., *et al.*, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, số công bố NIH 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.*, 1992 *J. Mol. Biol.* 227:776-798; và Cox, J. P. L. *et al.*, 1994 *Eur. J Immunol.* 24:827-836; nội dung của mỗi cơ sở dữ liệu trong số này được kết hợp rõ ràng ở đây bằng cách tham chiếu. Ví dụ, các trình tự ADN dòng mầm đối với các gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người và các trình tự gen kháng thể được sắp xếp lại có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu "IMGT" (sẵn có trên mạng Internet ở trang www.imgt.org; xem Lefranc, M.P. *et al.*, 1999 *Nucleic Acids Res.* 27:209-212; nội

dung của mỗi cơ sở dữ liệu trong số này được kết hợp rõ ràng ở đây bằng cách tham chiếu).

Ví dụ về các trình tự khung hoạt động để sử dụng trong các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế là các trình tự mà tương tự về cấu trúc với các trình tự khung hoạt động được sử dụng bằng các kháng thể được chọn và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, ví dụ, các trình tự thống nhất và/ hoặc các trình tự khung hoạt động được sử dụng bằng các kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Các trình tự CDR1, 2 và 3 của VH, và các trình tự CDR1, 2 và 3 của VL, có thể được ghép lên trên các vùng khung có trình tự giống nhau như đã tìm thấy trong gen mã hóa globulin miễn dịch dòng mầm mà trình tự khung hoạt động này bắt nguồn từ đó, hoặc các trình tự CDR có thể được ghép lên trên các vùng khung chứa một hoặc nhiều đột biến so với các trình tự dòng mầm này. Ví dụ, người ta đã tìm thấy là trong một số trường hợp, có lợi khi gây đột biến các gốc nằm trong các vùng khung để duy trì hoặc tăng cường khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể (xem ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 cấp cho Queen et al).

Loại cải biến vùng biến đổi khác là gây đột biến các gốc axit amin nằm trong các vùng CDR1, CDR2 và/ hoặc CDR3 của VH và/ hoặc VL để nhờ đó cải thiện một hoặc nhiều tính chất gắn kết (ví dụ, ái lực) của kháng thể quan tâm, được biết đến như là “sự thành thực ái lực”. Gây đột biến điểm định hướng hoặc gây đột biến qua trung gian PCR có thể được tiến hành để đưa các đột biến vào và tác động lên sự gắn kết kháng thể, hoặc tính chất chức năng quan tâm khác, có thể được đánh giá trong các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* như được mô tả ở đây và được đề xuất trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Các cải biến bảo toàn (như được thảo luận ở trên) có thể được đưa vào. Các đột biến có thể là thế, thêm hoặc xóa axit amin. Hơn nữa, thông thường không nhiều hơn một, hai, ba, bốn hoặc năm gốc nằm trong vùng CDR bị thay đổi.

Nhiều khung hoặc giá đỡ kháng thể/ globulin miễn dịch có thể được sử dụng miễn là polypeptit tạo thành bao gồm ít nhất một vùng gắn kết mà gắn kết đặc hiệu với TSLP. Các khung hoặc giá đỡ này bao gồm 5 idiotyp chính của các globulin miễn dịch của người, mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và bao gồm các globulin miễn dịch của các loài động vật khác, tốt hơn là có các khía cạnh được làm giống như của người. Các kháng thể chuỗi nặng đơn chẳng hạn như các kháng thể được xác định ở lạc đà

đặc biệt được quan tâm trong trường hợp này. Các khung, giá đỡ và mảnh mới tiếp tục được tìm kiếm và phát triển bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra globulin không miễn dịch dựa trên các kháng thể bằng cách sử dụng các giá đỡ globulin không miễn dịch miễn dịch mà các CDR theo sáng chế có thể được ghép lên đó. Các khung và giá đỡ globulin miễn dịch đã biết hoặc chưa biết có thể được sử dụng, miễn là chúng chứa vùng gắn kết cụ thể cho protein TSLP mục tiêu. Các khung hoặc giá đỡ globulin không miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, fibronectin (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, Mass.), ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland), các kháng thể miễn (Domantis, Ltd., Cambridge, UK, và Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium), lipocalin (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), các được phẩm miễn dịch mô đun nhỏ (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.), maxybody (Avidia, Inc., Mountain View, Calif.), Protein A (Affibody AG, Sweden), và affilin (gamma-crystallin hoặc ubiquitin) (SciI Proteins GmbH, Halle, Germany).

Các giá đỡ fibronectin dựa trên miền fibronectin typ III (ví dụ, mô đun thứ mười của fibronectin typ III (miền 10 Fn3)). Miền fibronectin typ III này có 7 hoặc 8 beta sợi được phân phối giữa hai phiên beta, các phiên này tự buộc vào nhau để tạo thành lõi protein, và còn chứa các cuộn (tương tự với các CDR) kết nối các sợi beta với nhau và được tiếp xúc dung môi. Có ít nhất ba cuộn như vậy ở mỗi cạnh của kết cấu kẹp phiên beta, ở đây cạnh là giới hạn của protein vuông góc với hướng của sợi beta này (xem công bố đơn sáng chế Mỹ số 6,818,418). Các giá đỡ gốc fibronectin này không phải là globulin miễn dịch, mặc dù toàn bộ nếp gấp có liên quan mật thiết với mảnh kháng thể chức năng nhỏ nhất, vùng biến đổi của chuỗi nặng, bao gồm toàn bộ đơn vị nhận diện kháng nguyên ở IgG của lạc đà và lạc đà không bướu. Do cấu trúc này, kháng thể globulin không miễn dịch bất chước các tính chất gắn kết kháng nguyên có bản chất và ái lực tương tự đối với các đặc tính của các kháng thể. Các giá đỡ này có thể được sử dụng trong chiến lược ngẫu nhiên hóa và xáo trộn cuộn *in vitro* mà tương tự với quá trình thành thực ái lực của các kháng thể *in vivo*. Các phân tử gốc fibronectin có thể được sử dụng làm giá đỡ trong đó vùng cuộn của phân tử này có thể được thay thế bằng các CDR theo sáng chế sử dụng các kỹ thuật tách dòng tiêu chuẩn.

Công nghệ ankyrin là dựa trên sử dụng các protein với các mô đun lặp lại có nguồn gốc ankyrin làm giá đỡ để mang các vùng biến đổi mà có thể được sử dụng để

gắn kết với các mục tiêu khác nhau. Mô đun lặp lại ankyrin là polypeptit có 33 axit amin bao gồm hai xoắn alpha đối song song và vòng beta. Sự gắn kết các vùng biến đổi chủ yếu được tối ưu hóa bằng cách sử dụng hiển thị ribosom.

Các avime có nguồn gốc từ protein chứa miền A tự nhiên chẳng hạn như LRP-1. Thực chất, những miền này được sử dụng đối với các tương tác protein-protein và ở người trên 250 protein là dựa trên các miền A về cấu trúc. Các avime bao gồm một số monome “miền A” khác nhau (2-10) được liên kết thông qua các mối liên kết axit amin. Các avime mà có thể gắn kết với kháng nguyên đích có thể được tạo ra sử dụng phương pháp được mô tả trong, ví dụ, các công bố đơn sáng chế Mỹ số 20040175756; 20050053973; 20050048512; và 20060008844.

Affibody là các phối tử ái lực nhỏ, các protein đơn giản gồm một bó ba xoắn dựa trên giá đỡ của một trong những miền gắn kết IgG của Protein A. Protein A là protein bề mặt từ vi khuẩn tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*). Miền giá đỡ này gồm 58 axit amin, 13 trong số này được chọn ngẫu nhiên để tạo ra các thư viện affibody với một số lượng lớn các biến thể phối tử (xem ví dụ, công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,831,012). Các phân tử affibody bắt chước các kháng thể, chúng có trọng lượng phân tử 6kDa, so với trọng lượng phân tử của các kháng thể, là 150kDa. Mặc dù có kích thước nhỏ, vị trí gắn kết của các phân tử affibody tương tự với vị trí gắn kết của kháng thể.

Anticalin là các sản phẩm được phát triển bởi công ty Pieris ProteoLab AG. Chúng có nguồn gốc từ lipocalin, một nhóm rộng bao gồm các protein nhỏ và mạnh mà thường có liên quan đến vận chuyển hoặc lưu trữ sinh lý các hợp chất nhạy cảm hóa học hoặc không tan. Một vài lipocalin tự nhiên xuất hiện trong mô của người hoặc chất lỏng trong cơ thể. Cấu trúc protein này làm liên tưởng đến globulin miễn dịch, với các cuộn siêu biến trên đỉnh của khung cố định. Tuy nhiên, ngược lại với các kháng thể hoặc mảnh tái tổ hợp của chúng, lipocalin được cấu tạo gồm chuỗi polypeptit đơn có 160 đến 180 gốc axit amin, chỉ lớn hơn miền globulin miễn dịch đơn một chút. Bộ bốn cuộn, tạo nên túi gắn kết, cho thấy tính dẻo cấu trúc rõ rệt và dung nạp rất nhiều chuỗi bên. Vị trí gắn kết vì vậy có thể định hình lại theo quy trình riêng để nhận diện các phân tử đích quy định có hình dạng khác nhau với ái lực và tính đặc hiệu cao. Một protein của họ lipocalin, protein gắn kết bilin (BBP) theo Pieris Brassicae đã được sử dụng để phát triển các anticalin bằng cách gây đột biến bộ bốn cuộn. Một ví dụ về đơn

sáng chế mô tả các anticalin là trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 1999/16873.

Các phân tử affilin là các protein không phải globulin miễn dịch nhỏ được thiết kế cho các ái lực cụ thể hướng tới các protein và các phân tử nhỏ. Các phân tử affilin mới có thể nhanh chóng được chọn từ hai thư viện, mỗi trong số này dựa trên protein giá đỡ có nguồn gốc từ người khác nhau. Các phân tử affilin không cho thấy bất kỳ sự tương đồng cấu trúc nào với các protein globulin miễn dịch. Hiện nay, hai giá đỡ affilin được sử dụng, một trong số chúng là tinh thể gama, protein trong thấu kính của mắt người và giá đỡ còn lại là protein thuộc siêu họ "ubiquitin". Cả hai giá đỡ của người đều rất nhỏ, cho thấy khả năng ổn định nhiệt độ cao và gần như kháng lại sự thay đổi độ pH và các chất biến tính. Khả năng ổn định cao này chủ yếu là do cấu trúc phiến beta của các protein được mở rộng. Ví dụ về các protein có nguồn gốc tinh thể gama crystalline được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2001/04144 và ví dụ về các protein "giống như ubiquitin" được mô tả trong WO 2004/106368.

Các chất bắt chước epitop của protein (Protein epitop mimetics - PEM) là các phân tử có kích thước trung bình, dạng vòng, giống như peptit (MW 1-2 kDa) bắt chước cấu trúc bậc hai beta-hairpin secondary của protein, cấu trúc bậc hai chính liên quan đến tương tác protein-protein.

Các kháng thể gắn kết TSLP của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, công nghệ tạo kháng thể giống như của người (humaneering) được sử dụng để chuyển hóa các kháng thể không phải của người vào các kháng thể của người được thiết kế. Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20050008625 mô tả phương pháp *in vivo* thay thế vùng biến đổi trên kháng thể không phải của người bằng vùng biến đổi của người trong kháng thể trong khi vẫn duy trì các đặc tính gắn kết giống hoặc tốt hơn so với kháng thể không phải của người. Phương pháp này dựa vào sự thay thế hướng dẫn epitop của các vùng biến đổi của kháng thể tham chiếu không phải của người bằng kháng thể đầy đủ của người. Kháng thể của người hình thành nói chung không liên quan về cấu trúc với kháng thể tham chiếu không phải của người, nhưng gắn kết với cùng epitop trên cùng kháng nguyên như kháng thể tham chiếu. Tóm lại, cách tiếp cận thay thế bổ sung hướng epitop nói tiếp được cho phép bằng cách thiết lập sự cạnh tranh trong các tế bào giữa “chất cạnh tranh” và thư viện gồm nhiều giống lai đa dạng của kháng thể tham chiếu (“các kháng

thể kiểm tra”) để gắn kết với lượng giới hạn kháng nguyên khi có mặt hệ thống chất thông báo có đáp ứng với sự gắn kết của kháng thể kiểm tra với kháng nguyên. Chất cạnh tranh có thể là kháng thể tham chiếu hoặc dẫn xuất của nó chẳng hạn như mảnh Fv đơn chuỗi. Chất cạnh tranh cũng có thể là phối tử tự nhiên hoặc nhân tạo của kháng nguyên mà gắn kết với cùng epitop như kháng thể tham chiếu. Yêu cầu duy nhất của chất cạnh tranh là nó gắn kết với cùng một như kháng thể tham chiếu, và nó cạnh tranh với kháng thể tham chiếu đối với sự gắn kết kháng nguyên. Các kháng thể kiểm tra có một vùng V gắn kết kháng nguyên chung từ kháng thể tham chiếu không phải của người, và vùng V còn lại được chọn ngẫu nhiên từ nguồn đa dạng chẳng hạn như thư viện danh mục các kháng thể của người. Vùng V chung từ kháng thể tham chiếu đóng vai trò dẫn dắt, đưa các kháng thể kiểm tra vào vị trí trên cùng epitop trên kháng nguyên, và theo cùng hướng, sao cho sự chọn lọc thiên về phía độ chính xác gắn kết kháng nguyên cao nhất đối với kháng thể tham chiếu.

Nhiều loại trong số các hệ thống chất thông báo có thể được sử dụng để phát hiện các tương tác mong muốn giữa các kháng thể kiểm tra và kháng nguyên. Ví dụ, các mảnh bổ sung cho chất thông báo có thể liên kết với kháng nguyên và kháng thể kiểm tra, tương ứng, sự kích hoạt chất thông báo bằng cách bổ sung mảnh chỉ xảy ra khi kháng thể kiểm tra gắn kết với kháng nguyên. Khi dung hợp kháng thể kiểm tra và mảnh thông báo kháng nguyên đồng biểu hiện với chất cạnh tranh, sự kích hoạt chất thông báo sẽ phụ thuộc vào khả năng cạnh tranh của kháng thể kiểm tra với chất cạnh tranh, nó tỉ lệ thuận với ái lực của kháng thể kiểm tra đối với kháng nguyên. Hệ thống chất thông báo khác mà có thể được sử dụng bao gồm máy kích hoạt hệ thống tái kích hoạt chất thông báo ức chế tự động (an auto-inhibited reporter reactivation system - RAIR) như được bộc lộ trong chuỗi đơn sáng chế Mỹ số 10/208,730 (công bố đơn số 20030198971), hoặc hệ thống kích hoạt cạnh tranh được bộc lộ trong chuỗi đơn sáng chế Mỹ số 10/076,845 (công bố đơn số 20030157579).

Với hệ thống thay thế bổ sung hướng dẫn epitop nối tiếp, sự chọn lọc được thực hiện để xác định các tế bào biểu hiện kháng thể kiểm tra đơn lẻ cùng với chất cạnh tranh, kháng nguyên, và các thành phần thông báo. Trong những tế bào này, mỗi kháng thể kiểm tra cạnh tranh một-một với chất cạnh tranh để gắn kết với lượng giới hạn kháng nguyên. Hoạt tính của chất thông báo tỉ lệ thuận với lượng kháng nguyên gắn kết với kháng thể kiểm tra, do đó tỉ lệ thuận với ái lực của kháng thể kiểm tra đối

với kháng nguyên và tính ổn định của kháng thể kiểm tra. Các kháng thể ban đầu được chọn trên cơ sở hoạt tính của chúng so với hoạt tính của kháng thể tham chiếu khi được biểu hiện như là kháng thể kiểm tra. Kết quả của vòng lựa chọn đầu tiên là bộ các kháng thể "lai", mỗi trong số này bao gồm vùng V không phải của người giống nhau từ kháng thể tham chiếu và vùng V của người từ thư viện, và mỗi trong số này gắn kết với cùng epitop trên kháng nguyên như kháng thể tham chiếu. Một hoặc nhiều kháng thể lai được chọn trong vòng đầu tiên sẽ có ái lực đối với kháng nguyên có thể tương đương hoặc cao hơn ái lực của kháng thể tham chiếu.

Trong bước thay thế vùng V thứ hai, các vùng V của người được chọn trong bước đầu tiên được sử dụng để hướng dẫn cho chọn lọc các thay thế của người cho vùng V của kháng thể tham chiếu không phải người còn lại với thư viện đa dạng các vùng V của người có cùng nguồn gốc. Các kháng thể lai được chọn trong vòng đầu tiên cũng có thể được sử dụng làm chất cạnh tranh cho vòng chọn thứ hai. Kết quả của vòng chọn thứ hai là một bộ đầy đủ các kháng thể người khác về cấu trúc với kháng thể tham chiếu, nhưng cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để gắn kết với cùng kháng nguyên. Một số trong số các kháng thể người được chọn gắn với cùng epitop trên cùng kháng nguyên như kháng thể tham chiếu. Một hoặc nhiều trong số các kháng thể người được chọn này gắn kết với cùng epitop với ái lực tương đương hoặc cao hơn ái lực của kháng thể tham chiếu.

Các kháng thể lạc đà

Các protein kháng thể thu được từ các thành viên của họ lạc đà và lạc đà một bướu (*Camelus bactrianus* và *Camelus dromaderius*) bao gồm các thành viên mới của thể giới chẳng hạn như loài lạc đà không bướu llama (*Lama pacos*, *Lama glama* và *Lama vicugna*) được xác định đặc điểm về kích thước, tính phức tạp cấu trúc và tính kháng nguyên đối với các đối tượng là người. Các kháng thể IgG nhất định từ họ động vật có vú này như được tìm thấy trong tự nhiên thiếu các chuỗi nhẹ, và vì vậy khác biệt về cấu trúc với bốn cấu trúc bốn chuỗi thông thường có hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, đối với các kháng thể từ các động vật khác. Xem sáng chế quốc tế số PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 được công bố ngày 3 tháng 3 năm 1994).

Vùng kháng thể lạc đà là miền biến đổi đơn nhỏ được xác định như là VHH có thể thu được bằng kỹ thuật di truyền để tạo ra protein nhỏ có ái lực cao đối với đích, hình thành nên protein có nguồn gốc kháng thể có trọng lượng phân tử thấp được biết

đến như là “nanobody của lạc đà”. Xem công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,759,808 được xuất bản ngày 2 tháng 6 năm 1998; ngoài ra xem Stijlemans, B. *et al.*, 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. *et al.*, 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. *et al.* 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. *et al.* 2002 Int J Cancer 89: 456-62; và Lauwereys, M. *et al.* 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Các thư viện kháng thể lạc đà được thiết kế và các mảnh kháng thể là sẵn có trên thị trường, ví dụ, từ Ablynx, Ghent, Belgium. Như với các kháng thể khác và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng có nguồn gốc không phải từ người, trình tự axit amin của kháng thể lạc đà có thể bị biến đổi tái tổ hợp để thu được trình tự giống trình tự của người nhiều hơn, nghĩa là, nanobody này có thể “được làm giống như của người”. Vì vậy, tính kháng nguyên thấp tự nhiên của các kháng thể lạc đà đối với người có thể giảm thêm nữa.

Nanobody của lạc đà có trọng lượng phân tử xấp xỉ 1/10 trọng lượng của phân tử IgG của người, và protein này có đường kính vật lý chỉ vài nanomet. Một hệ quả của kích thước nhỏ là khả năng gắn kết của nanobody của lạc đà với các vị trí kháng nguyên mà không nhìn thấy về chức năng ở các protein kháng thể lớn hơn, nghĩa là, nanobody của lạc đà hữu ích làm chất phản ứng để phát hiện các kháng nguyên ẩn sử dụng các kỹ thuật miễn dịch học cổ điển, và làm chất có thể điều trị. Vì vậy, hệ quả khác nữa của kích thước nhỏ đó là nanobody của lạc đà có thể ức chế như là kết quả của việc gắn kết với vị trí cụ thể trong rãnh hoặc khe hẹp của protein đích, và do đó có thể có khả năng đó là cực kỳ giống với chức năng của thuốc có trọng lượng phân tử thấp cổ điển hơn là chức năng của kháng thể cổ điển.

Trọng lượng phân tử thấp và kích thước nhỏ gọn còn hình thành nên các nanobody của lạc đà cực kỳ bền nhiệt, ổn định với các giá trị pH cực đoan và với sự phân hủy bằng cách thủy phân protein, và tính kháng nguyên yếu. Hệ quả khác là nanobody của lạc đà dễ dàng di chuyển từ hệ tuần hoàn vào các mô, và thậm chí vượt qua hàng rào máu não và có thể điều trị các rối loạn có ảnh hưởng đến mô thần kinh. Nanobody còn có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc vận chuyển được chất qua hàng rào máu não. Xem đơn sáng chế Mỹ số 20040161738 được xuất bản ngày 19 tháng 8 năm 2004. Những đặc tính này kết hợp với tính kháng nguyên yếu với người cho thấy tiềm năng điều trị tuyệt vời. Ngoài ra, những phân tử này có thể được biểu hiện đầy đủ trong các tế bào nhân sơ chẳng hạn như E. coli và được biểu hiện như là các protein

dung hợp với thể thực khuẩn và có chức năng.

Theo đó, đặc trưng của sáng chế là kháng thể hoặc nanobody của lạc đà có ái lực cao đối với TSLP. Theo một phương án ở đây, kháng thể hoặc nanobody của lạc đà được tạo ra tự nhiên trong cơ thể lạc đà, nghĩa là, được tạo ra bởi lạc đà sau khi gây miễn dịch bằng TSLP hoặc mảnh peptit của nó, sử dụng các kỹ thuật được mô tả ở đây đối với các kháng thể khác. Theo cách khác, nanobody gắn kết TSLP của lạc đà được thiết kế, nghĩa là, được tạo ra bằng cách chọn lọc ví dụ từ thư viện thể thực khuẩn biểu thị các protein nanobody của lạc đà bị gây đột biến một cách thích hợp sử dụng các quy trình sàng lọc sơ bộ (panning) với TSLP như là đích như được mô tả trong các ví dụ ở đây. Nanobody được thiết kế còn có thể được tùy chỉnh bằng kỹ thuật di truyền để có chu kỳ bán hủy ở đối tượng nhận là từ 45 phút đến hai tuần. Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc nanobody của lạc đà thu được bằng cách ghép các trình tự CDR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của các kháng thể người theo sáng chế vào nanobody hoặc các trình tự khung hoạt động kháng thể miễn đơn, ví dụ như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP93/02214.

Các phân tử đặc hiệu kép và các kháng thể đa hóa trị

Theo khía cạnh khác, sáng chế có đặc trưng là các phân tử đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu chứa kháng thể gắn kết TSLP, hoặc mảnh của nó, theo sáng chế. Kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, có thể được dẫn xuất hoặc liên kết với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác (ví dụ, kháng thể khác hoặc phối tử cho thụ thể) để sinh ra phân tử đặc hiệu kép mà gắn kết với ít nhất hai vị trí gắn kết hoặc phân tử đích khác nhau. Kháng thể theo sáng chế trong thực tế có thể được dẫn xuất hoặc liên kết với nhiều hơn một phân tử chức năng khác để sinh ra các phân tử đa đặc hiệu mà gắn kết với nhiều hơn hai vị trí gắn kết và/ hoặc phân tử đích khác nhau; các phân tử đa đặc hiệu này cũng được chủ định được bao hàm bởi thuật ngữ "phân tử đặc hiệu kép" như được sử dụng ở đây. Để tạo ra phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế, kháng thể theo sáng chế có thể được liên kết chức năng (ví dụ, bằng cách ghép đôi hóa học, dung hợp gen, liên kết không đồng hóa trị hoặc cách khác) với một hoặc nhiều phân tử gắn kết khác, chẳng hạn như kháng thể, mảnh kháng thể, peptit hoặc chất bất chước khác, sao cho thu được phân tử đặc hiệu kép.

Theo đó, sáng chế bao gồm các phân tử đặc hiệu kép chứa ít nhất một đặc hiệu gắn kết thứ nhất đối với TSLP và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai đối với epitop đích thứ

hai. Ví dụ, epitop đích thứ hai có thể là epitop khác của TSLP khác với epitop đích thứ nhất. Theo các phương án khác, epitop đích thứ hai có thể đến đích không liên quan đến TSLP, nhưng đem lại lợi ích điều trị khi kết hợp với TSLP.

Ngoài ra, đối với sáng chế trong đó phân tử đặc hiệu kép là đa đặc hiệu, phân tử này còn có thể bao gồm đặc hiệu gắn kết thứ ba, ngoài epitop đích thứ nhất và thứ hai.

Theo một phương án, phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế chứa ít nhất một kháng thể làm đặc hiệu liên kết, hoặc mảnh kháng thể của nó, bao gồm, ví dụ, Fab, Fab', F (ab')₂, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi. Kháng thể này cũng có thể là dime chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, hoặc mảnh nhỏ nhất bất kỳ của nó chẳng hạn như Fv hoặc cấu trúc chuỗi đơn như được mô tả trong Ladner et al. công bố đơn sáng chế Mỹ số 4,946,778.

Diabody là các phân tử đặc hiệu kép hóa trị hai trong đó các miền VH và VL được biểu hiện trên chuỗi polypeptit đơn, được kết nối bằng mối liên kết quá ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi. Các miền VH và VL cặp với các miền bổ sung của chuỗi khác, từ đó tạo ra hai vị trí gắn kết kháng nguyên (xem ví dụ, Holliger *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poijak *et al.*, 1994 Structure 2:1121-1123). Diabody có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện hai chuỗi polypeptit có cấu trúc VHA-VLB và VHB-VLA (cấu hình VH-VL), hoặc VLA-VHB và VLB-VHA (cấu hình VL-VH) trong cùng tế bào. Phần lớn trong số này có thể được biểu hiện ở dạng hòa tan trong vi khuẩn. Diabody đơn chuỗi (scDb) được tạo ra bằng cách kết nối hai chuỗi polypeptit tạo diabody bằng mối liên kết gồm khoảng 15 gốc axit amin (xem Holliger và Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (3-4):128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2 (1):21-36). scDb có thể được biểu hiện trong vi khuẩn ở dạng hòa tan, monome có hoạt tính (xem Holliger và Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (34): 128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2 (1):21-36; Pluckthun và Pack, 1997 Immunotechnology, 3 (2): 83-105; Ridgway *et al.*, 1996 Protein Eng., 9 (7):617-21). Diabody có thể được dung hợp với Fc để sinh ra "di-diabody" (xem Lu *et al.*, 2004 J. Biol. Chem., 279 (4):2856-65).

Các kháng thể khác có thể được sử dụng trong phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế là các kháng thể đơn dòng của chuột, thể khảm và được làm giống như của người.

Các phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách liên hợp các đặc hiệu gắn kết cơ định, sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Ví dụ, mỗi đặc hiệu gắn kết của phân tử đặc hiệu kép có thể được tạo ra riêng biệt và sau đó liên hiệp với đặc hiệu khác. Khi các đặc hiệu gắn kết là protein hoặc peptit, rất nhiều chất ghép đôi hoặc liên kết chéo có thể được sử dụng để liên hợp đồng hóa trị. Ví dụ về các chất liên kết chéo bao gồm protein A, carbodiimite, N-suxinimidyl-5-axetyl-thioaxetat (SATA), 5,5'-dithiobis (axit 2-nitrobenzoic) (DTNB), o-phenylendimaleimite (oPDM), N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), và sulfosuxinimidyl 4- (N-maleimidomethyl)xyclorhexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) (xem ví dụ, Karpovsky *et al.*, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M A *et al.*, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả trong Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.*, 1985 Science 229:81-83), và Glennie *et al.*, 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Các chất liên hợp là SATA và sulfo-SMCC, cả hai đều sẵn có từ Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.).

Khi các đặc hiệu gắn kết là các kháng thể, chúng có thể được liên hợp bằng liên kết sulfhydryl của các vùng bản lề đầu C của hai chuỗi nặng. Theo phương án cụ thể, vùng bản lề được biến đổi để chứa một số lẻ các gốc sulfhydryl, ví dụ một, trước khi liên hợp.

Theo cách khác, cả hai đặc hiệu gắn kết có thể được mã hóa trong cùng vector và được biểu hiện và được lắp ghép trong cùng tế bào chủ. Phương pháp này đặc biệt hữu ích trong trường hợp phân tử đặc hiệu kép là mAb X mAb, mAb X Fab, Fab X F (ab')₂ hoặc phối tử X protein dung hợp Fab. Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể là phân tử chuỗi đơn chứa một kháng thể chuỗi đơn và yếu tố quyết định gắn kết, hoặc phân tử đặc hiệu kép chuỗi đơn chứa hai yếu tố quyết định gắn kết. Phân tử đặc hiệu kép có thể chứa ít nhất hai các phân tử đơn chuỗi. Các phương pháp để điều chế phân tử đặc hiệu kép được mô tả trong, ví dụ công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,260,203; công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,455,030; công bố đơn sáng chế Mỹ số 4,881,175; công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,132,405; công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,091,513; công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,476,786; công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,013,653; công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,258,498; và công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,482,858.

Sự gắn kết các phân tử đặc hiệu kép với các đích cụ thể của chúng có thể được xác nhận bằng, ví dụ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (REA), phân tích FACS, thử nghiệm sinh học (ví dụ, ức chế tăng trưởng), hoặc thử nghiệm Western Blot. Mỗi trong số thử nghiệm này nói

chung phát hiện sự có mặt của các phức protein-kháng thể được quan tâm cụ thể bằng cách sử dụng chất phản ứng được đánh dấu (ví dụ, kháng thể) cụ thể cho phức quan tâm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các hợp chất đa hóa trị chứa ít nhất hai phần gắn kết kháng nguyên giống nhau hoặc khác nhau của các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế gắn kết với TSLP. Các phần gắn kết kháng nguyên có thể được liên kết với nhau thông qua dung hợp protein hoặc liên kết đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị. Theo cách khác, các phương pháp liên kết được mô tả cho các phân tử đặc hiệu kép. Các hợp chất có hóa trị bốn có thể thu được ví dụ bằng cách liên kết chéo các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế bằng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên mà gắn kết với các vùng cố định của các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, ví dụ vùng Fc hoặc vùng bản lề.

Miền trime hóa được mô tả ví dụ trong bằng sáng chế của Boreon Pharma số EP 1 012 280B1. Các mô đun pentame hóa được mô tả ví dụ trong đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP97/05897.

Các kháng thể có chu kỳ bán hủy kéo dài

Sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết đặc hiệu với TSLP và có chu kỳ bán hủy kéo dài *in vivo*.

Nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng đến chu kỳ bán hủy của protein *in vivo*. Ví dụ, quá trình lọc của thận, quá trình chuyển hóa trong gan, quá trình phân hủy bởi các enzym phân giải protein (protease), và các đáp ứng miễn dịch (ví dụ, sự trung hòa protein bởi các kháng thể và sự hấp thu bởi các đại thực bào và các tế bào đuôi gai). Nhiều chiến lược có thể được sử dụng để kéo dài chu kỳ bán hủy của các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Ví dụ, bằng sự liên kết hóa học với polyethyleneglycol (PEG), reCODE PEG, giá đỡ kháng thể, axit polysialic (PSA), tinh bột hydroxyetyl (HES), phối tử gắn kết albumin, và vỏ bọc carbohydrat; bằng cách dung hợp gen với các protein gắn kết với các protein huyết thanh, chẳng hạn như albumin, IgG, FcRn, và chuyển tiếp; bằng cách ghép đôi (về mặt di truyền hoặc về mặt hóa học) với các gốc gắn kết khác mà gắn với protein huyết thanh, chẳng hạn như nanobody, Fab, DARPin, avime, affibody, và anticalin; bằng cách dung hợp gen với rPEG, albumin, miền albumin, các protein gắn kết albumin, và Fc; hoặc bằng cách kết

hợp vào các chất mang nano, các chế phẩm bào chế giải phóng chậm, hoặc các thiết bị y tế.

Để kéo dài quá trình tuần hoàn huyết thanh của các kháng thể *in vivo*, các phân tử polyme trơ chẳng hạn như PEG có trọng lượng phân tử cao có thể được gắn vào các kháng thể hoặc mảnh của chúng bằng mỗi liên kết đa chức năng hoặc không cần thông qua liên hợp vị trí cụ thể của PEG với đầu N- hoặc C- của các kháng thể hoặc thông qua các nhóm epsilon-amino có mặt trên các gốc lysin. Để pegyl hóa kháng thể, kháng thể này, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, thông thường được cho phản ứng với polyetylen glycol (PEG), chẳng hạn như este phản ứng hoặc dẫn xuất aldehyt của PEG, trong các điều kiện trong đó một hoặc nhiều nhóm PEG sẽ được gắn vào kháng thể hoặc mảnh kháng thể này. Quá trình pegyl hóa có thể được thực hiện bằng phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với phân tử PEG phản ứng (hoặc polyme hòa tan được trong nước có khả năng phản ứng tương tự). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polyetylen glycol" nhằm bao hàm bất kỳ trong số các dạng PEG mà được sử dụng để dẫn xuất các protein khác, chẳng hạn như mono (C1-C10)alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol-maleimit. Theo một phương án, kháng thể để pegyl hóa là kháng thể aglycosyl hóa. Quá trình dẫn xuất polyme tuyến tính hoặc phân nhánh mà dẫn đến sự mất mát hoạt tính sinh học tối thiểu sẽ được sử dụng. Cấp độ liên hợp có thể được theo dõi chặt chẽ bằng SDS-PAGE và phép đo phổ khối để đảm bảo sự liên hợp thích hợp của các phân tử PEG với các kháng thể. PEG không phản ứng có thể được phân tách từ các thể liên hợp kháng thể-PEG bằng cách loại trừ kích thước hoặc sắc ký trao đổi ion. Các kháng thể được dẫn xuất từ PEG có thể được kiểm tra hoạt tính gắn kết cũng như hiệu suất *in vivo* bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách thử nghiệm miễn dịch được mô tả ở đây. Các phương pháp pegyl hóa protein đã được biết trong lĩnh vực này và có thể được áp dụng cho các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Xem ví dụ, đơn sáng chế EP 0 154 316 của Nishimura et al. và EP 0 401 384 của Ishikawa et al.

Các công nghệ pegyl hóa biến đổi khác bao gồm tái tạo công nghệ kỹ thuật trực giao hóa học (ReCODE PEG), công nghệ này kết hợp cả chuỗi bên được quy định về mặt hóa học vào các protein sinh tổng hợp thông qua hệ thống tái tạo bao gồm synthetaza tARN và tARN. Công nghệ này cho phép sự kết hợp của nhiều hơn 30 axit

amin mới vào các protein sinh tổng hợp trong tế bào E. coli, nấm men, và động vật có vú. tARN kết hợp axit amin quy chuẩn vào vị trí bất kỳ mà codon amber được đặt, chuyển amber này từ codon dừng sang codon truyền tín hiệu kết hợp axit amin được quy định hóa học.

Công nghệ pelgyl hóa tái tổ hợp (rPEG) cũng có thể được sử dụng để kéo dài chu kỳ bán hủy huyết thanh. Công nghệ này bao gồm dung hợp gen đuôi protein không được cấu trúc gồm 300-600 axit amin với protein được phẩm hiện có. Do trọng lượng phân tử biểu kiến của một chuỗi protein không được cấu trúc như vậy lớn hơn khoảng 15 lần trọng lượng phân tử thực tế của nó, chu kỳ bán hủy huyết thanh của protein tăng lên đáng kể. Ngược lại với quá trình PEGyl hóa truyền thống, yêu cầu quá trình liên hợp hóa học và tinh chế lại, quá trình sản xuất này được đơn giản hóa rất nhiều và sản phẩm là đồng nhất.

Polysialyl hóa là công nghệ khác, sử dụng axit polysialic polyme (polymer polysialic acid - PSA) để kéo dài thời gian hoạt động và cải thiện tính ổn định của các peptit và protein điều trị. PSA là polyme của axit sialic (đường). Khi được sử dụng để vận chuyển protein và dược chất peptit điều trị, axit polysialic cung cấp môi trường vi mô bảo vệ cho sự liên hợp. Điều này làm tăng thời gian hoạt động của protein điều trị trong tuần hoàn ngăn nó khỏi bị nhận diện bởi hệ miễn dịch. Polyme PSA được tìm thấy tự nhiên trong cơ thể người. Nó được chấp nhận bởi một số vi khuẩn đã phát triển qua hàng triệu năm để phủ nó lên thành của chúng. Những vi khuẩn được polysialyl hóa tự nhiên này sau đó có thể, bằng cách bắt chước phân tử, để ngăn chặn hệ thống phòng vệ của cơ thể. PSA, công nghệ tăng hình cơ bản của tự nhiên, có thể được tạo ra dễ dàng từ những vi khuẩn này với số lượng lớn và với đặc điểm hóa học được xác định trước. PSA vi khuẩn hoàn toàn không gây miễn dịch, thậm chí khi được ghép đôi với protein, vì nó giống về mặt hóa học với PSA trong cơ thể người.

Công nghệ khác bao gồm sử dụng dẫn xuất tinh bột hydroxyetyl ("HES") liên kết với các kháng thể. HES là polyme tự nhiên được biến đổi có nguồn gốc từ tinh bột ngô sếp và có thể được chuyển hóa bởi các enzym trong cơ thể. Dung dịch HES thường được dùng để thay thế lượng máu thiếu hụt và cải thiện tính chất lưu biến của máu. Quá trình hesyl hóa kháng thể cho phép kéo dài thời gian bán hủy tuần hoàn nhờ tăng tính ổn định phân tử, cũng như giảm sự thanh thải của thận, dẫn đến hoạt tính sinh học tăng. Bằng cách thay đổi các thông số khác nhau, chẳng hạn như trọng lượng

phân tử của HES, một loạt thể liên hợp HES kháng thể có thể được tùy chỉnh.

Các kháng thể có thời gian bán hủy tăng *in vivo* cũng có thể được sinh ra khi đưa vào một hoặc nhiều cải biến axit amin (nghĩa là, thế, chèn hoặc xóa) vào miền cố định IgG, hoặc mảnh gắn kết FcRn của nó (tốt hơn là Fc hoặc mảnh của miền Fc bản lề). Xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 98/23289; công bố đơn quốc tế số WO 97/34631; và bằng sáng chế Mỹ số 6,277,375.

Ngoài ra, các kháng thể có thể được liên hợp với albumin để tạo ra kháng thể hoặc mảnh kháng thể bền hơn *in vivo* có chu kỳ bán hủy dài hơn *in vivo*. Các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực này, xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 93/15199, WO 93/15200, và WO 01/77137; và bằng sáng chế châu Âu số EP 413,622.

Các chiến lược để tăng chu kỳ bán hủy đặc biệt hữu ích ở nanobody, các chất kết dính gốc fibronectin, và các kháng thể hoặc protein khác mà đối với nó chu kỳ bán hủy *in vivo* gia tăng mong muốn.

Thể liên hợp kháng thể

Sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết đặc hiệu với miền ngoại bào của TSLP được dung hợp tái tổ hợp hoặc liên hợp hóa học (bao gồm cả liên hợp đồng hóa trị và không đồng hóa trị) với protein hoặc polypeptit không tương đồng (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, tốt hơn là với polypeptit gồm ít nhất 10, ít nhất 20, ít nhất 30, ít nhất 40, ít nhất 50, ít nhất 60, ít nhất 70, ít nhất 80, ít nhất 90 hoặc ít nhất 100 axit amin) để sinh ra các protein dung hợp. Cụ thể, sáng chế đề xuất các protein dung hợp chứa mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể được mô tả ở đây (ví dụ, mảnh Fab, mảnh Fd, mảnh Fv, mảnh F(ab)₂, miền VH domain, CDR của VH, miền VL hoặc CDR của VL) và protein, polypeptit, hoặc peptit không tương đồng. Các phương pháp dung hợp hoặc liên hợp các protein, các polypeptit, hoặc các peptit với kháng thể hoặc mảnh kháng thể đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, và 5,112,946; bằng sáng chế châu Âu số EP 307,434 và EP 367,166; công bố đơn quốc tế số WO 96/04388 và WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; và Vil *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341.

Ngoài ra, các protein dung hợp có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật xáo trộn gen, xáo trộn motif, xáo trộn exon, và/ hoặc xáo trộn codon (được gọi chung là "xáo

trộn ADN"). Xáo trộn ADN có thể được sử dụng để làm thay đổi hoạt tính của các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế (ví dụ, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng có ái lực cao hơn và tỉ lệ phân ly thấp hơn). Xem, một cách tổng quát, bằng sáng chế Mỹ số 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, và 5,837,458; Patten *et al.*, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16 (2):76-82; Hansson, *et al.*, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; và Lorenzo và Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2):308-313 (mỗi trong số những bằng sáng chế và công bố đơn này được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu trong toàn bộ nội dung của nó). Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, hoặc các kháng thể được mã hóa và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, có thể được thay đổi bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên theo phương pháp PCR tạo lỗi ngẫu nhiên, chèn nucleotit ngẫu nhiên hoặc các phương pháp khác trước khi tái tổ hợp. Polynucleotit mã hóa mảnh gắn kết kháng nguyên kháng thể của nó gắn kết đặc hiệu với vùng thân của TSLP có thể được tái tổ hợp với một hoặc nhiều thành phần, motif, khu vực, phần, miền, mảnh, v.v. của một hoặc nhiều phân tử không tương đồng.

Hơn nữa, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được dung hợp với các trình tự chất đánh dấu, chẳng hạn như peptit để tạo điều kiện cho việc tinh chế. Theo một phương án, trình tự axit amin chất đánh dấu là hexa-histidin peptit, chẳng hạn như đuôi được đề xuất trong vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), v.v., nhiều trong số này sẵn có trên thị trường. Như được mô tả trong Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, ví dụ, hexa-histidin đem lại quá trình tinh chế protein dung hợp thuận lợi. Các đuôi peptit khác hữu ích để tinh chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thể hemagglutinin ("HA"), tương ứng với epitop có nguồn gốc từ protein influenza hemagglutinin (Wilson *et al.*, 1984, Cell 37:767), và thể "FLAG".

Theo một phương án, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế liên hợp với chất chẩn đoán hoặc chất phát hiện. Các kháng thể này có thể hữu ích để theo dõi hoặc dự báo sự khởi phát, phát triển, tiến triển và/ hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn như là một phần của quy trình kiểm tra lâm sàng, chẳng hạn như xác định hiệu quả của liệu pháp cụ thể. Sự chẩn đoán và phát hiện này có thể thực hiện bằng cách ghép đôi kháng thể với chất phát hiện bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhiều enzym khác nhau, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở,

peroxidaza củ cải ngựa (horseradish peroxidaza), alkaline phosphatase, beta-galactosidase, hoặc acetylcholinesterase; các nhóm prosthetic, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, streptavidin/biotin và avidin/biotin; các vật liệu huỳnh quang, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, umbelliferon, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, diethylstilbestrol fluorescein, dansyl chloride hoặc phycoerythrin; vật liệu phát quang, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, luminol; vật liệu phát quang sinh học, chẳng hạn như nhưng không giới hạn ở, luciferase, luciferin, và aequorin; vật liệu phóng xạ, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, iot (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , và ^{121}I), cacbon (^{14}C), lưu huỳnh (^{35}S), triti (^3H), indi (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , và ^{111}In), technetium (^{99}Tc), thali (^{201}Tl), gali (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladi (^{103}Pd), molybden (^{99}Mo), xenon (^{133}Xe), flo (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , và ^{117}Tm ; và kim loại phát xạ positron sử dụng nhiều phương pháp chụp cắt lớp phát xạ positron khác nhau, và các ion kim loại thuận từ không phóng xạ.

Ngoài ra, mảnh gắn kết kháng nguyên kháng thể của nó có thể liên hợp với gốc điều trị hoặc gốc dược chất. Các gốc điều trị hoặc các gốc dược chất không được hiểu là bị giới hạn ở các chất điều trị hóa học cổ điển. Ví dụ, gốc dược chất có thể là protein, peptit, hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học mong muốn. Các protein có thể bao gồm, ví dụ, toxin chẳng hạn như abrin, ricin A, exotoxin của trực khuẩn, cholera toxin, hoặc diphtheria toxin; protein chẳng hạn như yếu tố hoại tử khối u, alpha-interferon, beta-interferon, yếu tố tăng trưởng thần kinh, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu, chất hoạt hóa plasminogen của mô, chất gây chế tế bào, chất chống quá trình tạo mạch máu; hoặc, chất biến đổi đáp ứng sinh học chẳng hạn như, ví dụ, lymphokine.

Hơn nữa, kháng thể có thể được liên hợp với các gốc điều trị chẳng hạn như ion kim loại phóng xạ, chẳng hạn như nguồn phát xạ alpha chẳng hạn như ^{213}Bi hoặc chất tạo chelat vòng lớn hữu ích để liên hợp các ion phóng xạ kim loại, bao gồm nhưng không giới hạn ở, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , với các polypeptit. Theo một phương án, chất tạo chelat vòng lớn này là axit 1,4,7,10-tetraazacyclododecan- $\text{N,N',N'',N'''}\text{-tetraacetic}$ (DOTA) mà có thể được gắn vào kháng thể thông qua mối liên kết phân tử. Mối liên kết phân tử này đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực này và được

mô tả trong Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4 (10):2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10 (4):553-7; và Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26 (8):943-50, mỗi tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu trong toàn bộ nội dung của nó.

Các kỹ thuật để liên hợp các gốc điều trị với các kháng thể đã được biết rõ, xem, ví dụ, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", trong Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), trang 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", trong Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), trang 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", trong Monoclonal Antibodies 84: Biological and Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), trang 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", trong Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), trang 303-16 (Academic Press 1985), và Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

Các kháng thể cũng có thể được gắn vào các chất hỗ trợ rắn, là các chất đặc biệt hữu ích cho các thử nghiệm miễn dịch hoặc tinh chế kháng nguyên đích. Các chất hỗ trợ rắn này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thủy tinh, xenluloza, polyacrylamit, nylon, polystyren, polyvinyl clorua hoặc polypropylen.

Các axit nucleic mã hóa các kháng thể

Sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic về cơ bản là tinh sạch mã hóa các polypeptit chứa các đoạn hoặc miền của các kháng thể TSLP được mô tả ở trên. Các polynucleotit này có thể mã hóa ít nhất một vùng CDR và thường là cả ba vùng CDR từ chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của các kháng thể TSLP được mô tả ở đây. Các polynucleotit này cũng có thể mã hóa toàn bộ hoặc gần như là toàn bộ trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và/ hoặc chuỗi nhẹ của các kháng thể TSLP được mô tả ở đây. Các polynucleotit này cũng có thể mã hóa cả vùng biến đổi và vùng cố định của kháng thể. Do sự thoái hóa của mã, một loạt trình tự axit nucleic sẽ mã hóa cho mỗi trình tự axit amin globulin miễn dịch.

Trình tự polynucleotit có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp ADN pha rắn *de novo* hoặc tạo đột biến bằng PCR trên trình tự hiện có (ví dụ, các trình tự như được

mô tả trong phần Ví dụ bên dưới) mã hóa kháng thể gắn kết TSLP hoặc mảnh gắn kết của nó. Tổng hợp hóa học trực tiếp các axit nucleic có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, chẳng hạn như phương pháp phosphotrieste của Narang *et al.*, 1979, Meth. Enzymol. 68:90; phương pháp phosphodiester của Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; phương pháp diethylphosphoramidit của Beaucage *et al.*, Tetra. Lett., 22:1859, 1981; và phương pháp trộn rắn theo công bố đơn sáng chế Mỹ số 4,458,066. Việc đưa các đột biến vào trình tự polynucleotit bằng PCR có thể được tiến hành như được mô tả trong, ví dụ, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods và Applications, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; và Eckert *et al.*, PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

Sáng chế cũng đề xuất các vector biểu hiện và các tế bào chủ để sản xuất các kháng thể gắn kết TSLP được mô tả ở trên. Các vector biểu hiện khác nhau có thể được dùng để biểu hiện các polynucleotit mã hóa các chuỗi hoặc mảnh gắn kết của kháng thể gắn kết TSLP. Các vector không phải virus và vector có nguồn gốc virus có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể ở tế bào chủ động vật có vú. Các vector không phải virus và các hệ bao gồm plasmit, các vector bổ sung (episomal), thông thường có catxet biểu hiện để biểu hiện protein hoặc ARN, và các nhiễm sắc thể nhân tạo của người (xem, ví dụ, Harrington *et al.*, Nat Genet. 15:345, 1997). Ví dụ, các vector không phải virus hữu dụng để biểu hiện các polynucleotit gắn kết TSLP và các polypeptit ở động vật có vú (ví dụ, người) các tế bào bao gồm pThioHis A, B & C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B & C, (Invitrogen, San Diego, Calif.), các vector MPSV, và các vector đã biết khác trong lĩnh vực này để biểu hiện các protein khác nhau. Các vector virus hữu dụng bao gồm các vector dựa trên retrovirus, adenovirus, virus có liên quan đến adeno, virus herpes, các vector dựa trên SV40, virus papilloma, virus HBP Epstein Barr, các vector virus vaccinia và virus Semliki Forest (SFV). Xem, Brent *et al.*, supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; và Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143, 1992.

Việc lựa chọn vector biểu hiện phụ thuộc vào các tế bào chủ dự định trong đó vector này được biểu hiện. Thông thường, các vector biểu hiện chứa promoter và các trình tự điều hòa khác (ví dụ, yếu tố tăng cường) mà được liên kết điều khiển với các polynucleotit mã hóa mảnh gắn kết kháng nguyên chuỗi kháng thể gắn kết TSLP.

Theo một phương án, promotor cảm ứng được dùng để ngăn sự biểu hiện của trình tự quan tâm trừ khi trong điều kiện cảm ứng. Các promotor cảm ứng bao gồm, ví dụ, arabinoza, lacZ, promotor protein có liên kết với kim loại hoặc promotor sốc nhiệt. Việc nuôi cấy các sinh vật chuyển nhiễm có thể diễn ra trong các điều kiện không cảm ứng mà không thiên về hướng tập hợp để mã hóa trình tự mà các sản phẩm biểu hiện của chúng được dung nạp tốt hơn bởi các tế bào chủ. Ngoài các promotor, các yếu tố điều hòa khác cũng có thể bắt buộc hoặc cần thiết để biểu hiện đầy đủ chuỗi hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể gắn kết TSLP. Các yếu tố này thông thường bao gồm codon bắt đầu ATG và điểm gắn kết ribosom liền kề hoặc các trình tự khác. Ngoài ra, hiệu quả biểu hiện có thể được tăng cường bằng cách thêm các yếu tố tăng cường thích hợp đối với hệ tế bào khi sử dụng (xem, ví dụ, Scharf *et al.*, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; và Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Ví dụ, yếu tố tăng cường SV40 hoặc yếu tố tăng cường CMV có thể được sử dụng để tăng biểu hiện ở các tế bào chủ động vật có vú.

Các vector biểu hiện cũng có thể cung cấp vị trí trình tự của tín hiệu tiết để tạo thành protein dung hợp có các polypeptit được mã hóa bởi trình tự kháng thể gắn kết TSLP được thêm vào. Thường là, các trình tự kháng thể gắn kết TSLP được thêm vào được liên kết với trình tự tín hiệu trước khi bổ sung vào trong vector này. Các vector được sử dụng để nhận các trình tự mã hóa miền biến đổi trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể gắn kết TSLP, đôi khi cũng mã hóa các vùng cố định hoặc phần của nó. Các vector này cho phép biểu hiện vùng biến đổi như là protein dung hợp có các vùng cố định theo đó dẫn đến sự sản xuất các kháng thể nguyên vẹn và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Thông thường, các vùng cố định này là của người.

Các tế bào chủ mang và biểu hiện các chuỗi của kháng thể gắn kết TSLP có thể là tế bào nhân sơ hoặc nhân thực. *E. coli* là một tế bào chủ nhân sơ hữu dụng để tách dòng và biểu hiện các polynucleotit theo sáng chế. Các tế bào chủ vi khuẩn khác hữu dụng để sử dụng bao gồm bacillus, chẳng hạn như *Bacillus subtilis*, và họ vi khuẩn đường ruột (enterobacteriaceae) khác, chẳng hạn như *Salmonella*, *Serratia*, và các loài trực khuẩn (*Pseudomonas*) khác. Trong các vật chủ nhân sơ này, vật chủ cũng có thể tạo biểu hiện các vector biểu hiện, mà thông thường chứa trình tự kiểm soát biểu hiện tương thích với tế bào chủ (ví dụ, điểm khởi đầu sao chép). Ngoài ra, một số promotor đã biết bất kỳ sẽ có mặt, chẳng hạn như hệ promotor lactoza, hệ promotor tryptophan

(trp), hệ promotor beta-lactamaza, hoặc hệ promotor từ khuẩn lambda. Các promotor thông thường kiểm soát biểu hiện, một cách tùy ý với trình tự điều khiển, và có trình tự điểm gắn kết ribosom và tương tự, để khởi đầu và hoàn thành việc phiên mã và dịch mã. Các vi khuẩn khác, chẳng hạn như nấm men, cũng có thể được dùng để biểu hiện các polypeptit gắn kết TSLP theo sáng chế. Các tế bào của côn trùng kết hợp với các vector virus baculo cũng có thể được sử dụng.

Theo một phương án, các tế bào chủ của động vật có vú được sử dụng để biểu hiện và sản xuất các polypeptit gắn kết TSLP theo sáng chế. Ví dụ, chúng có thể là dòng tế bào lai biểu hiện các gen globulin miễn dịch nội sinh (ví dụ, dòng tế bào lai u tủy 1D6.C9 như được mô tả trong phần Ví dụ) hoặc dòng tế bào động có vú mang vector biểu hiện ngoại sinh (ví dụ, các tế bào u tủy SP2/0 được mô tả bên dưới). Chúng bao gồm tế bào của người hoặc động vật chết bình thường hoặc bất tử bình thường hoặc bất thường. Ví dụ, một số dòng tế bào chủ phù hợp có khả năng tiết các globulin miễn dịch nguyên vẹn được phát triển bao gồm các dòng tế bào CHO, các dòng tế bào Cos, tế bào HeLa, dòng tế bào u tủy, các tế bào B chuyển nhiễm và tế bào lai. Việc sử dụng nuôi cấy mô tế bào động vật có vú để biểu hiện các polypeptit được bàn luận trong, ví dụ, Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Các vector biểu hiện đối với các tế bào chủ động vật có vú có thể bao gồm các trình tự kiểm soát biểu hiện, chẳng hạn như điểm khởi đầu sao chép, promotor, và yếu tố tăng cường (xem, ví dụ, Queen, *et al.*, Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), và các điểm xử lý thông tin cần thiết, chẳng hạn như điểm gắn kết ribosom, điểm nối ARN, điểm polyadenyl hóa, và các trình tự kết thúc phiên mã. Các vector biểu hiện này thường chứa các promotor có nguồn gốc từ các gen của động vật có vú hoặc từ virus của động vật có vú. Các promotor phù hợp có thể có thể là cơ định, đặc hiệu kiểu tế bào, đặc hiệu giai đoạn, và/ hoặc có thể điều biến hoặc có thể điều hòa. Các promotor hữu dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, promotor protein có liên kết với kim loại, promotor muộn chính của virus adeno cơ định, promotor MMTV cảm ứng dexametason, promotor SV40, promotor MRP polIII, promotor MPSV cơ định, promotor CMV cảm ứng tetracyclin (chẳng hạn như promotor CMV sớm ở người), promotor CMV cơ định, và các tổ hợp promotor-yếu tố tăng cường đã biết trong lĩnh vực này.

Các phương pháp để đưa các vector biểu hiện chứa trình tự polynucleotit quan tâm thay đổi phụ thuộc vào loại tế bào chủ. Ví dụ, chuyển canxi clorua thường được

dùng cho các tế bào nhân sơ, trong khi việc xử lý canxi phosphat hoặc xung điện có thể được sử dụng cho các tế bào chủ khác nhau. (Xem Sambrook, *et al.*, *supra*). Các phương pháp khác bao gồm, ví dụ, xung điện, xử lý canxi phosphat, vận chuyển qua liposom, tiêm và vi tiêm, phương pháp đạn đạo (ballistic method), virosom, liposom miễn dịch, thể liên hợp polycation:axit nucleic, ADN trần, virion nhân tạo, dung hợp vào protein VP22 cấu trúc virus herpes (Elliot và O'Hare, *Cell* 88:223, 1997), chất tăng cường hấp thụ của ADN, và chuyển nạp *ex vivo*. Về lâu dài, sự sản xuất protein tái tổ hợp hiệu suất cao, biểu hiện ổn định là được mong muốn. Ví dụ, các dòng tế bào mà biểu hiện ổn định các chuỗi hoặc mảnh gắn kết của kháng thể gắn kết TSLP có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các vector biểu hiện theo sáng chế mà chứa điểm khởi đầu sao chép của virus hoặc thành phần biểu hiện ngoại sinh và gen đánh dấu chọn lọc. Sau khi đưa các vector này vào, các tế bào có thể lớn lên trong 1-2 ngày trong môi trường làm giàu trước khi chuyển đổi sang môi trường chọn lọc. Mục đích của yếu tố đánh dấu chọn lọc là để đem lại tính kháng để chọn lọc, và sự có mặt của nó làm cho sự lớn lên của tế bào biểu hiện thành công các trình tự được đưa vào trong môi trường chọn lọc. Tính kháng, các tế bào được chuyển nhiễm ổn định có thể được tăng sinh bằng cách sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô thích hợp với loại tế bào cấy.

Tạo các kháng thể và các mảnh kháng thể

Các kháng thể đơn dòng (mAb) có thể được sản xuất bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm phương pháp tạo kháng thể đơn dòng thông thường, ví dụ, kỹ thuật lai tạo tế bào soma tiêu chuẩn theo Kohler và Milstein, 1975 *Nature* 256: 495. Nhiều kỹ thuật để sản xuất kháng thể đơn dòng có thể được dùng ví dụ, chuyển đổi virus hoặc gây ung thư của tế bào lympho B.

Hệ động vật để sản xuất tế bào lai là hệ chuột. Việc sản xuất tế bào lai ở chuột là quy trình đã được tạo sẵn. Quy trình kỹ thuật gây miễn dịch để phân lập tế bào lách được gây miễn dịch để dung hợp đã biết trong lĩnh vực này. Các đối tác dung hợp (ví dụ, tế bào u tủy của chuột) và quy trình dung hợp là đã biết.

Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể đơn dòng được làm giống như của người. Các kháng thể dạng khảm hoặc được làm giống như của người và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể được điều chế dựa trên trình tự kháng thể đơn dòng của chuột được sản xuất như được mô tả ở trên. ADN mã hóa globulin miễn dịch của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể thu được từ

tế bào lai của chuột quan tâm và thiết kế để chứa trình tự globulin miễn dịch không phải của chuột (ví dụ, người) sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Ví dụ, để tạo kháng thể thể khảm, các vùng biến đổi của chuột có thể được liên kết với vùng cố định của người sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 4,816,567 cấp cho Cabilly et al.). Để tạo kháng thể được làm giống như của người, các vùng CDR của chuột có thể được chèn vào vùng khung của người sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Xem ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 5,225,539 cấp cho Winter, và các bằng sáng chế Mỹ số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 cấp cho Queen et al.

Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể đơn dòng của người. Các kháng thể đơn dòng ở người này chống lại TSLP có thể được tạo bằng cách sử dụng chuột chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể mang các phần của hệ miễn dịch của người hơn là hệ chuột. Chuột chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể này bao gồm chuột được đề cập ở đây như là chuột HuMAb và chuột KM, tương ứng, và được gọi chung ở đây là là “chuột mang Ig của người (human IgG mice).”

HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) chứa các minilocus trên gen globulin miễn dịch của người mà mã hóa các trình tự globulin miễn dịch trên chuỗi nhẹ kappa và chuỗi nặng (mu và gamma) của người không được sắp xếp, cùng với đột biến nhắm đích mà làm bất hoạt các locus trên chuỗi mu và kappa nội sinh (xem ví dụ, Lonberg, *et al.*, 1994 *Nature* 368 (6474): 856-859). Theo đó, chuột biểu lộ sự biểu hiện giảm IgM hoặc K của chuột, và để đáp ứng với gây miễn dịch, việc chuyển gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được đưa vào trải qua chuyển lớp và đột biến soma để tạo kháng thể đơn dòng IgG-kappa của người có ái lực cao (Lonberg, N. *et al.*, 1994 *supra*; xem Lonberg, N., 1994 *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. và Huszar, D., 1995 *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, và Harding, F. và Lonberg, N., 1995 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Việc sản xuất và sử dụng chuột HuMAb, và các biến đổi hệ gen diễn ra ở những con chuột này, còn được mô tả trong Taylor, L. *et al.*, 1992 *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.*, 1993 *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille *et al.*, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724; Choi *et al.*, 1993 *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.*, 1993 *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille *et al.*, 1994 *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.*, 1994 *International Immunology* 579-591; và Fishwild, D. *et al.*, 1996 *Nature*

Biotechnology 14: 845-851, các tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu đến toàn bộ nội dung của nó. Xem thêm, bằng sáng chế Mỹ số 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; và 5,770,429; cấp cho Lonberg và Kay; bằng sáng chế Mỹ số 5,545,807 cấp cho Surani et al.; công bố đơn sáng chế PCT số WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 và WO 99/45962, cấp cho Lonberg và Kay; và công bố đơn PCT số WO 01/14424 cấp cho Korman et al.

Theo một số phương án, các kháng thể của người có thể được có thể được sản sinh bằng các sử dụng chuột mang trình tự globulin miễn dịch của người để chuyển gen và chuyển nhiễm sắc thể chẳng hạn như chuột mang chuyển gen chuỗi nặng của người và chuyển nhiễm sắc thể chuỗi nhẹ của người người. Chuột này, được dùng để chỉ ở đây như “chuột KM”, được mô tả chi tiết trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 02/43478 cấp cho Ishida et al.

Hơn nữa, hệ động vật chuyển gen khác biểu hiện gen globulin miễn dịch của người là sẵn có trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để sản sinh các kháng thể gắn kết TSLP và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Ví dụ, hệ chuyển gen khác được đề cập đến như chuột Xeno (Abgenix, Inc.) có thể được sử dụng. Chuột này được mô tả trong, ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 và 6,162,963 cấp cho Kucherlapati et al.

Hơn nữa, các hệ động vật chuyển nhiễm sắc thể khác nhau biểu hiện gen globulin miễn dịch của người là sẵn có trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để sản sinh các kháng thể gắn kết TSLP theo sáng chế. Ví dụ, chuột mang cả chuyển nhiễm sắc thể chuỗi nặng của người và chuyển nhiễm sắc thể chuỗi nhẹ của người, dùng để chỉ “chuột TC” có thể được sử dụng; chuột này được mô tả trong Tomizuka *et al.*, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Ngoài ra, bò mang chuyển nhiễm sắc thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người đã được mô tả trong lĩnh vực này (Kuroiwa *et al.*, 2002 Nature Biotechnology 20:889-894) và có thể được sử dụng để sản sinh các kháng thể gắn kết TSLP theo sáng chế.

Các kháng thể đơn dòng của người cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện trên thực khuẩn thể để sàng lọc các thư viện gen globulin miễn dịch của người. Các phương pháp biểu hiện trên thực khuẩn thể để phân lập các kháng thể của người đã được thiết lập trong lĩnh vực này hoặc được mô tả trong các ví

dụ bên dưới. Xem ví dụ: bằng sáng chế Mỹ số 5,223,409; 5,403,484; và 5,571,698 cấp cho Ladner et al; bằng sáng chế Mỹ số 5,427,908 và 5,580,717 cấp cho Dower et al; bằng sáng chế Mỹ số 5,969,108 và 6,172,197 cấp cho McCafferty et al; và bằng sáng chế Mỹ số 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 và 6,593,081 cấp cho Griffiths et al.

Các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng chuột SCID mà các tế bào miễn dịch của người được tái thiết lập vào chúng để đáp ứng kháng thể của người có thể được tạo ra khi gây miễn dịch. Những con chuột này được mô tả trong, ví dụ, các bằng sáng chế Mỹ số 5,476,996 và 5,698,767 cấp cho Wilson et al.

Các mảnh Fab của kháng thể, hay các Fab, có thể được tạo ra bằng cách phân hủy các kháng thể đơn dòng bằng papain và sau đó tinh chế bằng sắc ký ái lực. Fab cũng có thể được tạo ra bằng tổng hợp tái tổ hợp sử dụng các axit nucleic mã hóa Fab như được mô tả ở trên. Các mảnh Fab có thể giữ lại tính đặc hiệu liên kết và/ hoặc hoạt tính của phân tử IgG dài đầy đủ, nhưng có kích thước nhỏ hơn và có trọng lượng phân tử thấp hơn, điều này có thể khiến chúng phù hợp với các ứng dụng khác nhau so với phân tử IgG phân tử dài đầy đủ.

Thiết kế vùng khung và vùng Fc

Các kháng thể được thiết kế và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế bao gồm các kháng thể được thiết kế và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng trong đó các biến thể được tạo ra đối với các gốc của vùng khung trong VH và/ hoặc VL, ví dụ để cải thiện các đặc tính của kháng thể. Thông thường các biến thể vùng khung này được tạo ra để làm giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể. Ví dụ, một phương pháp là “tạo đột biến ngược” một hoặc nhiều gốc của vùng khung cho trình tự dòng mầm tương ứng. Cụ thể hơn, kháng thể đã bị đột biến soma có thể chứa các gốc của vùng khung khác so với trình tự dòng mầm mà kháng thể được tạo ra từ đó. Các gốc này có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự vùng khung của kháng thể với các trình tự dòng mầm mà kháng thể được tạo ra từ đó. Để biến các trình tự vùng khung thành cấu hình dòng mầm của chúng, các đột biến soma có thể được “tạo đột biến ngược” thành trình tự dòng mầm, ví dụ, bằng cách gây đột biến điểm định hướng. Các kháng thể “đột biến ngược” này cũng nhằm để được bao gồm trong sáng chế.

Một loại biến thể vùng khung khác bao gồm tạo đột biến một hoặc nhiều các gốc trong vùng khung, hoặc thậm chí trong một hoặc nhiều vùng CDR, để loại bỏ epitop tế bào T để theo đó làm giảm tính sinh miễn dịch tiềm tàng của kháng thể. Phương pháp này cũng được gọi là “khử miễn dịch” và được mô tả chi tiết hơn trong Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20030153043 của Carr *et al.*, .

Ngoài các biến thể được tạo ra trong các vùng khung hoặc CDR, các kháng thể theo sáng chế có thể được thiết kế để bao gồm các biến thể trong vùng Fc, thông thường để làm thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể, chẳng hạn như thời gian bán hủy trong huyết thanh, cố định bổ thể, gắn kết thụ thể Fc, và/ hoặc sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể được cải biến về mặt hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn vào kháng thể) hoặc được cải biến để làm thay đổi sự glycosyl hóa của nó, để lại làm thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể. Mỗi phương án trong số các phương án này được mô tả chi tiết hơn sau đây. Việc đánh số các gốc trong vùng Fc là của chỉ số EU theo cách đánh số của Kabat.

Theo một phương án, vùng bản lề CH1 được cải biến sao cho số lượng các gốc cystein trong vùng bản lề được thay đổi, ví dụ, tăng hoặc giảm. Phương pháp này được mô tả cụ thể hơn trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 5,677,425 của Bodmer *et al.*, . Số lượng các gốc cystein trong vùng bản lề CH1 được thay đổi, ví dụ, để tạo thuận lợi cho việc lắp ráp các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc để làm tăng hoặc làm giảm tính ổn định của kháng thể.

Theo phương án khác, vùng bản lề Fc của kháng thể được gây đột biến để làm giảm chu kỳ bán rã sinh học của kháng thể. Cụ thể hơn, một hoặc nhiều đột biến axit amin được đưa vào vùng giao diện miền CH2-CH3 của mảnh bản lề Fc sao cho kháng thể có gắn kết Staphylococcal protein A (SpA) giảm so với gắn kết SpA miền bản lề Fc-nguyên bản. Phương pháp này được mô tả cụ thể hơn trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 6,165,745 của Ward *et al.*, .

Theo phương án khác, kháng thể được cải biến để làm tăng thời gian bán hủy sinh học của nó. Có thể có nhiều phương pháp khác. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến sau đây có thể được đưa vào: T252L, T254S, T256F, như được mô tả trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 6,277,375 của Ward. Theo cách khác, để tăng thời gian bán hủy sinh học, kháng thể có thể được tạo thay đổi trong vùng CH1 hoặc

CL để bao gồm thụ thể cứu hộ gắn kết với epitop thu được từ hai loops miền CH2 của vùng Fc của IgG, như được mô tả trong các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 5,869,046 và 6,121,022 của Presta *et al.*, .

Theo một phương án, vùng Fc được tạo thay đổi bằng cách thay thế ít nhất một gốc axit amin bằng gốc axit amin khác để làm thay đổi các chức năng tác động của kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể có ái lực thay đổi đối với phối tử tác động nhưng vẫn giữ khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể bố mẹ. Phối tử tác động mà ái lực thay đổi có thể là, ví dụ, thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của bổ thể. Phương pháp này được mô tả cụ thể hơn trong bằng sáng chế Mỹ số 5,624,821 và 5,648,260, của Winter *et al.*, .

Theo phương án khác, một hoặc nhiều axit amin mà được chọn từ các gốc axit amin có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể thay đổi sự gắn kết với C1q và/ hoặc giảm hoặc loại bỏ sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Phương pháp này được mô tả cụ thể hơn trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 6,194,551 của Idusogie *et al.*, .

Theo phương án khác, một hoặc nhiều gốc axit amin được làm thay đổi theo đó để làm thay đổi khả năng của kháng thể kháng thể để cố định bổ thể. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 94/29351 của Bodmer *et al.*, .

Theo phương án khác nữa, vùng Fc được cải biến để làm tăng khả năng của kháng thể để làm trung gian cho sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/ hoặc để làm tăng ái lực của kháng thể đối với thụ thể Fc-gama bằng cách cải biến một hoặc nhiều axit amin. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong công bố đơn PCT số WO 00/42072 của Presta. Hơn nữa, các vị trí gắn kết trên IgG1 của người đối với Fc-gama RI, Fc-gama RII, Fc-gama RIII và FcRn đã được lập bản đồ và các biến thể có sự gắn kết cải thiện đã được mô tả (xem Shields, R. L. *et al.*, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

Vẫn theo phương án khác, sự glycosyl hóa của kháng thể được cải biến. Ví dụ, kháng thể aglycosyl hóa có thể được tạo ra (nghĩa là, kháng thể không có sự glycosyl hóa). Sự glycosyl hóa có thể được thay đổi, ví dụ, để làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên. Các biến thể hydratecarbon này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách thay đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong trình tự kháng thể. Ví dụ, một

hoặc nhiều phần tử thể axit amin có thể được tạo ra dẫn đến sự loại bỏ một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa vùng khung trên vùng biến đổi theo đó loại bỏ sự glycosyl hóa ở vị trí đó. Sự aglycosyl hóa này có thể làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên. Phương pháp này được mô tả cụ thể hơn trong U.S. Pat. NO. 5,714,350 và 6,350,861 của Co *et al.*, .

Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể có thể được tạo ra có loại glycosyl hóa thay đổi, chẳng hạn như kháng thể hypofucosyl hóa có lượng các gốc fucosyl giảm hoặc kháng thể có các cấu trúc GlcNac cắt làm đôi tăng. Các kiểu glycosyl hóa thay đổi này đã được cho thấy để làm tăng khả năng ADCC của các kháng thể. Các biến thể hydratcacbon này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ bộ máy glycosyl hóa thay đổi. Các tế bào có bộ máy glycosyl hóa thay đổi đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật và có thể được sử dụng dưới dạng các tế bào chủ trong đó biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế để theo đó tạo kháng thể có sự glycosyl hóa thay đổi. Ví dụ, EP 1,176,195 của Hang *et al.*, mô tả dòng tế bào có gen FUT8 gián đoạn về mặt chức năng, gen này mã hóa fucosyl transferaza, sao cho các kháng thể biểu hiện trong dòng tế bào thể hiện sự hypofucosyl hóa. Công bố đơn PCT số WO 03/035835 của Presta mô tả dòng tế bào CHO biến thể, tế bào LecI3, có khả năng gắn fucoza với các hydratcacbon-liên kết Asn (297) giảm, cũng dẫn đến sự hypofucosyl hóa của các kháng thể được biểu hiện trong tế bào chủ đó (cũng xem Shields, R. L. *et al.*, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Công bố đơn PCT số WO 99/54342 của Umana *et al.*, . mô tả các dòng tế bào được thiết kế để biểu hiện glycoprotein-cải biến glycosyl transferaza (ví dụ, beta (1,4)--N axetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) sao cho các kháng thể được biểu hiện trong các dòng tế bào được thiết kế thể hiện các cấu trúc GlcNac cắt làm đôi tăng dẫn đến hoạt tính ADCC của các kháng thể tăng (cũng xem Umana *et al.*, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

Các phương pháp thiết kế kháng thể được thay đổi

Như được thảo luận ở trên, các kháng thể gắn kết TSLP có các trình tự VH và VL hoặc các trình tự của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ được thể hiện ở đây có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể gắn kết TSLP mới bằng cách cải biến các trình tự của chuỗi nặng và/ hoặc chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ, các trình tự VH và/ hoặc VL, hoặc (các) vùng cố định gắn ở đó. Do vậy, theo khía cạnh khác theo sáng

ché, các dấu hiệu cấu trúc của kháng thể gắn kết TSLP theo sáng chế được sử dụng để tạo các kháng thể gắn kết TSLP có liên quan về mặt cấu trúc mà vẫn giữ ít nhất một đặc tính chức năng của các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, chẳng hạn như gắn kết với TSLP của người.

Ví dụ, một hoặc nhiều vùng CDR của các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, hoặc đột biến của chúng, có thể được tổ hợp tái tổ hợp với các vùng khung và/ hoặc các CDR khác để tạo ra các kháng thể gắn kết TSLP được thiết kế tái tổ hợp bổ sung và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, như được thảo luận ở trên. Các loại biến thể khác bao gồm các biến thể được mô tả trong phần trên. Nguyên liệu khởi đầu cho phương pháp thiết kế này là một hoặc nhiều trong số các trình tự VH và/ hoặc VL được đề xuất ở đây, hoặc một hoặc nhiều vùng CDR của chúng. Để tạo ra kháng thể được thiết kế, không nhất thiết phải thực sự tạo ra (nghĩa là, biểu hiện dưới dạng protein) kháng thể có một hoặc nhiều trong số các trình tự VH và/ hoặc VL được đề xuất ở đây, hoặc một hoặc nhiều vùng CDR của chúng. Ngoài ra, thông tin chứa trong (các) trình tự này được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để tạo ra (các) trình tự “thế hệ thứ hai” có nguồn gốc từ (các) trình tự gốc và tiếp đó (các) trình tự “thế hệ thứ hai” được tạo ra và được biểu hiện dưới dạng protein. [001] Trình tự kháng thể thay đổi cũng có thể được tạo ra bằng cách sàng lọc các thư viện kháng thể có các trình tự CDR3 cố định hoặc các quyết định gắn kết thiết yếu tối thiểu như được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ số US20050255552 và sự đa dạng về các trình tự CDR1 và CDR2. Việc sàng lọc có thể được tiến hành theo công nghệ sàng lọc bất kỳ thích hợp cho việc sàng lọc các kháng thể từ các thư viện kháng thể, chẳng hạn như công nghệ bộc lộ thực khuẩn thể.

Các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tạo ra và biểu hiện trình tự kháng thể thay đổi. Kháng thể mà được mã hóa bởi (các) trình tự kháng thể thay đổi là kháng thể mà vẫn giữ một, một số hoặc tất cả các đặc tính chức năng của các kháng thể gắn kết TSLP được mô tả ở đây, các đặc tính chức năng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gắn kết đặc hiệu và ổn định protein TSLP của người.

Các đặc tính chức năng của các kháng thể có thể được đánh giá sử dụng các thử nghiệm tiêu chuẩn sẵn có trong lĩnh vực này và/ hoặc được mô tả ở đây, chẳng hạn như các thử nghiệm được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế (ví dụ, ELISAs).

Theo một số phương án, các phương pháp thiết kế các kháng thể và mảnh gắn

kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, các đột biến có thể được đưa vào ngẫu nhiên hoặc có chọn lọc cùng với tất cả hoặc một phần của trình tự mã hóa kháng thể gắn kết TSLP và các kháng thể gắn kết TSLP cải biến thu được có thể được sàng lọc đối với hoạt tính gắn kết và/ hoặc các đặc tính chức năng khác như được mô tả ở đây. Các phương pháp tạo đột biến đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật. Ví dụ, công bố đơn PCT số WO 02/092780 của Short mô tả các phương pháp tạo ra và sàng lọc các đột biến kháng thể sử dụng đột biến bão hòa, lắp ráp nối tổng hợp, hoặc tổ hợp của chúng. Theo cách khác, công bố đơn PCT số WO 03/074679 của Lazar *et al.*, mô tả các phương pháp sử dụng các phương pháp sàng lọc có trợ giúp của máy vi tính để tối ưu hóa các đặc tính hóa lý của các kháng thể.

Mô tả đặc tính các kháng thể theo sáng chế

Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể được mô tả đặc tính bằng các thử nghiệm chức năng khác nhau. Ví dụ, chúng có thể được mô tả đặc tính bằng khả năng gắn kết của chúng với TSLP và ức chế hoạt tính TSLP.

Khả năng gắn kết của kháng thể với TSLP có thể được phát hiện bằng cách đánh dấu kháng thể quan tâm trực tiếp, hoặc kháng thể có thể không được đánh dấu và được phát hiện gắn kết gián tiếp bằng cách sử dụng các dạng thử nghiệm sandwich khác nhau đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, các kháng thể gắn kết TSLP và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế phong bế hoặc cạnh tranh gắn kết của kháng thể gắn kết TSLP tham chiếu với polypeptit TSLP. Các kháng thể gắn kết TSLP và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể là các kháng thể gắn kết TSLP hoàn toàn là của người hoặc được làm giống như của người. Chúng cũng có thể là các kháng thể gắn kết TSLP của người, chuột, khảm hoặc được làm giống như của người khác mà gắn kết với epitop tương tự kháng thể tham chiếu. Năng lực phong bế hoặc cạnh tranh với sự gắn kết của kháng thể tham chiếu cho thấy rằng kháng thể gắn kết TSLP trong thử nghiệm gắn kết với epitope giống hệt hoặc tương tự như epitope được xác định bởi kháng thể tham chiếu, hoặc gắn kết với epitop đủ gần với epitop mà được gắn kết bởi kháng thể gắn kết TSLP tham chiếu. Đặc biệt là, các kháng thể này có khả năng có chung các đặc tính có lợi đã được xác định đối với kháng thể tham chiếu. Năng lực phong bế hoặc cạnh tranh với kháng thể tham chiếu có thể được xác định

bằng, ví dụ, thử nghiệm gắn kết cạnh tranh. Với thử nghiệm gắn kết cạnh tranh, kháng thể trong thử nghiệm được thẩm định về khả năng ức chế gắn kết đặc hiệu của kháng thể tham chiếu với kháng nguyên thông thường, chẳng hạn như polypeptit TSLP. Kháng thể thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể tham chiếu về sự gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên nếu lượng dư kháng thể thử nghiệm ức chế về cơ bản sự gắn kết của kháng thể tham chiếu. Sự ức chế cơ bản có nghĩa là kháng thể thử nghiệm làm giảm sự gắn kết đặc hiệu kháng thể tham chiếu thường ít nhất 10%, 25%, 50%, 75%, hoặc 90%.

Có một số thử nghiệm gắn kết cạnh tranh đã biết mà có thể được sử dụng để đánh giá sự cạnh tranh của kháng thể với kháng thể tham chiếu cho việc gắn kết với protein cụ thể, trong trường hợp này, TSLP. Các thử nghiệm này bao gồm, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp (RIA), thử nghiệm miễn dịch pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp (EIA), thử nghiệm cạnh tranh dạng bánh kẹp (sandwich) (xem Stahli và *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242-253, 1983); EIA biotin-avidin pha rắn trực tiếp EIA (xem Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614-3619, 1986); thử nghiệm đánh dấu trực tiếp pha rắn, thử nghiệm sandwich đánh dấu trực tiếp pha rắn (xem Harlow & Lane, *supra*); RIA đánh dấu trực tiếp pha rắn sử dụng chất đánh dấu I-125 (xem Morel *et al.*, *Molec. Immunol.* 25:7-15, 1988); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546-552, 1990); và RIA đánh dấu trực tiếp (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82, 1990). Thông thường, thông thường thử nghiệm này bao gồm việc sử dụng kháng nguyên đã được tinh sạch gắn kết với bề mặt rắn hoặc các tế bào mang một trong hai, kháng thể gắn kết TSLP thử nghiệm không được đánh dấu và kháng thể tham chiếu được đánh dấu. Ức chế cạnh tranh được đo bằng cách xác định lượng chất đánh dấu gắn với bề mặt rắn hoặc gắn với các tế bào khi có mặt kháng thể thử nghiệm. Thông thường kháng thể thử nghiệm có mặt dư. Các kháng thể mà được xác định bằng thử nghiệm cạnh tranh (các kháng thể) bao gồm các kháng thể gắn kết với epitop tương tự kháng thể tham chiếu và các kháng thể gắn kết với epitop liền kề mà đủ gần với epitop mà được gắn kết bởi kháng thể tham chiếu để cản trở về mặt không gian.

Để xác định liệu các kháng thể đơn dòng gắn kết TSLP có gắn kết với epitop duy nhất, mỗi kháng thể có thể được biotinyl hóa sử dụng các chất phản ứng sẵn có trên thị trường (ví dụ, các chất phản ứng từ Pierce, Rockford, Ill.). Các nghiên cứu

cuộc tranh giành sử dụng các kháng thể đơn dòng không được đánh dấu và các kháng thể đơn dòng được biotinyl hóa có thể được tiến hành sử dụng các đĩa ELISA phủ polypeptit TSLP. Sự gắn kết của kháng thể đơn dòng được biotinyl hóa có thể được phát hiện bằng mẫu rò strep-avidin-kiềm phosphatase. Để xác định isotyp của kháng thể gắn kết TSLP đã được tinh sạch, ELISA isotyp có thể được tiến hành. Ví dụ, các giếng của đĩa vi chuẩn độ có thể được phủ 1 $\mu\text{g/ml}$ IgG kháng người qua đêm 4°C. Sau khi phong bế bằng BSA 1%, các đĩa được cho phản ứng với 1 $\mu\text{g/ml}$ hoặc ít hơn kháng thể đơn dòng gắn kết TSLP hoặc đối chứng isotyp tinh sạch, ở nhiệt độ xung quanh trong một hoặc hai giờ. Tiếp đó, các giếng này có thể được cho phản ứng với IgG1 người hoặc các mẫu rò kiềm phosphatase đặc hiệu IgM của người. Tiếp đó, các đĩa được cho hiện ảnh và được phân tích sao cho isotyp của kháng thể tinh sạch có thể được xác định.

Để cho thấy sự gắn kết của các kháng thể đơn dòng gắn kết TSLP đối với tế bào sống biểu hiện polypeptit TSLP, kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy có thể được sử dụng. Tóm lại, các dòng tế bào biểu hiện TSLP (sinh trưởng trong các điều kiện sinh trưởng tiêu chuẩn) có thể được trộn với các nồng độ khác nhau của kháng thể gắn kết TSLP trong PBS chứa BSA 0,1% và huyết thanh bào thai bò 10%, và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa, các tế bào này được cho phản ứng với kháng thể IgG kháng người được đánh dấu huỳnh quang trong các điều kiện tương tự việc nhuộm kháng thể sơ cấp. Các mẫu này có thể được phân tích bằng thiết bị FACScan sử dụng ánh sáng và các thuộc tính tán xạ bên để ngăn cản đối với các tế bào đơn. Thử nghiệm khác sử dụng kính hiển vi huỳnh quang có thể được sử dụng (cùng với hoặc thay cho) thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy. Các tế bào có thể được nhuộm chính xác như được mô tả ở trên và được thẩm định bằng kính hiển vi huỳnh quang. Phương pháp này cho phép hiển thị các tế bào đơn lẻ, nhưng có thể làm giảm độ nhạy phụ thuộc vào mật độ kháng nguyên.

Kháng thể gắn kết TSLP và của nó và mảnh gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể tiếp tục được kiểm tra cho khả năng phản ứng với polypeptit TSLP hoặc mảnh kháng nguyên bằng Western blot. Một cách ngắn gọn, polypeptit TSLP tinh sạch hoặc protein dung hợp, hoặc dịch chiết tế bào từ tế bào biểu hiện TSLP có thể được chuẩn bị và đưa vào điện di trên gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit. Sau khi điện di, kháng nguyên phân tách được chuyển lên màng

nitrocelluloza, phong bế bằng 10% huyết thanh thai bò, và lai với kháng thể đơn dòng được kiểm tra. Việc gắn kết với IgG người có thể được phát hiện được sử dụng alkaline phosphatase kháng IgG người và phát triển bằng viên nén cơ chất BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Ví dụ về thử nghiệm chức năng cũng được mô tả trong phần ví dụ phía dưới.

Dược phẩm và chế phẩm bào chế

Cũng được đề xuất ở đây là chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, có chứa một hoặc nhiều phân tử, ví dụ, kháng thể, mảnh kháng thể chẳng hạn Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, thể mini, hoặc thể địa, mà gắn kết đặc hiệu với TSLP, làm thành phần hoạt tính.

Dược phẩm thường bao gồm tá dược dược dụng. Tá dược dược dụng có thể bao gồm nước muối, dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất kháng khuẩn, chất kháng nấm, chất đẳng trương và tri hoãn hấp phụ, và các chất tương tự, tương thích với việc dùng cho dược phẩm. Dược phẩm thường được tạo thành chế phẩm bào chế để tương thích với đường dùng đã định. Ví dụ, để dùng bằng cách xông-hít, hợp chất có thể được vận chuyển dạng phun sol khí từ một vật chứa nén mà có hoặc dụng cụ phân tán mà có chứa nhiên liệu đẩy thích hợp, ví dụ, khí chẳng hạn như carbon dioxide, hoặc máy khí dung. Những phương pháp này bao gồm những phương pháp được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,468,798.

Theo một vài phương án, dược phẩm được đề xuất ở đây, được được tạo thành chế phẩm bào chế để vận chuyển có mục tiêu tới đường hô hấp của đối tượng, đặc biệt là phổi của đối tượng. Chế phẩm bào chế này có thể vượt qua được sự lắng đọng của thành phần hoạt tính ở đường tiêu hóa trên của đối tượng, do đó giảm thiểu khả năng dung nạp hoặc vấn đề an toàn liên quan đến sự lắng đọng thuốc trong miệng và cổ họng. Theo một vài phương án, dược phẩm được đề xuất ở đây được được tạo thành chế phẩm bào chế dạng bột. Chế phẩm bào chế dạng bột khô này có thể bao gồm cả thành phần hoạt tính, tá dược tạo vỏ, tá dược tạo trạng thái thủy tinh, và đệm.

Thành phần hoạt tính

Các thành phần hoạt tính của chế phẩm bào chế dạng bột khô có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng thể kháng TSLP và mảnh kháng thể được mô tả ở đây.

Lượng thành phần hoạt tính trong chế phẩm bào chế được có thể được điều chỉnh tới lượng có hiệu quả điều trị của thành phần hoạt tính trong một đơn vị liều để thu được kết quả mong muốn. Trong thực tế, lượng này sẽ khác nhau phụ thuộc vào thành phần cụ thể, hoạt tính của nó, sự nghiêm trọng của tình trạng cần được điều trị, quần thể bệnh nhân, yêu cầu về liều lượng, hiệu quả điều trị mong muốn và lượng tương đối phụ gia chứa trong chế phẩm. Chế phẩm thường bao gồm thành phần hoạt tính từ khoảng 1% theo khối lượng đến khoảng 99% theo khối lượng, ví dụ, thành phần hoạt tính khoảng 5% đến khoảng 95%, khoảng 10% đến khoảng 90%, khoảng 15% tới 85%, khoảng 20% tới 80%, khoảng 25% tới 75%, khoảng 30% tới 70%, khoảng 40% tới 60%, hoặc khoảng 50% theo khối lượng. Chế phẩm theo sáng chế hữu ích cho các thành phần hoạt tính mà được vận chuyển trong liều từ 0,001mg/ngày tới 100mg/ngày, tốt hơn là trong liều từ 0,01mg/ngày đến 75mg/ngày, và tốt hơn nữa là trong liều từ 0,10 mg/ngày tới 50mg/ngày. Người ta nên hiểu rằng, có thể có nhiều hơn 1 thành phần hoạt tính có thể được kết hợp vào chế phẩm như được mô tả ở đây và việc sử dụng thuật ngữ “thành phần hoạt tính” không loại trừ việc sử dụng hai hoặc nhiều thành phần hoạt tính này.

Tá dược

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có thể chứa tá dược được dụng kỵ nước tạo hình vỏ. Tá dược tạo hình vỏ là chất có hoạt tính bề mặt mà làm tăng sự phân tán của bột khô sấy phun. Tá dược kỵ nước tạo hình vỏ có thể có nhiều dạng phụ thuộc ít nhất vào ít nhất ở một mức độ vào chế phẩm và mục đích sử dụng của chế phẩm bào chế dạng bột khô. Tá dược được dụng kỵ nước thích hợp có thể, nói chung, được lựa chọn từ nhóm bao gồm phospholipit, axit amin và peptit kỵ nước, và xà phòng axit béo chuỗi dài

Theo một vài phương án, tá dược tạo hình vỏ bao gồm: glycin, alanin, valin, trileuxin, dileuxin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin, tryptophan, dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), distearoylphosphatidylcholin (DSPC), và kẽm stearat. Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây bao gồm cả trileuxin.

Bằng cách kiểm soát chế phẩm bào chế và quy trình, bề mặt của hạt làm khô bằng sấy phun có khả năng bao gồm chủ yếu là tá dược tạo hình vỏ. Nồng độ bề mặt

của tá dược tạo hình vỏ có thể lớn hơn 70%, chẳng hạn lớn hơn 75% hoặc 80% hoặc 85%. Theo một vài phương án, bề mặt chứa tá chất tủa nước lớn hơn 90%, hoặc lớn hơn 95% hoặc 98% hoặc 99%. Đối với các thành phần hoạt tính mạnh, không phải là không phổ biến việc bề mặt có chứa tá dược tạo hình vỏ lớn hơn 95%.

Theo một vài phương án, tá dược tạo hình vỏ có chứa giao diện hạt lớn hơn 70% như đo được bằng phổ học electron cho phân tích (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis-ESCA, cũng được biết đến như là phổ huỳnh quang tia X hoặc XPS), tốt hơn là lớn hơn 90% hoặc 95%.

Theo một vài phương án, tá dược tạo hình vỏ tạo thuận lợi cho sự phát triển của hình thái xù xì của hạt thuận lợi cho sự phát triển hình thái hạt xù xì. Điều này có nghĩa là hình thái hạt xốp, nhăn, gợn sóng, nhăn hơn là mịn. Điều này có nghĩa là mặt trong và/ hoặc mặt ngoài của hạt thuốc có thể xông-hít được ít nhất 1 phần xù xì. Sự xù xì này hữu ích cho việc đề xuất hiệu quả vận chuyển cao, sự nhất quán liều và thuốc nhắm mục tiêu bằng cách cải thiện sự hóa lỏng và sự phân tán bột. Sự tăng độ xù xì của hạt dẫn đến làm giảm lực kết dính như là kết quả của sự bất hoạt các hạt để tiếp cận bên trong tương tác van der Waals. Sự tăng lực kết dính đủ để cải thiện đáng kể sự dịch hóa và phân tác bột trong toàn bộ các hạt xù xì.

Nếu có, thành phần của tá dược tạo hình vỏ thường nằm trong khoảng 15 đến 50% khối lượng/ khối lượng của thuốc. Đối với trileuxin, tối thiểu khoảng 15% lượng yêu cầu trong chế phẩm bào chế để tạo ra hiệu suất chấp nhận được như một chất tạo hình vỏ. Đối với leuxin, lượng tối thiểu yêu cầu cao hơn, khoảng 30%

Việc sử dụng tá dược kỵ nước tạo hình vỏ chẳng hạn như trileuxin có thể hạn chế bởi sự hòa tan của nó trong nguyên liệu lỏng. Thông thường, lượng trileuxin trong một loại bột kỹ thuật là ít hơn 30% khối lượng/ khối lượng, thường xuyên hơn theo trật tự 10% khối lượng/ khối lượng đến 20% khối lượng/ khối lượng (khoảng 10-30% khối lượng/ khối lượng). Do độ hòa tan giới hạn trong nước và hoạt tính bề mặt của nó, trileuxin là chất tạo hình vỏ rất tốt. Leuxin có thể được sử dụng làm tá dược tạo hình vỏ và các phương án theo sáng chế có thể bao gồm các hạt có chứa nồng độ leuxin khoảng 50% đến 75%.

Xà phòng axit béo hoạt động tương tự như leuxin và trileuxin và các chất thay đổi bề mặt thích hợp.

Do thời gian ngắn của việc sấy, các thành phần hoạt tính được hòa tan trong nguyên liệu thường sẽ có mặt như chất rắn vô định hình trong sản phẩm thuốc đã sấy khô.

Sự di chuyển phân tử của chất rắn vô định hình khi so sánh với sự di chuyển của đối tác tinh thể của nó. Sự di chuyển phân tử các chuyển động trong phạm vi rộng cũng như chuyển động tại chỗ chẳng hạn như xoay liên kết. Nguyên tắc chính trong sự ổn định trạng thái rắn của vật liệu vô định hình là sự chuyển động phân tử dẫn đến những thay đổi lý học và hóa học không mong muốn. Do đó, chiến lược tạo chế phẩm bào chế cho các vật liệu vô định hình thường tập trung vào sự kìm hãm sự di động phân tử.

Sự tồn tại của các mối liên quan giữa sự chuyển động phân tử và sự không ổn định là trực quan và đã biết. Tuy nhiên, để hữu ích, sự chuyển động phân tử phải được định nghĩa một cách cẩn thận và phải được hiểu dưới góc độ các loại chuyển động hiện tại. Sự chuyển động trong phạm vi rộng của phân tử tăng từ giãn sự phục hồi cấu trúc, được biết đến là sự giãn α . Thời gian cho những chuyển động này làm tăng đáng kể vì nhiệt độ làm giảm nhiệt độ chuyển đổi thủy tinh dưới đây, (T_g), hoặc bảo tồn, vì T_g tăng ở nhiệt độ quan sát cố định. Do sự ổn định của phân tử trong thủy tinh hạn chế sự ổn định phân tử sự chuyển động phân tử trong phạm vi rộng, điều này trở thành chiến lược tạo chế phẩm bào chế phổ biến đối với sự ổn định trạng thái rắn của cá thuốc vô định hình.

Việc kiểm soát sự ổn định của chuyển động phân tử trong pha rắn, chẳng hạn như thông qua việc sử dụng các chất tạo trạng thái thủy tinh, có thể cải thiện sự ổn định hóa lý của protein trong chế phẩm bào chế. Khi chất tạo trạng thái thủy tinh cần thiết, nhiều sự cân nhắc sẽ chi phối việc lựa chọn nó. Vai trò chính của tá dược tạo trạng thái thủy tinh là để giảm giới hạn chuyển động toàn bộ phân tử của thuốc. Trong thực tế, điều này đi kèm với việc tăng nhiệt độ chuyển đổi thủy tinh của pha vô định hình mà có chứa thuốc. Trong khi các tá dược với giá trị T_g cao thường mong muốn, thậm chí tá dược với T_g trung bình có thể thích hợp cho một vài chế phẩm bào chế (ví dụ, thuốc với T_g trung bình hoặc nếu nồng độ thuốc trong chế phẩm bào chế là thấp). Để hướng dẫn người tạo chế phẩm bào chế, thật đáng để làm nổi bật đặc tính của chất tạo trạng thái thủy tinh lý tưởng: vật liệu tương thích sinh học với nhiệt độ đổi thủy

ting mà có thể phối trộn được với thuốc, tạo thành pha vô định hình mà chỉ được làm dẻo bằng nước.

[002] Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có chứa tá dược tạo trạng thái thủy tinh. Tá dược tạo trạng thái thủy tinh mà kim hãm chuyển động phân tử phạm vi rộng bao gồm carbohydrat, axit amin, và đệm. Theo một vài phương án, tá dược tạo trạng thái thủy tinh bao gồm: histidin, histidin HCl, sucroza, trehaloza, mannitol, và natri xitrat. Do đó một vài tá dược, chẳng hạn histidin, có thể được đề cập như là đệm hoặc tá dược tạo trạng thái thủy tinh có thể được sử dụng lẫn nhau. Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây, ví dụ, chế phẩm bào chế lõi-vỏ, có cả trehaloza.

Sự quan trọng của các loại chuyển động phân tử ngày càng được công nhận trong lĩnh vực dược. Khóa phân loại (α , β ,...) được sử dụng để chỉ loại chuyển động phân tử bắt nguồn từ quang phổ điện môi băng thông rộng. Phổ hồi phục điện môi thường thường được vẽ dựa trên phạm vi tần số. Khi phổ này được diễn giải, sự tồn thất điện môi đạt đỉnh ở tần số thấp nhất được ký hiệu là chuyển động α , tần số cao hơn chuyển động là chuyển động β , sau đó là γ , và Do đó, β và các chuyển động mà xảy ra ở tần số cao hơn được coi là “nhẹ” hoặc chuyển động bậc hai (và trong một vài trường hợp, sự hồi phục Johari-Goldstein). Mặc dù những sự giãn bậc hai này thường được cho là sự chuyển động nội phân tử những tiểu phân phân tử khác nhau (ví dụ, chuỗi bên của protein), chúng tồn tại thậm chí cho những phân tử cứng. Trong bức tranh cơ học đơn giản, chuyển động β đôi khi được mô tả là “sự bắt giữ” (cage rattling) ngẫu nhiên một loài bởi những phân tử xung quanh. Ở điểm này, chuyển động tại chỗ của các phân tử xung quanh đem lại thể tích tự do đủ để cho phép một bước nhảy không kiểm soát của loài bị bắt giữ. Đây là chuyển động α . Do đó, sự chuyển động β dẫn đến sự chuyển động α .

Chuyển động bậc hai là nghiên cứu năng động cả về quan điểm lý thuyết và thực tiễn. Và, mặc dù nhiều tài liệu tham khảo liên quan đến dạng thủy tinh đông khô hoặc tan chảy, các nguyên lý cũng liên quan đến các hạt vô định hình, kỹ thuật để xông-hít (ví dụ, bột được sản xuất sử dụng quy trình làm khô bằng sấy phun hoặc quy trình từ dưới lên). Tinh thể hóa các phân tử nhỏ gần Tg bị nghi là làm tăng chuyển động β . Những người tạo chế phẩm bào chế protein đã nhận thấy sự quan trọng của

việc kiểm soát những chuyển động β này. Sự kìm hãm chuyển động β trong chế phẩm bào chế vô định hình thường được thực hiện bằng những tá dược hữu cơ nhỏ, chẳng hạn như glycerol, mannitol, sorbitol, và dimethylsulfoxit. Mặc dù những tá dược này hầu hết được cho là ức chế chuyển động β , những các phân tử hữu cơ khác có MW thấp cũng được dùng với mục đích này (ví dụ, muối đệm hoặc counterion). Những tá dược này được giả thuyết là kìm hãm chuyển động của miền có khả năng di động cao bằng cách làm tăng độ nhớt tại chỗ. Để người đọc quen với nhiều tài liệu tham khảo về sự ổn định thủy tính, việc sử dụng những tá dược này có thể xem là khác thường. Những tá dược này và những vật liệu có khối lượng phân tử thấp khác có giá trị T_g thấp và sẽ làm giảm T_g của chế phẩm bào chế, một hiện tượng được gọi là sự mềm dẻo. Tuy nhiên, những tá dược này cũng có thể làm suy giảm chuyển động β . Do đó, chúng thường được cho là chất chống làm dẻo hoặc đôi khi là chất làm dẻo, phụ thuộc vào tài liệu tham khảo; trong khi chúng làm mềm dẻo chuyển động α , chúng lại chống làm dẻo chuyển động β . Chú ý là, thuật ngữ này là nguồn gốc cho những nhầm lẫn trong tài liệu tham khảo; việc chỉ định một vật liệu hoặc một chất chống làm dẻo phụ thuộc vào tài liệu tham khảo về chuyển động α hay chuyển động bậc hai.

Do sự ổn định trạng thái rắn của protein đòi hỏi chế phẩm bào chế hóa từ lưới thủy, sự đóng góp của các chuyển động α và β nhận được sự quan tâm đặc biệt. Mặc dù có nhiều tài liệu tham khảo sử dụng chất dùng chất tạo trạng thái thủy tinh để ổn định protein, cho đến gần đây, có một vài tham khảo cụ thể đến ảnh hưởng của những chất này sự chuyển động tại chỗ. Mặc dù nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh của protein rất khó để đo, hầu hết các dữ liệu đề cho thấy rằng $T_g > 150^\circ\text{C}$. Thus, tá dược (ví dụ, disaccharit chẳng hạn như sucroza hoặc trehaloza) thường được sử dụng để ổn định protein cũng sẽ làm mềm dẻo chuyển động α trong protein (và không làm mềm dẻo chuyển động bậc 2). Nghiên cứu gần đây giải thích rằng chuyển động β chi phối phần lớn sự ổn định của đường thủy tinh. Do đó, disaccharit không làm dẻo chuyển động β trong chế phẩm bào chế protein.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có chứa tá dược tạo trạng thái thủy tinh với nhiệt độ chuyển đổi thể tinh là ($>80^\circ\text{C}$). Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây bao gồm chất

tạo trạng thái thủy tinh chẳng hạn sucroza, trehaloza, mannitol, fumaryl diketopiperazin, và natri xitrat.

Hỗn hợp chất tạo trạng thái thủy tinh có thể được sử dụng để thu được sự ổn định tối ưu của chất rắn vô định hình. Đối với “nền” của chế phẩm bào chế lõi-vỏ, hỗn hợp của trehaloza và manitol được sử dụng theo một vài phương án.

Lượng chất tạo hình cần thiết để đạt được sự ức chế chuyển động phân tử và đạt được sự ổn định lý học và hóa học sẽ phụ thuộc vào bản chất của chất có hoạt tính. Đối với một vài phương án với protein được làm khô bằng sấy phun, tỷ lệ mol chất tạo trạng thái thủy tinh với protein có thể nằm trong khoảng từ 300 đến 900. Đối với những phân tử nhỏ, lượng cần thiết chất tạo trạng thái thủy tinh sẽ phụ thuộc vào Tg của chất hoạt tính.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có chứa đệm. Đệm được biết đến là để kiểm soát pH, cũng là để vận chuyển thuốc ở pH tương thích sinh lý (có nghĩa là, để làm tăng khả năng dung nạp), cũng như để đề xuất điều kiện lỏng thích hợp cho sự ổn định hóa học của thuốc. Trong một vài chế phẩm bào chế và quy trình được mô tả, môi trường của thuốc có thể được kiểm soát bằng bào chế đồng thời thuốc và đệm cùng nhau trong cùng một hạt.

Trong khi rất tự nhiên khi đặt ra câu hỏi về ý nghĩa của pH trong sản phẩm thuốc ở trạng thái rắn, nhiều nghiên cứu đã chứng minh về tầm quan trọng của việc kiểm soát pH control đối với sự ổn định hóa học của trạng thái rắn. Nước ở khắp mọi nơi, thậm chí trong chế phẩm bào chế dạng bột khô ở trạng thái rắn. Ngoài vai trò của nó như là một chất làm dẻo cho vật liệu vô định hình, nước là chất phản ứng, sản phẩm phân hủy, và cũng có thể dùng làm môi trường cho sự giải phóng và phản ứng hóa học. Có bằng chứng cho rằng sự hấp phụ nước lên bề mặt của hạt có thể dẫn đến dung dịch bão hòa trong màng bề mặt ngoài. Thực vậy, một vài nghiên cứu đã sử dụng pH của hỗn hợp thuốc (có nghĩa là, dung dịch bão hòa) như là một chất chỉ thị của pH tại chỗ hoặc “vi môi trường” của thuốc được hòa tan trong màng bọc ngoài ở bột “khô”. pH của vi môi trường đã được biết, trong một vài trường hợp, tương ứng với sự ổn định của thuốc.

Như với thuốc, tá dược cũng hòa tan trong màng bọc ngoài của nước đã hấp phụ để tạo thành dung dịch bão hòa. Điều này có thể được sử dụng để tạo thuận lợi

nhằm cho phép sự kiểm soát pH tại chỗ trong lớp ẩm được hấp phụ. Đệm hoặc chất biến đổi pH, chẳng hạn như histidin hoặc phosphat, thường được sử dụng ở dạng đông lạnh hoặc chế phẩm bào chế làm khô bằng sấy phun để kiểm soát sự phân hủy protein của pha lỏng và pha rắn.

Theo một vài phương án đệm cho chế phẩm bào chế có cả: histidin, glycin, axetat, và phosphat.

Tá được tùy ý bao gồm muối (ví dụ, natri clorit, canxi clorit, natri xitrat), chất chống oxi hóa (ví dụ, metionin), tá được để làm giảm sự tích tụ protein trong dung dịch (ví dụ, arginin), chất che giấu hương vị, và các chất được thiết kế để cải thiện sự hấp phụ của các đại phân tử vào sự tuần hoàn của cơ thể (ví dụ, fumaryl diketopiperazin).

Chế phẩm bào chế bào chế:

Được đề xuất ở đây chế phẩm bào chế dạng bột khô có chứa các hạt làm khô bằng sấy phun mà vượt qua một cách có hiệu quả sự lắng đọng trong cổ họng của người lớn bình trung bình, mà cho phép sự vận chuyển có chủ đích thuốc tới phổi.

Theo một vài phương án, các hạt theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có liều tổng cho phổi *in vitro* (TLD) giữa 80 và 95% khối lượng/ khối lượng của liều danh nghĩa, ví dụ giữa 85 và 90% khối lượng/ khối lượng cho đối tượng lớn trung bình.

Theo một vài phương án, các hạt theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có liều tổng cho phổi *in vitro* (TLD) giữa 90 và 100% khối lượng/ khối lượng của liều phân phối, ví dụ giữa 90 và 95% khối lượng/ khối lượng cho đối tượng lớn trung bình.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây bao gồm liều vận chuyển thích hợp tham số quán tính giữa 120 và 400 $\mu\text{m}^2/\text{phút}$, ví dụ giữa 150 và 300 $\mu\text{m}^2 \text{ L/phút}$.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây bao gồm các hạt kỹ thuật có bề mặt xốp, gợn sóng hoặc xù xì. Những hạt kỹ thuật này làm giảm lực kết dính liên hạt so với các tinh thể thuốc được tán vụn có kích thước hạt cơ

bản có thể so sánh được. Điều này dẫn đến cải thiện sự hóa lỏng bột và phân tán bột tương ứng với hỗn hợp được yêu cầu có thuốc đã tán vụn và lactoza thô.

Theo một vài phương án, các hạt theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có độ thô lớn hơn 1,5, ví dụ từ 1,5 đến 20, 3 đến 15, hoặc 5 đến 10.

Đối với thành phần được có hoạt tính, ví dụ, nhiều peptit hoặc protein (ví dụ, Fab kháng TSLP), bề mặt thô có thể đạt được bằng cách sấy phun được chất gọn gàng. Trong trường hợp này, chế phẩm bào chế có thể bao gồm được chất gọn gàng, mà là 100% khối lượng/ khối lượng của thành phần hoạt tính hoặc thuốc.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có chứa được chất và đậm. Chế phẩm bào chế có thể bao gồm 70% đến 99% khối lượng/ khối lượng của thuốc hoặc chất có hoạt tính, và phần còn lại là đậm.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế được mô tả ở đây có thể bao gồm 0,1 to 99% khối lượng/ khối lượng của thành phần hoạt tính, hoặc 0,1 đến 70% khối lượng/ khối lượng của thành phần hoạt tính, hoặc 0,1 đến 50% khối lượng/ khối lượng của thành phần hoạt tính), hoặc 0,1% đến 30% khối lượng/ khối lượng của thành phần hoạt tính.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có thể bao gồm tá được để tiếp tục làm tăng sự ổn định hoặc sự tương thích sinh học của chế phẩm bào chế. Ví dụ, các muối khác nhau, đậm, chất oxi hóa, tá được tạo hình vỏ, và tá được tạo trạng thái thủy tinh được dự tính.

Theo một vài phương án, các hạt theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có kích thước hình học, được thể hiện bằng đường kính trung bình khối (x50) là giữa 0,8 và 2,0 μm , ví dụ là giữa 1,0 và 1,5 μm .

Theo một vài phương án, các hạt theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có kích thước hình học, thể hiện bằng x90 là giữa 2,0 μm và 4,0 μm , ví dụ giữa 2,5 μm và 3,5 μm .

Theo một vài phương án, các hạt theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có khối lượng riêng từ hạt (ρ_{tapped}) là giữa 0,03 và 0,40g/cm³, ví dụ giữa 0,07 và 0,30 g/cm³.

Theo một vài phương án, các hạt cơ bản theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có kích thước khí động học trung bình (Da) là giữa 0,1 và 1,0 μ m, ví dụ giữa 0,5 và 0,8 μ m.

Theo một vài phương án, các hạt theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây có đường kính khí động học được tính toán là giữa 0,5 và 1,2 μ m, ví dụ là giữa 0,8 và 1,0 μ m.

Theo một vài phương án, toàn bộ các hạt theo chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả ở đây trình bày ở dạng liều vận chuyển thích hợp have có kích thước khí động học trung bình khối (MMAD) là giữa 1,0 và 3,0 μ m, ví dụ là giữa 1,5 và 2,0 μ m.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế của sáng chế có chứa các hạt có vỏ và lõi: trileuxin là chất tạo vỏ xuất hiện ở bề mặt của hạt, và lõi có chứa thành phần hoạt tính (ví dụ, Fab kháng TSLP), trehaloza, hoặc trehaloza và manitol kết hợp với nhau và đậm.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm bào chế có chứa khoảng 40% (khối lượng/ khối lượng) phân tử gắn kết TSLP, ví dụ, Fab1 kháng TSLP, khoảng 25% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, khoảng 30% (khối lượng/ khối lượng) trehaloza và manitol kết hợp, và khoảng 5% (khối lượng/ khối lượng) histidin. Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm bào chế có chứa khoảng 50% (khối lượng/ khối lượng) Phân tử gắn kết TSLP, khoảng 15% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, khoảng 2,6% (khối lượng/ khối lượng) HCl, khoảng 5,6% (khối lượng/ khối lượng) histidin, và khoảng 26,8% (khối lượng/ khối lượng) trehaloza và một bazơ kết hợp; hoặc khoảng 50% (khối lượng/ khối lượng) Phân tử gắn kết TSLP, khoảng 15% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, khoảng 19,4% (khối lượng/ khối lượng) trehaloza, khoảng 13% (khối lượng/ khối lượng) histidin, và khoảng 2,6% (khối lượng/ khối lượng) HCl.

Theo các phương án khác, sáng chế bộc lộ được phẩm dạng bột không chứa chất mang có chứa các hạt có khả năng vận chuyển từ thiết bị xông-hít bột khô, có chứa các phân tử kháng TSLP được bộc lộ ở đây, trong đó liều cho phổi *in vitro* lớn hơn 90% so với liều phân phối, và trong đó các hạt dưới dạng liều vận chuyển có thông số quán tính giữa 120 và 400 μ m²L/phút.

Theo một phương án khác, sáng chế bộc lộ được phẩm không chứa chất mang có khả năng vận chuyển từ thiết bị xông-hít bột khô, chế phẩm có chứa đa số các hạt, có lõi có chứa phân tử kháng TSLP như được bộc lộ ở đây và ít nhất một tá được tạo trạng thái thủy tinh, và vỏ có chứa tá được kỵ nước và đậm; và trong đó liều cho phổi *in vitro* lớn hơn 90% khối lượng/ khối lượng của liều phân phối. Theo một vài phương án, các hạt được tạo ra bằng cách làm khô bằng sấy phun. Theo một phương án khác, tá được kỵ nước có chứa trileuxin.

Theo một phương án nữa, sáng chế bộc lộ được phẩm không chứa chất mang có chứa đa số hạt cơ bản và hạt kết tụ có khả năng vận chuyển từ thiết bị xông-hít bột khô, chế phẩm có chứa phân tử kháng TSLP được bộc lộ ở đây, và trong đó liều tổng cho phổi *in vitro* (TLD) là lớn hơn 80% liều danh nghĩa, và trong đó hạt cơ bản đặc trưng bởi: hình thái nhẵn; đường kính khí động học (Da) giữa 0,3 và 1,0 μ m; và trong đó các hạt và kết tụ của các hạt được vận chuyển từ thiết bị xông-hít bột khô và có đường kính khí động học khối (MMAD) giữa 1,5 và 3,0 μ m. Theo một vài phương án, được phẩm còn chứa đồ đựng thuốc chuyên dụng có chứa hạt cơ bản, đồ đựng thuốc chuyên dụng thích hợp để chứa hạt trước sự hóa sol khí của nó trong thiết bị xông-hít bột khô, và trong đó sol khí có chứa chất kết tụ có thể xông-hít thở được được hình thành khi sol khí hóa.

Theo một phương án nữa, sáng chế bộ lộ chế phẩm bào chế được dạng bột để vận chuyển cho phổi, bột có chứa các hạt có: 1 đến 100 wt% phân tử kháng TSLP được bộc lộ ở đây, trong đó bột đặc trưng bởi sự phân bố kích thước hạt ít nhất 50% giữa 1 đến 1,5 micron, hoặc mật độ bột 0,05 đến 0,3g/cm³, kích thước khí động học nhỏ hơn 2 micron, độ xù xì là 1,5 đến 20; và trong đó bột được dùng bằng cách xông-hít, và đề xuất một liều tổng cho phổi *in vitro* lớn hơn 80%. Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế được dạng bột không chứa chất mang. Theo các phương án khác, bột được đóng gói trong đồ đựng thuốc chuyên dụng để sử dụng cùng thiết bị xông-hít bột khô, và trong đó khi bị sol khí hóa sử dụng thiết bị xông-hít bột khô đã nêu, bột đặc trưng bởi các chất kết tụ thở ra được có kích thước khí động học khối nhỏ hơn khoảng 2 micron.

Quy trình

Cũng được đề xuất ở đây là quy trình bào chế chế phẩm bào chế dạng bột khô để xông-hít có chứa các hạt được làm khô bằng sấy phun, chế phẩm bào chế có Chứa

ít nhất một thành phần hoạt tính, và có liều tổng cho phổi *in vitro* (total lung dose-TLD) là giữa 80 và 95% khối lượng/ khối lượng, ví dụ giữa 85 và 90% khối lượng/ khối lượng của liều danh nghĩa cho đối tượng người lớn trung bình.

Cũng được đề xuất ở đây là quy trình bào chế chế phẩm bào chế dạng bột khô để xông-hít có chứa các hạt được làm khô bằng sấy phun, chế phẩm bào chế có chứa ít nhất một thành phần hoạt tính, và có liều tổng cho phổi *in vitro* (TLD) là giữa 90 và 100% khối lượng/ khối lượng, ví dụ giữa 90 và 95% khối lượng/ khối lượng của liều vận chuyển cho đối tượng người lớn trung bình.

Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô có chứa ít nhất một thành phần hoạt tính mà thích hợp để điều trị các bệnh tắc nghẽn hoặc viêm đường hô hấp, đặc biệt là hen suyễn và/ hoặc COPD, ví dụ, Fab kháng TSLP. Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô có chứa ít nhất một thành phần hoạt tính mà thích hợp điều trị không xâm lấn các bệnh trong hệ tuần hoàn của cơ thể.

Làm khô bằng sấy phun đem lại thuận lợi trong việc sản xuất các hạt kỹ thuật để hít chẳng hạn như khả năng sản xuất nhanh bột khô, và kiểm soát các tính chất hạt gồm có kích cỡ, hình thái, mật độ, và chế phẩm. Quy trình làm khô rất nhanh (tính theo milli giây). Kết quả là, hầu hết các thành phần hoạt tính mà không hòa tan trong pha lỏng kết tủa thành chất rắn vô định hình, vì chúng không có thời gian đủ để tinh thể hóa.

Làm khô bằng sấy phun có chứa bốn đơn vị hoạt động: chuẩn bị nguồn nguyên liệu, làm nguyên liệu để sản xuất các giọt nhỏ micron, làm khô các giọt trong khí nóng, và thu các hạt khô bằng một cái túi hoặc bình tách xyclon.

Theo một vài phương án, quy trình tạo hạt bột khô bao gồm ba bước, tuy nhiên, theo một vài phương án hai hoặc thậm chí là ba trong số có thể được thực hiện hầu như đồng thời, do đó trong thực tế quy trình có thể được xem là quy trình một bước. Chỉ nhằm mục đích mô tả quy trình của sáng chế, 3 nước sẽ được mô tả riêng biệt, nhưng sự mô tả này không nhằm hạn chế quy trình 3 bước này.

Theo một vài phương án, quy trình bao gồm chuẩn bị nguyên liệu và làm khô bằng sấy phun nguyên liệu để cung cấp các hạt bột khô có hoạt tính. Các nguyên liệu chứa ít nhất một thành phần hoạt tính được hòa tan trong nguyên liệu lỏng. Theo một vài phương án, nguyên liệu có chứa ít nhất một thành phần hoạt tính (ví dụ, Fab1

kháng TSLP) được hòa tan trong nguyên liệu có nước có chứa đồng dung môi bổ sung. Theo một vài phương án, nguyên liệu có chứa ít nhất một chất hoạt tính hòa tan trong nguyên liệu etanol/nước, trong đó phân đoạn etanol là giữa 5% và 30% khối lượng/ khối lượng, ví dụ giữa 5% và 20% khối lượng/ khối lượng.

Đối với các chất rắn vô định hình, việc kiểm soát độ ẩm của sản phẩm thuốc là rất quan trọng. Đối với các thuốc không phải hydrat, độ ẩm trong bột tốt hơn là thấp hơn 5%, điển hình hơn là thấp hơn 3%, hoặc thậm chí 2% khối lượng/ khối lượng. Tuy nhiên, độ ẩm phải đủ cao, để đảm bảo rằng bột không thể hiện lực hấp dẫn tĩnh điện đáng kể. Độ ẩm trong bột khô sấy phun có thể được xác định bằng máy chuẩn độ Karl Fischer.

Theo một vài phương án, nguyên liệu được phun vào một dòng khí ẩm được lọc không khí làm bốc hơi dung môi và chuyển sản phẩm khô đến bộ thu. Không khí đã qua sử dụng được làm cạn kiệt bằng dung môi. Các điều kiện hoạt động của máy sấy phun như nhiệt độ đầu vào và đầu ra, tốc độ nạp, áp suất phun, tốc độ dòng không khí sấy, và cấu hình vòi phun có thể được điều chỉnh để tạo ra kích cỡ hạt, độ ẩm và sản lượng hạt khô thu được. Việc lựa chọn các thiết bị thích hợp và điều kiện quy trình thích hợp trong tầm nhìn của những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà không cần phải có thực nghiệm. Các thông số cài đặt cho máy sấy khô NIRO® PSD-1® như sau: nhiệt độ không khí đầu vào giữa khoảng 80°C và khoảng 200°C, chẳng hạn giữa 110°C và 170°C; nhiệt độ không khí đầu ra giữa khoảng 40°C đến khoảng 120°C, chẳng hạn giữa khoảng 60°C và 100°C; tốc độ đưa chất lỏng vào giữa khoảng 30g/phút đến khoảng 120g/phút, chẳng hạn như khoảng 50g/phút đến 100g/phút; dòng không khí tổng là khoảng 140 scfm (đơn vị feet khối chuẩn trên phút) (scfm) đến khoảng 230scfm, chẳng hạn như khoảng 160scfm đến 210scfm; và tốc độ dòng không khí hóa lỏng giữa khoảng 30scfm và khoảng 90scfm, chẳng hạn như khoảng 40scfm đến 80scfm. Thành phần rắn trong nguyên liệu khô bằng sấy phụ thường nằm trong khoảng từ 0,5% khối lượng/thể tích (5mg/ml) đến 10% khối lượng/thể tích (100mg/ml), chẳng hạn như 1,0% khối lượng/thể tích to 5,0% khối lượng/thể tích. Những cài đặt này tất nhiên sẽ khác nhau, phụ thuộc vào quy mô và loại thiết bị sử dụng. Trong sự kiện bất kỳ, việc sử dụng những phương pháp này và phương pháp tương tự cho phép sự tạo thành hạt có đường kính thích hợp sự lắng đọng sol khí vào phổi.

Theo một vài phương án, tá dược được hòa tan trong nguyên liệu, và chất bao vỏ lõi trên các hoạt chất phân tán được điều khiển bởi các đặc tính vật lý của các chất tan hòa tan.

Như đã thảo luận trước đây về các hạt có chứa các thành phần hoạt tính vô định hình, bản chất của bề mặt của hạt và hình thái học sẽ được kiểm soát sự hòa tan và sự phân tán các thành phần bên trong nguyên liệu. Tá dược kỵ nước hoạt động bề mặt (ví dụ, trileuxin, phospholipit, xà phòng axit béo) có thể được tập trung ở giao diện, nhằm cải thiện sự dịch hóa và phân tán bột, trong khi vẫn điều khiển sự thô của bề mặt hạt.

Bước làm khô bằng bất kỳ và/ hoặc tất cả các bước làm khô bằng sấy phun có thể được thực hiện sử dụng thiết bị truyền thống để bào chế các hạt khô bằng sấy phun nhằm sử dụng trong dược phẩm mà dùng bằng cách xông-hít. Các máy sấy phun trên thị trường bao gồm những máy được sản xuất bởi Büchi Ltd. và Niro Corp.

Theo một vài phương án, nguyên liệu được phun bằng một vòi phun chất lỏng đôi. Việc mở rộng đáng kể sự phân bố của các giọt chất lỏng xảy ra phía trên tải chất rắn là khoảng 1,5% khối lượng/ khối lượng. Các giọt có kích thước lớn hơn ở cuối của việc phân bố khiến cho các hạt lớn hơn trong sự vận chuyển bột tương ứng. Kết quả là, một vài phương án với vòi phun chất lỏng đôi hạn chế sự tải chất rắn đến 1,5% khối lượng/ khối lượng hoặc ít hơn, chẳng hạn như 1,0% khối lượng/ khối lượng, hoặc 0,75% khối lượng/ khối lượng.

Theo một vài phương án, sự phân bố của kích thước hạt nhỏ hẹp có thể thu được máy phun phim phẳng đã được bộc lộ, ví dụ, trong bằng sáng chế Mỹ số 7,967,221 và 8,616,464 ở ở tải chất rắn cao hơn. Theo một vài phương án, nguyên liệu được phun ở tải chất rắn giữa 2% và 10% khối lượng/ khối lượng, chẳng hạn như 3% và 5% khối lượng/ khối lượng.

Theo một vài phương án mật độ hạt hoặc PPD là giữa $0,01 \times 10^{-6}$ và 1.0×10^{-6} , chẳng hạn như giữa $0,03 \times 10^{-6}$ và $0,2 \times 10^{-6}$.

Theo một vài phương án, tỷ lệ EtOH/chất rắn là giữa 1,0 và 20,0, chẳng hạn như giữa 3,0 và 10,0.

Theo một vài phương án, sáng chế bộ lộ chế phẩm bào chế được dạng bột dễ xông-hít có chứa hạt được tạo thành bởi quy trình có chứa:

- a. chuẩn bị dung dịch phân tử gắn kết với kháng TSLP được bọc lộ ở đây trong hỗn hợp nước/etanol, trong đó etanol có mặt với tỷ lệ giữa 1 và 20% và tỷ lệ etanol trên chất rắn tổng là giữa 1 và 20;
- b. làm khô bằng sấy phun dung dịch để thu được hạt, trong đó các hạt đặc trưng bởi mật độ 0,2g/cm³ hoặc thấp hơn, đường kính hình học là 1-3 micron và đường kính đường kính khí động học là 1 đến 2 micron;

và trong đó bột, khi dùng bằng cách xông-hít, đề xuất liều dùng cho phổi tổng *in vitro* là lớn hơn khoảng 80%. Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế được dạng bột còn bao gồm tá dược tạo trạng thái thủy tinh. Theo một vài phương án, tá dược tạo trạng thái thủy tinh có chứa một alpha. Theo các phương án khác, tá dược tạo trạng thái thủy tinh có chứa một beta. Theo một phương án nữa, tá dược tạo trạng thái thủy tinh có chứa trehalosa.

Theo một vài phương án của chế phẩm bào chế được dạng bột, mật độ hạt là giữa $0,01 \times 10^{-6}$ và $1,0 \times 10^{-6}$.

Sáng chế này cũng bọc lộ phương pháp vận chuyển hạt có chứa bột khô vào phổi của đối tượng, phương pháp bao gồm:

- a. chuẩn bị dung dịch phân tử gắn kết với kháng TSLP bọc lộ ở đây trong hỗn hợp nước/etanol, trong đó etanol xuất hiện giữa 5 và 20%,
- b. làm khô bằng sấy phun dung dịch để thu được hạt, trong đó hạt đặc trưng bởi mật độ hạt giữa khoảng 0,05 và 0,3g/cm³ đường kính hình học là 1-3 micron và đường kính khí động học là 1-2 micron;
- c. đóng gói bột sấy khô trong một đồ đựng thuốc chuyên dụng;
- d. cung cấp một ống xông-hít có chứa một phương tiện để chiết xuất bột cho đồ đựng thuốc chuyên dụng, thiết bị xông-hít còn có thiết bị dịch hóa và sol khí hóa bột, thiết bị xông-hít có thể hoạt động qua nỗ lực thở của bệnh nhân khoảng 2 đến khoảng 6kPa; thiết bị xông-hít và bột cùng nhau cung cấp một thông số quán tính giữa khoảng giữa 120 và 400 μ m² L/phút và trong đó hạt, khi sử dụng bằng cách xông-hít, đề xuất ít nhất 90% lắng đọng ở phổi.

Sáng chế này cũng bộ lộ phương pháp bào chế chế phẩm bào chế thuốc bột khô để vận chuyển cho phổi, phương pháp bao gồm

- a. điều chế dung dịch của các phân tử kháng gắn kết với kháng TSLP bộc lộ ở đây trong hỗn hợp nước/etanol, trong đó etanol xuất hiện giữa 5 và 20%,
- b. làm khô bằng sấy phun dung dịch để thu được dung dịch có chứa các hạt, trong đó các hạt đặc trưng bởi mật độ hạt là giữa khoảng 0,05 và 0,3, đường kính hình học là 1-3 micron và đường kính khí hình học là 1-2 micron.

Theo một phương án nữa, sáng chế bộ lộ được phẩm dạng bột có khả năng vận chuyển từ một thiết bị xông-hít bột khô, có chứa particles có các phân tử gắn kết với kháng TSLP bộc lộ ở đây, trong đó liều tổng cho phổi *in vitro* lớn hơn 90% khối lượng/khối lượng liều phân phối, và trong đó chế phẩm ít nhất một đặc tính của chất mang tự do, mật độ hạt là 0,05 đến 0,3g/cm³; độ xù xì của hạt là 3 đến 20; các hạt được tạo thành từ một quy trình có chứa làm khô bằng sấy phun từ hỗn hợp etanol:nước; và các hạt tạo thành từ quy trình có chứa làm khô bằng sấy phun từ hỗn hợp etanol:nước có chứa tỷ lệ etanol:chất rắn giữa 1 và 20. Theo một vài phương án, được phẩm bột có chứa ít nhất hai đặc tính; theo các phương án khác, được phẩm bột có chứa ít nhất ba đặc tính.

Liều lượng

Liều lượng, tính độc, và hiệu quả điều trị của các phân tử kháng TSLP đã được bộc lộ ở đây, bao gồm được phẩm có chứa kháng thể kháng TSLP hoặc đoạn của nó, có thể được xác định bằng các quy trình được chuẩn trong nuôi cấy tế bào hoặc thí nghiệm động vật, ví dụ, để xác định LD50 (liều gây chết đến 50% quần thể) và ED50 (liều có hiệu quả điều trị cho 50% quần thể). Tỷ lệ liều giữa tác dụng động và tác dụng điều trị là chỉ số điều trị và nó có thể được biểu hiện là tỷ lệ LD50/ED50. Các hợp chất mà thể hiện các chỉ số điều trị được mong muốn. Trong khi các hợp chất mà thể hiện tác dụng phụ có thể được sử dụng, cần cẩn thận thiết kế hệ vận chuyển mà nhắm vào các hợp chất này tới vị trí của mô bị ảnh hưởng để giảm thiểu thiệt hại tiềm ẩn đối với các tế bào không bị nhiễm, do đó, giảm tác dụng phụ.

Dữ liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và động nghiên cứu động vật có thể được sử dụng trong việc tạo chế phẩm bào chế một phạm vi liều để sử dụng cho người. Liều lượng của những hợp chất này tốt hơn là nằm trong một phạm vi nồng

độ tuần hoàn mà bao gồm ED50 với độc tính thấp hoặc không có. Liều lượng có thể khác nhau phụ thuộc vào dạng liều sử dụng và con đường dùng. Đối với hợp chất bất kỳ sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, liều có hiệu quả điều trị có thể được ước lượng đầu tiên từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Một liều có thể được tạo chế phẩm bào chế trong mô hình động vật để thu được phạm vi nồng độ huyết tương tuần hoàn mà gồm có IC50 (có nghĩa là, nồng độ của hợp chất khảo nghiệm mà thu được sự ức chế tối đa một nửa các triệu chứng) được xác định trong môi trường nuôi cấy. Những thông tin này có thể được sử dụng để xác định chính xác liều hữu ích ở người. Mức độ trong huyết tương có thể được đo, ví dụ, bằng sắc ký lỏng hiệu suất cao.

Bộ kit

Cũng được đề xuất ở đây là kit bao gồm một hoặc nhiều dược phẩm được đề xuất ở đây, thiết bị để vận chuyển dược phẩm tới đối tượng, và hướng dẫn sử dụng. Theo một vài phương án, thiết bị có thể vận chuyển dược phẩm dưới dạng sol khí. Theo một vài phương án, thiết bị là một thiết bị xông, ví dụ, thiết bị xông-hít bột khô (DPI). Theo các phương án khác, thiết bị có thể được là liều được đo bằng thiết bị xông-hít hoặc máy khí dung.

Thiết bị xông-hít bột khô thích hợp bao gồm thiết bị xông-hít liều đơn vị, trong đó bột khô được bảo quản trong viên nang hoặc viên nang bóng trong đó, và bệnh nhân cho một hoặc nhiều nang hoặc viên nang bóng vào thiết bị trước khi sử dụng. Theo một cách khác, thiết bị xông-hít bột khô liều đa được dự liệu là ở đó liều được đóng gói trước trong một màng nang bóng, ví dụ dạng hộp, dải hoặc bánh xe.

Thiết bị xông-hít bột khô bao gồm thiết bị xông-hít bột khô liều đa chẳng hạn như DISKUS™ (GSK, mô tả trong bằng sáng chế Mỹ 6536427), DISKHALER™ (GSK, mô tả trong công bố đơn quốc tế WO 97/25086), GEMINI™ (GSK, mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 05/14089), GYROHALER™ (Vectura, mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 05/37353), và PROHALER™ (Valois, mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 03/77979).

Thiết bị xông-hít bột khô liều đơn bao gồm AEROLIZER™ (Novartis, mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 3991761) và BREEZHALER™ (Novartis, mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 8479730 (Ziegler *et al.*). Thiết bị xông-hít liều đơn thích hợp bao gồm các thiết bị được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 8069851 và 7559325.

Thiết bị xông liều viên nang bóng, mà một vài bệnh nhân cảm thấy dễ dàng và thuận tiện sử dụng để vận chuyển thuốc cần dùng mỗi ngày 1 lần, bao gồm thiết bị xông-hít được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 8573197 (Axford *et al.*).

Theo một vài phương án, thiết bị xông là thiết bị xông-hít bột khô liều đa trong đó năng lượng để dịch hóa và phân tán bột được cung cấp bởi bệnh nhân (có nghĩa là, MD-DPI “chủ động”). Booth theo sáng chế dịch hóa và phân tán hiệu quả ở lưu lượng đỉnh thấp (PIF). Kết quả là, những sự thay đổi nhỏ trong sự phân tán bột với PIF đã quan sát được sự cân bằng có hiệu quả trong sự va chạm quán tính mà xảy ra với sự tăng trong PIF, dẫn đến sự lắng đọng trong phổi độc lập với tốc độ dòng. Không có sự phụ thuộc vào tốc độ dòng đối với bột theo sáng chế làm giảm toàn bộ sự biến đổi giữa các bệnh nhân.

Hướng dẫn sử dụng có thể bao gồm cả hướng dẫn để chẩn đoán hoặc điều trị tình trạng viêm liên quan tới SLP. Kit được cung cấp ở đây có thể được sử dụng phù hợp với phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ chú ý tới những sử dụng phù hợp đối với kit được đề xuất ở đây, và sẽ có thể dùng kit cho những việc sử dụng này. Kit được đề xuất ở đây có thể cũng bao gồm (ví dụ, dạng phong bì đã trả cước phí hoặc gói gửi thư) mà có thể được sử dụng để trả lại mẫu cho phân tích, ví dụ, cho phòng thí nghiệm. Kit có thể bao gồm một hoặc nhiều hộp chứa cho mẫu, hoặc mẫu có thể ở trong lọ thu máu chuẩn. Kit có thể bao gồm một hoặc nhiều dạng mẫu thỏa thuận đã thông báo, dạng yêu cầu kiểm tra, và hướng dẫn làm thế nào để sử dụng kit trong phương pháp được mô tả ở đây. Phương pháp sử dụng kit này cũng được bao gồm ở đây. Một hoặc nhiều dạng (ví dụ, dạng yêu cầu kiểm tra) và các hộp chứa mẫu có thể được mã hóa, ví dụ, với mã vạch để nhận dạng đối tượng cung cấp mẫu.

Phương pháp điều trị

Được đề xuất ở đây là phương pháp điều trị tình trạng liên quan tới TSLP ở đối tượng cần điều trị, ví dụ, người, bằng cách cho đối tượng dùng lượng có hiệu quả điều trị của phân tử gắn kết TSLP được mô tả ở đây, hoặc được phẩm của nó. Theo một vài phương án, các phương pháp này còn bao gồm xác định và lựa chọn đối tượng cần điều trị tình trạng viêm liên quan tới TSLP. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng phân tử gắn kết TSLP được mô tả ở đây, hoặc được phẩm của nó, để điều trị hoặc ngăn

ngừa bệnh ở bệnh nhân. Theo một vài phương án, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết TSLP được mô tả ở đây, hoặc được phẩm của nó, để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở bệnh nhân. Theo phương án nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng phân tử gắn kết TSLP như được mô tả ở đây hoặc được phẩm của nó, trong sản xuất thuốc để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở bệnh nhân.

Theo một vài phương án, tình trạng viêm liên quan tới TSLP có thể được khởi phát bởi phản ứng dị ứng hoặc các chất dị ứng từ môi trường hoặc các chất kích. Theo phương án cụ thể, tình trạng viêm liên quan tới TSLP bao gồm hen suyễn, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, viêm mũi dị ứng, viêm xoang mạn tính, viêm mũi xoang mạn tính, viêm bạch cầu ái toan ở thực quản

Theo một vài phương án, phân tử gắn kết TSLP, hoặc được phẩm có chứa phân tử gắn kết TSLP được dùng cho bệnh nhân bằng cách xông-hít, ví dụ, ở dạng sol khí bằng thiết bị xông-hít bột khô. Theo các phương án khác, phân tử gắn kết TSLP hoặc được phẩm có thể được dùng sử dụng một hoặc nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hài lòng khi biết rằng, con đường và/ hoặc cách dùng sẽ khác nhau phụ thuộc vào kết quả mong muốn. Con đường dùng được lựa chọn bao gồm đường dùng qua ven, cơ, biểu bì, ổ bụng, dưới da, cột sống hoặc các đường dùng khác, ví dụ bằng tiêm hoặc truyền. Dùng cho đường tiêu hóa có thể cách dùng điển hình hơn so với dùng nội và trên bề mặt, thường bằng tiêm, và bao gồm, mà không hạn chế tới, tiêm và truyền tĩnh mạch, trong dạ dày, trong màng cứng, trong tử cung, trong buồng tim, trong da, trong da, trong ổ bụng, qua da, dưới da, dưới da, dưới da, dưới bao nhày, trong tủy sống, trong tử cung, tế bào ngoài màng cứng và trung thất. Theo một cách khác, phân tử gắn kết TSLP, hoặc được phẩm có chứa phân tử gắn kết TSLP theo sáng chế, có thể được dùng qua đường không phải tiêu hóa, chẳng hạn như đường dùng trên bề mặt, biểu bì hoặc hoặc màng nhày, ví dụ, nội vị, qua đường miệng, đường âm đạo, trực tràng, dưới lưỡi hoặc trên bề mặt.

Theo một vài phương án, tình trạng viêm liên quan tới TSLP là hen suyễn. Hen suyễn là bệnh phức tạp và bệnh viêm mạn tính không đồng nhất ở đường dẫn khí mà đặc trưng bởi co thắt phế quản đảo ngược và liên quan tới một đáp ứng quá mức ở đường dẫn khí đối với một phạm vi rộng các chất kích thích co thắt phế quản (tăng phản ứng đường dẫn khí-AHR). Nghiên cứu gần đây tập trung vào việc nhận dạng con đường miễn dịch liên quan đến sinh bệnh học của hen suyễn, và tiết lộ vai trò của tế

bào T giúp đỡ loại 2 (Th2) và tế bào hiệu ứng không trung gian bởi Th2 (Lambrecht và Hammad, *Nature immunology* 2014, 16: 45-56). Trong trường hợp hen suyễn do dị ứng, đặc trưng bởi viêm bạch cầu đơn nhân và bằng chứng viêm da cơ địa, các nhân tố trong con đường miễn dịch Th2 qua trung gian trong việc phát triển và duy trì sự viêm đường dẫn khí và AHR. Lymphopoietin mô đệm tuyến ức (Thymic stromal lymphopoietin-TSLP) là nhân tố điều hòa chính của đáp ứng Th2. TSLP được biểu hiện trong tế bào biểu mô trong đường dẫn khí để đáp ứng với các chất kích thích khác nhau (ví dụ, các chấn thương cơ học, vật chất hạt xung quanh, các tác nhân dị ứng, xytokin tiền viêm hoặc xytokin phân cực Th2, và các sản phẩm từ vi sinh vật). Vai trò của TSLP là để điều biến các tế bào tua (DC) và cảm ứng sự biệt hóa các tế bào T còn non thành các tế bào viêm Th2 và thúc đẩy sự tiết xytokin từ các tế bào mast, bạch cầu ái toan và đại thực bào như là một phần của đáp ứng miễn dịch. Ngoài ra, TSLP có thể gây cản trở sự phát triển của tế bào T làm suy yếu sự cân bằng giữa dung nạp và sự viêm. Trong trường hợp hen suyễn không do dị ứng, đặc trưng bởi viêm bạch cầu trung tính hoặc viêm bạch cầu hạt, các xytokin điều khiển sự viêm chưa được hiểu rõ, tuy nhiên cả xytokin IL-17 không trung gian bởi Th2 và interferon- γ (IFN- γ) được cho là đóng vai trò. Thú vị là, ngoài vai trò trong việc làm trung gian cho đáp ứng Th2, các bằng chứng cận lâm sàng gợi ý rằng TSLP khuếch đại các đáp ứng không trung gian bởi Th2 và có thể quan trọng trong việc thiết lập viêm mạn tính trung gian bởi IL-17 và IFN- γ .

TSLP là cần thiết và đủ để phát triển viêm liên quan tới xytokin Th2 ở đường dẫn khí ở động vật gặm nhấm. Chuột chuyển gen với sự tiết TSLP từ tế bào biểu mô ở phổi có kết cấu, dưới sự kiểm soát của promoter chất hoạt động bề mặt protein C, phát triển các dấu hiệu tương thích với hen suyễn: viêm bạch cầu ái toan đường dẫn khí; sự biểu hiện Th2 thiên về sự xâm nhập của tế bào T CD4; bạch cầu ái toan trên toàn bộ cơ thể; IgE tăng; sự phản ứng quá mức ở đường dẫn khí; và sự sắp xếp lại ở đường dẫn khí bao gồm sự tăng sản tế bào mỡ và đường dẫn khí và xơ vữa mạch. Tiếp tục hỗ trợ vai trò của TSLP trong viêm so dị ứng, sự biểu hiện TSLP và sản sinh protein cũng được thấy là tăng lên khi phơi nhiễm với các tác nhân gây dị ứng đã xông-hít vào phổi (Zhou *et al.*, 2005, *Nature immunology* 6, 1047-1053), trong khi việc vận chuyển TSLP trực tiếp qua đường mũi khi không có mặt kháng nguyên sẽ dẫn đến sự khởi phát nhanh của bệnh nghiêm trọng (Headley *et al.*, 2009, *Journal of immunology* 182,

1641-1647). Chuột nhất thiếu TSLPR kháng lại sự phát triển viêm giống Th2 ở mô hình truyền thống ovalbumin-và-phèn chua ở chuột (Al-Shami *et al.*, 2005, The Journal of experimental medicine 202, 829-839; Zhou *et al.*, 2005, Nature immunology 6, 1047-1053). Viêm đường dẫn khí giảm tương ứng với sự giảm IgE trong huyết thanh và giảm xytokin Th2 và chemokin, chẳng hạn như IL-4, -5, -13, eotaxin, và chemokin điều hòa bởi tuyến ức và điều hòa bởi hoạt hóa (Thymus- and Activation-Regulated Chemokine-TARC).

Sự biểu hiện TSLP tăng ở đường dẫn khí ở màng mô liên kết được quan sát cụ thể ở bệnh nhân bị hen suyễn nghiêm trọng (Shikotra *et al.*, 2012, Journal of Allergy và Clinical Immunology 129, 104-111.e109). Hơn nữa, một vài nghiên cứu đã cho thấy sự liên hệ giữa mức độ thường xuyên của sự đa hình nucleotit đơn (single-nucleotide polymorphism-SNP) ở locus TSLP của người và mức độ biểu hiện TSLP và sự mẫn cảm đối với bệnh đối với hen suyễn và viêm thực quản tăng bạch cầu ái toan (Ferreira *et al.*, 2014, The Journal of allergy và clinical immunology 133, 1564-1571; Harada *et al.*, 2011, American journal of respiratory cell and molecular biology 44, 787-793; He *et al.*, 2009, The Journal of allergy và clinical immunology 124, 222-229; Rothenberg *et al.*, 2010, Nature Genetics 42, 289-291). Trong nghiên cứu gần đây, các biến thể của gen TSLP được cho là làm tăng đáng kể nguy cơ bị hen suyễn ở người bị hen suyễn khi còn nhỏ thông qua sự liên hiệp của gen trội (Biagini Myers *et al.*, 2014, The Journal of allergy và clinical immunology 134, 891-899 e893).

Liệu pháp kết hợp

Nhiều cách điều trị khác nhau đã được mô tả ở trên có thể kết hợp với cách điều trị khác chẳng hạn như sự chăm sóc chuẩn hiện này cho các tình trạng viêm liên quan đến TSLP. Theo đó, phương pháp điều trị viêm liên quan đến TSLP được mô tả ở đây còn bao gồm việc dùng chất thứ hai cho đối tượng cần điều trị. Theo một vài phương án, chất thứ hai có thể được lựa chọn từ, nhưng không hạn chế tới, corticosteroid, thuốc co giãn phế quản (SABA, LABA, SAMA, LAMA), thuốc kháng histamin, thuốc kháng leukitrien, và thuốc ức chế PDE-4.

Thuật ngữ “kết hợp” đề cập đến sự kết hợp cố định trong dạng liều đơn vị, hoặc dùng kết hợp ở đó hợp chất theo sáng chế và một chất kết hợp khác (ví dụ được chất khác được giải thích sau đây, cũng được đề cập tới là “chất được chất” hoặc “đồng

chất”) có thể được dùng độc lập cùng lúc hoặc riêng trong khoảng thời gian ở giữa, cụ thể là ở thời gian giữa này cho phép các chất kết hợp thể hiện sự hợp tác, ví dụ tác dụng hiệp đồng. Thành phần đơn giản có thể được đóng gói trong kit hoặc riêng biệt. Một hoặc cả hai thành phần (ví dụ, bột hoặc dung dịch) có thể được thiết lập lại hoặc pha loãng đến liều mong muốn trước khi dùng. Thuật ngữ “dùng đồng thời” hoặc “dùng kết hợp” hoặc cách dùng tương tự được sử dụng ở đây mang nghĩa bao hàm việc dùng các chất lựa chọn kết hợp đối với một đối tượng cần dùng (ví dụ bệnh nhân), và nhằm bao gồm liệu pháp điều trị trong đó chất này không cần thiết dùng bằng đường dùng giống hoặc cùng thời gian. Thuật ngữ “hợp phần được” sử dụng ở đây nghĩa là sản phẩm thu được từ việc trộn hoặc kết hợp nhiều chất được và bao gồm cả sự kết hợp cố định và không cố định của các chất điều trị. Thuật ngữ “kết hợp cố định” nghĩa là chất điều trị, ví dụ hợp chất theo sáng chế và chất kết hợp, đều được dùng cho bệnh nhân đồng thời dưới dạng thực thể hoặc liều lượng đơn. Thuật ngữ “kết hợp không cố định” có nghĩa là chất điều trị, ví dụ, hợp chất theo sáng chế và chất kết hợp, đều được dùng cho bệnh như những thực thể riêng biệt đồng thời, cùng lúc hoặc theo trình tự với các giới hạn thời gian cụ thể, trong đó việc dùng này đề xuất những mức hiệu quả điều trị của hai thành phần trong cơ thể bệnh nhân. Sau này người ta cũng ứng dụng liệu pháp cocktail, ví dụ dùng ba hoặc nhiều chất điều trị. Thuật ngữ “hợp phần được” như được sử dụng ở đây đề cập đến sự kết hợp cố định trong đơn liều lượng đơn vị, hoặc không cố định hoặc kit của các chất dùng kết hợp trong đó hai hoặc nhiều chất điều trị được dùng cùng lúc, riêng biệt trong khoảng thời gian giữa, cụ thể ở đó những khoảng thời gian giữa này cho phép các chất kết hợp thể hiện sự hợp tác, ví dụ tác dụng hiệp đồng.

Thuật ngữ “liệu pháp kết hợp” đề cập tới việc dùng hai hoặc nhiều chất trị liệu để điều trị tình trạng hoặc rối loạn được mô tả ở trong bản mô tả. Việc dùng này bao gồm việc dùng đồng thời những chất trị liệu này theo cách tương đối đồng thời, chẳng hạn như trong viên nang đơn có tỷ lệ cố định thành phần hoạt tính. Theo một cách khác, việc dùng này bao gồm việc dùng đồng thời trong nhiều vật chứa, hoặc riêng rẽ (ví dụ, viên, viên nang, bột, và chất lỏng) đối với mỗi thành phần hoạt tính. Bột và/hoặc chất lỏng có thể tái tạo hoặc pha loãng đến liều mong muốn trước khi dùng. Hơn nữa, việc sử dụng này cũng bao hàm cả việc sử dụng mỗi loại chất điều trị theo cách tuần tự, hoặc là vào cùng khoảng thời gian hoặc thời gian khác nhau. Trong cả hai

trường hợp, phác đồ điều trị sẽ đem lại tác dụng hữu ích của việc kết hợp thuốc trong việc điều trị tình trạng hoặc rối loạn được mô tả ở đây.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Mặc dù phương pháp và vật liệu tương tự với những gì được mô tả ở đây có thể sử dụng để thực hành sáng chế, các phương pháp và vật liệu thích hợp được mô tả ở dưới. Tất cả các công bố đơn sáng chế, bằng sáng chế, và các tài liệu tham khảo khác được đưa vào đây bằng cách tham khảo toàn bộ. Trong trường hợp có xung đột, bản mô tả, bao gồm phần định nghĩa sẽ kiểm soát. Ngoài ra, vật liệu, phương pháp, và các ví dụ chỉ để minh họa mà không nhằm để hạn chế. Một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương đối với gì mô tả ở đây, có thể được sử dụng trong việc thực hành sáng chế. Thực vậy, sáng chế không hề giới hạn về phương pháp và vật liệu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo kháng thể kháng TSLP của người và mảnh Fab của nó sử dụng biểu lộ thực khuẩn thể

Fab mà gắn kết đặc hiệu với isoform 1 TSLP của người (SEQ ID NO: 27) được tạo ra sử dụng công nghệ biểu lộ thực khuẩn thể MorphoSys HuCAL PLATINUM®. Thư viện phagemit dựa trên khái niệm HuCAL® concept (Knappik *et al.*, 2000, J Mol Biol 296, 57-86) và sử dụng công nghệ CysDisplay™ cho việc biểu lộ trên bề mặt của thực khuẩn thể (Lohning, WO 2001/05950).

Sàng lọc sơ bộ

Ba loại sàng lọc sơ bộ được thực hiện: sàng lọc pha rắn trực tiếp cho SLP đã phủ của người tái tổ hợp (rhTSLP), tiền chất protein solid phase amyloid (APP) sàng lọc sơ bộ bất giữ, và sàng lọc sơ bộ dung dịch cho TSLP.

Đối với việc sàng lọc sơ bộ pha rắn trực tiếp cho rhTSLP đã phủ, đĩa 96 giếng Maxisorp™ được phủ bằng 300µl *E. coli* có nguồn gốc từ rhTSLP (R&D Systems) mỗi giếng ở 4°C qua đêm. Để sàng lọc sơ bộ, khoảng 4×10^{13} HuCAL PLATINUM® kháng thể -thực khuẩn thể được thêm vào mỗi kháng nguyên đã phủ và ủ trong 2 giờ ở

nhệt độ phòng trên máy lắc đĩa vi chuẩn độ. Sau đó, thực khuẩn thể không gắn kết đặc hiệu được rửa trôi bằng một vài bước rửa và thực khuẩn thể gắn kết đặc hiệu được rửa giải sử dụng 25mM DTT trong 10mM Tris/HCl pH 8. Dịch rửa giải DTT được chuyển vào 14ml *E. coli* TG1, và ủ để nhiễm thực khuẩn thể.

Vi khuẩn chuyển nhiễm được tạo huyền phù trong môi trường 2xYT, được cấy trên đĩa thạch LB/Cam và ủ qua đêm. Các khuẩn lạc được lấy khỏi tế bào và được sử dụng để phục hồi thực khuẩn thể, khuếch đại đã dòng các dòng đã lựa chọn, và sản xuất thực khuẩn thể. Với thực khuẩn thể tinh sạch, lần sàng lọc sơ bộ tiếp theo bắt đầu. Việc sàng lọc sơ bộ pha rắn lần thứ hai hoặc thứ ba được thực hiện theo quy trình của lần sàng lọc thứ nhất ngoại trừ sự giảm lượng kháng nguyên và các điều kiện rửa nghiêm khắc.

Trong việc sàng lọc sơ bộ bắt giữ APP trong pha rắn APP cho Cyno TSLP, kháng nguyên trong sàng lọc sơ bộ có đuôi APP6 (tiền chất protein amyloid-precursor-protein), và protein dung hòa kháng nguyên APP6 được bắt giữ qua kháng thể kháng APP6 mà cố định trong đĩa Maxisorp™. Để ngăn việc chọn lọc thực khuẩn thể gắn kết vào đuôi APP6 của kháng nguyên hoặc vào kháng thể bắt giữ kháng APP6, phong bế trước thực khuẩn thể sử dụng kháng thể bắt giữ và kháng nguyên có đuôi APP6 không liên quan được thực hiện.

Đĩa 96 giếng Maxisorp™ được phủ bằng 300µl kháng thể kháng APP và kháng nguyên gắn đuôi APP6 không liên quan qua đêm ở 4°C. Kháng nguyên TSLP_Avi-APP6 của người hoặc TSLP_APP6-Avi của khỉ được bắt giữ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc. Song song với việc này, thực khuẩn thể được hấp phụ lại 2 lần trên kháng thể kháng APP và kháng nguyên không liên quan.

Bên cạnh việc phủ kháng nguyên và quy trình phong bế thực khuẩn thể, việc sàng lọc sơ bộ bắt giữ được thực hiện giống như sàng lọc sơ bộ thực khuẩn thể pha rắn như đã mô tả ở trên.

Đối với việc sàng lọc dung dịch cho TSLP, thực khuẩn thể được phong bế bằng 50% huyết thanh người /0,33x chất phong bế hóa học/0,05% Tween20. Đối với mỗi mẻ thực khuẩn thể, 4mg hạt Streptavidin (Dynabeads® M-280 Streptavidin; Invitrogen) được phong bế trong 1x chất phong bế hóa học. Để loại bỏ thực khuẩn thể gắn kết hạt hoặc Streptavidin hoặc, tiền hấp phụ các hạt thực khuẩn thể đã phong bế

được thực hiện hai lần sử dụng hạt Streptavidin đã phong bế. Sau đó, TSLP_Avi-APP6 kháng nguyên của người đã biotinyl hóa được bổ sung vào hạt thực khuẩn thể. Sau khi ủ, phức hệ kháng nguyên thực khuẩn thể được bắt giữ sử dụng hạt Streptavidin và hạt thực khuẩn thể đã gắn kết vào hạt Streptavidin được thu lại bằng máy phân tách từ. Các thực khuẩn thể gắn kết không đặc hiệu được rửa bỏ bằng một vài bước rửa sử dụng PBS/0,05% Tween20 và PBS. Cụ thể, thực khuẩn thể đã gắn kết được rửa giải khỏi hạt Streptavidin sử dụng 25mM DTT trong Tris/HCl 10mM pH 8. Sự nhiễm thực khuẩn thể và sản xuất thực khuẩn thể sau đó được thực hiện theo quy trình sàng lọc sơ bộ pha rắn và sàng lọc lần tiếp theo bắt đầu.

Biểu hiện

Để thuận lợi cho việc biểu hiện Fab hòa tan, Fab mã hóa cho các đoạn mã hóa thực khuẩn thể HuCAL PLATINUM® đã tách dòng phụ từ vector biểu lộ pMORPH®30 sang vector biểu hiện pMORPH®x11_FH. Sau khi biến nạp vào *E. coli* TG1-F- sự biểu hiện dòng đơn và dạng bào chế của dịch chiết chu chất có chứa đoạn HuCAL®-Fab được thực hiện như đã mô tả trước đây (Rauchenberger *et al.*, 2003, J Biol Chem 278: 38194-38205).

Các dòng đơn kháng Chloramphenicol được lấy vào các giếng của đĩa vi chuẩn độ 384 giếng sạch được bổ sung 2xYT môi trường trước và nuôi qua đêm ở 37°C. Buổi sáng tiếp theo, glycerol chứa môi trường được thêm vào mỗi giếng của đĩa; đĩa được bọc kín bằng lá nhôm và bảo quản ở -80°C.

ELISA sàng lọc

Sử dụng ELISA sàng lọc, các dòng Fab đơn được nhận dạng bằng kết quả đầu ra của sàng lọc sơ bộ cho việc gắn kết vào kháng nguyên đích. Fab được kiểm tra sử dụng dịch tan *E. coli* thô có chứa Fab. Để kiểm tra sự biểu hiện Fab trong dịch tan *E. coli* đã chuẩn bị, đĩa 384 giếng Maxisorp™ 384 được phủ bằng mảnh Fd đặc hiệu với IgG của cừu kháng người pha loãng 1:1000 trong PBS. Sau khi phong bế bằng 5% bột sữa gầy trong PBS có chứa 0,05% Tween20, dịch tan *E. coli* có chứa Fab được thêm vào. Sau đó, các đoạn HuCAL®-Fab đã gắn kết được phát hiện bằng cách ủ với F(ab)2 đặc hiệu IgG của dê kháng người liên hợp với kiềm phosphatase (pha loãng 1:5000) sau khi thêm cơ chất huỳnh quang AttoPhos (Roche, #11681982001). Sự phát xạ huỳnh quang ở 535nm được ghi lại với kích thích ở 430 nm.

Để thực hiện ELISA sàng lọc kháng nguyên phủ trực tiếp, đĩa Maxisorp™ 384 giếng được phủ bằng các kháng nguyên TSLP khác nhau ở nồng độ 2 µg/ml trong PBS. Sau khi phong bế đĩa bằng 5% bột sữa gầy trong PBS, dịch tan *E. coli* được thêm vào. Gắn kết của Fab được phát hiện bằng F(ab)2 đặc hiệu IgG của dê kháng người liên hợp với kiềm phosphataza (pha loãng trong 1:5000) sử dụng cơ chất phát huỳnh quang Attophos (Roche, #11681982001). Sự phát xạ huỳnh quang ở 535nm được ghi nhận với sự kích thích ở 430nm.

Để thực hiện ELISA sàng lọc đối với kháng nguyên bắt giữ APP, đĩa Maxisorp™ 384 giếng được phủ với kháng thể đặc hiệu kháng APP ở nồng độ 2,5µg/ml trong PBS. Sau khi phong bế đĩa bằng 5% bột sữa gầy trong PBS, kháng nguyên TSLP gắn đuôi APP ở nồng độ 2µg/ml được cho phép gắn kết trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dịch tan *E. coli* chứa Fab được thêm vào. Sự gắn kết của Fab được phát hiện bằng F(ab)2 đặc hiệu với IgG của dê kháng người liên hợp với kiềm phosphataza (pha loãng 1:5000) sử dụng cơ chất huỳnh quang Attophos (Roche, #11681982001). Sự phát xạ huỳnh quang ở 535nm được ghi nhận với sự kích thích ở 430nm.

Để thực hiện ELISA sàng lọc của kháng nguyên biotinyl, Maxisorp™ đĩa 384 giếng được phủ với mảnh Fd đặc hiệu IgG của cừu kháng người (The binding site, #PC075) pha loãng 1:1000 trong PBS hoặc IgG chuột kháng His (R&D Systems, #MAB050). Sau khi phong bế với 5% sữa bột gầy trong PBS, dịch tan *E. coli* chứa Fab được thêm vào. Sau đó, mảnh HuCAL®-Fab được bắt giữ được cho phép để gắn kết lần lượt với 0,7 – 1,5 µg/ml hu TSLP, hu TSLP hoặc cy TSLP đã biotyl hóa, mà được phát hiện bằng cách ủ với streptavidin liên hợp với kiềm phosphataza sau khi thêm cơ chất huỳnh quang AttoPhos (Roche, #11681982001). Sự phát xạ huỳnh quang được ghi nhận với sự kích thích ở 430nm.

Kháng nguyên biotinyl hóa (2,5 – 5µg/ml) được bắt giữ trên đĩa phủ Neutravidin. Sau khi phong bế bằng 5% bột sữa gầy trong PBS, dịch tan *E. coli* chứa Fab được thêm vào. Sự gắn kết của Fab được phát hiện bằng F(ab)2 đặc hiệu IgG của dê kháng người liên hợp với kiềm phosphataza (pha loãng 1:5000) sử dụng cơ chất huỳnh quang Attophos (Roche, #11681982001). Sự phát huỳnh quang ở 535nm được ghi lại với sự kích thích ở 430nm.

9984 dòng (384 dòng/sàng lọc sơ bộ chỉ số phụ) được phân tích trên ELISA sàng lọc sơ cấp dựa trên TSLP_Avi-APP6 của người đã biotyl hóa và TSLP_APP6-Avi của khỉ đã biotyl hóa phủ trên đĩa NA (xem 3.4.4). Kết quả ELISA được phân tích bằng chương trình GENios Pro “PrimeScreen.” Kết quả được phân tích và so sánh với tín hiệu cơ sở. Đối với kháng nguyên của người, chỉ có những giếng có tín hiệu >10x cơ sở và đối với kháng nguyên của khỉ với những giếng có tín hiệu >5x cơ sở được chọn là dương tính. Các tín hiệu thấp hơn 5x cơ sở có khả năng là kết quả của Fab biểu hiện thấp, Fab có ái lực thấp, hiệu ứng cạnh của đĩa, hoặc các giá trị không thể tái thực hiện được. Sàng lọc sơ bộ dung dịch tạo ra 3133, sàng lọc pha rắn tạo ra 240 hit chính. 1472 hit chính được chọn lọc được phân tích tiếp trong sàng lọc ELISA thứ cấp.

Các chế độ trình diện kháng nguyên được sử dụng trong sàng lọc ELISA thứ cấp, bao gồm các kháng nguyên có đuôi Avi-APP6 ở đầu C hoặc N, các kháng nguyên phủ trực tiếp, các kháng nguyên đã biotyl hóa xuất hiện trong dung dịch, các kháng nguyên có nguồn gốc HEK, các kháng nguyên có nguồn gốc *E. coli*, các biến thể khử glycosyl hóa của kháng nguyên (đã xử lý PNGaza). Thêm vào đó, sự gắn kết không đặc hiệu với đích đối kháng (countertarget) IL-7 được phân tích trong sàng lọc thứ cấp. Để loại trừ các chất gắn kết với đuôi và biotin, kháng nguyên gắn đuôi Avi không liên quan tới APP đã biotyl hóa được sử dụng. Kết quả ELISA được phân tích với chương trình GENios Pro “PrimeScreen” và kết quả được phân tích và so sánh với tín hiệu cơ bản. Đối với kháng nguyên không liên quan, đích đối kháng (countertarget) IL-7, chỉ những hit với tín hiệu <2 lần cơ sở được chọn lọc.

Kết quả về việc sàng lọc thứ cấp chỉ ra rằng cách thức trình diện kháng nguyên rất quan trọng cho phản ứng chéo. Việc sàng lọc kháng nguyên đã glycosyl hóa cho thấy rằng có thể có các chất gắn kết nhằm vào epitop glyco-. Ngoài ra, vị trí của đuôi và thành phần của đuôi có thể ảnh hưởng đến phản ứng chéo do sự thay đổi cấu hình. Các dòng được nhóm theo profi phản ứng chéo của chúng tạo ra 7 nhóm phản ứng chéo khác nhau. Nhóm 1-3 có chứa tất cả các dòng mà phản ứng chéo với TSLP của người có nguồn gốc từ *E. coli* riêng biệt hoặc kết hợp với kháng nguyên có nguồn gốc từ HEK. Nhóm 4 bao gồm tất cả các dòng mà phản ứng chéo ít nhất với TSLP của người_Avi-APP6 của người xuất hiện trong dung dịch. Ngược lại, nhóm 5 bao gồm tất cả các dòng mà phản ứng chéo duy nhất với TSLP của người_Avi-APP6 trong dung dịch. Trong nhóm 6, có tất cả các dòng phản ứng chéo với TSLP của người_Avi-APP6

và với TSLP của người đã khử glycosyl hóa _Avi-APP6, và trong nhóm 7 có tất cả các dòng mà phản ứng chéo với các kháng nguyên có nguồn gốc từ HEK bao gồm các kháng nguyên đã khử glycosyl hóa.

Trình tự và chuyển đổi thành IgG

Phân tích trình tự được thực hiện trên 73 dòng trong số các nhóm phản ứng chéo 1-3 (các dòng phản ứng chéo với *E. coli* có nguồn gốc từ TSLP) và của 569 dòng trong số các nhóm 4-7 (dòng mà phản ứng chéo với kháng nguyên có nguồn gốc từ HEK). Tổng cộng, 297 dòng duy nhất HCDR3 được nhận dạng, 222 dòng được củng cố, và 124 dòng được tinh sạch ở định dạng dạng Fab.

Các dòng có nguồn gốc từ phân tích trình tự lần thứ 3 và 4 được đưa ngay vào chuyển đổi IgG và sau đó là tách dòng vào vector pMORPH®4_IgG1f để biểu hiện trong tế bào động vật.

Xác định ái lực

Việc xác định hằng số phân ly (K_D) của HuCAL® Fab và phiên bản IgG của các dòng được thực hiện như sau: TSLP của người đã biotyl hóa được phủ ở 0,2µg/ml trong đệm thử nghiệm trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trên đĩa MSD streptavidin. Đĩa Streptavidin được phong bế qua đêm ở 4°C với PBS chứa 3% BSA trước khi phủ kháng nguyên. Chuẩn độ cân bằng dung dịch (SET) được thực hiện với TSLP human và TSLP của khỉ *Cynomolgus* dưới điều kiện mô tả dưới đây. Các phân đoạn monomer của protein kháng thể được sử dụng (ít nhất 90% thành phần polymer, phân tích bằng SEC phân tích; Superdex75 (Amersham Pharmacia) cho Fab, hoặc Tosoh G3000SWXL (Tosoh Bioscience) cho IgG).

Việc xác định ái lực trong dung dịch được thực hiện về cơ bản như đã mô tả trong các tài liệu (Friquet *et al.*, 1985, J Immunol Meth 77, 305-319). Để cải thiện sự ổn định và tính chính xác của phương pháp SET, người ta đã chuyển từ ELISA cổ điển thành công nghệ dựa trên (Haenel *et al.*, 2005, Anal Biochem 339, 182-184). Kháng thể dê đặc hiệu mảnh (Fab)₂ kháng người 1mg/ml (Dianova) được đánh dấu bằng MSD Sulfo-TAG™ NHS-Este (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thực nghiệm được thực hiện trong đĩa vi chuẩn độ polypropylen và PBS pH 7,4 có chứa 0,5% BSA và 0,02% Tween-20 làm đệm thử nghiệm. Kháng thể không đánh dấu được pha loãng trong dãy pha loãng 2^n , bắt đầu bằng nồng độ ít nhất 10 lần cao hơn K_D mong đợi. Các giếng không có kháng nguyên được sử dụng để xác định giá trị B_{max} ; các giếng chỉ chứa đệm được sử dụng để xác định cơ sở. Sau khi bổ sung lượng chất gắn kết thích hợp (nồng độ kháng thể tương tự hoặc thấp hơn K_D mong đợi, 60 μ l thể tích cuối), hỗn hợp được ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng.

Đĩa MSD được phủ bằng kháng thể (30 μ l/giếng). Sai khi rửa đĩa bằng PBS với 0,02% Tween-20, các mẫu cân bằng được chuyển vào đĩa (30 μ l/giếng) và ủ trong 20 phút. Sau khi rửa, 30 μ l/giếng của kháng thể phát hiện được đánh dấu đuôi MSD-Sulfo ((Fab)2 kháng người, thường pha loãng nồng độ cuối là 1:2.000) được thêm vào đĩa MSD và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong máy lắc Eppendorf (700 vòng/phút).

Sau khi rửa đĩa MSD và thêm 30 μ l/giếng đệm đọc MSD T bằng chất bề mặt, tín hiệu huỳnh quang điện được phát hiện bằng Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA).

Dữ liệu được đánh giá bằng phần mềm XLfit (IDBS) ứng dụng mô hình tự lắp số liệu tùy chỉnh. Xác định K_D của phân tử Fab mô hình lắp số liệu sau được sử dụng (theo Haenel *et al.*, 2005), sửa đổi theo (Abraham *et al.*, 1996)):

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

$[Fab]_t$: áp dụng cho nồng độ Fab tổng

x : áp dụng cho nồng độ kháng nguyên hòa tan (vị trí gắn kết)

$B_{\max}$: tín hiệu lớn nhất của Fab mà không có kháng nguyên

K_D : ái lực

Để xác định K_D của phân tử IgG, mô hình lắp số liệu sau cho IgG được sử dụng (sửa đổi theo Piehler *et al.*, 1997):

Ái lực có thể được xác định bằng cộng hưởng bề mặt plasmon Biacore (SPR) bằng việc xác định các hằng số động học sử dụng thiết bị Biacore 3000 hoặc T200 (Biacore, GE Healthcare). Việc xác định Biacore K_D qua kháng nguyên phủ trực tiếp được thực hiện trên cơ sở sau: 50 RU TSLP của người đã biotinyl hóa bị bắt giữ trên chip SA chip (Biacore, GE Healthcare). Dòng tế bào tham chiếu được giữ trống. PBS pH7,2 GIBCO + 0,05% Tween 20 được sử dụng làm đệm chạy với tốc độ dòng là 30µl/phút. Nồng độ Fab nằm trong khoảng từ 3,9 đến 500nM được sử dụng với thể tích bơm là 45µl và thời gian phân ly là 300 giây. Sự tái tạo chất phân tích đã gắn kết được thực hiện bằng 2 lần bơm Glycin 10mM pH 1,5, mỗi lần 5µl. Sử liệu thô được được lắp vào mô hình gắn kết 1:1, với các thông số R_{max} cài đặt tại chỗ và RI cài đặt về 0.

$$y = \frac{2B_{max}}{[IgG]} \left[\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right]$$

[IgG]: áp dụng cho nồng độ IgG tổng

x: áp dụng cho nồng độ kháng nguyên hòa tan (vị trí gắn kết)

B_{max} : tín hiệu lớn nhất của IgG mà không có kháng nguyên

K_D : ái lực

Thành thực ái lực

Bảy ứng viên Fab được lựa chọn cho sự thành thực ái lực. Để làm tăng ái lực và hoạt tính sinh học của các Fab, vùng L-CDR3 và HCDR2 được tối ưu hóa song song bằng đột biến cassette sử dụng đột biến định hướng trinucleotit (Virnekas *et al.*, 1994, Nucleic Acids Res 22: 5600-5607), trong khi vùng khung được giữ không đổi. Để tối ưu hóa L-CDR3 của mảnh Fab gốc, LCDR3, khung 4 và vùng cố định của chuỗi nhẹ (405 bp) của nhóm chất gắn kết được loại bỏ bằng phân cắt sử dụng enzym và thay thế bằng danh mục các L-CDR3 đa dạng cùng với một khung hoạt động 4 và miền cố định. Trong thư viện thứ 2, H-CDR2 được đa dạng hóa, trong khi vùng khung hoạt động kết nối được giữ cố định. Hỗn hợp lai được xung điện trong 4 ml tế bào *E. coli* TOP10F thu được từ 108 đến 109 khuẩn lạc độc lập. Kích thước thư viện này đảm bảo

sự bao phủ toàn bộ sự đa dạng lý thuyết. Việc khuếch đại thư viện được thực hiện như đã mô tả (Rauchenberger *et al.*, 2003, J Biol Chem 278: 38194-38205). Để kiểm soát chất lượng, dòng đơn được chọn ngẫu nhiên và giải trình tự. Để chọn lọc các chất gắn kết đã cải thiện về ái lực, thực khuẩn thể có nguồn gốc từ thư viện thành thực được đưa vào 3 vòng sàng lọc sơ bộ dung dịch phage sử dụng kháng nguyên TSLP của người đã biotyl hóa_Avi-APP6 và TSLP của Khỉ Cynomolgus _APP6-Avi. Tính chính xác tăng lên khi hạ thấp nồng độ kháng nguyên ở mỗi lần sàng lọc sơ bộ (Low *et al.*, 1996, J Mol Biol 260, 359-368. 1996.). Ngoài kháng nguyên, sự giảm chọn lọc phân ly (off-rate) (Hawkins *et al.*, 1992, J Mol Biol 226, 889-896) cũng được thực hiện. Bước này kết hợp với bước rửa kéo dài qua đêm ở nhiệt độ phòng.

Để tiếp tục làm tăng ái lực và hoạt tính sinh học của một vài đoạn kháng thể được lựa chọn, các vùng L-CDR1, L-CDR3, H-CDR2, H-CDR1 được tối ưu hóa song song với việc gây đột biến cassette sử dụng đột biến định hướng ba nucleotit directed mutagenesis (Virnekas *et al.*, 1994, Nucleic Acids Res 22: 5600-5607), trong khi đó các vùng khung hoạt động được giữ không đổi.

Sự biến đổi sau mã (PTMs) trong CDR không được mong muốn do hiệu lực của các kháng thể này có thể bị giảm xuống phụ thuộc vào vị trí của PTM, ngoài ra, PTM có thể dẫn đến hợp chất không đồng nhất. Trước khi thành thực ái lực, các biến thể không có các vị trí NG, NS, và DG được tạo ra và nằm trong nhóm với dòng gốc nhằm mục đích lựa chọn cá biến thể đã loại bỏ PTM trong suốt quá trình lựa chọn. Fab có chứa dịch phần giải tế bào của các biến thể được tạo ra được kiểm tra sự gắn kết với kháng nguyên trong ELISA ở TSLP ở người. ADN plasmid của các biến thể được trộn với ADN gốc để tạo thư viện thành thực.

Để xếp loại các chất kết dính thành thực cho chuẩn độ cân bằng dung dịch dựa trên những nguyên lý được mô tả bởi Haenel *et al.*, 2005, Anal Biochem 339: 182-184, một lượng không đổi của dịch chiết xuất từ BEL đã pha loãng được cân bằng qua đêm với những nồng độ kháng nguyên khác nhau. Sau đó, hỗn hợp được chuyển sang đĩa MSD mà đã ủ trước với kháng nguyên, và sau khi ủ và rửa, một kháng thể phát hiện đánh dấu đuôi MSD-Sulfo thích hợp được thêm vào. Sau đó, nồng độ Fab không gắn kết được định lượng thông qua phát hiện ECL sử dụng Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA). Kết quả được xử lý sử dụng phần mềm

XLfit (IDBS), áp dụng mô hình lắp số liệu để ước lượng ái lực và do đó nhận dạng các dòng cải thiện nhất qua quá trình thành thực.

Sản xuất

Tế bào HKB11 được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện pMORPH®4 với ADN mã hóa cho cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fab kháng TSLP hoặc IgG. Dịch nổi tế bào được thu sau khi chuyển nhiễm từ 3 đến 6 ngày. Sau khi lọc, dung dịch được đưa lên cột sắc ký Protein A (MabSelect SURE, GE Healthcare) sử dụng trạm điều khiển dung dịch. Trừ phi có quy định khác, sự trao đổi đệm được hiện bằng 1x Dulbecco's PBS (pH 7,2, Invitrogen) và mẫu được lọc vô trùng (kích thước lỗ lọc 0,2µm). Nồng độ protein được xác định bằng khối phổ UV và độ tinh sạch của IgG được phân tích dưới điều kiện biến tính, giảm sử dụng hệ thống Labchip (Perkin Elmer, USA).

Fab1 kháng TSLP

Fab1 kháng TSLP bắt nguồn từ họ MOR011086, mà được nhận dạng trong những sàng lọc đầu tiên. Sự thành thực ái lực của MOR011086 dẫn đến sự hình thành MOR014051, mà đã bao gồm motif biến đổi sau dịch mã có chứa motif biến đổi sau dịch mã DG trong HC-CDR2. Việc loại bỏ motif DG này dẫn đến sự tạo thành MOR14701 (DG→DA), mà sau đó chúng được làm dòng gốc để sản xuất MOR014824, có nghĩa là, Mab1 trong bảng 2. Fab1 kháng TSLP trong bảng 2 là mảnh Fab của Mab1.

Trình tự axit amin của Fab1 kháng TSLP heavy chain CDRs (HCDRs), chuỗi nhẹ CDRs (LCDRs), theo Kabat, Chothia, hoặc kết hợp đánh số, cũng như trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định và liệt kê ở bảng 2. Fab1 kháng TSLP gắn kết với ái lực cao ($K_D=6\text{pM}$) với TSLP của người tái tổ hợp được xác định bằng SET. Fab1 kháng TSLP không gắn kết với xytokin tương tự về mặt cấu trúc, IL-7.

Ví dụ 2: Hiệu lực của FabI kháng TSLP so với TSLP của người được tiết tự nhiên và tái tổ hợp trong thử nghiệm gen thông báo

Hiệu lực của FabI kháng TSLP so với TSLP của người tái tổ hợp TSLP, TSLP của người tiết tự nhiên, và TSLP của khỉ *Cynomolgus* được kiểm tra bằng thử nghiệm gen thông báo luciferaza.

Vật liệu và phương pháp

TSLP của người tiết tự nhiên thu được từ các tế bào tế bào nguyên bào sợi ở phổi của người bằng cách kích thích IL-1 β , TNF- α , và IL-13 trong giờ.

Tế bào Ba/F3 được chuyển nhiễm với hTSLPR, hIL7R α và thiết kế thông báo Stat5-luciferaza. Stat5 là nhân tố xuôi dòng của đường truyền tín hiệu TSLP. Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào: RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, NY) với FCIII 10% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), Penicillin/Streptomycin 1% (Invitrogen, Grand Island, NY), puromycin 1 μ g/ml (Sigma, St. Louis, MO), và 5ng/ml TSLP của người tái tổ hợp (rhTSLP, R&D Systems, Minneapolis, MN). Đệm thử nghiệm thông báo được điều chế từ RPMI 1640 với 10% FCIII, Penicillin/Streptomycin 1%, và Puromycin 1 μ g/ml.

Tế bào Ba/F3 được nuôi ở dạng huyền phù trong chai T162cm² và phân chia với tỷ lệ 1:50 2 lần/ tuần. Tế bào Ba/F3 được thu và thu cạn ở giữa pha phát triển lũy tiến bằng cách ly tâm ở 200xg trong 5 phút và rửa trong môi trường nuôi cấy không chứa TSLP. Bước này được lặp lại sau đó ở 18-24 giờ trong điều kiện không có TSLP. Ngày tiếp theo, tế bào được thu cạn lần nữa bằng ly tâm ở 200xg trong 5 phút, và tạo huyền phù lại trong đệm thử nghiệm thông báo để có nồng độ tế bào là 1 x 10⁶ tế bào/mL. 10 μ l tế bào Ba/F3 ở 1 x 10⁶ tế bào/mL được kết hợp với 70 μ l đệm thử nghiệm thông báo trong mỗi giếng của đĩa quang trắng 96 giếng (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). Bước này theo sau bởi 10 μ l ở 6 điểm số 6 của dãy pha loãng kháng thể 1:10 (nồng độ lớn nhất là 100nM) và ủ trong 30 phút ở 37°C/5% CO₂ trong tủ ẩm có làm ẩm. Cuối cùng, 10 μ l 0,5ng/mL TSLP của người hoặc của khỉ *Cynomolgus* hoặc một nồng độ được tính toán của TSLP tiết theo cách tự nhiên với hoạt tính tương đối giống, và đĩa được bọc kín để làm giảm sự bốc hơi, và ủ trong 4 giờ ở 37°C/5% CO₂ trong tủ ẩm được làm ẩm. Đĩa sau đó được lấy ra khỏi tủ ẩm, và cho phép cân bằng tới nhiệt độ phòng trong khoảng 15 phút. Điều này được cho phép

bằng cách bổ sung 100 μ L chất phản ứng (Promega, Madison, WI) vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Đọc được ở thiết bị Envision, sử dụng chương trình phát hình quang (máy ghi phôi sáng 1 giây/giây) và dữ liệu được phân tích bằng Microsoft Excel và Graphpad Prism.

Kết quả

Fab1 kháng TSLP đã chứng minh hiệu lực đối với 3 dạng TSLP trong thử nghiệm gen thông báo luciferaza, với IC₅₀ là 15,4pM so với TSLP của người tái tổ hợp (1ng/ml), IC₅₀ là 17,1pM so với TSLP của người được tiết tự nhiên, và IC₅₀ là 10,8pM so với TSLP của khỉ Cynomolgus. Khi thử nghiệm gen thông báo trung bình là kết quả của nhiều thí nghiệm (n=3) được tính toán, các giá trị IC₅₀ cho Fab1 so với TSLP của người tái tổ hợp là 15,3pM $\pm$ 1,5pM SEM. Giá trị IC₅₀ trung bình cho Fab1 so với TSLP của khỉ Cynomolgus là 9,5pM $\pm$ 0,9pM SEM.

Do đó, Fab1 kháng TSLP chất ức chế mạnh của người và TSLP của khỉ Cynomolgus với hiệu lực picromol. Thực tế là, Fab1 kháng TSLP đã chứng minh hiệu lực hoàn hảo so với TSLP tiết tự nhiên từ nguyên bào sợi ở phổi của người làm giảm khả năng gây glycosyl vi sai của TSLP hoạt động ở cơ thể của người và TSLP của người tái tổ hợp được sử dụng để tạo Fab kháng TSLP.

Ví dụ 3: Ức chế TARC (Chemokin điều hòa tuyến ức và điều hòa hóa hóa) cảm ứng bởi sự tiết TSLP từ các tế bào máu nguyên sinh đơn nhân ngoại vi (primary human peripheral blood mononuclear cells- PBMC) bởi Fab1 kháng TSLP

Để xác định liệu Fab1 kháng TSLP có khả năng trung hòa TSLP trong bối cảnh đáp ứng điều khiển bởi tế bào nguyên sinh, sự tiết TARC cảm ứng với TSLP của người hoặc Khỉ Cynomolgus được kiểm tra trong sự vắng mặt của Fab1 kháng TSLP.

Vật liệu và phương pháp

Máu tĩnh mạch được lấy từ những cơ thể cho khỏe mạnh được chống đông (Sigma, St. Louis, MO) và thu nhận trong xi lanh 50mL và sau đó chia vào hai ống falcon, mỗi ống, 25ml mỗi ống. Những ống này được ly tâm ở 1200vòng/phút trong 20 phút với sự tăng tốc và giảm tốc chậm trước khi loại bỏ lớp huyết tương sử dụng pipet

Pasteur. 20ml máu từ mỗi ống được chuyển sang ống Falcon 50ml sạch và 20mL PBS (1x, Invitrogen, Grand Island, NY) và 10mL 4% Dextran (khối lượng/thể tích, Sigma, St. Louis, MO) được thêm vào mỗi ống. Các ống được đảo thông qua việc trộn kỹ máu và dextran và chúng được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để cho phép các tế bào máu đỏ sa lắng. 20mL dịch nổi được chuyển vào ống Falcon 50ml và được rửa trong 30ml PBS (1400 vòng/phút trong 8 phút) trước khi before hút dịch nổi và tạo lại huyền phù từ cặn tế bào trong 10mL PBS.

Để ly giải tế bào máu đỏ, 20mL nước khử ion vô trùng lạnh (Sigma, St. Louis, MO) được thêm vào tế bào và trộn bằng 20ml stripet trong 1 phút trước khi 20ml 2xPBS lạnh vô trùng được thêm vào để dừng ly giải. Các ống được đảo một vài lần và ly tâm ở 1400 vòng/phút trong 8 phút trước khi được trữ trong một ống và rửa hai lần với đệm thử nghiệm (1400vòng/phút, 8 phút). Đệm thử nghiệm được chuẩn bị từ RPMI 1640 (with GlutaMax, Invitrogen, Grand Island, NY) với 10% huyết thanh người AB (Life Technologies, Grand Island, NY) và 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Grand Island, NY).

Tế bào được đếm và tạo lại huyền phù ở nồng độ 10×10^6 tế bào/ml, 100 μ l của dịch huyền phù được thêm vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng đáy bằng (1×10^6 tế bào/giếng). 50 μ l/giếng của kháng thể kháng TSLP được thêm vào mỗi giếng và để ủ trong 30 phút ở 37°C trước khi thêm TSLP của người hoặc Khỉ Cynomolgus, thu được nồng độ cuối là 1ng/ml TSLP (66pM). Tế bào được ủ trong 24 giờ trước khi đĩa được ly tâm ở 1300 vòng/phút trong 5 phút và dịch nổi được thi lại cho phân tích Chemokin điều hòa bởi tuyến ức và bởi sự hoạt hóa (Thymus- và Activation-Regulated Chemokine - TARC) bằng ELISA. Dịch nổi được bảo quản ở -20°C cho đến khi chúng được làm tan để phân tích trong TARC ELISA (mẫu kiểm tra gọn gàng).

Phân tích TARC ELISA được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất (R&D Systems, Minneapolis, MN). Một cách ngắn gọn, kháng thể bắt giữ được pha loãng đến nồng độ hoạt động trong PBS không có chất mang protein. Vi đĩa miễn dịch maxiSorp plates (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) được phủ bằng 100 μ l/giếng với kháng thể bắt giữ đã pha loãng, các đĩa này được bọc kín bằng lớp phủ dính và ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Ngày sau đó, kháng thể bắt giữ được hút ra và rửa đĩa bằng đệm rửa, lặp lại quy trình 2 lần để cho 3 lần rửa. Các giếng được rửa bằng cách làm

làm đả mỗi giếng bằng dụng cụ phân phối nhiều đầu ra hoặc máy rửa tự động. Sau lần rửa cuối, đệm rửa còn lại được loại bỏ bằng cách đạo đĩa và đặt đĩa lên giấy thấm sạch. Đĩa được phong bế bằng cách thêm 300µl chất phản ứng pha loãng (1% BSA trong PBS) vào mỗi giếng. Đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 1 giờ. Các bước rửa được lặp lại và 100µl mẫu hoặc mẫu chuẩn trong chất phản ứng đã pha loãng được thêm vào mỗi giếng. Đĩa được đập bằng miếng dính và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Bước hút/rửa được lặp lại và 100µl kháng thể phát hiện được pha loãng được thêm vào mỗi giếng, đập bằng miếng dính và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng trước khi lặp lại bước rửa như mô tả trước đây. 100µl độ pha loãng hoạt động của Streptavidin-HRP được thêm vào mỗi giếng và đĩa được đập lại và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, tránh đặt trực tiếp dưới ánh sáng. Bước hút/rửa được lặp lại và 100µl dung dịch cơ chất TMB được thêm vào mỗi giếng. Đĩa được ủ đến 20 phút ở nhiệt độ phòng trong tối sau khi thêm 50ml dung dịch dừng. Đập nhẹ vào đĩa để đảm bảo việc trộn đều ở các giếng và mật độ quang mỗi giếng được xác định bằng máy đo vi đĩa với cài đặt 450nm.

Kết quả

Fab1 kháng TSLP là chất ức chế rất có tiềm năng sự tiết TARC cảm ứng bởi TSLP của người tái tổ hợp từ PBMC của người với IC₅₀ là 20,3pM và IC₉₀ là 99,65pM so với 1ng/ml TSLP của người tái tổ hợp. Fab1 kháng TSLP được xem là chất ức chế tiềm năng sự tiết TARC cảm ứng bởi TSLP của khỉ với IC₅₀ là 11,3pM kháng 1ng/ml TSLP của khỉ tái tổ hợp. Khi kết quả trung bình PBMC của người từ nhiều thí nghiệm (n=3) được tính toán, giá trị IC₅₀ trung bình cho Fab1 kháng TSLP của người tái tổ hợp là 19,7pM ± 1,9pM SEM. Giá trị IC₅₀ trung bình cho Fab1 kháng TSLP của Khỉ Cynomolgus là 11,1pM ± 0,5pM SEM.

Ví dụ 4: Ức chế MDC cảm ứng bằng sự tiết TSLP (xytokin có nguồn gốc từ đại thực bào) từ các tế bào đơn nhân ngoại vi trong máu của khỉ Cynomolgus bởi Fab1 kháng TSLP

Vật liệu và phương pháp

Máu tĩnh mạch của khỉ Cynomolgus được thu vào ống hút chân không có chứa lithilum heparin của Covance (Dedham, MA). 30ml máu từ mỗi vật cho được chuyển

vào ống falcon 50ml ly tâm ở 1200 vòng/phút trong 20 phút với sự tăng tốc độ và giảm tốc độ chậm trước khi lớp huyết tương được loại bỏ sử dụng pipet Pasteur, để lại 0,5cm khoảng trống giữa các lớp. Lớp tế bào còn lại dưới đáy được tạo huyền phù lại và 10ml được chuyển vào ống falcon sạch, sau khi thêm 10ml 1x PBS và 5ml 4% Dextran (khối lượng/thể tích, Sigma, St. Louis, MO) trước khi đảo ống 4-5 lần để trộn kĩ. Tất cả các ống đều được ủ ở nhiệt độ phòng trong tủ hút 25 phút để cho phép RBC sa lắng xuống đáy ống. 10mL dịch nổi được chuyển vào ống Falcon sạch 50ml và rửa bằng 40ml môi trường nuôi cấy (1400 vòng/phút trong 8 phút) trước khi hút bỏ dịch nổi và tạo lại huyền phù cấy tế bào trong 5mL 1xPBS.

Để ly giải tế bào máu đỏ, 20mL nước khử ion lạnh (Sigma, St. Louis, MO) được thêm vào tế bào và trộn bằng stripet 20ml trong 1 phút trước khi thêm 20ml 2xPBS lạnh vô trùng để dừng ly giải. Các ống được đảo một vài lần và ly tâm ở 1400 vòng/phút trong 8 phút trước khi đổ vào một ống và rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy (1400 vòng/phút, 8 phút, 4°C). Môi trường nuôi cấy được tạo ra từ RPMII 1640 (with GlutaMax, Invitrogen, Grand Island, NY) với 10% Fetal clone III (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) và 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Grand Island, NY).

Các tế bào được đếm sử dụng ống thuốc nhuộm xanh Trypan và tạo lại huyền phù ở nồng độ là 10×10^6 tế bào/ml, 100µl thuốc nhuộm được thêm vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng đáy bằng (1×10^6 tế bào/giếng). 50µl/giếng kháng thể kháng TSLP (nồng độ cao nhất là 100nM) được thêm vào mỗi giếng và để ủ trong 30 phút ở 37°C trước khi thêm TSLP của Khỉ Cynomolgus, thu được nồng độ cuối là 0,5ng/ml TSLP (33pM). Các tế bào được ủ trong 24 giờ trước khi đĩa được ly tâm ở 1400 vòng/phút trong 8 phút và dịch nổi được thu nhận chemokine có nguồn gốc từ thực khuẩn thể (MDC, CCL22) cho phân tích ELISA. Dịch nổi được bảo quản ở -20°C cho đến khi chúng tan đá cho phân tích trên MDC ELISA (pha loãng 1:2 trong đệm thử nghiệm trước khi thêm vào đĩa ELISA). Phân tích MDC ELISA được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Kết quả

Fab1 kháng TSLP cho thấy là một chất ức chế tiềm năng sự tiết MDC cảm ứng bởi TSLP của PBMC của khỉ Cynomolgus với IC₅₀ là 55,5pM kháng 0,5ng/ml TSLP

của khỉ *Cynomolgus* tái tổ hợp. Khi kết quả PBMC trung bình của khỉ *Cynomolgus* từ nhiều thực nghiệm ($n=3$) được tính toán, giá trị IC_{50} trung bình cho Fab1 kháng TSLP của khỉ *Cynomolgus* là $25,1pM \pm 5,9pM$ SEM.

Ví dụ 5: Phản ứng chéo loài của Fab1 kháng TSLP

Vật liệu và phương pháp

Phân tích cộng hưởng Plasmon bề mặt (Biacore surface plasmon resonance-SPR) được thực hiện để thiết lập liệu Fab1 kháng TSLP có gắn kết với protein TSLP của người, chuột nhắt, hoặc chuột đồng. Chất phản ứng Biacore, bao gồm Series S Sensor Chip CM5, đệm HBS-EP+, Kit bắt giữ Fab của người, EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide), NHS (N-hydroxysuccinimide), Ethanolamin, dung dịch chuẩn hóa BIA, 70% (khối lượng/ khối lượng) glycerol, và glycine, mua từ GE Healthcare. Đệm chạy sử dụng cho phân tích bắt giữ Fab và gắn kết TSLP là 1X HBS-EP+, với 10mM HEPES (pH 7,4), 150mM NaCl, 3mM EDTA, chất có hoạt tính bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích. TSLP của người, khỉ *Cynomolgus* hoặc chuột nhắt (MW 15 kDa) nhận từ R&D Systems (Minneapolis, MN). TSLP của chuột đồng tái tổ hợp (MW 15,4 kDa) nhận từ USCN Life Science Inc. (Wuhan, China).

Cách thức bắt giữ được sử dụng để điều chế Fab1 kháng TSLP trên Chip Biacore CM5 trước khi tiêm TSLP của người, chuột nhắt, hoặc chuột đồng. Chất gắn kết với Fab của người được cố định trên tất cả bốn tế bào dòng chảy của Chip CM5 sử dụng kit bắt giữ Fab của người theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thời gian tiếp xúc là 360 giây ở tốc độ dòng là 10uL/phút được cụ thể hóa. Nhiệt độ của khoang mẫu là 10°C và nhiệt độ phân tích là 25°C; trước khi cố định, chip CM5 được gắn với HBS-EP+ và chuẩn hóa bằng dung dịch chuẩn hóa BIA. 375uL của chất gắn kết Fab của người 20ug/mL được chuẩn bị kết hợp với 15uL 0,5mg/mL gốc bằng 360uL pH5 đệm cố định (cả hai đều được cung cấp trong kit bắt giữ Fab của người). Các mức độ cố định thu được xấp xỉ 4000-4400RU chất gắn kết Fab của người trong Fc1, 2, 3 và 4.

Phương pháp Biocore thông thường được sử dụng để thiết lập thử nghiệm động học, trong đó, xấp xỉ 14RU Fab1 kháng TSLP bị bắt giữ mỗi vòng. Kết quả này thu được bằng cách bơm 5nM Fab1 kháng TSLP trong đệm HBS-EP+ với thời gian tiếp xúc là 60 giây ở tốc độ dòng là 10uL/phút, sau đó là giai đoạn ổn định 30 giây. Nhiệt

độ của khoang mẫu là 10°C và nhiệt độ phân tích là 25°C. Sử dụng phương pháp Biacore thông thường này, thử nghiệm động học được thiết lập để đánh giá tương tác hTSLP, mTSLP, và rTSLP với Fab1 kháng TSLP được bắt giữ. Đối với mỗi kháng nguyên, 10 nồng độ sau được chuẩn bị trong HBS-EP+ và được bơm lên bề mặt Fab1 kháng TSLP, bao gồm đệm trống 0nM, 10nM, 5nM, 2,5nM, 1,25nM, 0,625nM, 0,313nM, 0,156nM, 0,078nM, 0,039nM, 0,02nM. Sau khi bắt giữ ~14RU Fab1 kháng TSLP, kháng nguyên được bơm 45uL/phút trong 360 giây, sau đó giai đoạn phân ly là 600 giây (đối với tất cả nồng độ kiểm tra) hoặc 1200 giây (đối với nồng độ kháng nguyên 0nM và 2,5nM). Sự tái tạo bề mặt các chất gắn kết với Fab thu được sau khi bơm 10mM glycine-HCl, pH 2,0 trong 60 giây ở 10uL/phút, sau đó rửa thêm bằng đệm HBS-EP+. Nhiệt độ của khoang mẫu là 10°C và nhiệt độ phân tích là 25°C.

Tất cả các khảo nghiệm SPR và phân tích được thực hiện bằng thiết bị Biacore T200 kiểm soát bởi phần mềm kiểm soát Biacore T200. Dữ liệu được xử lý sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200. Các ký hiệu cảm biến trừ đi màu trắng được tính toán để phân tích định tính về phản ứng chéo của các phản ứng của Fab1 kháng TSLP.

Kết quả

Kết quả thực nghiệm phản ứng chéo Biacore SPR cho thấy sự gắn kết chặt của Fab1 kháng TSLP đối với TSLP của người tái tổ hợp, trong khi không phát hiện ra sự gắn kết với TSLP của chuột đồng và chuột nhắt tái tổ hợp, kết quả này nhất quán bởi sự tương đồng thấp giữa TSLP của người và của bộ gặm (khoảng 40%).

Fab1 kháng TSLP gắn kết với ái lực cao đối với TSLP của khỉ Cynomolgus tái tổ hợp và là chất ức chế tiềm năng TSLP của khỉ Cynomolgus ($IC_{50} = 10,8pM$ chống lại 1ng/ml TSLP tái tổ hợp) trong thử nghiệm gen thông báo luciferaza. Trong cả thử nghiệm PGMc ở thử nghiệm PBMC nguyên phát của người và khỉ Cynomolgus, Fab1 kháng TSLP là một chất ức chế tiềm năng sự tiết TARC cảm ứng bởi TSLP của Khỉ Cynomolgus tái tổ hợp từ PBMC của người ($IC_{50} = 11,3pM$) và sự tiết MDC secretion từ TSLP của khỉ Cynomolgus cảm ứng bởi cyno PBMC ($IC_{50} = 55,5pM$).

Do đó, Fab1 kháng TSLP cho thấy phản ứng chéo loài bị hạn chế, nhận ra TSLP tái tổ hợp của khỉ Cynomolgus, nhưng không nhận ra TSLP của chuột đồng hoặc chuột nhắt.

Ví dụ 6: Hiệu quả của kháng thể kháng TSLP của chuột nhắt trong mô hình hen suyễn ở chuột nhắt

Vật liệu và phương pháp

Ảnh hưởng của việc trung hòa TSLP lên đáp ứng dị ứng ở đường hô hấp được đánh giá ở mô hình nhạy cảm với ovalbumin (OVA) trên toàn bộ cơ thể sensitization sau đó là thử thách kháng nguyên với phổi. Mô hình này được đặc trưng bởi sự phát triển của phenotyp Th2 và viêm bạch cầu ái toan có liên quan. Do Fab1 kháng TSLP theo ví dụ 1 không phản ứng chéo với protein TSLP của bộ gắm nhấm như đã mô tả trong ví dụ 5, ảnh hưởng của việc trung hòa TSLP được đánh giá sử dụng kháng thể đơn dòng kháng TSLP của chuột thương mại hóa (MAB555, R&D Systems, Minneapolis, MN), nó trung hòa hoàn toàn hoạt tính sinh học của TSLP của chuột tái tổ hợp với IC50 là khoảng 1,3nM so với 0,5nM TSLP của chuột (dữ liệu được cung cấp bởi R&D Systems). Kit ELISA đặc hiệu cho tất cả xytokin và chemokin cũng được mua từ R&D Systems.

Chuột nhắt cái Balb/c được gây miễn dịch với OVA (hoặc nước muối) và phèn chua như là một tá dược vào ngày 1 và ngày 14. Một cách ngắn gọn, chuột nhắt được gây miễn dịch qua ổ bụng với 0,2mL 0,9 % khối lượng/thể tích NaCl (nước muối) có chứa 100µg ovalbumin (5 x dạng tinh thể, Sigma, UK) đã hấp phụ trong 1,6mg nhôm hydroxit (Sigma). Vào ngày thứ 21, chuột nhắt được dùng OVA hoặc nước muối saline dưới dạng sol khí và đào thải 24 giờ sau. Viêm được đánh giá bằng việc đếm tế bào khác biệt và tổng số giữa rửa phế quản phế nang (BAL), trong khi xytokin & chemokin được đo bằng ELISA đặc hiệu.

Hai mươi tư giờ sau lần cuối dùng OVA hoặc PBS qua mũi, chuột nhắt được gây mê bằng cách tiêm ổ bụng 4mg/Kg natri pentobarbital (Rhone Merieux, Harlow, UK). Dịch BAL được thu bằng cách đặt ống vào khí quản và rửa phổi bằng tổng lượng nước muối là 1,2ml ($3 \times 0,4$ mL mỗi lá phổi). Ví dụ, tổng số tế bào đếm được xác định và cytopsin dạng bào chế (Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK) được thực hiện. Tế bào được nhuộm bằng Diff-Quik (Baxter Dade AG, Dudingen, Switzerland) và tế bào khác biệt là 200 được thực hiện sử dụng các chỉ số về hình thái chuẩn.

Để đánh giá ảnh hưởng của việc làm suy kiệt TSLP đối với pha nhạy cảm của đáp ứng, kháng thể đơn dòng kháng TSLP của chuột nhắt (ở 10mg/Kg) hoặc IgG2 của chuột đối chứng isotyp được tiêm tĩnh mạch 1 giờ trước khi gây mẫn cảm OVA và lần nữa trước khi tăng liều vào ngày thứ 14. Để đánh giá vai trò của TSLP vào thời điểm ggaay miễn dịch, một vài con chuột nhắt được cho dùng kháng thể 1 giờ trước khi sol khí OVA vào ngày thứ 21. Không có ảnh hưởng nghiêm trọng quan sát được khi dùng những kháng thể này qua tĩnh mạch.

Kết quả được biểu hiện là các giá trị trung bình $\pm$ SEM của các số liệu thí nghiệm. Phân tích một yếu tố khác nhau (ANOVA) được sử dụng để xác định sự có ý nghĩa trong nhóm. Nếu sự khác nhau có ý nghĩa được phát hiện, kiểm tra Student's T không bắt cặp được sử dụng để đánh giá khả năng so sánh được giữa các giá trị trung bình. Giá trị $p \leq 0,05$ được xem là có ý nghĩa.

Kết quả

Sự mẫn cảm và sự đổi mặt OVA dẫn đến số lượng tế bào tăng trong dịch rửa phế quản, mà có bao gồm bạch cầu ái toan và bạch cầu trung tính, so với động vật đối chứng (Fig. 3). Điều này đồng nhất với các trải nghiệm trước đây về đáp ứng sau khi đổi mặt với kháng nguyên đơn. Hơn nữa, nhiều các nhân tố trung gian gây viêm cũng được điều hòa dương trong dịch rửa phổi của chuột mẫn cảm/đã đổi mặt với OVA so với đối chứng (Fig. 4A-4C).

Điều trị với kháng thể kháng TSLP của chuột (10mg/kg) ức chế đáng kể tổng số tế bào trong dịch BAL xấp xỉ 50%, trong khi số lượng tế bào ái toan giảm còn 80%. Điều trị bằng kháng thể khi có sự mẫn cảm với kháng nguyên khi không có mặt kháng nguyên thay đổi không đáng kể thành phần tế bào ở đường cơ bản của phổi. Phân tích các chất chuẩn xuôi dòng hoạt tính TSLP bộc lộ mức giảm IL-13 (Fig. 4A), xytokin liên quan tới sự viêm đường dẫn khí do dị ứng, và chemokin eotaxin-2 và TARC (Fig. 4B và 4C), cả hai đều được coi là chất dẫn dụ của tế bào Th2 và bạch cầu ái toan mà sinh ra từ các tế bào tua kích thích bởi TSLP.

Ví dụ 7: Đặc tính động học của Fab1 kháng TSLP ở chuột đồng

Vật liệu và phương pháp

Động dược học (PK) và sự lắng đọng ở phổi của kháng TSLP Fab1 được nghiên cứu ở chuột cống sau khi tiêm tĩnh mạch (IV) bằng tiêm nhanh, sự bôi trơn nội tạng (Intratracheal instillation-ITI), hoặc chỉ xông-hít qua mũi liều đơn đánh nghĩa khi dung Fab1 kháng TSLP ở 1mg/kg trong 20 phút. Nồng độ Fab1 kháng TSLP ở thời điểm sau liều khác nhau được xác định trong huyết tương, dịch BAL, cũng như các mẫu phổi đã đồng nhất (sau khi BAL và lấy máu từ hệ mạch máu phổi).

Kết quả

Fab1 kháng TSLP bị biến mất khỏi tuần hoàn của cơ thể nhanh chóng sau khi tiêm IV, với thời gian bán thải trung bình là khoảng 3 giờ. Sau khi ITI hoặc xông hít, Fab1 kháng TSLP được hấp phụ chậm vào hệ tuần hoàn của cơ thể, đạt Cmax của huyết tương khoảng 2 giờ đối với cả 2 con đường, và thời gian bán rã trung bình dài hơn khi xác định sau lần dùng thứ IV (7 giờ sau ITI và 4 giờ sau khi xông-hít, so với 3 giờ sau khi IV), điều này cho thấy động học bị hạn chế bởi tốc độ hấp phụ. Tính sinh khả dụng hệ thống của Fab1 kháng TSLP trung bình khoảng 6% sau khi ITI và 1% sau khi xông-hít, có thể do phân đoạn lắng đọng ở phổi cao hơn sau khi ITI so với khi xông-hít. So sánh với sự phơi nhiễm toàn bộ, nồng độ Fab1 kháng TSLP trong dịch BAL và dịch đồng nhất ở phổi cao hơn nhiều (>100 lần) sau khi ITI hoặc xông-hít, tính cho 97-99% tổng lượng liệu phục hồi từ 3 lưới (66-79% cho BAL và 20-31% cho phổi) ở 2, 6, 24 hoặc 72 giờ sau khi dùng liều. Sự lắng đọng bán rã ước tính của Fab1 kháng TSLP trung bình lần lượt là khoảng 7 và 9 giờ trong BAL và dịch đồng nhất của phổi.

Ví dụ 8: Đặc tính độc học của Fab1 kháng TSLP ở khỉ

Vật liệu và phương pháp

Động học của chất độc, PK/PD, và sự phân bố của Fab1 kháng TSLP ở phổi được nghiên cứu ở Khỉ Cynomolgus sau khi xông-hít liều 1, 10 và 20mg/kg hàng ngày trong vòng 14 ngày (Nhóm 3-5), hoặc dùng liều đơn chéo 1mg/kg IV sau đó là liều

xông-hít đơn 20mg/kg sau giai đoạn rửa 16 ngày (Nhóm 6). Hàng loạt mẫu máu được thu thập cho PK/PD, TSLP tổng được đánh giá làm chỉ thị PD và các đánh giá về tính sinh miễn dịch. Ngoài ra, các mẫu phổi đồng nhất (khi kết thúc) và các mẫu dịch BAL (khi kết thúc của nhóm 3-5 và trước khi dùng liều tĩnh mạch và kết thúc PK của nhóm 6) cũng được thu thập cho các đánh giá về PK, TSLP tổng, và tính sinh miễn dịch (chỉ cho dịch BAL).

Kết quả

Sự phơi nhiễm toàn bộ của Fab1 kháng TSLP trong huyết thanh thấp sau khi xông-hít một sinh khả dụng đã ước tính nhỏ hơn 1% ở mức liều xông-hít là 20mg/kg. Liều xông-hít 1mg/kg không thu được sự phơi nhiễm toàn bộ có thể phát hiện được và liều 10 và 20mg/kg đã xông-hít chỉ thấy sự phơi nhiễm toàn bộ với Fab1 kháng TSLP. Cmax đạt được ở khoảng 3 giờ sau khi xông-hít. Tương tự với PK chuột đồng, thời gian bán hủy toàn bộ (khoảng 7 giờ) so với IV (khoảng 2,3 giờ), cho thấy sự hấp phụ động học có tốc độ giới hạn. Sự tích tụ phơi nhiễm trong huyết thanh quan sát được sau 14 ngày dùng liều. So với sự phơi nhiễm huyết thanh thấp (Fig. 5), dữ liệu sơ bộ về nồng độ Fab1 kháng TSLP trong dịch BAL cuối cùng và dịch đồng nhất phổi cao hơn nhiều và tăng với liều tăng dần (Fig. 6).

Ví dụ 9: Tinh thể học và lập bản đồ Epitop của Fab1 kháng TSLP

Trong ví dụ này, Fab1 kháng TSLP được tinh thể hóa ở trạng thái tự do hoặc trong phức hợp với TSLP của người, và cấu trúc tinh thể tương ứng được xác định. Phân tích sự gắn kết Fab1 kháng TSLP tới TSLP của người dựa trên dữ liệu tia X cung cấp thông tin về epitop về Fab1 kháng TSLP đối với TSLP của người.

Vật liệu và phương pháp

Dạng bào chế và tinh chế TSLP của người và Fab1 kháng TSLP

Fab1 kháng TSLP được tạo ra bằng cách phân hủy mAb1 kháng TSLP (10,6mg) bằng 21µg papain trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng (room temperature-RT), trong 100mM Tris (pH 7,0) bằng 10mM DTT. Phản ứng được dừng bằng 30µM chất ức chế papain E64. Fab1 kháng TSLP được tinh sạch trên cột Lambda Select 5 mL, cân bằng với 20mM natri phosphat (pH 7,0). Fab được rửa giải bằng axit xitric 0,1M

pH 3,0, và pH của các phân đoạn thu được ngay lập tức được điều chỉnh bằng Tris pH 8,5 1M pha loãng 1:10. Phân tích LC-MS cho thấy khối lượng quan sát được là 47107,7Da mà hợp với trình tự axit amin có chuỗi nặng được phân cắt sau Thr228 và mang gốc axit pyroglutamic ở đầu amin. Đối sự tinh thể hóa, đệm được trao đổi với Tris-HCl 10mM pH 7,4, 25mM NaCl bằng cách lặp lại các bước pha loãng nồng độ sử dụng thiết bị siêu lọc và cuối cùng mẫu được cô đặc tới 13mg/ml Fab1 kháng TSLP.

Thiết kế TSLP của người (Uniprot entry Q969D9; axit amin 29 đến 159) với đuôi hexahistidin đầu N theo sau bởi vị trí phân cắt PreScission (HRV-3C proteaza) được tách dòng và biểu hiện trong *E. coli* dưới dạng thể vùi. Để làm cuộn gấp, 89,4g tế bào *E. coli* được dung giải trong 715ml (pH 7,0) Tris 50mM bằng 1mM EDTA, 6mM MgCl₂, và 0,375M sucroza bằng máy đồng nhất bằng áp suất cao Avestin®. Sau 30 phút ủ với 3,7kU benzonaza, dịch dung giải được ly tâm trong 30 phút ở 13.000 vòng/phút bằng roto góc cố định SS-34. Tủa tế bào được tạo huyền phù lại trong 387ml Tris (pH 7,0) 100mM với EDTA 20mM, NaCl 0,5M, Triton X-100 2% và sau đó ly tâm ở 13.500 vòng/phút trong 50 phút. Tủa tế bào được tạo huyền phù trong 387ml của Tris 100mM pH 7,0 bằng EDTA 20mM, ly tâm 13.500 vòng/phút trong 30 phút, và quy trình rửa này được lặp lại 4 lần, tạo thành 13g thể vùi. Thể vùi được hòa tan trong 65ml dung dịch guanidin hydrochlorit 6M với 50mM potassium axetat (pH 5,0), 5mM EDTA, và 10mM TCEP. Sau khi ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng, mẫu được ly tâm trong 30 phút ở 20.000 vòng/phút (roto góc cố định SS-34). Dịch nổi (70ml) được pha loãng tới 100ml bằng dung dịch guanidinium hydrochlorit như mô tả ở trên. Cuộn gấp lại được thực hiện bằng pha loãng nhanh ở 4°C với 10L Tris 100mM (pH 8,25) với 0,5M arginin hydrochlorit, 5mM EDTA, và 1mM GSH. Sau khi pha loãng, 0,1mM glutathion disulfit (GSSG) được thêm vào và hỗn hợp gấp lại được ủ khuấy từ chậm trong 7 ngày ở 4°C. Sau đó, pH được điều chỉnh đến 5,1 bằng axit axetic, và 0,1mM GSSG được thêm vào để phân hủy TCEP còn lại. Dung dịch cuộn gấp. Dung dịch cuộn gấp hơi đục được lọc bằng bao nang lọc Sartobran 0,65/0,45µm và cô đặc bằng màng chảy chéo Pellicon 10kD thành 750ml. Dung dịch cô đặc được thẩm tích trong 10L natri axetat 50mM pH 5,4. Khoảng 550 mg của TSLP đã cuộn gấp lại được thu hồi. Phân tích LC-MS của mẫu tinh sạch được khẳng định sự hình thành của tất cả các cầu disulfit và cho thấy sản phẩm 94% des-Met (MW = 16862.8 Da), và 6% protein

với metionin ở đầu N. Để tinh thể hóa với Fab1 kháng TSLP, mẫu TSLP đã cuộn gập lại được sử dụng mà không cắt bỏ đuôi ở đầu N bằng proteaza PreScission.

Để điều chế phức hợp TSLP-Fab, hai lần hàm lượng mol của protein His₆-PreSc-TSLP trong 25mM Tris (pH 7,4) với 50mM NaCl được bổ sung vào Fab1 kháng TSLP, mẫu được cô đặc bằng siêu ly tâm đến khoảng 10mg/ml, được đưa lên cột sắc ký loại trừ SPX-75 và rửa giải đẳng dòng trong 10mM Tris-HCl pH 7,4 với 25mM NaCl. Phân đoạn đỉnh được cô đặc đến 9,2mg/ml bằng siêu ly tâm và đưa vào sàng lọc tinh thể.

Sự tinh thể hóa và thu thập dữ liệu tia X

Tinh thể được nuôi trong đĩa 96 giếng (đĩa Innovadyne SD2) bằng cách khuếch tán hơi các giọt đọng. Một cách chi tiết, 0,2μl protein gốc được trộn với 0,2μl dung dịch gốc, và giọt được cân bằng với cùng dung dịch chứa ở 20°C. Thí nghiệm được cài đặt với hệ robot Phoenix (Art Robbins Instruments), giữ ở RockImager hotel (Formulatrix) và chụp lại tự động.

Đối với bộ sưu tập dữ liệu tia X, một tinh thể được gắn trực tiếp vào vòng lặp và làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Các bộ dữ liệu tia X được thu thập bằng nguồn ánh sáng, chùm sáng X10SA, với máy dò điểm ảnh Pilatus, sử dụng sự phát xạ tia X 1,00001Å. Trong cả hai trường hợp, 720 ảnh với dao động 0,25° giữa hai trường hợp được ghi nhận ở khoảng cách phát hiện tinh thể là 345mm và tiến hành bằng phiên bản XDS ngày 6/12/2010, (Kabsch 1993, J Appl Crystallogr; 26:795-800), như thực hiện trong APRV.

Xác định và phân tích cấu trúc

[003] Cấu trúc của Fab1 kháng TSLP được xác định bằng thay thế phân tử bằng chương trình Phaser (McCoy *et al.*, 2007, J Appl Crystallogr 40:658-674), sử dụng cấu trúc tinh thể của mảnh Fab của kháng thể kháng CD132 như mô hình khởi đầu. Kháng thể Fab kháng CD132 được lựa chọn dựa trên cơ sở sự giống nhau về trình tự với kháng TSLP. Các miền biến đổi cố định đầu tiên được sử dụng như là những mô hình tìm kiếm độc lập để cho phép sự biến đổi của Fab. Cấu trúc được tinh chế sử dụng các chu kỳ lặp lại của mô hình sau khi tinh chỉnh sau khi tinh chỉnh bằng phương pháp tinh thể học tự động với chương trình Coot 0.8.0 (Crystallographic Object-Oriented Toolkit; Emsley *et al.*, 2010, Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr;

66:486-501) và Autobuster 2.11.5 (Bricogne *et al.*, 2011, BUSTER version 2.11.2. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.).

Cấu trúc của phức hệ TSLP-Fab được xác định bằng thay thế phân tử bằng chương trình Phaser, sử dụng cấu trúc tinh thể của Fab1 kháng TSLP tự do và TSLP của người trước đây được xác định *in house* trong phức hợp với mảnh Fab của kháng thể khác. Một lần nữa, các miền biến đổi cố định của miền biến đổi và cố định đầu tiên của Fab1 kháng TSLP được sử dụng làm mô hình tìm kiếm độc lập. Cấu trúc được tinh chế như đã mô tả cho Fab tự do, với Coot 0.8.0 và Autobuster 2.11.5.

Kiểm tra bằng mắt các cấu trúc tinh thể được thực hiện sử dụng chương trình Coot (Emsley *et al.*, 2010, Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr; 66:486-501) và PyMOL (Molecular Graphics System; DeLano Scientific: Palo Alto, CA). Chất lượng của mô hình tinh chỉnh cuối cùng được đánh giá bằng chương trình Coot và PROCHECK v3.3 (Laskowski *et al.*, 1992, J Appl Crystallogr; 26:283-291). Các gốc TSLP của người mà dung môi không thể tiếp cận được khi gắn kết của Fab1 kháng TSLP được xác định bằng chương trình AREAIMOL của bộ chương trình CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Những tiếp xúc nội phân tử được xác định sử dụng khoảng cách giới hạn là 4,0Å và được nhận dạng bằng chương trình NCONT của CCP4.

Kết quả

Cấu trúc tinh thể của Fab1 kháng TSLP

Fab1 kháng TSLP tự do và phức hệ của nó với TSLP của người được tinh thể hóa trong đĩa 96 giếng bằng phương pháp bằng phương pháp khuếch tán hơi in sitting drops, ở 19°C. Thú vị là, hai mẫu protein đã tinh thể hóa dưới điều kiện tinh thể hóa tương tự nhau: 0,17M (NH₄)₂SO₄, 85mM natri axetat pH 5,6, 25,5% PEG MME 2000, 15% glycerol. Tinh thể xuất hiện sau 4-5 tuần và phát triển đến kích thước đầy đủ trong một vài ngày.

Tinh thể không chứa Fab ở nhóm không gian vị trí ortho P2₁2₁2₁, với một phân tử Fab trên mỗi đơn vị bất đối. Tinh thể của phức hợp Fab-TSLP ở nhóm không gian I222, với một phức hợp trên mỗi đơn vị bất đối (Bảng 3). Cả hai tinh thể được làm nhiều xạ đến độ phân giải cao, và bộ dữ liệu nhiều xạ có chất lượng tốt và dư thừa cao có thể thu được từ mỗi tinh thể (Bảng 3).

Xác định cấu trúc bằng cách thay thế phân tử được thực hiện bằng cách sử dụng cấu trúc TSLP của người. Sự tinh chế bằng autobuster tạo ra dữ liệu thông kê tinh chỉnh tốt và hình học tổng quát tốt (Bảng 3). Hai gốc kháng thể, Asp50L và Asp152L nằm ngoài Ramachandran trong cấu trúc của Fab tự do. Ngoài hai gốc này, gốc kháng thể thứ 3, Tyr103H, cũng nằm ở bên ngoài Ramachandran trong cấu trúc của phức hợp Fab-TSLP. Ba gốc này có mật độ điện tích đã được xác định rõ và do đó chính là đường kính ngoài động học. Đáng lưu ý, Asp50L và Tyr103H là các gốc CDR liên quan đến sự gắn kết TSLP như được mô tả phía dưới.

Trình tự axit amin của Fab1 kháng TSLP chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được trình bày trong FIG. 1A và 1B, với CDR được gạch chân (được định nghĩa bởi Kabat, 1991, Trình tự của các protein quan tâm về miễn dịch, công bố đơn NIH số 91-3242) và các gốc nằm ở giao diện kháng thể-kháng nguyên đánh dấu bằng *.

Bảng 3. Thu thập dữ liệu tia X và số liệu tinh chế

	Fab1 tự do kháng TSLP	Fab1 phức hợp với TSLP
Thu thập dữ liệu		
Nhóm không gian	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	I222
a, b, c (Å)	69,05, 72,33, 113,58	77,68, 78,46, 233,23
α , β , γ (°)	90,00, 90,00, 90,00	90;00, 90,00, 90,00
Độ phân giải (Å)	1,85 (1,90-1,85)*	2,00 (2,05-2,00)*
R _{sym} hoặc R _{merge}	0,044 (1,108)	0,071 (1,83)
I / σ (I)	21,4 (1,42)	16,6 (1,14)
Hoàn thiện (%)	99,9 (99,8)	99,9 (99,9)
Dư	6,6 (6,2)	6,6 (6,4)
Tinh chế		
Độ phân giải (Å)	37,00-1,85	40,00-2,00

Số phản xạ	49,249	48,502
R _{hoạt động} / R _{tự do}	0,201 / 0,222	0,194 / 0,214
Số nguyên tử		
Protein	3,245	4,042
Ion sulfat	0	3x5
Nước	213	195
Nhân tố B (Å ²)		
Chuỗi nhẹ Fab (chuỗi L)	45,7	52,4
Chuỗi nặng Fab (chuỗi H)	48,3	48,5
TSLP (chuỗi T)	-	98,5
Vùng nước (chuỗi W)	51,4	53,1
Sai lệch R.m.s.		
Chiều dài liên kết (Å) / góc (°)	0,009 / 1,05	0,010 / 1,07
Chú ý: (*) Số trong ngoặc tương ứng với vỏ có độ phân giải cao.		

Cấu trúc tinh thể của Fab1 kháng TSLP trong phức hợp với TSLP của người

Trình tự axit amin của TSLP của người tái tổ hợp sử dụng trong ví dụ này (SEQ ID NO: 38) được cung cấp trong FIG. 2. TSLP thành thực của người bắt đầu từ Tyr29. Thiết kế được sử dụng ở đây có đuôi hexahistidin ở đầu N (gốc 15-20) sau đó là vị trí nhận biết proteaza HRV-3C (PreScission) (gốc 21-28) và gốc 11-14 thu được từ tách dòng. Asn64 và Asn119 là vị trí tiềm năng cho glycosyl hóa liên kết với N; và gốc 127-130 cấu thành vị trí phân cắt furin tiềm năng (RRKR, SEQ ID NO: 39). Các thành phần của cấu trúc bậc hai: được trình bày dưới trình tự axit amin: các hộp biểu diễn chuỗi xoắn α A, B, C và D, và đường kẻ đậm biểu diễn vòng xoắn.

TSLP không thể hiện bất cứ sự giống nhau về trình tự axit amin đáng kể với các thành viên khác của siêu họ IL-2 của xytokin. Thực vậy, TSLP cuộn gập thành bốn

vòng xoắn với cách bố trí lên-lên-xuống-xuống, like IL-2, IL-7 và nhiều xytokin khác (FIG. 7). Chuỗi xoắn α_A có một nút thắt gần trung tâm của nó, xoay quanh vị trí Thr46. Các chuỗi xoắn α_B và α_C khá ngắn, mỗi chuỗi chỉ có 3 vòng; và chuỗi xoắn α_D đầu C dài hơn với gần 5 vòng (FIG. 7). Ba disulfit (Cys34-Cys110, Cys69-Cys75, Cys90-Cys137) ổn định bó xoắn 4 chuỗi ngắn này. Tuy nhiên, hai mối nối chéo giữa α_A và α_B , và α_C và α_D hỗn độn và nhìn thấy trong cấu trúc tinh thể. Ba axit amin từ ba axit amin từ vòng lặp α_B - α_C , và 5 gốc ở đầu cacboxyl bị mất trong cấu trúc tinh thể cuối cùng. Sự phân cắt furin tiềm năng và các vị trí N-glycosyl hóa nằm trong những mối nối bị đứt.

Cấu trúc ba chiều của phức hợp Fab-TSLP trong FIG. 7.

Fab1 kháng TSLP gắn kết chủ yếu với chuỗi xoắn α_A của TSLP, mà chạy qua rãnh nông bao quanh bởi H-CDR1 và H-CDR2 trên một mặt, và bởi H-CDR3 và L-CDR3 trên mặt kia. Chỗ xoắn của vòng xoắn ốc α_A chiếm đóng phần trung tâm của rãnh. Vòng xoắn trống nằm giữa α_C và α_D và bốn gốc đầu tiên của vòng lặp α_A - α_B góp phần vào sự tiếp xúc của kháng thể.

Sự hình thành phức hợp Fab-TSLP bị chôn xấp xỉ $1700\text{\AA}^2$ so với bề mặt có thể bị tiếp cận bởi dung môi kết hợp, với 25 gốc axit amin của Fab và 25 gốc axit amin TSLP chịu sự giảm bề mặt có thể có thể bị tiếp cận bởi dung môi của nó khi hình thành phức hợp. Trong số này, 20 gốc Fab và 16 gốc TSLP (xem bảng 4) đều liên quan đến sự tiếp xúc nội phân tử trực tiếp, khi khoảng cách giới hạn là $4,0\text{\AA}$ được sử dụng. Dữ liệu thống kê bổ sung về hình dạng Sc (Lawrence và Colman, 1993, J Mol Biol; 234:946-50) là 0,72, một giá trị tương đối cao cho một phức hợp kháng thể - protein (Sundberg và Mariuzza, 2003, Adv Protein Chem; 61:119-60). Tất cả 6 CDR của Fab1 kháng TSLP đều đóng góp vào sự gắn kết vào TSLP. Ngoài ra, 6 vùng nước đã được xác định nằm trong gaio diện giữa kháng nguyên và kháng thể làm trung gian cho sự tương tác gắn kết.

Bảng 4. Các gốc epitop và paratop

TSLP epitop		Fab1 kháng paratop TSLP	
Thành	Các gốc tiếp	Các gốc tiếp xúc	Thành phần cấu trúc

phần cấu trúc	xúc		
α_A	Lys38	Thr28H	H-CDR1
	Ala41	Tyr32H	H-CDR1
	Leu44	Tyr103H, Ile102H, Tyr48L	H-CDR3, L-CDR2
	Ser45	Asp31H, Tyr32H	H-CDR1
	Thr46	Asp56H	H-CDR2
	Ser48	Tyr103H	H-CDR3
	Lys49	Trp33H, Glu101H, Tyr103H, Tyr104H, Tyr105H	H-CDR1, H-CDR3
	Ile52	Tyr103H, Tyr104H, Tyr31L, Trp92L	H-CDR3, L-CDR1, L-CDR3
	Thr53	Trp92L	L-CDR3
Vòng xoắn $\alpha_A - \alpha_B$	Ser56	Trp92L	L-CDR3
	Gly57	Trp92L	L-CDR3
	Thr58	Trp92L	L-CDR3
	Lys59	Gly28L, Ser29L, Lys30L, Tyr31L, Asp50L, Asn65L	L-CDR1, L-CDR2, L-FR3
α_C	Lys101	Asp56H	H-CDR2
α_D	Gln145	Tyr103H, Tyr31L	H-CDR3, L-CDR1
	Arg149	Asn51L, Glu52L	L-CDR2
Danh sách các gốc epitop và paratop không tiếp xúc trực tiếp xuất phát từ tọa độ tinh chế cuối cùng bằng chương trình CCP4 NCONT, sử dụng khoảng cách giới hạn là 4,0Å.			

Các gốc TSLP nằm ở giao diện gắn kết được xác định từ các tọa độ tinh thể học bằng cách tính toán (i) tương tác nội phân tử các nguyên tử không phải hydrogen nhỏ

hơn 4,0Å, và (ii) việc giảm bề mặt có thể bị tiếp cận bởi dung môi khi hình thành phức hợp. Kết quả hình hoạc được chỉ ra ở FIG. 8, và hình dung về kháng thể của epitop TSLP đã được đề xuất trong FIG. 9. Như có thể quan sát ở 2 hình, chuỗi xoắn α_A , cùng với bốn góc đầu tiên của vòng lặp α_A - α_B , hình thành lõi của epitop, và đóng góp 82% tổng số các tương tác nội phân tử và của bề mặt có khả năng tiếp xúc với dung môi trên TSLP. Hơn nữa, đa số các góc chính của epitop được tìm thấy ở vùng này: Lys49, Ile52, Gly57 và Lys59. Để so sánh, các chuỗi xoắn α_C và α_D đã đóng góp rất ít góc của epitop: Lys101 (α_C), Gln145 và Arg149 (α_D).

Tất cả 6 vùng quyết định bổ sung (CDR) của Fab1 kháng TSLP đều góp mặt trong giao diện gắn kết, như đã được chứng minh bằng sự giảm bề mặt có thể bị tiếp cận bởi dung môi khi gắn kết với kháng nguyên và sự đóng góp của chúng với sự tiếp xúc nội phân tử (FIG. 10A và 10B). Ngoài ra, Asn65L của vùng khung hoạt động thứ 3 của chuỗi nhẹ (L-FR3) cũng nằm ở giao diện gắn kết kháng nguyên, nhưng chỉ hình thành sự tương tác yếu (3,6Å) bằng liên kết H với Lys59 của TSLP.

Vòng lặp H-CDR3 đóng vai trò đặc biệt quan trọng. Glu101H tạo thành tương tác cầu muối quan trọng với Lys49 của TSLP, và 3 gốc tyrosin liên tiếp nằm ở đầu của vòng lặp, Tyr103H, Tyr104H và Tyr105H, đóng góp một cách toàn bộ vào 58% vào sự tiếp xúc tạo thành bởi toàn bộ chuỗi nặng. Trp33H H-CDR1 và Asp56H của H-CDR2 cũng quan trọng đối với các gốc paratop, mà lần lượt đóng góp vào sự gắn kết với Lys49 và Lys101 của TSLP.

Trp92L là gốc duy nhất của L-CDR3 mà tạo ra sự tiếp xúc trực tiếp với kháng nguyên. Gốc này nằm ở đầu của L-CDR3 và nó không có cấu trúc xác định trong cấu trúc tinh thể của Fab1 kháng TSLP tự do. Tuy nhiên, trong phức hợp TSLP, chuỗi bên có mật độ electron đã được xác định rõ, và được tạo thành những tiếp xúc rộng với vòng lặp α_A - α_B , sự đóng góp của nó vào khoảng 42% các tiếp xúc tạo bởi cả chuỗi nhẹ. Asp50L của L-CDR2 và Tyr31L của L-CDR1 là các gốc paratop quan trọng khác cung cấp bởi chuỗi nhẹ. Gốc thứ nhất tạo ra tương tác rất ngắn (2,8Å) tương tác tĩnh điện với Lys59 của TSLP. Gốc sau đóng góp vào tương tác gắn kết với Ile52, Lys59, và Gln145 of TSLP, và cũng làm ổn định cấu hình gắn kết của vòng lặp H-CDR3 thông qua tương tác π - π với Tyr103H và Tyr104H.

Cơ chế hoạt động Fab1 kháng TSLP

Sự truyền tín TSLP đòi hỏi sự lắp ráp của phức hợp 3 thành phần có chứa TSLP, liên kết chuỗi TSLPR và chuỗi có chung IL-7R α . Sự hình thành phức hợp 2 thành phần TSLP-TSLPR là điều kiện tiên quyết để thu hút IL-7R α . Phức hợp TSLP-Fab1 của người được thêm vào phức hợp ba thành phần TSLP-TSLPR-IL-7R α của chuột nhắt, dựa trên tất cả các nguyên tử C α của TSLP. Sự chồng lặp cấu trúc giải thích rằng Fab1 kháng TSLP đã phong bế sự gắn kết TSLP vào cả TSLPR và IL-7R α . Vòng xoắn α_A của TSLP là nhân tố trung tâm của epitop Fab1 kháng TSLP (FIG. 11B), và chuỗi xoắn này cũng đóng vai trò trung tâm trong sự gắn kết với TSLPR và IL-7R α (FIG. 11A). Ngoài ra, vòng xoắn α_C được khớp vào sự gắn kết IL-7R α và vòng xoắn α_D là một phần của giao diện gắn kết TSLPR. Do những vòng xoắn này đóng góp vào epitop Fab1 kháng TSLP, sự nhiễu không gian giữa Fab1 kháng TSLP và hai chuỗi thụ thể lớn. Chuỗi nhẹ của kháng thể chồng lặp rộng với miền D2 của TSLPR, trong khi chuỗi nặng chồng lặp với miền IL-7R α D2 và cũng với một vài vòng lặp gắn kết xytokin của miền D1 (FIG. 11C). Dữ liệu giải thích rằng Fab1 kháng TSLP đã trung hòa TSLP bởi việc ăn các xytokin và ngăn cản sự gắn kết của nó với thụ thể TSLPR, do đó, phong bế sự hình thành phức hợp truyền tín hiệu ái lực cao trong phức hợp với IL-7R α .

Tóm lại, cấu trúc tinh thể có độ phân giải cao của Fab1 kháng TSLP ở trạng thái tự do hoặc phức hợp với TSLP của người tái tổ hợp đã cuộn gập được xác định. Fab1 kháng TSLP được tìm thấy gắn kết chủ yếu với chuỗi xoắn α_A (gốc axit amin Lys 38 đến Thr 53) của TSLP người, với một vài sự đóng góp quan trọng từ các chuỗi xoắn α_C (Lys101) và α_D (Gln145, Arg149) và từ vòng lặp α_A - α_B (các gốc axit amin Ser 56 đến Lys 59). Sự chồng lặp cấu trúc của TSLP của người trong phức hợp với Fab1 kháng TSLP lên phức hợp TSLP của chuột đã cô bố với IL-7RA và miền TSLPR ngoại bào cho thấy rằng Fab1 kháng TSLP cạnh tranh với cả IL-7RA và TSLPR cho sự gắn kết TSLP. Fab1 kháng TSLP gắn kết TSLP không thể gắn kết với TSLPR và thu hút thụ thể IL7R α cũng bị ức chế do sự cản trở không gian rộng giữa Fab và thụ thể IL-7 α .

Ví dụ 10: Quy trình làm khô bằng sấy phun và tạo chế phẩm bào chế Fab1 kháng TSLP

Thiết bị và điều khiển làm khô bằng sấy phun

Máy sấy phun được sử dụng để sấy phun nguyên liệu khô. Kết cấu của máy sấy khô bằng sấy phun có chứa bộ phận phun hóa mẫu hai dòng một vòi phun, khoang làm khô, bình chiết tách cyclon, bộ chuyển đổi, van cách ly, và bộ thu 1 lít trong áo được kiểm soát nhiệt độ. Theo các phương án được mô tả ở đây, quy trình làm khô bằng sấy phun có thể bao gồm quy trình phun hóa, quy trình làm khô, và quy trình thu hạt.

Quá trình phun hóa mẫu điển hình có thể bao gồm các bước sau: (A1) dịch nguyên liệu tạo chế phẩm bào chế có thể được đưa vào thông qua bơm nhu động (Watson Marlow) ở tốc độ dòng được kiểm soát tới vòng phun đơn, máy phun hỗ trợ không khí gắn trên máy làm khô sấy phun; (A2) khí nén khô với tốc độ dòng được kiểm soát được đưa vào vòi phun ga đồng tâm, hội tụ; và (A3) giãn nở khí ở đầu vòi phun hóa mẫu dòng vào các giọt phun nhỏ.

Quy trình làm khô có thể bao gồm các bước sau: (B1) không khí khô với các chất làm nóng điện được đưa vào khoảng làm khô ở nhiệt độ đã cài đặt và tốc độ dòng được kiểm soát; (B2) không khí làm khô nóng tương tác với các giọt phụ sương nhỏ từ bước A3. Dung môi (nước) trong giọt khí bốc hơi, dẫn đến tạo thành các hạt rắn; và (B3) các hạt và hơi/khí dung môi tồn tại ở khoang làm khô ở nhiệt độ đã định.

Quy trình thu hạt bao gồm các bước sau: (C1) các hạt và hơi/khí không phải dung môi từ bước B3 đi vào bình chiết tách cyclon tốc độ tiếp tuyến; (C2) các hạt được phân tách từ hỗn hợp khí bằng lực ly tâm và được thu từ ở đáy của bình chiết tách cyclon ở bình chứa được kiểm soát nhiệt độ; và (C3) hơi/ khí thải không phải dung môi vượt qua bộ lọc và lỗ thông hơi vào khí quyển trong bộ phân ly.

Quy trình và chế phẩm bào chế bột có thể xông-hít thở được của Fab1 kháng TSLP

Phần này đề xuất chế phẩm bào chế và quy trình làm khô bằng sấy phun được sử dụng để điều chế bột có thể xông-hít thở được có chứa hạt theo Fab1 kháng TSLP

được tạo chế phẩm bào chế với các tá dược các nhau. Điều này liên quan đến việc làm khô bằng sấy phun pha đơn, nguyên liệu lỏng có chứa protein (Fab1 kháng TSLP) và tá dược mà có chức năng chính là chất tăng cường khuếch tán (ví dụ, trileuxin) hoặc chất tạo trạng thái thủy tinh (ví dụ, saccharit, muối đệm). pH của nguyên liệu được kiểm soát bằng đệm histidin-HCl ở pH đích là pH5,0 - pH5,5. Mặc dù việc ứng dụng những nguyên lý hạt kỹ thuật, tá dược và thành phần được lựa chọn để tạo bột mà có chứa các hạt xù xì – mỗi hạt có lõi protein ổn định bằng lưới thủy tinh bao quanh bởi vỏ tá dược ưa nước mà có chứa sự phân tán bột cải thiện và chất hoạt tính được bảo vệ.

Bảng 5. Chế phẩm bào chế Fab1 kháng TSLP

Lô #	Fab1 kháng TSLP	Histidin	Trehaloza	Mannitol	Trileuxin
	% khối lượng/thể tích	% khối lượng/thể tích	% khối lượng/thể tích	% khối lượng/thể tích	% khối lượng/thể tích
569-38-01	80	20	0	0	0
569-38-02	90	10	0	0	0
569-38-03	60	10	30	0	0
569-38-04	60	5	20	5	10
569-38-05	40	5	35	0	20
569-38-06	40	5	30	5	20

FIG. 12 trình bày chế phẩm bào chế có tá dược cao hơn: tỷ lệ protein được cải thiện về tính ổn định của Fab1 kháng TSLP và giảm tốc độ ngưng kết của Fab1 kháng TSLP.

Tạo chế phẩm bào chế PulmoSol có chứa Fab1 kháng TSLP

Phần này đề xuất chế phẩm có nguyên liệu cơ bản được tạo chế phẩm bào chế ở nồng độ chất rắn khác nhau và thành phần trileuxin nhằm làm tăng việc sản xuất lưu

thông và tối ưu hóa sự hình thành vỏ. Nồng độ chất rắn cao làm tăng sản lượng bột lưu thông. Trong ví dụ này, thành phần TSLP Fab1 được cố định ở 50%, ngoại trừ, khi so sánh với ví dụ khác.

Bảng 6. Chế phẩm bào chế có chứa Fab1 kháng TSLP và trileuxin

Lot #	Thành phần rắn	Fab1 kháng TSLP	Histidin	Trileuxin	Trehaloza	Tỷ lệ mol
	% khối lượng/thể tích	% khối lượng/khối lượng	% khối lượng/khối lượng	% khối lượng/khối lượng	% khối lượng/khối lượng	Đường: Dược chất
728-06-01	1,5%	50,0%	5,89%	20,0%	24,1%	70,4
728-06-02	2,0%	50,0%	5,89%	15,0%	29,1%	85,0
728-06-03	2,5%	50,0%	5,89%	10,0%	34,1%	99,6
728-06-04	2,0%	50,0%	5,89%	10,0%	34,1%	99,6
728-06-05	1,5%	40,0%	4,71%	20,0%	30,3%	110,6

Chế phẩm bào chế có chứa Fab1 kháng TSLP và 15% Trileuxin

Phần này nhấn mạnh một vài chế phẩm bào chế thiết kế cho sự hòa tan trong nước hạn chế của trileuxin trong khi vẫn duy trì pH chấp nhận được của nguyên liệu và các hạt tạo thành. Do đó, trileuxin được hòa tan trong HCl lỏng và chuẩn độ nồng độ sử dụng môi trường cơ bản để thu được pH mục tiêu của dung dịch nguyên liệu (pH5,0-pH5,5). Xấp xỉ là, tỷ lệ mol 1:1 của HCl với trileuxin là cần thiết để hòa tan hoàn toàn trileuxin.

Bảng 7. Chế phẩm bào chế có chứa Fab1 kháng TSLP và 15% trileuxin

Lô No.	FAB1 KHÁNG TSLP	Histidin	Trehaloza	Trileuxin	Axit, HCl	Bazơ
	% khối	% khối	% khối	% khối	% khối	% khối lượng/

	lượng/thể tích	lượng/khối lượng	lượng/khối lượng	lượng/khối lượng	lượng/khối lượng	khối lượng	
569-60-01	50,0%	5,64%	26,8%	15,0%	2,56%	N/A	
569-60-02	50,0%	5,64%	19,4%	15,0%	2,56%	Histidin	7,40%
569-60-03	50,0%	5,64%	24,1%	15,0%	2,56%	KOH	2,69%
569-60-04	50,0%	5,64%	26,8%	15,0%	2,56%	NH ₄ OH	2,70%

Ví dụ 11: Ái lực gắn kết của Fab1 kháng TLSP đối với các protein của người và khỉ cyno được xác định bằng chuẩn độ cân bằng dung dịch (SET)

Các phép đo chuẩn độ cân bằng dung dịch (SET) được thực hiện để xác định ái lực gắn kết của Fab1 kháng-TSLP đối với protein TSLP của người và của khỉ cyno. Fab này được ủ ở nồng độ cố định với dịch pha loãng liên tiếp của các kháng nguyên tương ứng. Ái lực gắn kết được rút ra từ đường cong cạnh tranh được tạo ra bằng cách vẽ đồ thị kết quả đầu ra về nồng độ kháng thể không gắn kết theo nồng độ kháng nguyên sử dụng. Fab1 kháng-TSLP thể hiện ái lực gắn kết trong phạm vi picomol thấp (pM) đối với tất cả các protein TSLP của người và khỉ cyno.

Các bước thử nghiệm

Hai mươi hai lượt pha loãng 1,6ⁿ TSLP của người (được sản xuất trong tế bào HEK) và các kháng nguyên TSLP của khỉ cyno được chuẩn bị trong đệm mẫu và nồng độ Fab1 cố định được bổ sung. Trong hai lần lặp lại của thử nghiệm, lượng chứa 60 µl/giếng của mỗi hỗn hợp kháng nguyên-Fab được đưa vào đĩa vi chuẩn độ polypropylen gồm 384 giếng (MTP). Đệm mẫu là đối chứng âm tính và mẫu chỉ chứa Fab1 là đối chứng dương tính (Bmax). Đĩa này được bịt kín và ủ qua đêm (o/n, ít nhất 16 h) ở nhiệt độ phòng (RT) trên máy lắc.

Đĩa phiên MTP MSD 384 giếng được phủ qua đêm ở 4 °C bằng 30 µl/ giếng hsTSLP (được sản xuất trong E. coli) mà đã được pha loãng trong PBS ở 5µg/ml, tiếp đó được rửa ba lần bằng 70µl/ giếng đệm rửa và được phong bế bằng 50µl/ giếng đệm phong bế trong 1h ở RT trên máy lắc. Sau khi rửa, lượng chứa 30 µl/ giếng của hỗn

hợp kháng nguyên-Fab đã được cân bằng được chuyển từ MTP polypropylen đến đĩa MSD mà đã được phủ và được ủ trong 20 phút ở RT.

Sau bước rửa bổ sung, 30µl kháng thể phát hiện gắn đuôi sulfo mà đã được pha loãng trong đệm mẫu ở 1,8µg/ml được thêm vào mỗi giếng và được ủ trong 30 phút ở RT trên máy lắc. Đĩa MSD được rửa và 35µl/ giếng đệm đọc đĩa 1x MSD được thêm và được ủ trong 5 phút ở RT. Các tín hiệu ECL được tạo ra và được đo bằng thiết bị MSD Sector Imager 6000.

Ba thử nghiệm độc lập được tiến hành cho mỗi kháng nguyên và được cho thấy các điều kiện thử nghiệm ổn định. Từ các thử nghiệm này các giá trị trung bình đối với hệ số cân bằng phân ly KD và sai số tiêu chuẩn được tính như được thể hiện sau đây.

Bảng 8. Hằng số ái lực (KD) đối với sự gắn kết của Fab1 đối với các protein TSLP của người và khỉ cyno

FAB	Kháng nguyên	KD (pM)	Số thử nghiệm
Fab1	TSLP của người (HEK)	$5,0 \pm 2,0$	3
Fab1	TSLP khỉ cyno	$1,4 \pm 0,6$	3

Ví dụ 12: Nghiên cứu phát hiện liều xông-hít hai tuần ở khỉ Cynomolgus

Trong nghiên cứu không GLP này, mục đích là nhằm xác định sự độc đối với tế bào tiềm tàng của Fab1, Fab kháng lymphopietin mô đệm tuyến ức (TSLP), khi được sử dụng cho khỉ Cynomolgus bằng đường xông-hít một lần hằng ngày trong 14 ngày hoặc, dưới dạng tiêm tĩnh mạch liều đơn vào ngày 1, tiếp đó là giai đoạn không định liều lượng trong 13 ngày và liều xông-hít đơn trong ngày 15. Ngoài ra, thông số profi về dược động học/dược lực học (PK/PD) và tính sinh miễn dịch (IG) của Fab1 được xem xét.

Nghiên cứu này được tiến hành dưới dạng hai thành phần riêng biệt của nghiên cứu đơn.

Chỉ xông-xông-hít: bột Fab1 PulmoSol, Fab1 39,7% trong PulmoSol, được sử dụng bằng cách xông-xông-hít đối với 3 nhóm (3 con đực/nhóm) khỉ *Cynomolgus* ở các liều hằng ngày nhắm đích là 1,0, 10,0 và 20,0mg Fab1/kg/ ngày. Nhóm các khỉ khác (2 con đực) nhận giả được bột PulmoSol và là đối chứng. Con đực riêng lẻ khác chỉ nhận không khí và đóng vai trò là đối chứng không khí. Các thiết bị khí dung chứa Fab1 PulmoSol và giả được PulmoSol được tạo ra sử dụng dụng cụ tạo chổi quay (RBG1000). Các con vật thử nghiệm được cho tiếp xúc với thiết bị khí dung chứa bột Fab1 PulmoSol (các nhóm 3 đến 5) hoặc giả được bột PulmoSol (Nhóm 2) trong đích 60 phút một lần hằng ngày trong 14 ngày, sử dụng mặt nạ khí dung lắp ở trạng thái đóng. Con vật đực nhóm 1 đơn lẻ được cho tiếp xúc với khí khô đã lọc chỉ trong cùng đích thời gian bằng cách sử dụng cùng thiết bị đã được cài đặt. Tổng nồng độ khi khí dung trung bình được sử dụng của Fab1 lần lượt là 0,036, 0,31 và 0,66mg/L đối với các nhóm 3, 4 và 5. Tổng liều được phân phối trung bình (đều là được ước lượng) lần lượt là 1,1, 9,6 và 19,9mg Fab1/kg/ngày đối với các nhóm 3, 4 và 5. Đường kính trung bình khối lượng khí động học (MMAD) khẳng định rằng các dạng sol khí chứa Fab1 được tạo ra có thể xông-hít được đối với các con khỉ này và rằng sự lắng đọng ở phổi chấp nhận được sẽ đạt được đối với các loài thử nghiệm.

Đường tĩnh mạch/ đường xông-hít: Fab1 được sử dụng cho nhóm gồm 3 con đực (nhóm 6) dưới dạng tiêm nhanh qua tĩnh mạch vào ngày 1. Liều đích là 1mg Fab1/kg. Các con vật này tiếp đó được cho phép thời gian không định liều lượng trong 13 ngày trước khi được dùng bột Fab1 PulmoSol, 39,7% Fab1 trong PulmoSol, bằng cách xông-hít vào ngày 15. Liều đích là 20 mg Fab1/kg. Bình khí dung chứa Fab1 PulmoSol được tạo ra sử dụng dụng cụ tạo chổi quay (RBG1000). Các con vật này được tiếp xúc với bình khí dung chứa Fab1 PulmoSol trong đích thời gian 60 phút một lần, sử dụng mặt nạ khí dung ở trạng thái đóng. Các con vật tiếp đó được giữ trong 6 ngày trước khi được gây chết vào ngày 21. Tổng nồng độ sol khí trung bình được dùng của Fab1 là 0,60mg/L. Tổng liều đưa vào mà đã được ước tính trung bình chung là 16,3mg Fab1/kg/ngày. Đường kính trung bình khối lượng khí động học (MMAD) khẳng định rằng các dạng sol khí chứa Fab1 được tạo ra có thể xông-hít được đối với các con khỉ này và rằng sự lắng đọng ở phổi chấp nhận được sẽ đạt được đối với các loài thử nghiệm.

Các thông số và các điểm cuối sau đây được đánh giá trong nghiên cứu này: dấu hiệu lâm sàng, trọng lượng cơ thể, sự thay đổi trọng lượng cơ thể, các thông số bệnh lý lâm sàng (huyết học, đông máu và hóa lâm sàng), thử nghiệm sinh học đối với các nồng độ Fab1 và TSLP và các thông số độc động học (huyết thanh, dịch rửa phế quản phế nang (BAL), dịch chiết mô phổi), kháng thể kháng -Fab1 (huyết thanh và dịch BAL), các phát hiện hoại tử to, trọng lượng cơ quan và xét nghiệm mô bệnh học (chỉ các nhóm 1 đến 5).

Việc sử dụng Fab1 trong 14 ngày, qua định liều xông-xông-hít, dẫn đến các thay đổi rõ rệt trong khoang mũi (tăng các tế bào niêm mạc trong biểu mô đường hô hấp), phổi (khuếch tán sự tích tụ các đại thực bào ở phế nang, tăng tế bào lympho trong phế quản-phế nang và sự xâm nhập của tế bào viêm phế nang hỗn hợp) và hạch bạch huyết ở phế quản (tăng tổng tế bào) của con đực khỉ *Cynomolgus*. Các thay đổi này là rõ rệt trong số các khỉ từ tất cả các nhóm được điều trị. Mức độ nặng của các phát hiện này là tối thiểu đến rất nhẹ trong tất cả các trường hợp và các quan sát này không được coi là bất lợi.

Nhìn chung, sự tiếp xúc đối với Fab1 được nhận thấy trong tất cả khỉ mà được điều trị bằng Fab1 trên cơ sở dữ liệu nồng độ trong huyết thanh, phế quản phế nang (BAL) và các dịch chiết ở phổi; trong khi không có Fab1 được phát hiện trong mẫu bất kỳ trong số các mẫu từ khỉ đối chứng bằng khí hoặc khỉ đối chứng bằng giả được PulmoSol. Sinh khả dụng được tính toán là khoảng 0,2% sau khi dùng liều xông-xông-hít vào ngày 15. Các kháng thể kháng Fab1 trong huyết thanh được phát hiện chỉ ở một khỉ nhóm 4 ở liều sơ bộ vào ngày 1 và một khỉ nhóm 5 ở ngày 14, nhưng các tín hiệu quan sát được được cho là không có tác động rõ rệt đến sự bộc lộ đối với Fab1 ở các khỉ này. Nhìn chung, không có sự sinh miễn dịch rõ rệt đối với Fab1 được phát hiện trong nghiên cứu này. TSLP tổng không được phát hiện trong huyết thanh, BAL hoặc mô phổi trong phần lớn các mẫu, ngoại trừ một số tín hiệu rất nhỏ được phát hiện trong các mẫu rửa đầu tiên (gom được trong quy trình BAL từ ba con vật được điều trị bằng Fab1).

Tóm lại, việc sử dụng Fab1 cho 3 khỉ *Cynomolgus* dưới dạng tiêm nhanh qua đường tĩnh mạch vào ngày 1, tiếp theo là giai đoạn không định liều lượng 13 ngày và xông-hít đơn liều vào ngày 15 không dẫn đến tác dụng phụ. Việc sử dụng xông-hít Fab1 cho khỉ *Cynomolgus* trong 14 ngày có liên quan đến các thay đổi rõ rệt ở khoang

mũi, phổi và hạch bạch huyết ở phế quản của các khỉ từ tất cả các nhóm được điều trị. Mức độ trầm trọng của các phát hiện này là tối thiểu đến rất nhẹ trong tất cả các trường hợp và các quan sát được coi là không có hại. Tất cả các con vật nhận Fab1 được cho tiếp xúc hệ thống với vật thử nghiệm.

Ví dụ 13: Nghiên cứu gây độc bằng cách cho xông-hít mười ba tuần ở khỉ *Cynomolgus*

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định độc tính tiềm năng của Fab1, Fab kháng lymphopoietin mô đệm tuyến ức (TSLP), khi được đưa vào bằng đường xông-hít một lần một ngày trong ít nhất 92 ngày liên tiếp (13 tuần) cho khỉ *Cynomolgus*, và để đánh giá khả năng nghịch đảo tiềm năng của phát hiện bất kỳ sau khoảng thời gian phục hồi 42 ngày (6 ngày). Ngoài ra, các đặc tính động học độc tố và gây miễn dịch của Fab1 được xác định.

Bột Fab1 PulmoSol được dùng bằng cách xông-hít đối với 3 nhóm (3/giới/nhóm) của khỉ *Cynomolgus* ở các liều đích hàng ngày là 3, 10 và 22 mg/kg/day. Nhóm khỉ khác (3/giới) dùng bột placebo PulmoSol và được dùng là đối chứng. 2 con khác (2/giới) trong Placebo và các nhóm 22 mg/kg/day được giữ lại trong nghiên cứu trong khoảng thời gian phục hồi 6 tuần. Sol khí của Fab1 PulmoSol và placebo PulmoSol được tạo ra bằng cách sử dụng thiết bị quét quay (RBG1000). Những con phơi nhiễm với sol khí của bột Fab1 PulmoSol (Nhóm 2 đến 4) hoặc bột placebo PulmoSol (Nhóm 1) trong 60 phút đích một lần mỗi ngày trong ít nhất 92 ngày liên tục, sử dụng mặt nạ che kín miệng và mũi.

Các thông số sau và các điểm kết thúc được đánh giá trong nghiên cứu này: các dấu hiệu lâm sàng, khối lượng cơ thể, thay đổi khối lượng cơ thể, các xét nghiệm về mắt, kiểm tra thần kinh (bao gồm tốc độ hô hấp), điện tâm đồ, các thông số bệnh lý lâm sàng (huyết học, đông máu, hóa lâm sàng và bài tiết nước tiểu), xác định kiểu hình miễn dịch tế bào lympho máu ngoại biên (đếm tế bào trong dòng chảy), chức năng miễn dịch (đáp ứng kháng thể phụ thuộc tế bào T (TDAR) đối với keyhole limpet hemacyanin (KLH)), phân tích sinh học đối với các nồng độ Fab1 và các thông số động học độc tố (dịch chiết mô phổi và huyết thanh), kháng thể kháng Fab1 (huyết thanh), các phát hiện hoại tử tổng quát, khối lượng cơ quan, và các xét nghiệm mô bệnh.

Toàn bộ được dùng các nồng độ sol khí trung bình của Fab1 là 0,10, 0,33 và 0,72mg/L đối với lần lượt các nhóm 2, 3 và 4. Tổng số trung bình ước tính đạt được tổng

liều vận chuyển (kết hợp giới) là 3,0, 10,1 và 22,2 mg/kg/day Fab1 đối với lần lượt các Nhóm 2, 3 và 4. Đường kính khí động học trung bình khối (MMAD) xác định rằng sol khí Fab1 tạo ra có thể xông-hít được đối với khí và phơi nhiễm ở phổi có thể chấp nhận sẽ đạt được đối với các loài thử nghiệm.

Không có tác động liên quan đến mục kiểm tra công khai nào được quan sát thấy đối với các thông số tim mạch bất kỳ sau khi dùng Fab1 ở liều đạt được là 3, 10 hoặc 22mg/kg/ngày.

Kết quả về điều tra chức năng miễn dịch (TDAR) chỉ ra rằng xu hướng là các mức độ kháng thể IgG kháng KLH giảm ở các liều đạt được là $\geq 10,1$ mg/kg/nga. Ở thời điểm lấy mẫu cuối cùng (ngày nghiên cứu thứ 78), các mức độ kháng thể IgG và IgM kháng-KLH giảm được ghi lại ở các liều đạt được ≥ 3 mg/kg/ngày. Hiệu quả này được nhận thấy rõ nhất ở khi đực ở mọi thời điểm và ở khi cái trong ngày 78, nhưng ít nổi bật ở khi cái khi lấy mẫu các lần khác. Xu hướng giảm ở đáp ứng kháng-KLH không được xem là có hại. Các mức độ kháng thể IgG và IgM kháng-KLH trong nhóm 4 (22,2 mg/kg/ngày) những con phục hồi cao hơn ở tất cả các trường hợp khi so sánh với giá trị phục hồi kiểm soát đồng thời (Nhóm 1) và tương tự với đối chứng (Nhóm 1) các nghiên cứu chính, hỗ trợ phục hồi của đáp ứng kháng thể kháng KLH. Việc dùng Fab1 trong ít nhất 92 ngày, qua liều xông-hít, dẫn đến số lượng tăng mô lympho trong phổi ở liều đã thu được 3mg/kg/ngày. Sự nghiêm trọng của phát hiện này tối thiểu là nhẹ trong tất cả các trường hợp và được xem là không nghiêm trọng. Sau 6 tuần phục hồi, phát hiện không xuất hiện trong 2/4 (50%) động vật phục hồi và được quan sát thấy ở 2/4 (50%) của các động vật dùng liều cao ở mức độ nghiêm trọng tối thiểu. Phát hiện tương tự cũng xuất hiện trong một đối chứng con cái phục hồi (nhẹ) khẳng định rằng sự thay đổi này có thể đôi khi không thường xuyên trong số các động vật đối chứng. Fab1 được phát hiện trong bất cứ mẫu huyết thanh hoặc mẫu mô phổi từ nhóm động vật đối chứng placebo PulmoSol (Nhóm 1). Một cách tổng quát, sự phơi nhiễm của Fab1 được giải thích thông qua giai đoạn sử dụng liều ở động vật được điều trị bằng Fab1, với sự tăng liên quan đến liều ở cả huyết thanh và mô phổi. Sự phơi nhiễm hệ thống trong huyết thanh trong suốt quá trình phục hồi cho tới 14-28 ngày sau liều cuối vào ngày 92, trong khi các nồng độ của mô phổi không thể phát hiện được trong tất cả các động vật bởi thời gian hoại tử vào ngày 135 (42 ngày sau liều cuối cùng). Có sự tích tụ đáng chú ý trong huyết thanh phơi

nhiễm với Fab1 từ nghiên cứu ngày 1 đến nghiên cứu ngày 91 sau khi lặp lại các liều hàng ngày giữa tất cả các nhóm liều. Không có sự khác biệt nào về giới tính khi phơi nhiễm như quan sát được. Tín hiệu kháng thể kháng được chất (ADA) thấp nhưng vẫn phát hiện được ở hai động vật đối chứng placebo PulmoSol ở đường cơ sở ở thời điểm trước và thời điểm sau sau khi dùng liều, có khả năng là do kháng thể đã tồn tại trước đó mà không đặc hiệu với Fab1. Tín hiệu ADA được phát hiện ở bất cứ động vật đối chứng. Tất cả các động vật đã điều trị bằng Fab1 đã phát triển các tín hiệu sau khi sử dụng liều ADA sớm nhất vào ngày 28 trở đi. Các tín hiệu ADA mạnh trong 3 động vật hiến nhiên là liên quan đến sự mất phơi nhiễm với Fab1 trong huyết thanh, nhưng phơi nhiễm với Fab1 vẫn được giải thích trong các động vật này ở thời điểm hoại tử (1~6 giờ sau liều cuối cùng). Tóm lại, dùng Fab1 bằng xông-hít đối với Khỉ Cynomolgus trong 13 tuần được dung nạp tốt ở liều thu được có thể xông-hít thở được ở mức độ cao đến 22,2mg/kg/ngày. Tất cả các động vật nhận Fab1 được khẳng định để có sự phơi nhiễm với Fab1 cả toàn bộ cơ thể và trong phổi. Kháng thể kháng Fab1 xuất hiện trong tất cả các động vật được điều trị sớm nhất vào ngày 28 trở đi và liên quan đến sự phơi nhiễm thấp hơn ở 3 cá thể so với các động vật được điều trị còn lại. Việc đánh giá vi mô khẳng định số lượng tế bào tăng trong mô lympho ở phổi đối với đã số các động vật được điều trị bằng Fab1, mà đã quan sát được trong số 50% các động vật phục hồi ở liều cao sau giai đoạn phục hồi 6 tuần. Sự nghiêm trọng của phát hiện này là tối thiểu đến nhẹ ở tất cả các trường hợp và không được xem là bất lợi.

Ví dụ 14: Bào chế chế phẩm bào chế đơn giản làm khô bằng sấy phun mảnh kháng thể đơn dòng

Mảnh kháng thể đơn dòng Fab1 được mô tả ở đây có trọng lượng phân tử là 46,6kDa. Chế phẩm bào chế dạng bột khô được mô tả để vận chuyển tại chỗ ở phổi để điều trị hen suyễn. Trong ngữ cảnh này, việc sử dụng thuật ngữ “đơn giản” chỉ để đề cập đến chế phẩm bào chế có thành phần được hoạt tính (Fab1) và đệm.

Một loại chế phẩm bào chế kháng thể đơn giản có chứa 89,5% thành phần được có hoạt tính và 10,5% đệm histidin được sản xuất từ nguyên liệu cơ bản có chứa nhiều

dung môi hợp phần etanol/nước (Bảng 9). Thành phần etanol khác nhau giữa 5% và 20% khối lượng/ khối lượng. Nguyên liệu cơ bản được làm khô bằng sấy phụ trên máy sấy phun NSD có nhiệt độ trong là 105°C, nhiệt độ bên ngoài 70°C, tốc độ dòng khí làm khô 595 L/phút, tốc độ dòng phun là 20 L/phút, tốc độ đưa chất lỏng vào là 8,0 mL/phút, và ALR là $2,5 \times 10^3$ thể tích/thể tích. Thành phần rắn cố định 2% khối lượng/thể tích.

Bảng 9. Tác động của các thông số quy trình tới đặc tính tán mịn chế phẩm bào chế kháng thể đơn giản có chứa 89,5% API trong đệm histidin

Lô #	API (% khối lượng/ khối lượng)	Trileuxin (% khối lượng/ khối lượng)	Chất rắn (%khối lượng/t hể tích)	EtOH (% khối lượng/ khối lượng)	PPSD (μm)			Khối lượng riêng từ hạt (g/cm ³)
					x10	x50	x90	
761-22-07	89,5	0	2	0	0,55	1,34	3,24	0,347
761-02-09	89,5	0	2	5	0,66	1,93	5,64	0,178
761-02-06	89,5	0	2	10	0,73	2,48	7,19	0,142
761-02-07	89,5	0	2	20	0,69	1,94	6,04	0,135

Ví dụ 15: Đặc tính tán mịn chế phẩm bào chế đơn giản làm khô bằng sấy phun của kháng thể

Đặc tính tán mịn của chế phẩm bào chế kháng thể làm khô bằng sấy phun theo ví dụ 14 được trình bày trong bảng 9. Tất cả các chế phẩm bào chế đơn giản chỉ chứa API và đệm, sản sinh ra các hạt với bề mặt hạt nhẵn (có nghĩa là, không có sự nhăn trên bề mặt). Việc thêm lượng nhỏ etanol vào nguyên liệu lỏng làm giảm số lượng và khối lượng riêng từ hạt của bột (cũng quan sát thấy ở chế phẩm bào chế insulin). Các hạt tương đối lớn, về sự phân bố kích thước hạt chính (primary particle size distribution-PPSD).

Ví dụ 16: Hiệu suất sol khí chế phẩm bào chế đơn giản làm khô bằng sấy phun kháng thể

DD và TLD được xác định là bột được mô tả trong ví dụ 15 được trình bày trong bảng 10. Các hạt chính có đường kính khí động học được tính toán, D_a , giữa 0,71 và 0,93 μm (được tính toán từ khối lượng riêng từ hạt và x50 phép đo sử dụng chế phẩm bào chế: $d_a = d_g \sqrt{\rho_p}$).

Thiết bị xông-hít bột khô Concept1 là thiết bị dựa trên viên nang kháng thấp ($R = 0,07\text{cm H}_2\text{O})^{1/2} / (\text{L/phút})$).

Bảng 10. Hiệu suất sol khí của chế phẩm bào chế kháng thể. Hiệu suất sol khí được đánh giá bằng thiết bị xông-hít Concept1 (20mg khối chất thải) ở tốc độ chảy 90L/phút và thể tích tổng là 2L (n=5)

Lô #	Khối lượng riêng từ hạt (g/cm^3)	x50 (μm)	D_a (calc) (μm)	Hình thái	DD (%) ND)	TLD (% DD)
761-22-07	0,347	1,34	0,79	Tron	64,9	65,0
761-02-09	0,178	1,93	0,81	Tron	77,0	57,1
761-02-06	0,142	2,48	0,93	Tron	81,2	43,7
761-02-07	0,135	1,94	0,71	Tron	74,3	57,7

Rõ ràng là, dữ liệu trong bảng 10 mà chỉ làm giảm mật độ đủ để cho phép sự hình thành hạt có thể vượt qua được sự lắng đọng ở miệng-cổ họng. Để thu được điều này, hình thái hạt được biến đổi để làm tăng độ xù xì bề mặt (độ gợn sóng), và giảm kích thước hạt chính cũng được mong đợi.

Điều thú vị đáng chú ý là trong khi các protein nhỏ có hình thái gợn sóng khi không có tá dược tạo vỏ, việc tạo chế phẩm bào chế kháng thể đòi hỏi việc bổ sung tá dược tạo hình vỏ để cho phép tạo thành gợn sóng. Về khía cạnh này, tá dược tạo hình vỏ và việc thêm etanol thực hiện chức năng tương tự trong quá trình biến đổi độ dày thành

và mật độ của các hạt làm khô bằng sấy phun. Do đó, tác dụng của việc thêm etanol nhỏ hơn khi có mặt các chất tạo hình vỏ.

Ví dụ 17: Dạng bào chế và đặc tính tán mịn của chế phẩm bào chế nền làm khô bằng sấy phun của kháng thể

Trong số một loạt bột sấy phun, các điều kiện sấy phun được giữ không đổi, và tác động của việc thêm tá dược tạo hình vỏ (có nghĩa là, trileuxin, 0-15% khối lượng/ khối lượng) được đánh giá cho các chế phẩm bào chế kháng thể. Những chế phẩm bào chế này cũng chứa trehaloza là chất tạo trạng thái thủy tinh (khoảng 29-44% khối lượng/ khối lượng phụ thuộc vào thành phần trileuxin) và đệm histidin (5,9% khối lượng/ khối lượng, pH 5,0).

Bột được sấy khô trên máy sấy khô NSD tùy chỉnh với nhiệt độ đầu vào là 105°C, nhiệt độ đầu ra là 70°C, tốc độ dòng khí làm khô 595L/phút, tốc độ dòng phun là 25L/phút, tốc độ đưa chất lỏng vào là 10,0mL/phút, và ALR là $2,5 \times 10^3$ thể tích/thể tích. Thành phần rắn được giữ không đổi ở 2% khối lượng/ khối lượng. Tất cả các bột có hình thái gọn song với ngoại lệ là lô 761-02-12, mà được làm khô bằng sấy phun khi không có mặt chất tạo hình vỏ và tạo ra các hạt trơn tương tự như đã quan sát được trong ví dụ 16. Kết quả được trình bày trong bảng 11. Theo một vài phương án, chế phẩm bào chế dạng bột khô theo sáng chế có chứa các hạt gồm hai phần vỏ và lõi có chứa: tá dược tạo vỏ, và lõi có chứa API, tá dược tạo trạng thái thủy tinh, và đệm, đôi khi cũng được đề cập ở đây như là chế phẩm bào chế nền.

Bảng 11. Tác động của các thông số quy trình tới đặc tính tán mịn của chế phẩm bào chế kháng thể “nền” có chứa 50,0% khối lượng/ khối lượng API, 5,9% đệm histidin, trehaloza và trileuxin

Lô #	API (% khối lượng/ khối lượng)	Trileuxin (% khối lượng/ khối lượng)	EtOH (% khối lượng/ khối lượng)	PPSD (μ m)			Khối lượng riêng từ hạt (g/cm ³)
				x10	x50	x90	

728-06-04	50,0	10,0	0	0,55	2,28	5,14	0,366
728-06-02	50,0	15,0	0	0,64	2,06	4,83	0,197
761-02-12	50,0	0,0	10	0,48	1,60	4,87	0,158
761-22-06	50,0	5,0	10	0,50	1,63	3,85	0,268
761-02-11	50,0	10,0	10	0,63	2,25	5,75	0,176
761-02-10	50,0	15,0	10	0,67	2,30	5,27	0,112

Ví dụ 18: Hiệu suất sol khí của chế phẩm bào chế “nền” làm khô bằng sấy phun của kháng thể với thành phần trileuxin khác nhau

DD và TLD xác định cho bột được mô tả trong ví dụ 17 được trình bày ở bảng 12.

Bảng 12. Tác động của các thông số quy trình tới đặc tính tán mịn và hiệu suất sol khí của chế phẩm bào chế kháng thể nền. Hiệu suất sol khí được đánh giá bằng thiết bị xông-hít Concept1 (20mg khối chất thải) ở tốc độ chảy là 90L/phút và thể tích tổng là 2L (n=5)

Lô #	Etanol/ Chất rắn	Khối lượng riêng từ hạt (g/cm ³)	x50 (µm)	D _a (calc) (µm)	Hình thái	DD (% ND)	TLD (% DD)
728-06-04	0	0,366	2,28	1,38	Gợn sóng	90,0	83,3
728-06-02	0	0,197	2,06	0,91	Gợn sóng	90,0	80,0

761-02-12	5	0,158	1,60	0,64	Tron	69,0	66,2
761-22-06	5	0,268	1,63	0,84	Gọn sóng	89,2	79,1
761-02-11	5	0,176	2,25	0,94	Gọn sóng	92,3	84,8
761-02-10	5	0,112	2,30	0,77	Gọn sóng	93,1	83,0

Sự cải thiện đáng kể của DD và TLD được quan sát thấy ở chế phẩm bào chế kháng thể với hình thái gọn sóng. Theo phương án của sáng chế, hình thái hạt gọn sóng là kết quả của sự có mặt của tá dược tạo hình vỏ trileuxin trên bề mặt của hạt.

Theo phương án của sáng chế, các đặc tính hóa lý của vật liệu trên bề mặt của hạt ảnh hưởng đến hình thái của hạt. Đối với những protein lớn (chẳng hạn như những protein nhất định trên 20.000 Dalton) tá dược tạo vỏ chẳng hạn như trileuxin được ưu thích hơn để thu được hình thành mong muốn. Theo các phương án của sáng chế các hạt tạo thành chế phẩm bào chế và được phẩm có hình thái xù xì để giảm lực kết dính giữa các hạt, chẳng hạn như kích cỡ của các chất tích tụ nhỏ hơn các chất thở ra.

Khi etanol được thêm vào, nó làm cho mật độ hạt thấp đi đối với những gọn sóng (nếu không thì) bằng cách làm giảm độ dày của thành. Ngược lại, điều này làm giảm khối lượng riêng từ hạt cho phép các hạt chính nhỏ hơn tương ứng với đặc tính khí động học. Theo một vài phương án, các hạt nên có mật độ thấp, sao cho chẳng hạn như các hạt chính, và các chất kết tụ có thể xông-hít thở được.

Sự giảm đáng kể của khối lượng riêng từ hạt được ghi nhận cho chế phẩm bào chế ghép 728-06-04 và 761-02-11 và 728-06-02 và 761-02-10 khi thành phần etanol tăng từ 0% đến 10% khối lượng/ khối lượng. Đối với chế phẩm bào chế cụ thể trong ví dụ này, việc thêm riêng 10% etanol không đủ khả năng cải thiện về hiệu suất sol khí so với hiệu suất mong muốn tạo bởi tá dược tạo hình vỏ. TLD hoàn hảo (>80% của DD), nhưng dưới mục tiêu mong muốn là 90% khối lượng/ khối lượng của DD, phần lớn là do các hạt quá to và dày đặc. Đối với các gọn sóng, đường kính khí động học đầu tiên đo được, D_a , nằm trong khoảng từ 0,77 đến 1,38 μ m.

Ví dụ 19: Tác động của các thông số quy trình sửa đổi (hàm lượng chất rắn và việc thêm chất đồng dung môi) đặc tính tán mịn của chế phẩm bào chế kháng thể nền

Chế phẩm bào chế có chứa 50,0% khối lượng/ khối lượng API, 5,9% khối lượng/ khối lượng đệm histidin (pH 5,0), khoảng 14% khối lượng/ khối lượng hoặc 29% khối lượng/ khối lượng trehaloza và 15% khối lượng/ khối lượng hoặc 30% khối lượng/ khối lượng trileuxin. Bột được làm khô bằng sấy phun tự điều chỉnh NSD với nhiệt độ đầu vào là 105°C, nhiệt độ đầu ra là 70°C, tốc độ dòng khí làm khô 595L/phút, tốc độ dòng phun là 30L/phút, tốc độ đưa chất lỏng vào là 4,0mL/phút, và ALR là $7,5 \times 10^3$ thể tích/thể tích. Thành phần rắn giảm tới 1% khối lượng/ khối lượng. Sự sửa đổi trong quy trình làm khô bằng sấy phun được thiết kế để làm giảm kích thước hạt cơ bản. Theo các phương án của sáng chế, sự giảm đáng kể về sự phân bố kích thước hạt đã được quan sát thấy.

Bảng 13. Tác động của các thông số quy trình tới đặc tính tán mịn của chế phẩm bào chế kháng thể “nền” có chứa 50,0% khối lượng/ khối lượng API, 5,9% đệm histidin, trehaloza và trileuxin.

Lô #	API (% khối lượng / khối lượng)	Solids (% khối lượng/t hể tích)	Trileuxin (% khối lượng/ khối lượng)	EtOH (% khối lượng/ khối lượng)	PPSD (μm)			Khối lượng riêng từ hạt (g/cm^3)
					x10	x50	x90	
761-22-01	50,0	1,0	15,0	5	0,3 9	1,3 3	2,5 9	0,282
761-22-02	50,0	1,0	15,0	10	0,5 1	1,3 1	2,5 9	0,232
761-22-03	50,0	1,0	15,0	20	0,5 3	1,3 6	2,9 4	0,151
761-02-04	50,0	1,0	15,0	30	0,5 5	1,4 4	3,1 5	0,162

761-22-05	50,0	1,0	30,0	20	0,6 4	1,5 8	2,9 4	0,122
-----------	------	-----	------	----	----------	----------	----------	-------

Ví dụ 20: Tác động của các thông số quy trình sửa đổi (hàm lượng chất rắn và sự bổ sung đồng dung môi) tới hiệu suất sol khí của chế phẩm bào chế kháng thể nền

Tác động của việc giảm hàm lượng chất rắn và tăng in ALR đối với hiệu suất sol khí của chế phẩm bào chế kháng thể nền trình bày trong bảng 14. Sự giảm đáng kể về đường kính khí động học trung bình của hạt chính đã quan sát được là tương ứng với các hạt trong ví dụ 18. Những sự chuyển đổi thành TLD giữa khoảng 94% và 98% của DD, có nghĩa là, trong hiệu suất mong muốn, được ưa thích, hoặc phạm vi đích tối ưu.

Bảng 14. Tác động của các thông số quy trình lên đặc tính đặc tính tán mịn và hiệu suất sol khí của chế phẩm bào chế kháng thể nền. Hiệu suất sol khí được đánh giá bằng thiết bị xông-hít Concept1 (20 mg khối chất thải) ở tốc độ chảy 90L/phút và thể tích tổng là 2L (n=5).

Lô #	Etanol/ Chất rắn	Khối lượng riêng từ hạt (g/cm ³)	x50 (μm)	Hình thái	D _a (calc) (μm)	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-01	5	0,282	1,33	Gợn sóng	0,71	92,4	97,8
761-22-02	10	0,232	1,31	Gợn sóng	0,63	93,9	95,1
761-22-03	20	0,151	1,36	Gợn sóng	0,53	92,1	95,6
761-02-04	30	0,162	1,44	Gợn sóng	0,58	93,7	95,0
761-22-05	20	0,122	1,58	Gợn sóng	0,55	95,0	93,7

Trừ phi được định nghĩa khác, các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây cùng nghĩa với các thuật ngữ như đã được hiểu với chuyên gia trong lĩnh vực mà sử dụng bản mô tả.

Trừ phi chỉ ra điều ngược lại, tất cả các phương pháp, các bước, các kỹ thuật và các thao tác mà không được mô tả chi tiết cụ thể có thể được thực hiện và đã được thực hiện theo cách đã biết, và sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Sự tham chiếu là tới những các sổ tay tiêu chuẩn và những kiến thức chung trong lĩnh vực được đề cập ở đây và tới những tài liệu tham khảo khác được trích dẫn ở đây.

Trừ phi chỉ ra điều ngược lại, từng tài liệu tham khảo được đưa vào đây bằng cách tham khảo toàn bộ.

Các yêu cầu bảo hộ là không hạn chế và được trình bày dưới đây.

Mặc dù các khía cạnh đặc biệt và yêu cầu bảo hộ được bộc lộ chi tiết ở đây, cách thực hiện ở ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa, và không nhằm hạn chế phạm vi của các yêu cầu bảo hộ đi kèm, hoặc phạm vi của các đối tượng trong yêu cầu bảo hộ của đơn đồng dạng bất kỳ trong tương lai. Cụ thể, các nhà sáng chế đã dự tính rằng, sự thay thế, thay đổi, và sửa đổi có thể được thực hiện nhằm bộc lộ sáng chế mà không ra khỏi tinh thần và phạm vi của sự bộ lộ đã được trình bày trong yêu cầu bảo hộ. Sự lựa chọn vật liệu axit nucleic khởi đầu, dòng quan tâm, hoặc loại thư viện được cho là vấn đề thói quen của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực với những hiểu biết về các khía cạnh mô tả ở đây. Các khía cạnh khác, thuận lợi, và sửa đổi được xem là nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ sau. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra hoặc có khả năng đảm bảo, chỉ sử dụng các khảo nghiệm thông thường, nhiều khảo nghiệm tương đương trong các khía cạnh cụ thể theo sáng chế được mô tả ở đây. Các khảo nghiệm tương đương này chăm bao hàm cả cả các yêu cầu bảo hộ sau. Việc soạn lại phạm vi bảo hộ trong các đơn đồng dạng nộp sau có thể là do sự giới hạn trong luật sáng chế ở nhiều nước khác nhau và nên được cho là từ bỏ các yêu cầu bảo hộ đó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử gắn kết đặc hiệu với lymphopoietin mô đệm tuyến ức (TSLP) của người được lựa chọn bất kỳ trong số các phân tử sau:

a) phân tử bao gồm:

vùng biến đổi trên chuỗi nặng có chứa:

vùng xác định bổ trợ trên chuỗi nặng 1 (HCDR1) có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 4;

vùng xác định bổ trợ trên chuỗi nặng 2 (HCDR2) có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 2; và

vùng xác định bổ trợ trên chuỗi nặng 3 (HCDR3) có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 3; và

vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có chứa:

vùng xác định bổ trợ trên chuỗi nhẹ 1 (LCDR1) có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 11;

vùng xác định bổ trợ trên chuỗi nhẹ 2 (LCDR2) có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 12; và

vùng xác định bổ trợ trên chuỗi nhẹ 3 (LCDR3) có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 13;

b) phân tử bao gồm:

vùng biến đổi trên chuỗi nặng có chứa:

HCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 5;

HCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 6; và

HCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 3; và

vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có chứa:

LCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 14;

LCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 15; và

LCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 16;

c) phân tử bao gồm vùng biến đổi trên chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 7, và vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 17;

d) phân tử bao gồm chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 22, và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 25;

e) phân tử bao gồm chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 9, và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 19;

f) mảnh kháng thể gắn kết với TSLP của người và có chứa vùng biến đổi trên chuỗi nặng có chứa:

HCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 4;

HCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 2; và

HCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 3; và

vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có chứa

LCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 11;

LCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 12; và

LCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 13;

và

g) mảnh kháng thể gắn kết với TSLP của người và có chứa:

vùng biến đổi trên chuỗi nặng có chứa:

HCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 5;

HCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 6; và

HCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 3; và

vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có chứa

LCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 14;

LCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 15; và

LCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 16.

2. Phân tử theo điểm 1, trong đó phân tử này là kháng thể đơn dòng.
3. Phân tử theo điểm 1, trong đó phân tử này mảnh kháng thể được lựa chọn từ Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, thể mini, hoặc thể dia.
4. Phân tử theo điểm 3, trong đó phân tử này là Fab.
5. Phân tử theo điểm 4, trong đó phân tử này là Fab của người hoặc được làm giống của người.
6. Phân tử theo điểm 1, trong đó phân tử này là globulin miễn dịch của người.
7. Phân tử theo điểm 1, trong đó phân tử này gắn kết với TSLP của người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 100pM.
8. Phân tử theo điểm 1, trong đó phân tử gắn kết với TSLP của người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 10pM.
9. Dược phẩm có chứa phân tử theo điểm 1 và ít nhất một tá dược dược dụng.
10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó phân tử là khoảng 5% đến khoảng 95%, hoặc khoảng 10% đến khoảng 90%, hoặc khoảng 15% đến khoảng 85%, hoặc khoảng 20% đến khoảng 80%, hoặc khoảng 25% đến khoảng 75%, hoặc khoảng 30% đến khoảng 70%, hoặc khoảng 40% đến khoảng 60%, hoặc khoảng từ 40 đến 50% (khối lượng/ khối lượng) của dược phẩm.

11. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này có chứa chất tạo hình vỏ.
12. Dược phẩm theo điểm 11, trong đó chất tạo hình vỏ là trileuxin hoặc leuxin.
13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó trileuxin hoặc leuxin là khoảng từ 10 đến 75% (khối lượng/ khối lượng) của dược phẩm.
14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó trileuxin là khoảng từ 10 đến 30% (khối lượng/ khối lượng) của dược phẩm, hoặc trong đó leuxin là khoảng từ 50 đến 75% (khối lượng/ khối lượng) của dược phẩm.
15. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này có chứa ít nhất tá dược tạo trạng thái thủy tinh.
16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó tá dược tạo trạng thái thủy tinh được lựa chọn từ histidin, trehaloza, manitol, sucroza hoặc natri xitrat.
17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó ít nhất tá dược tạo trạng thái thủy tinh được lựa chọn từ trehaloza hoặc hỗn hợp của trehaloza và manitol.
18. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó tá dược tạo trạng thái thủy tinh là khoảng từ 15 đến 35% (khối lượng/ khối lượng) của dược phẩm.
19. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này có chứa đệm.
20. Dược phẩm theo điểm 19, trong đó đệm được lựa chọn từ đệm histidin, glyxin, axetat hoặc phosphat.
21. Dược phẩm theo điểm 19, trong đó đệm là khoảng từ 5 đến 13% của dược phẩm.

22. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này được bào chế dưới dạng chế phẩm bào chế dạng bột khô.

23. Dược phẩm theo điểm 22, trong đó dược phẩm này được bào chế dưới dạng chế phẩm bào chế dạng bột khô thích hợp để xông-hít.

24. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này có chứa: các hạt làm khô bằng sấy phun có chứa vỏ và lõi, trong đó vỏ có chứa trileuxin hoặc leuxin và lõi bao gồm:

- i) phân tử, trehaloza, manitol và đệm; hoặc
- ii) phân tử, trehaloza, đệm và HCl.

25. Dược phẩm theo điểm 24, trong đó đệm được lựa chọn từ đệm histidin, glyxin, axetat, hoặc phosphat.

26. Dược phẩm có chứa các hạt làm khô bằng sấy phun bao gồm:

i) lõi có chứa trehaloza, manitol, histidin, và phân tử gắn kết TSLP, hoặc lõi có chứa trehaloza, histidin, HCl, và phân tử gắn kết TSLP, trong đó phân tử gắn kết TSLP là mảnh Fab của kháng thể có chứa:

a) vùng biến đổi trên chuỗi nặng có chứa:

HCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 4;

HCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 2; và

HCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 3; và

vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có chứa:

LCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 11;

LCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 12; và

LCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 13;

hoặc

b) vùng biến đổi trên chuỗi nặng có chứa:

HCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 5;

HCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 6; và

HCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 3; và

vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có chứa:

LCDR1 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 14;

LCDR2 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 15; và

LCDR3 có chứa trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 16; và

ii) vỏ có chứa trileuxin hoặc leuxin.

27. Dược phẩm theo điểm 26 có chứa:

a) 40% (khối lượng/ khối lượng) phân tử gắn kết TSLP, 25% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, 30% (khối lượng/ khối lượng) khối lượng kết hợp của trehaloza và manitol, và 5% (khối lượng/ khối lượng) histidin;

b) 50% (khối lượng/ khối lượng) phân tử gắn kết TSLP, 15% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, 2,6% (khối lượng/ khối lượng) HCl, 5,6% (khối lượng/ khối lượng) histidin, và 26,8% (khối lượng/ khối lượng) khối lượng kết hợp của trehaloza và một bazơ; hoặc

c) 50% (khối lượng/ khối lượng) phân tử gắn kết TSLP, 15% (khối lượng/ khối lượng) trileuxin, 19,4% (khối lượng/ khối lượng) trehaloza, 13,04% (khối lượng/ khối lượng) histidin, và 2,56% (khối lượng/ khối lượng) HCl.

28. Bộ kit có chứa phân tử theo điểm 1, hoặc dược phẩm theo điểm 9, và thiết bị để vận chuyển phân tử hoặc dược phẩm đến đối tượng.

29. Bộ kit theo điểm 28, trong đó thiết bị vận chuyển phân tử hoặc dược phẩm dạng sol khí.

30. Bộ kit theo điểm 28, trong đó thiết bị là thiết bị xông-hít bột khô.

31. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó tỷ lệ khối lượng tá dược : phân tử lớn hơn 0,5.

Fig. 1A

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMHWVRQAPGKGLEWVGHIKSKTDAGTTDYAAPVK
GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAREIYYYAPDSWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC (SEQ ID NO: 22)

Fig. 1B

SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS
 RAQAGDEADYYCQAADWVDFYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK
 ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 25)

Fig. 2

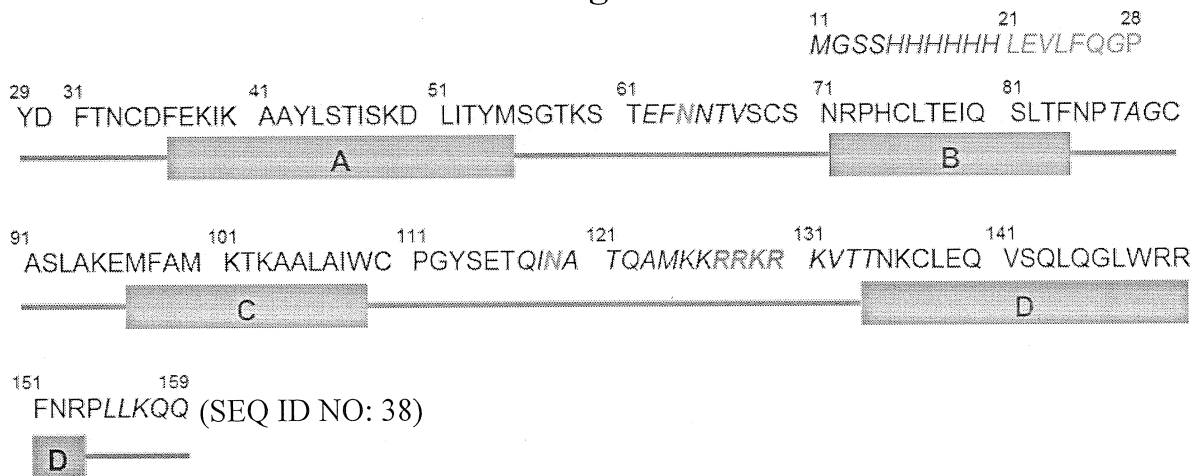


Fig. 3

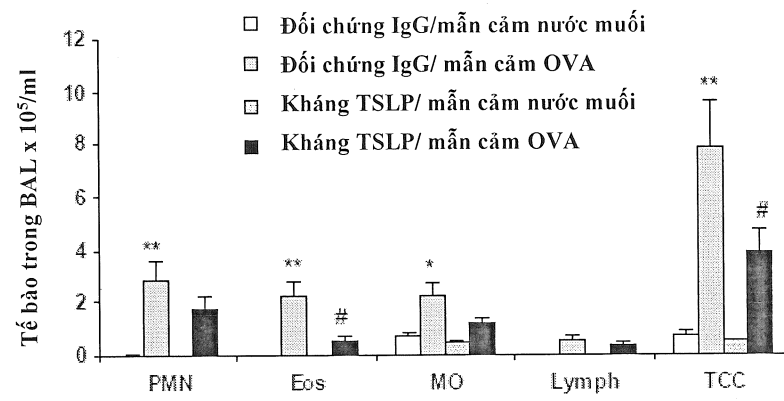


Fig. 4A

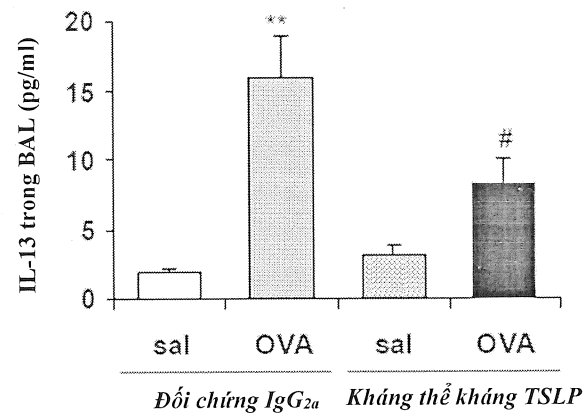


Fig. 4B

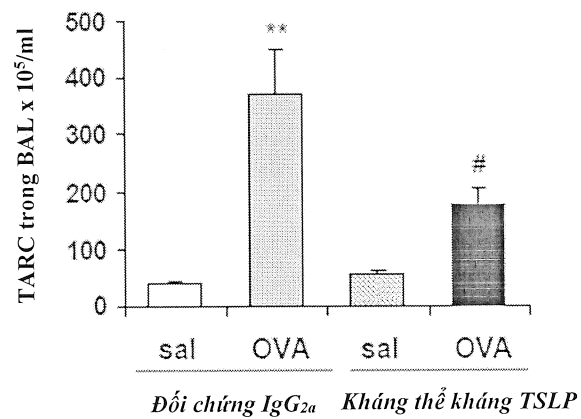


Fig. 4C

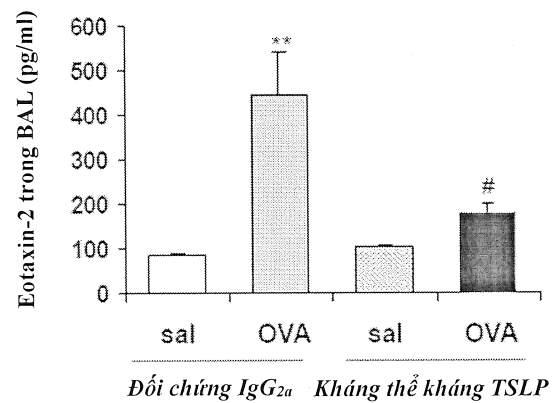


Fig. 5

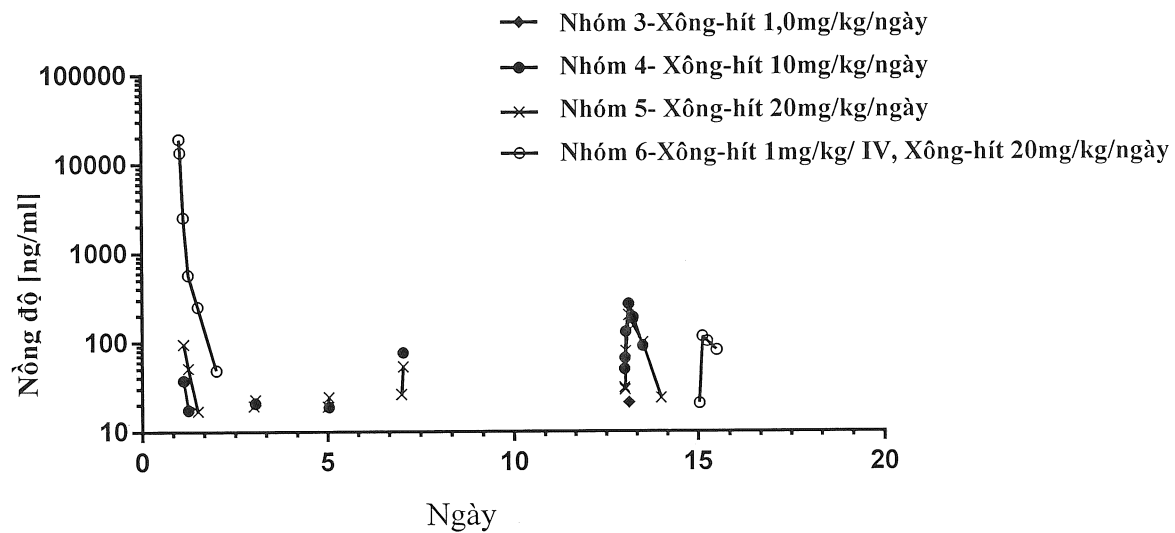


Fig. 6A

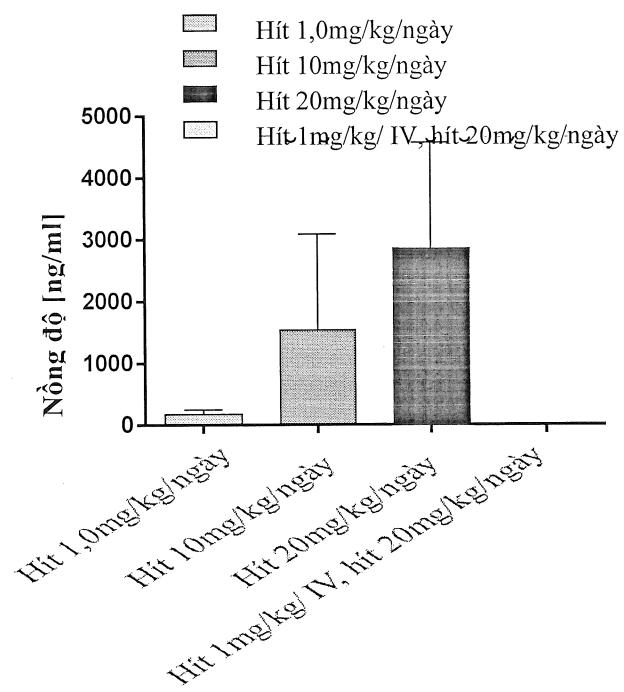


Fig. 6B

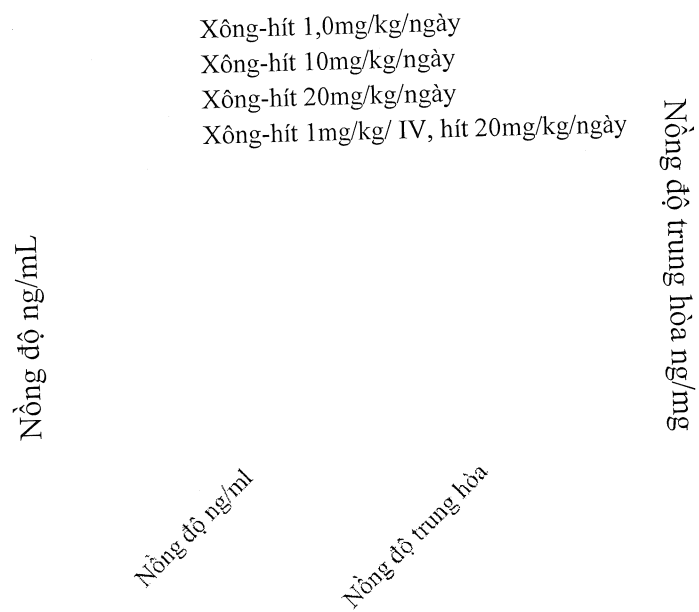


Fig. 7

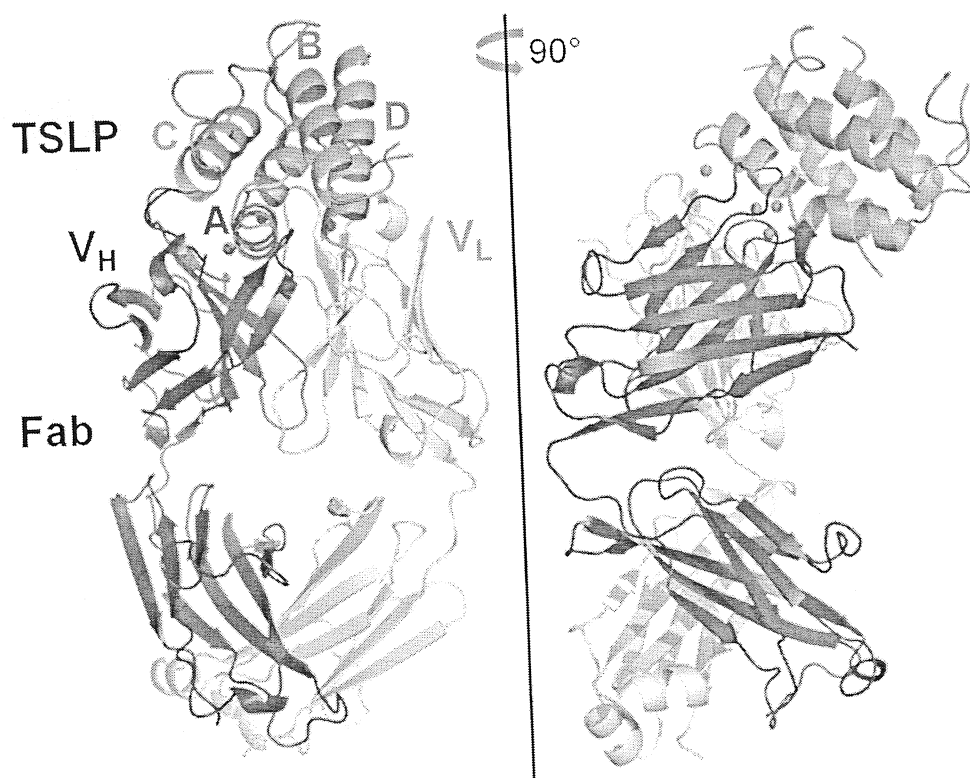
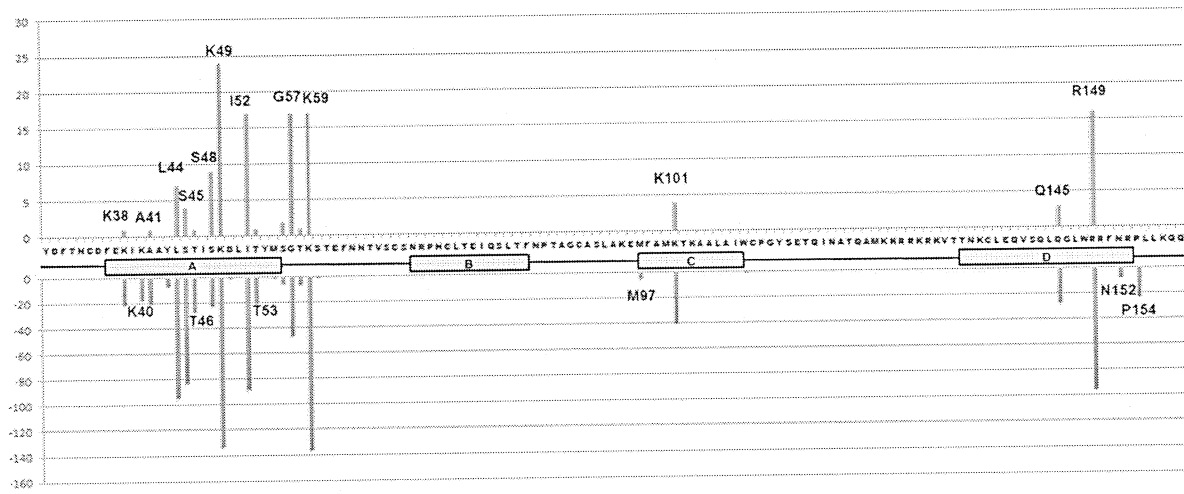


Fig. 8

Nb của các tương tác nội phân tử trực tiếp ($\leq 4.0\text{\AA}$)



Giảm bề mặt có thể bị tiếp cận bởi dung môi ($\text{\AA}^2$)

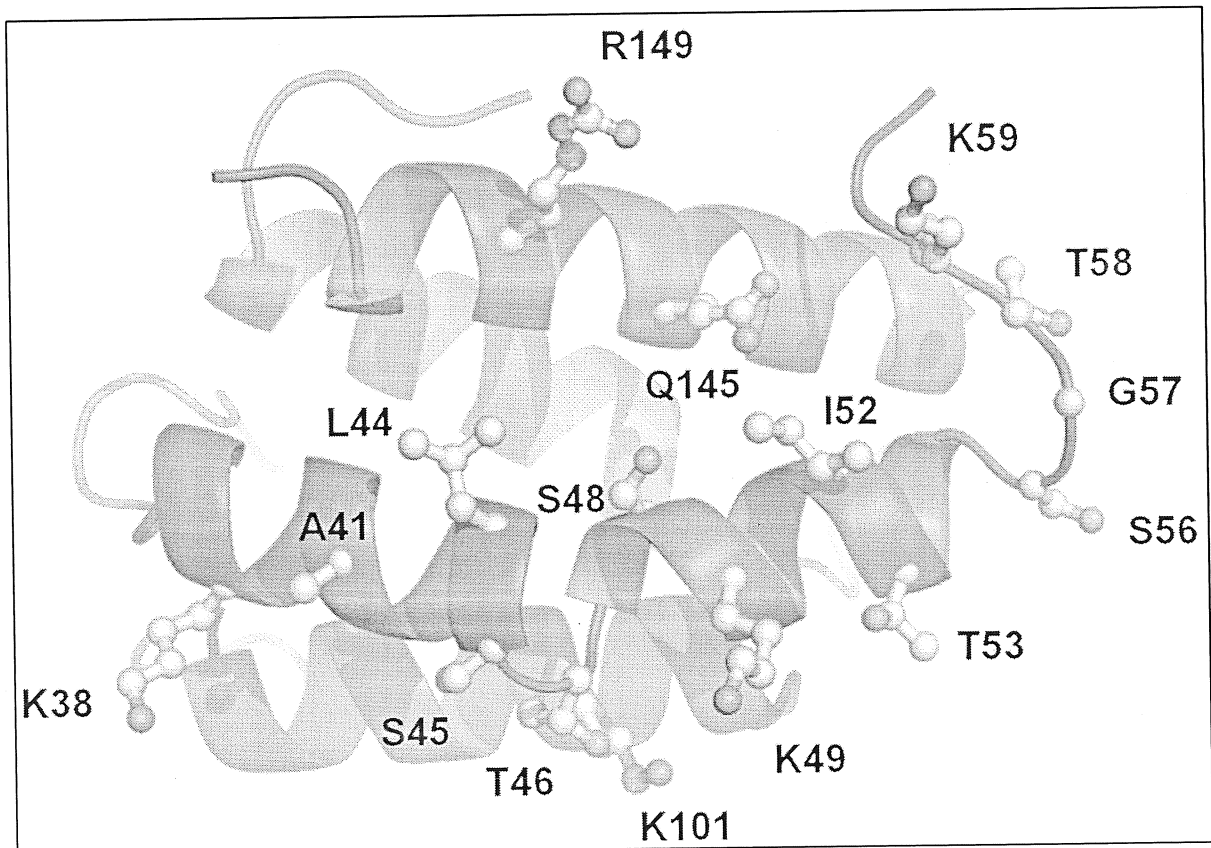
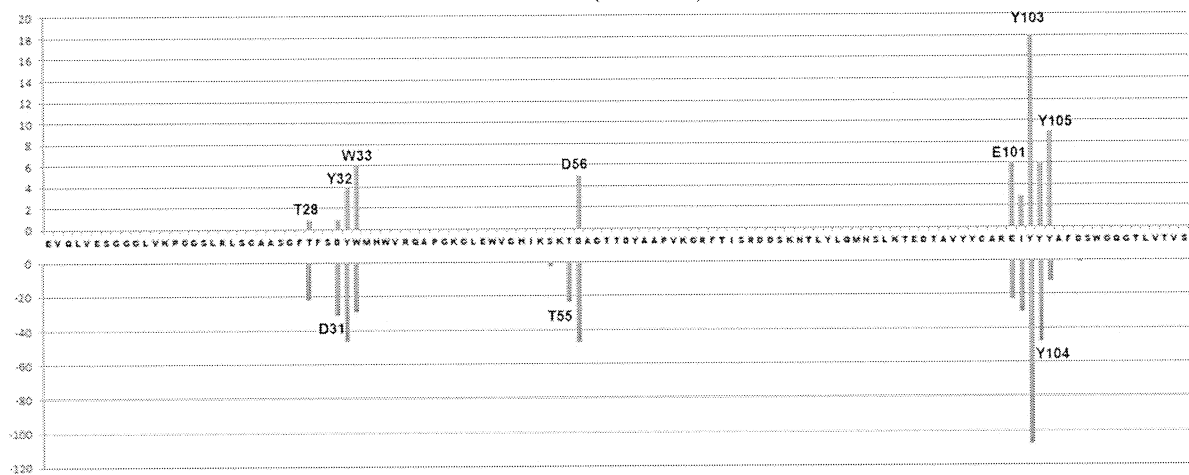
Fig. 9

Fig. 10A

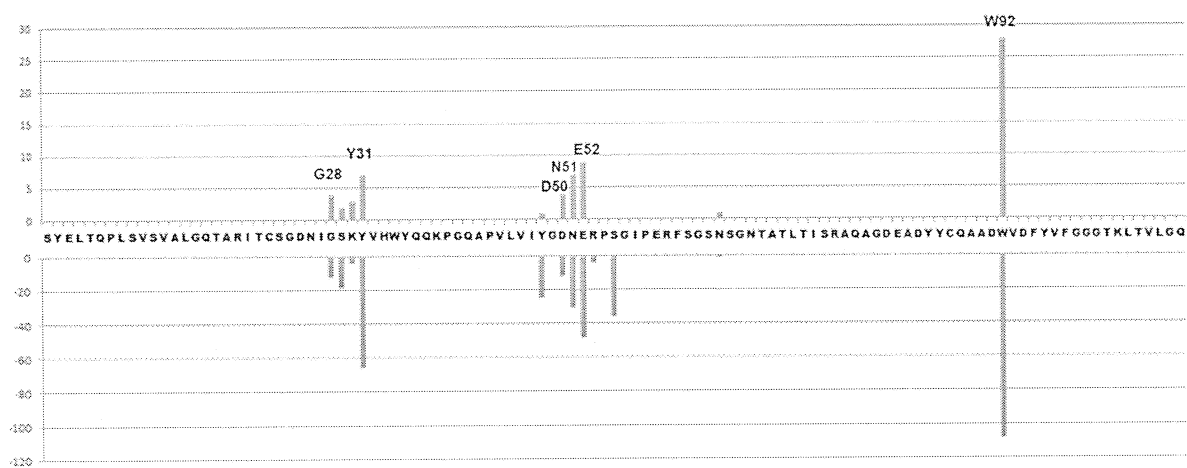
Nb của các tương tác nội phân tử trực tiếp ($\leq 4.0\text{\AA}$)



Giảm bề mặt có thể bị tiếp cận bởi dung môi ($\text{\AA}^2$)

Fig. 10B

Nb của các tương tác nội phân tử trực tiếp ($\leq 4.0\text{\AA}$)



Giảm bề mặt có thể bị tiếp cận bởi dung môi ($\text{\AA}^2$)

Fig. 11A

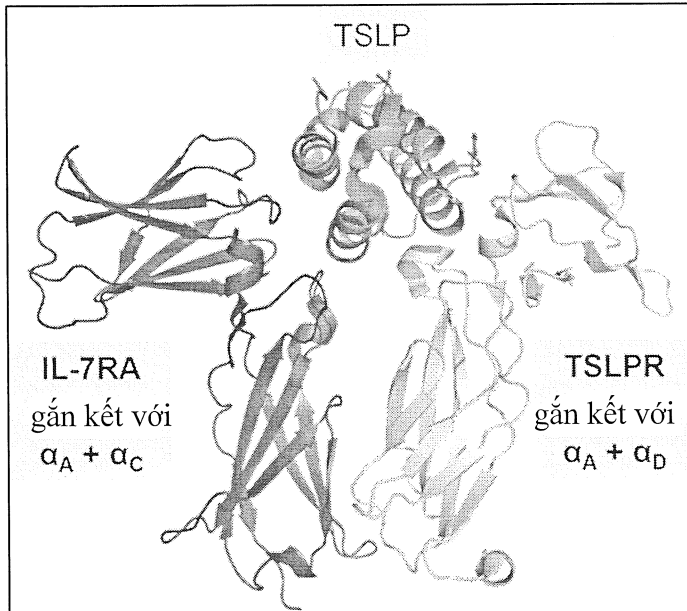


Fig. 11B

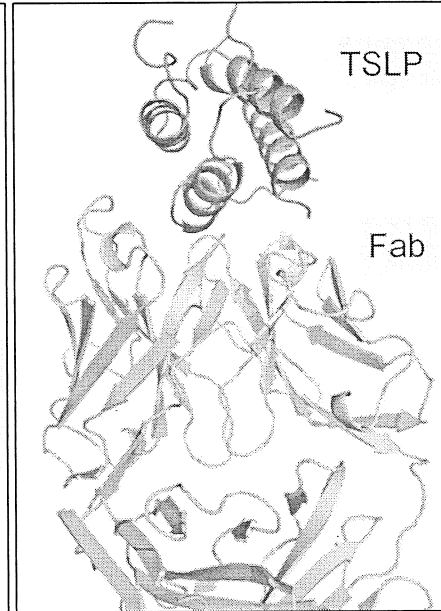


Fig. 11C

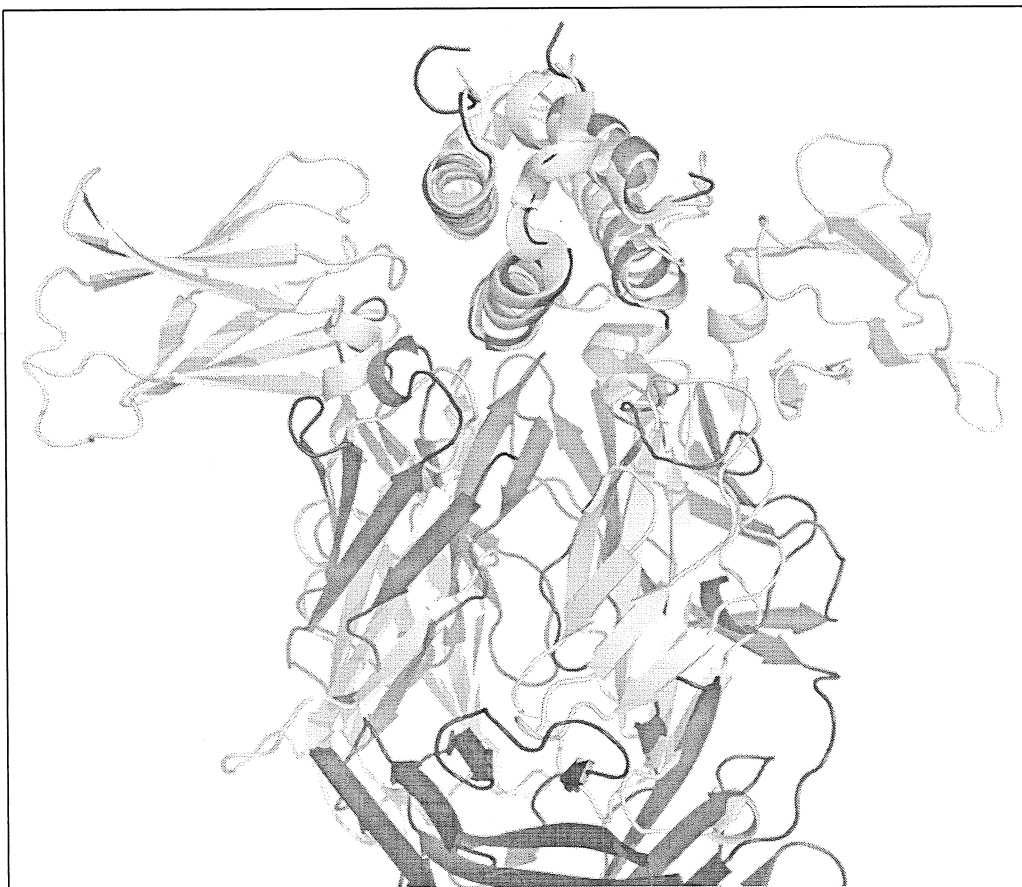
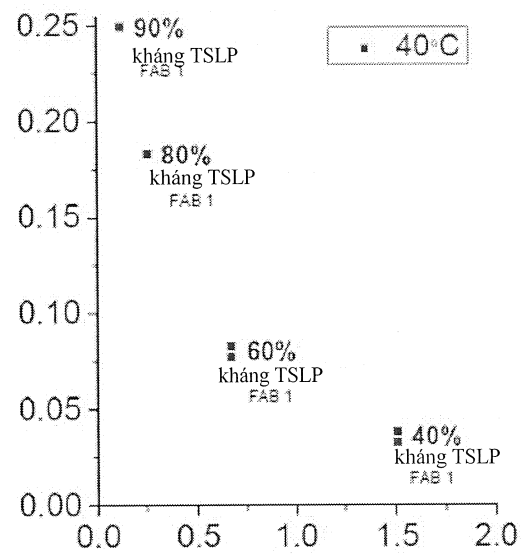


Fig. 12



Danh sách trình tự

<110> NOVARTIS AG

<120> PHÂN TỬ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI LYMPHOPOIETIN MÔ ĐỆM TUYẾN ỨC (TSLP) CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ NÀY

<130> PAT057035-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 62/342,511

<151> 2016-05-27

<150> 62/216,050

<151> 2015-09-09

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 2

His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 3
 Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 4
 Asp Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 5
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 6
 Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 7

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

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

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

Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit"

<400> 8

gaggttcagc tgggtgaatc aggcggcgga ctgggttaagc ctggcggtag ccttagactt	60
agctgcgctg ctagtggctt caccttttagc gactactgga tgcactgggt tagacaggcc	120
cctggttaaag gcttggagtg ggtcggacac attaagtcta agaccgacgc cggcactacc	180
gactacgccg ctcccgtaa gggccgggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc	240

ctctaccttc aaatgaatag ccttaagacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga 300

gaaatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcaaggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360

<210> 9

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 9

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

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

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

Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 10

<211> 1350

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 10

gaggttcagc tgggtggaatc agggggcgga ctggttaagc ctggcggtag ccttagactt	60
agctgcgctg ctagtggctt cacctttagc gactactgga tgcactgggt tagacaggcc	120
cctggtaaag gcttggagtg ggtcggacac attaatcta agaccgacgc cggcactacc	180
gactacgccg ctcccgtaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc	240
ctctaccttc aaatgaatag ccttaagacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga	300
gaaatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcaaggca ccctcgtgac cgtgtctagc	360
gctagcacta agggcccaag tgtgtttccc ctggcccca gcagcaagtc tacttccggc	420
ggaactgctg ccctgggttg cctggtgaag gactacttcc ccgagccgt gacagtgtcc	480
tggaactctg gggctctgac ttccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc	540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgaca gtgccctcca gctctctggg aaccagacc	600
tatatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc	660
aagagctgcg acaagacca cacctgcccc ccctgcccag ctccagaact gctgggaggg	720
ccttccgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag caggaccccc	780
gaggtgacct gcgtggtggg ggacgtgtcc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac	900

```

agcacctaca ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa      960
gaatacaagt gcaaagtctc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gacaatcagc      1020
aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacaccc tgccccccag ccgggaggag      1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc cagcgatata      1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg      1200
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg      1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc      1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggaag      1350

```

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 11
 Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val His
 1 5 10

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 12
 Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 13
 Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr Val
 1 5 10

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 14
 Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr
 1 5

<210> 15
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 15
 Gly Asp Asn
 1

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 16
 Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr
 1 5

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 17
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15

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

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

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 18

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 18

agctacgagc tgactcagcc ccttagcggt agcgtggccc tgggtcaaac cgctagaatc 60

acctgtagcg gcgataatat cggtctataa tacgttcact ggtatcagca gaagcccggg 120

caagcccccg tgctcgtgat ctacggcgat aacgagcggc ctacggaat ccccgagcgg 180

tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc 240

gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga 300

ggcactaagc tgaccgtgct g 321

<210> 19

<211> 213

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 19

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

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

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

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
 65 70 75 80

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
 115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
 130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
 145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
 180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
 195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 20
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 20
 agctacgagc tgactcagcc ccttagcggt agcgtggccc tgggtcaaac cgctagaatc 60
 acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgttcact ggtatcagca gaagcccggc 120
 caagcccccg tgctcgtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg 180
 tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc 240
 gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga 300
 ggactaaagc tgaccgtgct ggggtcaacct aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360
 cccagcagcg aggagctgca ggccaacaag gccaccctgg tgtgcctgat cagcgacttc 420
 taccagggcg ccgtgaccgt ggcttgaag gccgacagca gcccgtgaa ggccggcggtg 480
 gagaccacca ccccgagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540
 ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600
 agcaccgtgg aaaagaccgt ggccccaacc gagtgcagc 639

<210> 21
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 21
 gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctgggtcaagc ctggcggtag cctgagactg 60
 agctgcgctg ctagtggctt cacctttagc gactactgga tgactgggt cagacaggcc 120
 cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacac attaagtcta agaccgacgc cggcactacc 180
 gactacgccg ctctgtgaa gggccgggtc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga 300
 gagatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcagggca ccctggtcac cgtgtctagc 360

<210> 22

<211> 223
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

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

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

<210> 23
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 23
 gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctgggtcaagc ctggcggttag cctgagactg 60
 agctgcgctg ctagtggctt caccttttagc gactactgga tgactggtt cagacaggcc 120
 cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacac attaatgcta agaccgacgc cggcactacc 180
 gactacgccg ctctgtgaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgttacta ctgcgctaga 300
 gagatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcagggca ccctgggtcac cgtgtctagc 360
 gctagcacta agggcccctc cgtgttcctt ctggcccctt ccagcaagtc tacctctggc 420
 ggcaccgctg ctctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtgtcc 480
 tggaactctg gcgccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtcctcc 540
 ggctgtact ccctgtcctc cgtgggtgaca gtgccttcc ccagcctggg caccagacc 600
 tatactctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagcct 660
 aagtcattgc 669

<210> 24
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 24
 agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtc agcgtggccc tgggtcagac cgctagaatc 60
 acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgtgcact ggtatcagca gaagcccggc 120

caggcccccg tgctggtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg 180
 ttttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc 240
 gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga 300
 ggcactaagc tgaccgtgct g 321

<210> 25

<211> 213

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 25

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

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

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

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
 65 70 75 80

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
 115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
 130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
 145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
 180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
 195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 26
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 26
 agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtc agcgtggccc tgggtcagac cgctagaatc 60
 acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgtgcact ggtatcagca gaagcccggc 120
 caggcccccg tgctgggtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg 180
 tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc 240
 gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga 300
 ggactaagc tgaccgtgct gggtcagcct aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360
 cccagcagcg aggagctgca ggccaacaag gccaccctgg tgtgcctgat cagcgacttc 420
 taccagcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccgacagca gcccgtgaa ggccggcgtg 480
 gagaccacca ccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540
 ctgacccccg agcagtgga gagccacagg tctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600
 agcaccgtgg aaaagaccgt ggccccaacc gagtgcagc 639

<210> 27
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys
1 5 10 15

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr
20 25 30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser
35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn
50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln
65 70 75 80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu
85 90 95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
100 105 110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg
115 120 125

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
130 135 140

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
145 150 155

<210> 28

<211> 2629

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 28

gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa 60

taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggcccct 120

aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtgggaag agtttagtgt gaaactgggg 180

tgggaattggg tgtccacgta tgttcccttt tgccttacta tatgttctgt cagtttcttt 240

caggaaaatc ttcattctac aacttgtagg gctggtgtta acttacgact tcactaactg 300

tgactttgag aagattaaag cagcctatct cagtactatt tctaaagacc tgattacata 360

tatgagtggg accaaaagta ccgagttcaa caacaccgtc tttttagca atcgccaca	420
ttgccttact gaaatccaga gcctaacctt caatcccacc gccggctgcg cgtcgctcgc	480
caaagaaatg ttcgccatga aaactaaggc tgccttagct atctggtgcc caggctattc	540
ggaaactcag ataaatgcta ctcaggcaat gaagaagagg agaaaaagga aagtcacaac	600
caataaatgt ctggaacaag tgtcacaatt acaaggattg tggcgctcgt tcaatcagacc	660
tttactgaaa caacagtaaa ccatctttat tatggtcata ttccacagca ccaaaataaa	720
tcatctttat taagtagatg aaacattaac tctaactgtg acaaagaaga ccacaaatag	780
ttatctttta attacagaag agtttcttaa cttacttttg taagttttta ttgtgtaagt	840
ttataatgca ggggaagtac tactcctcaa atgttgaggg aagcttccat aacattgatg	900
actggcttca tggcagtaat tctcggctgt agttgcataa gcattgctca agaggaaaat	960
ccaaaagtgc agcaggagaa ctcttttccc tgaaaaagga aaaatattga actcaatgat	1020
agcacctaaa cttacattta aaagacagac attccttcta catgtaatga cacttcttgt	1080
gttaaactaa aaatttacia gagaagaaag tgaaagcaaa tggggtttca caaatagttg	1140
taaatatagt gaagcaatth gaaataatth tcaagcaaag tattgtgaaa gtattctaag	1200
ccaagtttta aatattatct aacagacaag agtggtatat acaagtagat cctgagaagt	1260
acctttgtta cagctactat aaatatacat ataaattata gaatctactt taatttatth	1320
tgtgaacact ttgaaaatg tacatgttcc tttgtaattg aactatata tttcttaata	1380
aaataattct caaatttgth tcttatgaat catctctcaa atctagttag acaatttgca	1440
cacatactth tctaaggac attatcttcc ttcaggthth tacctccact catccttaga	1500
gccactgac tgctcccctt tatacctgth ggccctgcct ataggagaga atatttgag	1560
ataggcagct tcaggatgca ttgcaatcat ctttttctta aattatgtca ctagtctth	1620
atthtttccc ctcttgaact ttcctcacac ctggaagaaa caaagtagga aaaagtgaac	1680
aggggatgtc aaatcgattc ttgaattccc gctgcaagct agagccgcag gcaccctctc	1740
actcaatttc cactcagaac cctataaaca ccagtgggaa gggcaacca ctgcacgtgg	1800
gaatgcactg atthttccta ggagtagaca tgttcctcta attactccct gagggttagt	1860
tggggctaaa ccatgacaga agtggggaag ttcaatgtcc ttaaatccat cttacttgcc	1920
aacaggtaag aggaagctta cattacatgt ccagtccaca tttaaagagc acttactgtg	1980
gaacaagcct tcagccaaac aatggggata gaaaagtagg taagactcag cttttgtcca	2040

gagaagctca gggatatagct gaataggcag tttcttttgt cctgaggaaa atcaggacat 2100
 gcctgctttc taaaaatctt cctctgaaga cctgacccaa gctcttaa at gctattgtaa 2160
 gagaaatttc tttgtctatt aactccattt tagtagggat tcaactgacta gattttactg 2220
 aactatgaaa ataaatacac ataatttttc acaaaatttt gggcccaatt cccctaaaag 2280
 aattgaggat tagggagaaa ggagacaact caaagtcac ccattaagt cagtttcttt 2340
 gaatcttctg ctttatcttt aaaaatttgt ataatttata tattttattc tatgtgttcc 2400
 atagatatct taatgtaaaa ttagtcattt aaattacact gtcaattaaa agtaatgggc 2460
 aagagattgc atcatactaa tttagtaaga acgttcccaa atgttgtaac aatgtggatc 2520
 atacatctct gggtttttta atgtattgag gctttcttgg tggactagta tagtatacgg 2580
 tcagttatgt caatgtttca tgggtcaataa aaaggaagtt gcaaattgt 2629

<210> 29
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
 1 5 10 15

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg
 20 25 30

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
 35 40 45

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
 50 55 60

<210> 30
 <211> 2411
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 accctcgcca cgcccctgct ccccgcggt tggttcttcc ttgctctact caaccctgac 60
 ctcttctctc tgactctcga cttgtgttcc ccgctcctcc ctgaccttcc tccctcccc 120
 tttcactcaa ttctcaccaa ctcttctctc ctctgggtgtt ttctcctttt ctcgtaaact 180
 ttgccgccta tgagcagcca cattgcctta ctgaaatcca gagcctaacc ttcaatccca 240

ccgccggctg cgcgctcgctc gccaaagaaa tgttcgccat gaaaactaag gctgccttag	300
ctatctgggtg cccaggctat tcggaaactc agataaatgc tactcaggca atgaagaaga	360
ggagaaaaag gaaagtcaca accaataaat gtctggaaca agtgtcacao ttacaaggat	420
tgtggcgtcg cttcaatcga cctttactga aacaacagta aaccatcttt attatgggtca	480
tatttcacag caccaaaata aatcatcttt attaataga tgaaacatta actctaactg	540
tgacaaagaa gaccacaaat agttatcttt taattacaga agagtttctt aacttacttt	600
tgtaatgttt tatttgttaa gtttataatg caggggaagt actactcctc aaatgttgag	660
ggaagcttcc ataacattga tgactggctt catggcagta attctcggct gtagttgcat	720
aagcattgct caagaggaaa atccaaaagt gcagcaggag aactcttttc cctgaaaaag	780
gaaaaatatt gaactcaatg atagcaccta aacttacatt taaaagacag acattccttc	840
tacatgtaat gacacttctt gtgttaaact aaaaatttac aagagaagaa agtgaaagca	900
aatgggggtt cacaaatagt tgtaaataata gtgaagcaat ttgaaataat tttcaagcaa	960
agtattgtga aagtattcta agccaagttt taaatattat ctaacagaca agagtgggtat	1020
atacaagtag atcctgagaa gtacctttgt tacagctact ataaatatac atataaatta	1080
tagaatctac tttaatattat tttgtgaaca cttttgaaaa tgtacatgtt cctttgtaat	1140
tgacactata tatttcttaa taaaataatt ctcaaatttg tttcttatga atcatctctc	1200
aaatctagtt agacaatttg cacacatact tttctaaggg acattatctt ccttcagggt	1260
tttacctcca ctcatcctta gagcccactg actgctcccc tttataacctg ttggccctgc	1320
ctataggaga gaatatttgg agataggcag cttcaggatg cattgcaatc atccttttct	1380
taaattatgt cactagtctt ttattttttc ccctcttgaa ctttcctcac acctggaaga	1440
aacaaagtag gaaaaagtga acaggggatg tcaaatcgat tcttgaattc ccgctgcaag	1500
ctagagccgc aggcaccctc tactcaatt tccactcaga accctataaa caccagtggg	1560
aagggcaacc cactgcacgt gggaatgcac tgatttttcc taggagtaga catgttcctc	1620
taattactcc ctgaggggta gttggggcta aaccatgaca gaagtgggga agttcaatgt	1680
ccttaaatac atcttacttg ccaacaggta agaggaagct tacattacat gtccagtcca	1740
catttaaaga gcacttactg tggaacaagc cttcagccaa acaatgggga tagaaaagta	1800
ggtaagactc agcctttgtc cagagaagct cagggtatag ctgaataggc agtttctttt	1860
gtcctgagga aatcaggac atgcctgctt tctaaaaatc ttcctctgaa gacctgacct	1920
aagctcttaa atgctattgt aagagaaatt tctttgtcta ttaactccat tttagtaggg	1980

```

attcactgac tagattttac tgaactatga aaataaatac acataatttt tcacaaaatt 2040
ttggggcccaa ttcccctaaa agaattgagg attagggaga aaggagacaa ctcaaagtca 2100
tcccattaag tgcagtttct ttgaatcttc tgctttatct ttaaaaattt gtataattta 2160
tatattttat tctatgtggt ccatagatat cttaatgtaa aattagtcac tttaaattaca 2220
ctgtcaatta aaagtaatgg gcaagagatt gcatcactact aatttagtaa gaacgttccc 2280
aaatgttgta acaatgtgga tcatacatct ctgggtttttt aaatgtattg aggctttctt 2340
ggtggtactag tatagtatac ggtcagttat gtcaatgttt catgggtcaat aaaaaggaag 2400
ttgcaaattg t 2411

```

<210> 31

<211> 131

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 31

```

Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Glu Ala Asp Tyr Leu
1           5           10           15

```

```

Arg Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser
          20           25           30

```

```

Thr Asp Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu
35           40           45

```

```

Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Pro Arg Cys Ala Ser
50           55           60

```

```

Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Arg Lys Thr Lys Ala Thr Leu Ala Leu
65           70           75           80

```

```

Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met
85           90           95

```

```

Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln
100           105           110

```

```

Val Ser Gln Leu Leu Gly Leu Trp Arg Arg Phe Ile Arg Thr Leu Leu
115           120           125

```

Lys Lys Gln

130

<210> 32

<211> 393

<212> ADN

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 32

```

tacgacttca ccaactgcga cttcgagaag atcgaggccg actacctgag aaccatcagc      60
aaggacctga tcacctacat gagcggcacc aagagcaccg acttcaacaa caccgtgtcc      120
tgcagcaaca gacccactg cctgaccgag atccagagcc tgaccttcaa cccaccccc      180
agatgtgcca gcctggccaa agagatgttc gccagaaaga ccaaggccac cctggccctg      240
tggtgtcccg gctacagcga gacacagatc aacgccacac aggccatgaa gaagcggcgg      300
aagcggaaaag tgaccaccaa caagtgcctg gaacagggtgt cacagctgct ggggctgtgg      360
cggcggttca tccggaccct gctgaagaag cag                                     393

```

<210> 33

<211> 140

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 33

```

Met Val Leu Leu Arg Ser Leu Phe Ile Leu Gln Val Leu Val Arg Met
1           5           10          15

Gly Leu Thr Tyr Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe Thr Ser Ile Thr Lys
20          25          30

Ile Tyr Cys Asn Ile Ile Phe His Asp Leu Thr Gly Asp Leu Lys Gly
35          40          45

Ala Lys Phe Glu Gln Ile Glu Asp Cys Glu Ser Lys Pro Ala Cys Leu
50          55          60

Leu Lys Ile Glu Tyr Tyr Thr Leu Asn Pro Ile Pro Gly Cys Pro Ser
65          70          75          80

Leu Pro Asp Lys Thr Phe Ala Arg Arg Thr Arg Glu Ala Leu Asn Asp
85          90          95

His Cys Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Glu Arg Asn Asp Gly Thr Gln Glu
100         105         110

```

Met Ala Gln Glu Val Gln Asn Ile Cys Leu Asn Gln Thr Ser Gln Ile
 115 120 125

Leu Arg Leu Trp Tyr Ser Phe Met Gln Ser Pro Glu
 130 135 140

<210> 34
 <211> 1143
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 34
 cacgttcagg cgacagcatg gttcttctca ggagcctctt catcctgcaa gtactagtag 60
 ggatggggct aacttacaac ttttctaact gcaacttcac gtcaattacg aaaatatatt 120
 gtaacataat ttttcatgac ctgactggag atttgaaagg ggctaagttc gagcaaatcg 180
 aggactgtga gagcaagcca gcttgtctcc tgaaaatcga gtactatact ctcaatccta 240
 tccctggctg cccttcactc cccgacaaaa catttgcccg gagaacaaga gaagccctca 300
 atgaccactg cccaggctac cctgaaactg agagaaatga cggtagctcag gaaatggcac 360
 aagaagtcca aaacatctgc ctgaatcaaa cctcaciaat tctaagattg tggatttcct 420
 tcatgcaatc tccagaataa aattagcttt cagcttctgc tatgaaaatc tctatcttgg 480
 ttttagtgga cagaatacta aggggtgtgac acttagagga ccaactggtgt ttattcttta 540
 attacagaag ggattcttaa cttatTTTTT ggcataatcg ttttttcagt ataggtgctt 600
 taaatgggaa atgagcaata gaccgttaat ggaaatatct gtactgttaa tgaccagctt 660
 ctgagaagtc tttctcacct cccctgcaca caccttactc tagggcaaac ctaactgtag 720
 taggaagaga attgaaagta gaaaaaaaa attaaaacca atgacagcat ctaaaccctg 780
 tttaaaaggc aaggattttt ctacctgtaa tgattcttct aacattccta tgctaagatt 840
 ttaccaaaga agaaaatgac agttcgggca gtcactgcca tgatgaggtg gtctgaaaga 900
 agattgtgga atctgggaga aactgctgag atcatattgc aaatccagct gtcaaagggt 960
 tcagacccag gacagtacaa ttctgtgagca gatctcaaga gccttgaca tctacgagat 1020
 atatatttaa agttgtagat aatgaatttc taatttattt tgtgagcact tttggaaata 1080
 tacatgctac tttgtaatga atacatttct gaataaagta attctcaagt ttgaaaaaaaa 1140
 aaa 1143

<210> 35

<211> 1146

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 35

```

actcttgcca ggcacctccc tcctgtgggt tgattccggt ttctcttct caactgactc      60
tggattctga taccagacac ctctctgggt tctttccctc ctatcccat ccccttcctt      120
gtccctttca ttcaattttt aatatctggc gggttttttt ttttttttct ctctctctga      180
actgtgccgc ttgtgagcag ccagcttgct tcctgaaaat cgagtactat actctcaatc      240
ctatccctgg ctgcccttca ctccccgaca aaacatttgc ccggagaaca agagaagccc      300
tcaatgacca ctgcccaggc taccctgaaa ctgagagaaa tgacgggtact caggaaatgg      360
cacaagaagt ccaaaacatc tgcctgaatc aaacctcaca aattctaaga ttgtggtatt      420
ccttcatgca atctccagaa taaaattagc tttcagcttc tgctatgaaa atctctatct      480
tggtttttagt ggacagaata ctaaggggtgt gacacttaga ggaccactgg tgtttattct      540
ttaattacag aagggattct taacttattt tttggcatat cgcttttttc agtatagggtg      600
ctttaaatgg gaaatgagca atagaccgtt aatggaaata tctgtactgt taatgaccag      660
cttctgagaa gtcttttctc cctccccctgc acacacctta ctctagggca aacctactg      720
tagtaggaag agaattgaaa gtagaaaaaa aaaattaaaa ccaatgacag catctaaacc      780
ctgttttaaaa ggcaaggatt tttctacctg taatgattct tctaacattc ctatgctaag      840
attttaccaa agaagaaaat gacagttcgg gcagtcactg ccatgatgag gtggtctgaa      900
agaagattgt ggaatctggg agaaactgct gagatcatat tgcaaatcca gctgtcaaag      960
ggttcagacc caggacagta caattcgtga gcagatctca agagccttgc acatctacga     1020
gatatatatt taaagttgta gataatgaat ttctaattta ttttgtgagc acttttggaa     1080
atatacatgc tactttgtaa tgaatacatt tctgaataaa gtaattctca agtttgaaaa     1140
aaaaaa                                           1146

```

<210> 36

<211> 136

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 36

```

Met Val Leu Phe Arg Tyr Leu Phe Ile Leu Gln Val Val Arg Leu Ala
1           5           10          15

```

```

Leu Thr Tyr Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe Glu Met Ile Leu Arg Ile

```

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

<210> 37
 <211> 1125
 <212> ADN
 <213> Rattus norvegicus

<400> 37
 tcaggcaaca gcatggttct tttcaggtac ctctttatcc tgcaagtggc acggctggca 60
 ctaacttaca acttttctaa ctgtaacttc gagatgattt tgagaatata tcatgcaaca 120
 atttttcgtg acctgcttaa agatttgaat gggatcttgt tcgaccaa at cgaggactgt 180
 gacagcagga cagcttgtct cctgaaaatc gaccaccata cttcaatcc tgtccctggc 240
 tgcccgtcac tccccgagaa agcgttcgct ttgaaaacga aagcggccct cattaactac 300
 tgcccaggct actctgaaac tgagagaaat ggtactctgg aaatgacacg agaaatcaga 360
 aacatctgcc tgaatcaaac ctcacaaatt ctaggattgt ggctttcctg cattcaatct 420
 tgaagaaaaa attagctttt ggattatatt atgaaaatat atatcttggt ttagtagat 480
 ataatactaa ggggtgtgaca cttaaaagaa cactaatgtt tattctttaa ttatagaagg 540
 gattcttaac ttatttttgg catatcggtg ttagtgtag gcgctttaaa tggaaaatga 600

```

gcattacccc tttaatggaa ataaccgtgc tgttaatgat tggcttcggc ttctgagcag      660
tctttctcac ctcacctgag acactttact ctagggcaaa cctaactgta gtaggaagaa      720
aatcaaaagt agaaaaacag ttgaaaccaa tgacaggatc tataactccat ttaaaaggca      780
agaatTTTTg tacctgtaat gattcttcta acattcctac gctaagattt tactaaagaa      840
gaaaataaca gcagaggaaa gtgttcaggc agtcactgcc atgatgaagc tgtcagaatc      900
tgagagctac tgctgcaact gatcgtgtag taaatccagc tgtaaagggg atcttaaccc      960
accacagtgg gatgcacagg cagatcccca agggcattgt gcagctgtga gatatatatt     1020
taaagttgta tataatgatt ttctaattta ttccgtgagc accttgaaa atatacatgt     1080
cgctgtgtaa caaatacact tctgaataaa gtaattctca agttc                       1125

```

<210> 38

<211> 149

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 38

```

Met Gly Ser Ser His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln
1              5              10              15

```

```

Gly Pro Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala
                20                25                30

```

```

Tyr Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr
          35              40              45

```

```

Lys Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His
          50              55              60

```

```

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

```

```

Ala Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu
          85              90              95

```

```

Ala Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln
          100             105             110

```

Ala Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu
 115 120 125

Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro
 130 135 140

Leu Leu Lys Gln Gln
 145

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> không xác định

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả không xác định: Điểm phân cắt bởi furin tiềm năng"

<400> 39

Arg Arg Lys Arg

1

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Đuôi 6xHis tổng hợp"

<400> 40

His His His His His His

1

5

<210> 41

<211> 131

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 41

Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu

1

5

10

15

Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser

20

25

30

Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu
35 40 45

Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser
50 55 60

Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile
65 70 75 80

Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met
85 90 95

Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln
100 105 110

Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu
115 120 125

Lys Gln Gln
130

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 42

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

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

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

Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 43

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 43

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

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

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

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
 65 70 75 80

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105