



(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)



1-0029557

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/395

(13) B

(21) 1-2016-00962

(22) 13/08/2014

(86) PCT/EP2014/002234 13/08/2014

(87) WO 2015/022077 A1 19/02/2015

(30) EP13004094.2 16/08/2013 EP

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/05/2016 338A

(73) SUPPREMOL GMBH (DE)

Am Klopferspitz 19a, 82152 Martinsried/München, Germany

(72) SONDERMANN, Peter (DE); POHL, Thomas (DE); TER MEER, Dominik (DE);
CARLE, Anna (DE); EHEHALT, Daniela (DE); RIETH, Nicole (DE).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D&N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG FC γ RIIB VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Fc γ RIIB mà, so với các kháng thể trong các giải pháp kỹ thuật đã biết, làm tăng đáng kể quá trình phosphoryl ITIM của Fc γ RIIB và do đó có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh tự miễn. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể, vector, tế bào chủ, dược phẩm chứa kháng thể và phương pháp sản xuất kháng thể.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcγRIIB mà, so với các kháng thể trong các giải pháp kỹ thuật đã biết, làm tăng đáng kể quá trình phosphoryl ITIM của FcγRIIB và do đó có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh tự miễn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể FcγRII, các thành viên thuộc siêu họ protein của gen globulin miễn dịch, là các glycoprotein liên kết màng toàn vẹn có chuỗi polypeptit 40kDa đơn nhất, gồm hai vùng globulin miễn dịch ngoại bào, một vùng xuyên màng và một vùng nội bào có chiều dài thay đổi. Các thụ thể FcγRII được biểu hiện ở nhiều loại tế bào tạo máu khác nhau và là các thụ thể Fc duy nhất có trên tiểu cầu và tế bào nhân không lồ của người (Cassel, McKenzie, 1993). Ba loại thụ thể FcγRII được biết ở người, FcγRIIA, FcγRIIB và FcγRIIC, tất cả các thụ thể này đều liên kết với IgG (ví dụ, IgG₁ có ái lực là $1-2 \times 10^6 M^{-1}$) hoặc các phức hợp miễn dịch (immune complexe-IC, ví dụ tác nhân gây bệnh được xử lý bằng opsonin nhờ IgG). FcγRIIA và FcγRIIB khác nhau chủ yếu là do sự khác nhau ở vùng nội bào, điều này cuối cùng dẫn đến các đáp ứng không đồng nhất về mặt chức năng khi gắn kết với thụ thể. Kích hoạt FcγRIIA dẫn đến hoạt hóa tế bào (ví dụ thực bào, bùng nổ hô hấp) và FcγRIIB khởi đầu các tín hiệu hô hấp dẫn đến ví dụ, ức chế sự hoạt hóa tế bào B. FcγRIIC có vùng ngoại bào giống với FcγRIIB và vùng nội bào giống với FcγRIIA, do đó truyền các tín hiệu hoạt hóa khi liên kết với IgG hoặc IC. FcγRIIB được biểu hiện trên tất cả các bạch cầu ngoại trừ tế bào T và tế bào NK và là thụ thể Fc ức chế duy nhất được biểu hiện trên tế bào B của người. Bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào tua, bạch cầu ưa bazơ và dưỡng bào biểu hiện đồng thời FcγRIIA hoạt hóa và thụ thể FcγRIIB ức chế và FcγRIIC được biểu hiện trên tế bào giết tự nhiên (tế bào NK) và cấu thành FcγR duy nhất trên loại tế bào này. Đã biết có hai đồng dạng đối với FcγRIIB mà khác nhau về chức năng sinh học của chúng. FcγRIIB-1 được biểu hiện chuyên biệt trên tế bào B, trong khi FcγRIIB-2, thụ thể này gây ra sự cảm ứng nội-/thực bào khi liên kết với IC, được tìm thấy trên tất cả tế bào biểu hiện FcγRIIB khác (Nimmerjahn, Ravetch, 2008).

Fc γ RIIB có mức độ tương đồng 93% ở vùng ngoại bào với Fc γ RIIA. Như đề cập trên đây, sự khác nhau chủ yếu giữa Fc γ RIIA và Fc γ RIIB được tìm thấy ở vùng nội bào. Trong khi Fc γ RIIA chứa ITAM (môtip hoạt hóa thụ thể miễn dịch dựa trên tyrosin), Fc γ RIIB chứa ITIM (môtip ức chế thụ thể miễn dịch dựa trên tyrosin).

Sự tạo cụm Fc γ RIIA thông qua liên kết của các IC dẫn đến sự tập trung đồng thời của môtip ITAM với các kinaza liên kết thụ thể tác động lên quá trình phosphoryl hóa của các gốc tyrosin trong môtip ITAM (trình tự liên ứng: Y-X₂-L/I-X₈-Y-X₂-L/I, Isakov, 1997) và sự tương tác sau đó với kinaza Syk, kháng thể này tác động lên sự hoạt hóa tế bào thông qua nhiều quá trình truyền tín hiệu xuôi chiều và các sự kiện hoạt hóa gen (Ghazizadeh et al., 1994). Globulin miễn dịch liên kết với Fc γ RIIA hoạt hóa gây ra đáp ứng tiền viêm, đáp ứng này sau đó dẫn đến sự loại bỏ tác nhân gây bệnh nhưng trong trường hợp tự kháng thể cũng có thể dẫn đến sự phá hủy các mô khỏe mạnh chết dần ở bệnh tự miễn bệnh lý. Do đó, việc kiểm soát chặt chẽ tính đặc hiệu của kháng thể và hệ phản hồi âm tính là cần thiết để phá vỡ tổn thương bất thường cho cơ thể bởi hệ miễn dịch. Thụ thể Fc γ RIIB ức chế là một phần của hệ phản hồi âm tính này.

Fc γ RIIB được đặc trưng bởi sự có mặt của môtip ITIM (trình tự liên ứng: V/I-X-Y-X₂-V/L, Isakov, 1997) trong vùng nội bào, môtip này được phosphoryl hóa nhờ kinaza Lyn khi liên kết với tổ hợp Ig hoặc các IC và sự đồng gắn kết với các thụ thể Fc γ hoạt hóa mang ITAM. ITIM được phosphoryl hóa thu hút vùng SH2 của inositol polyphosphat 5'-phosphatase (SHIP), enzym này lại thủy phân chất truyền tin phosphoinositol được giải phóng là kết quả của sự hoạt hóa tyrosin kinaza qua trung gian Fc γ R chứa ITAM, nhờ đó ngăn chặn dòng vào của Ca²⁺ nội bào. Liên kết ngang của Fc γ RIIB ức chế đáp ứng hoạt hóa đối với sự liên kết của Fc γ R, điều này lại ức chế quá trình hoạt hóa tế bào B, tăng sinh và tiết kháng thể.

Fc γ RIIB có hai hoạt tính ức chế. Như đề cập trên đây, một trong các hoạt tính này phụ thuộc vào môtip ITIM và xuất hiện khi Fc γ RIIB được gắn vào thụ thể chứa ITIM (ví dụ Fc γ RIIA) dẫn đến sự ức chế quá trình di chuyển của canxi được kích hoạt nhờ ITAM và quá trình tăng sinh tế bào. Điều này có nghĩa là các quá trình phụ thuộc canxi như quá trình giải phóng hạt, quá trình thực bào, ADCC, quá trình giải phóng xytokin và quá trình hoạt hóa tiền viêm, và ngoài ra là quá trình tăng sinh tế bào B cũng bị phong bế bởi Fc γ RIIB. Hoạt tính ức chế thứ hai của Fc γ RIIB liên quan đến sự kết tụ cùng loại của thụ

thể trên tế bào B (tạo cụm FcγRIIB). Sự kết tụ cùng loại phát tín hiệu đi trước của sự chết tế bào theo chương trình vào tế bào chết mà có thể bị phong bế bởi sự gắn kết của FcγRIIB lên thụ thể tế bào B (BCR). Sự liên kết với kháng nguyên đa trị sau quá trình truyền tín hiệu của BCR được đặc trưng bởi quá trình phosphoryl hóa BCR kết cụm nhờ Lyn, kinaza thuộc họ Src. Quá trình phosphoryl hóa có hiệu quả nhờ Lyn xảy ra đồng thời với sự liên kết của BCR với sphingolipit- và tiểu vùng của màng giàu cholesterol được gọi là mảng lipid. Mảng lipid không tan này đóng vai trò quan trọng trong việc tạo xinap miễn dịch. Nhận thấy rằng sự tương tác của BCR với kháng nguyên trên APC (tế bào trình diện kháng nguyên) dẫn đến sự tạo xinap miễn dịch này ở bề mặt chung của tế bào B được gắn kết và APC. Sự đồng gắn kết của FcγRIIB với BCR làm mất ổn định mối liên kết của BCR với mảng lipid, sau đó phong bế sự hình thành xinap miễn dịch của tế bào B. Sự ức chế quá trình truyền tín hiệu BCR của FcγRIIB bao gồm quá trình phosphoryl hóa các gốc tyrosin trong ITIM của vùng nội bào của thụ thể nhờ kinaza Lyn và sự huy động sau đó của inositol phosphatase SHIP (Daeron *et al.*, 1995, Ravetch and Bolland, 2001).

Được chấp nhận bởi hội đồng khoa học rằng FcγRIIB có thể được xem như điểm kiểm tra cuối trong quá trình phát triển của tế bào B ngoại vi và nó cũng điều hòa trực tiếp sự sống của tế bào trong huyết tương. Do đó FcγRIIB được xem là đích có giá trị để điều trị các rối loạn liên quan đến tế bào B và đặc biệt là các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào B.

Các nghiên cứu ở chuột và người đã làm sáng tỏ ảnh hưởng của FcγRIIB lên hoạt tính của tế bào B và sự dung nạp thể dịch, trong đó sự biểu hiện giảm hoặc thiếu của FcγRIIB dẫn đến sự phát triển hoặc tình trạng nặng lên của bệnh tự miễn được biểu hiện. Thực vậy, FcγRIIB đóng vai trò then chốt trong sự phát triển và diễn tiến của bệnh tự miễn như giảm tiểu cầu miễn dịch tự phát, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm khớp dạng thấp (RA), pemphigut bong nước, pemphigut thông thường và các dạng pemphigut khác, đa xơ cứng do tế bào B, và bệnh tự miễn khác được đặc trưng bởi sự phát triển của phức hợp miễn dịch gây bệnh. Trong phản ứng miễn dịch ở cá thể khỏe mạnh, tác nhân gây bệnh xâm nhập vào vòng tuần hoàn máu được xử lý bằng opsonin nhờ kháng thể (globulin miễn dịch, Ig) trực tiếp kháng lại các epitop của sinh vật gây bệnh, điều này dẫn đến sự tạo phức hợp miễn dịch. Các phức hợp miễn dịch này sau đó được thực bào bằng các tế bào đặc hiệu của hệ miễn dịch (ví dụ đại thực bào, bạch cầu trung tính, thực

bào) dẫn đến việc làm sạch các sinh vật gây bệnh từ vòng tuần hoàn máu. Cũng biết rằng, Fc γ RIIB đóng vai trò then chốt trong sự dung nạp ngoại vi bởi vì những con chuột được làm bất hoạt Fc γ RIIB phát triển bệnh tự miễn một cách tự phát. Sự thiếu hụt Fc γ RIIB dẫn đến khả năng dễ gây ra bệnh tự miễn (Bolland and Ravetch, 2000).

Ở người bệnh mắc bệnh tự miễn, sự biểu hiện của Fc γ RIIB trên tế bào B thường ở mức độ nhẹ hoặc giảm so với người khỏe mạnh. Trong khi đó, ví dụ tế bào B nguyên thể thể hiện sự biểu hiện Fc γ RIIB bình thường, tế bào B ghi nhớ và tế bào non trong huyết tương từ người bệnh RA thể hiện sự biểu hiện giảm của thụ thể này (Catalán, 2010). Xiang và cộng sự cũng có thể chứng tỏ rằng liên kết ngang của Fc γ RIIB lên tế bào non trong huyết tương từ người cho khỏe mạnh thông qua kháng thể kháng Fc γ RIIB 2.4G2 kết cặp trên bề mặt dẫn đến sự chết tế bào theo chương trình (Xiang et al., 2007).

Dựa trên vai trò hiển nhiên của Fc γ RIIB trong bệnh tự miễn như được mô tả trên đây, các kháng thể kháng thụ thể đã được phát triển để có thể điều trị hoặc chẩn đoán cho người bệnh. WO 2009/083009 bộc lộ các kháng thể kháng cả hai đồng dạng của Fc γ RIIB, trong khi WO 2004/016750 bộc lộ các kháng thể liên kết đặc hiệu với vùng ngoại bào của Fc γ RIIB được biểu hiện nội sinh trên tế bào người có ái lực lớn hơn ít nhất 10 lần mà các kháng thể này liên kết với Fc γ RIIA được biểu hiện trên tế bào người, lưu ý rằng vùng ngoại bào của Fc γ RIIB và Fc γ RIIA có mức độ tương đồng cao. EP 1 709 073 bộc lộ các kháng thể đặc hiệu cao đối với Fc γ RIIB và việc sử dụng chúng để chẩn đoán và điều trị bệnh tự miễn, nhiễm trùng, khối u và các tình trạng bệnh lý bất thường khác.

Để đạt được mục đích này, có kỳ vọng lớn là sử dụng các kháng thể có tính đặc hiệu và ái lực cao đối với thụ thể. Đặc biệt là tính đặc hiệu cao làm giảm nguy cơ phản ứng chéo của kháng thể và do đó làm giảm các tác dụng phụ bất lợi và ái lực cao làm tăng hiệu lực và hiệu quả của việc sử dụng nó. Cũng có thể mong muốn rằng các kháng thể này không phong bế, tức là liên kết của chúng với thụ thể Fc thông qua vùng biến đổi của chúng không gây ảnh hưởng đến liên kết của phức hợp miễn dịch (IC) hoặc IgG kết tụ lên với tế bào. Ngoài ra, đặc tính có lợi có thể mong muốn cao của kháng thể kháng Fc γ RIIB là nó tác động đến cơ chế kết hợp ức chế Fc γ RIIB để kiểm soát sự hoạt hóa tế bào B. Cụ thể là, biết rằng phần trong tế bào của Fc γ RIIB chứa ITIM và sự truyền tín hiệu qua các thụ thể chứa ITIM thường là ức chế trong quá trình điều hòa của hệ miễn dịch. Như được mô tả trên đây, Fc γ RIIB được biết là có chức năng điều hòa ức chế khi

được liên kết bởi các phần Fc của phân tử IgG. Do đó, có thể mong muốn lợi dụng chức năng điều hòa ức chế này của Fc γ RIIB nhằm kiểm soát tế bào B có liên quan đến bệnh tự miễn, không kể các bệnh khác.

Nhìn chung, mặc dù giải pháp kỹ thuật đã biết đã bộc lộ một số kháng thể kháng Fc γ RIIB có tính đặc hiệu và ái lực khác nhau, vẫn có nhu cầu đối với kháng thể kháng Fc γ RIIB được cải thiện để sử dụng trong điều trị, ngăn ngừa và chẩn đoán bệnh tự miễn ở đối tượng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đáp ứng nhu cầu này bằng cách đề xuất các kháng thể được mô tả dưới đây, được mô tả đặc trưng trong yêu cầu bảo hộ và được minh họa bằng các ví dụ và hình vẽ đi kèm.

Bất ngờ nhất là, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng các kháng thể được đề xuất bởi sáng chế làm tăng đáng kể quá trình phosphoryl hóa ITIM. So với các kháng thể trong các giải pháp kỹ thuật đã biết mà cũng liên kết đặc hiệu với Fc γ RIIB, bất ngờ là các kháng thể theo sáng chế thể hiện tác động mạnh hơn nhiều lên quá trình phosphoryl hóa ITIM mà không thể dự đoán được. Tác động mạnh hơn nhiều này là có lợi. Cụ thể là, môi liên kết hoạt hóa-ức chế, sự kết cặp của tín hiệu dương với vòng ức chế, kiểm soát cường độ và thời gian của nhiều quá trình sinh học. Trong tế bào lympho B, việc nhận diện kháng nguyên bởi thụ thể tế bào B (B cell receptor-BCR) kiểu dòng vô tính bao gồm tín hiệu mà có thể chi phối quá trình mở rộng dòng, biệt hóa, giải phóng xytokin, và, cuối cùng là sản sinh Ig. Sự hoạt hóa không kiểm soát được được ngăn chặn bằng cách làm tiêu hết các tác nhân hoạt hóa cũng như bằng cách khởi động vòng phản hồi âm liên quan đến sự tham gia của thụ thể ức chế Fc γ (Fc γ receptor-Fc γ R), Fc γ RIIB (CD32B). Cơ chế sau được kích hoạt khi BCR nhận diện kháng nguyên phức hợp miễn dịch, dẫn đến sự tham gia đồng thời của CD32B nhờ vùng Fc của IgG liên kết phức, do đó ngăn chặn sự biểu hiện của dòng tế bào B có cùng đặc tính với đặc tính được nhận diện bởi IgG tan được. Do đó, chiến lược điều hòa âm tính thành công cần phải tạo ra cơ sở phân tử cho vòng truyền tín hiệu âm tính.

Các kháng thể được đề xuất bởi sáng chế thể hiện tác động mạnh đáng kể lên quá trình phosphoryl hóa ITIM của CD32B và, do đó, chúng được mong đợi là có tác động mạnh lên vòng truyền tín hiệu âm tính được kích hoạt bởi quá trình phosphoryl hóa ITIM

của CD32B, vòng này lại kiểm soát tế bào B mà liên quan đến các bệnh tự miễn, chưa kể các bệnh khác.

Cụ thể là, kháng thể theo sáng chế tốt hơn là làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIB trong tế bào Daudi so với tế bào Daudi không được xử lý bằng kháng thể này. Tốt hơn là làm tăng 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 lần. Từ các kháng thể theo giải pháp đã biết mà liên kết với CD32B, đặc tính lợi thế của các kháng thể theo sáng chế có thể là không dự đoán được hay biết trước được, chưa nói đến việc có sự kỳ vọng hợp lý là tạo ra chúng thành công, cụ thể là CDR hoặc chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ biến đổi như được xác định đặc trưng ở đây. Ngoài đặc tính được cải thiện này của các kháng thể theo sáng chế, các kháng thể được mô tả ở đây cũng có tính đặc hiệu cao đối với FcγRIIB của người và/hoặc không phong bế, tức là, sự liên kết của chúng với thụ thể Fc thông qua (các) vùng biến đổi của chúng không gây ảnh hưởng đến liên kết của các phức hợp miễn dịch (phức hợp miễn dịch-IC) hoặc IgG kết tụ với tế bào.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcγRIIB, tốt hơn là typ IgG, bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng của nó H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 29, 30 và 31 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của nó L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 32, 33 và 34. Kháng thể này làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIB trong tế bào Daudi từ 4 đến 10 lần so với tế bào Daudi không được xử lý bằng kháng thể này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1: Phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt 8A6 được làm tương thích với người theo SEQ. ID. No. 3 và 4 ở dạng kiểu đại hoặc dạng N297A, ch8A6_N297A (theo SEQ. ID. NO. 14 và 15 và chGB3_N297A.

FIG.2: Trình tự của hu8A6_wt và hu8A6_N297A thể hiện vị trí thay đổi axit amin N thành A ở dạng N297A.

FIG.3: Đặc tính không phong bế của ch8A6_N297A. Tế bào Raji được ủ với lượng không đổi IgG kết tụ của người và lượng thay đổi của ch8A6_N297A, chGB3_N297A hoặc kháng thể phong bế 2B6 hoặc R&D Ab. Các kháng thể theo sáng chế là không phong bế.

FIG.4: Liên kết từ 15μg/ml đến 0,005μg/ml của kháng thể Protein A được tinh sạch (hu8A6_VL + hu8A6_VH và ch8A6_N297A) với FcγRIIB nguyên thể được biểu hiện

trên tế bào Raji. Các biến thể 8A6 được làm tương thích với người liên kết với ái lực cao với Fc γ RIIB được biểu hiện trên tế bào Raji.

FIG.5: Liên kết của 15 μ g/ml kháng thể (hu8A6_VH + hu8A6_VL và ch8A6_N297A) với Fc γ RIIA nguyên thể được biểu hiện trên tế bào K562. Các kháng thể theo sáng chế không liên kết với Fc γ RIIA trên K-562.

FIG.6a: Quá trình phosphoryl hóa ITIM được làm tăng bởi 8A6 thể khảm (ch8A6_N297A) trong PBMC từ người hiến khỏe mạnh. PBMC từ người hiến khỏe mạnh được phân lập bằng quy trình tách Ficoll và sau đó để không xử lý hoặc được ủ trong 25 phút với hỗn hợp kháng thể gồm kháng IgM (kháng người, chuột) và kháng IgG của chuột (thỏ). Sau đó tế bào được xử lý 20 phút với 5 μ g/mL ch8A6_N297A hoặc dung dịch đệm làm đối chứng (không có kháng thể). Tế bào được thu gom sau khi ủ và ly giải theo quy trình chuẩn. Dịch ly giải được đưa vào phân tích WB. β -Actin = đối chứng tải.

FIG.6b: Thử nghiệm đối chứng cho quá trình phosphoryl hóa ITIM. Tế bào Daudi được để không xử lý hoặc được xử lý trong 25 phút với kháng thể isotyp đối chứng, kháng thể đa dòng kháng IgM (đa dòng kháng hIgM), đơn dòng kháng IgM của người (kháng hIgM), kháng hIgM + 5 μ g/mL ch8A6_N297A, kháng IgG của chuột từ thỏ (α -IgG của chuột), α -IgG của chuột+5 μ g/mL ch8A6_N297A, hỗn hợp gồm kháng hIgM và α -IgG của chuột (hỗn hợp Ab) hoặc hỗn hợp Ab + 5 μ g/mL ch8A6_N297A). β -Actin = đối chứng tải.

FIG.6c: Kháng thể theo sáng chế làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM khi có hoặc không có mặt liên kết ngang/liên kết của BCR và Fc gamma RIIB trong PBMC nguyên thủy.

FIG.7: So sánh ch8A6_N297A với kháng thể trong giải pháp đã biết (chGB3_N297A). Tế bào Daudi người được ủ trong 25 phút với hỗn hợp kháng thể gồm kháng IgM (kháng người, chuột) và kháng IgG của chuột (thỏ) hoặc để không xử lý. Sau đó tế bào hoặc được xử lý 20 phút với lượng thay đổi của chGB3_N297A hoặc ch8A6_N297A hoặc dung dịch đệm làm đối chứng (w/o). Tế bào được thu gom sau khi ủ và ly giải theo quy trình chuẩn. Dịch ly giải được đưa vào phân tích WB. β -Actin = đối chứng tải.

FIG.8: So sánh tác động của biến thể được làm tương thích với người hu8A6_N297A và ch8A6_N297A và chGB3_N297A lên quá trình phosphoryl hóa ITIM

trong PBMC nguyên thủy. Sau khi liên kết ngang của BCR và Fc γ RIIB nhờ hỗn hợp kháng thể này, các kháng thể khác nhau được bổ sung ở nồng độ 5 μ g/ml và phân tích thấm tách Western đối với quá trình phosphoryl hóa ITIM được thực hiện. β -Actin = đối chứng tải.

FIG.9: Quá trình kết tủa miễn dịch đồng thời của SHIP-1 được phosphoryl hóa với ITIM của Fc γ RIIB. Sau khi kích thích trong tế bào Daudi bằng hỗn hợp kháng thể này và hoặc ch8A6_N297A, kháng thể phong bế kháng Fc γ RIIB 2B6 hoặc chGB3_N297A (5 μ g/ml), Fc γ RIIB được kết tủa từ dịch ly giải tế bào và phân tích thấm tách Western được thực hiện đối với phosphatase SHIP-1. Kháng CD32 sử dụng kháng thể bản kháng CD32 (AF1330) = đối chứng tải.

FIG.10: So sánh các biến thể 8A6 được làm tương thích với người (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/ VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7) với ch8A6_N297A. Tế bào Daudi được ủ trong 25 phút với dung dịch đệm (không được xử lý) hoặc hỗn hợp (hỗn hợp kháng thể) chứa kháng IgM (kháng người, chuột) và kháng IgG của chuột (thỏ). Sau đó tế bào hoặc được xử lý 20 phút với 0,25 μ g/mL ch8A6_N297A hoặc các biến thể 8A6 được làm tương thích với người (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/ VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7). Tế bào được thu gom sau khi ủ và ly giải theo quy trình chuẩn. Dịch ly giải được đưa vào phân tích WB. β -Actin = đối chứng tải.

FIG.11: So sánh các biến thể 8A6 được làm tương thích với người (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/ VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7) với ch8A6_N297A, kháng thể phong bế kháng Fc γ RIIB và chGB3_N297A. Tế bào Daudi được ủ trong 25 phút với dung dịch đệm (không được xử lý) hoặc hỗn hợp (hỗn hợp kháng thể) chứa kháng IgM (kháng người, chuột) và kháng IgG của chuột (thỏ). Sau đó tế bào hoặc được xử lý 20 phút với 0,25 μ g/mL ch8A6_N297A, các biến thể 8A6 được làm tương thích với người (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/ VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7), thể kháng phong bế kháng Fc γ RIIB 2B6 hoặc chGB3_N297A. Tế bào được thu gom sau khi ủ, ly giải theo quy trình chuẩn và được phân tích trong thử nghiệm thấm tách Western. Dịch ly giải được đưa vào phân tích WB. β -Actin = đối chứng tải.

FIG.12: Thiết lập thử nghiệm cho mô hình chuột SLE-PBL. PBL từ người bệnh SLE của người được chuyển vào chuột được gây tổn thương miễn dịch. Tế bào PBL được ghép và sau đó chuột được xử lý với đối chứng (PBS) hoặc kháng thể ch8A6_N297A kháng Fc γ RIIB theo sáng chế.

FIG.13: Tổng mức IgG của người [μ g/mL] ở chuột được ghép PBL từ đối tượng cho là người mắc SLE. Được mô tả trên hình vẽ là chuột được xử lý với đối chứng (#2, PBS) hoặc ch8A6_N297A (#3 và #4).

FIG.14: Sự giảm IgG kháng ADN của người đặc hiệu bệnh ở chuột được xử lý bằng ch8A6_N297A bắt đầu trong tuần 4 sau khi chuyển/ghép SLE-PBL nhờ sử dụng PBL từ đối tượng cho là người mắc SLE. Được mô tả là độ chuẩn IgG kháng ADN ở hai con chuột khác nhau, #3 và #4 (được xử lý bằng ch8A6_N297A), #2 thể hiện đối chứng PBS.

Mô tả chi tiết sáng chế

Fig.7 cho thấy rằng kháng thể trong giải pháp kỹ thuật đã biết GB3 (xem WO 2005/051999) và 2B6 (xem WO 2004/016750) không thể làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của Fc γ RIIB như có thể được làm tăng bởi kháng thể theo sáng chế, như 8A6 – hoặc như kháng thể 8A6 thể khảm hoặc được làm tương thích với người. Khả năng hoặc không có khả năng làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của Fc γ RIIB do đó dường như lần lượt phụ thuộc vào CDR, cụ thể là vào một số gốc then chốt có mặt trong 8A6, nhưng không có trong GB3 và/hoặc 2B6, tương ứng. Do vậy, các axit amin mà chỉ có trong CDR của 8A6 ở các vị trí mà tương ứng với các vị trí tương ứng trong CDR của 2B6 hoặc GB3 có thể được xem là “các gốc then chốt”.

Việc so sánh CDR bằng cách quan sát từ 2B6, GB3 và 8A6 về các gốc then chốt cho thấy rằng kháng thể theo sáng chế chứa trong H-CDR1 trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 29, trong H-CDR2 nó gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 30, trong H-CDR3 nó gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 31, trong L-CDR1 nó gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 32, trong L-CDR2 nó gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 33 và trong L-CDR3 nó gồm trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 34.

Sự khác nhau giữa các trình tự axit amin của CDR của 8A6, GB3 và 2B6 cũng có thể được thể hiện ở mức độ tương đồng (theo % độ tương đồng) mà được cho phép trong

CDR của kháng thể theo sáng chế khi sử dụng CDR của 8A6 làm trình tự tham chiếu. Theo đó, H-CDR1 của kháng thể theo sáng chế tốt hơn, được đặc trưng là có mức độ tương đồng là 60% hoặc cao hơn, như 70%, 80% hoặc 90% so với H-CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 20.

H-CDR2 của kháng thể theo sáng chế tốt hơn, được đặc trưng là có mức độ tương đồng là 36% hoặc cao hơn, như 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% so với H-CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 21.

H-CDR3 của kháng thể theo sáng chế tốt hơn, được đặc trưng là có mức độ tương đồng là 50% hoặc cao hơn, như 60%, 70%, 80%, hoặc 90% so với H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 22.

L-CDR1 của kháng thể theo sáng chế tốt hơn, được đặc trưng là có mức độ tương đồng là 64% hoặc cao hơn, như 70%, 80%, hoặc 90% so với L-CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 23.

L-CDR2 của kháng thể theo sáng chế tốt hơn, được đặc trưng là có mức độ tương đồng là 29% hoặc cao hơn, như 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% so với L-CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 24.

L-CDR3 của kháng thể theo sáng chế tốt hơn, được đặc trưng là có mức độ tương đồng là 78% hoặc cao hơn, như 80%, hoặc 90% so với L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 25.

Theo đó, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcγRIIB, chứa trong vùng biến đổi của chuỗi nặng của nó trình tự H-CDR1 mà có mức độ tương đồng là 60% hoặc cao hơn so với trình tự H-CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 20, trình tự H-CDR2 mà có mức độ tương đồng là 36% hoặc cao hơn so với trình tự H-CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 21, trình tự H-CDR3 mà có mức độ tương đồng là 50% hoặc cao hơn so với trình tự H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 22, trình tự L-CDR1 mà có mức độ tương đồng là 64% hoặc cao hơn so với trình tự L-CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 23, trình tự L-CDR2 mà có mức độ tương đồng là 29% hoặc cao hơn so với trình tự L-CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 24, và trình tự L-CDR3 mà có mức độ tương đồng là 78% hoặc cao hơn so với trình tự L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 25.

Tốt hơn là, kháng thể này vẫn chứa trong CDR vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của nó “các gốc then chốt” như được xác định trong trình tự SEQ ID NO. 29, 30, 31 (H-CDR) và như được xác định trong trình tự SEQ ID NO. 32, 33 và 34 (L-CDR).

Kháng thể này tốt hơn là làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIB trong tế bào Daudi từ 4 đến 10 lần so với tế bào Daudi không được xử lý bằng kháng thể này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “% độ tương đồng” chỉ tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin giống nhau ở vị trí tương ứng trong trình tự khi so sánh hai trình tự axit amin với sự canh thẳng trình tự tối ưu như được minh họa bằng các kỹ thuật ClustalW hoặc X có sẵn trên www.clustal.org, hoặc kỹ thuật tương đương. Ví dụ, trong trường hợp canh thẳng CDR, mỗi CDR (lần lượt từ vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 20-25 lần lượt là trình tự tham chiếu đối với trình tự CDR đích của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, ví dụ H-CDR1 của SEQ ID NO. 20 được canh thẳng với H-CDR1 đích. Theo đó, cả hai trình tự (trình tự tham chiếu và trình tự đích) được canh thẳng, các gốc axit amin giống nhau giữa hai trình tự này được xác định và tổng số axit amin giống nhau lần lượt chia cho tổng số axit amin (chiều dài axit amin) của trình tự SEQ ID NO. 20, 21, 22, 23, 24, hoặc 25, tùy thuộc vào H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, hoặc L-CDR3 được canh thẳng. Kết quả của phép chia này là giá trị phần trăm, tức là giá trị phần trăm/mức độ tương đồng.

Các trình tự H-CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 14 và 20 là các trình tự loài được ưu tiên của H-CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 29.

Các trình tự H-CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 15 và 21 là các trình tự loài được ưu tiên của H-CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 30.

Các trình tự H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 16 và 22 là các trình tự loài được ưu tiên của H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 31.

Các trình tự L-CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 17 và 23 là các trình tự loài được ưu tiên của L-CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 32.

Các trình tự L-CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 18 và 24 là các trình tự loài được ưu tiên của L-CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 33.

Các trình tự L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 19 và 25 là các trình tự loài được ưu tiên của L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 34.

Theo đó, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcγRIIB, tốt hơn là typ IgG, kháng thể này

chứa trong vùng biến đổi của chuỗi nặng của nó H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 14, 15 và 16 và trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của nó L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 17, 18 và 19; hoặc

chứa trong vùng biến đổi của chuỗi nặng của nó H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 20, 21 và 22 và trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của nó L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 23, 24 và 25,

trong đó kháng thể này tốt hơn là làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIB trong tế bào Daudi từ 4 đến 10 lần so với tế bào Daudi không được xử lý bằng kháng thể này.

Kháng thể kháng FcγRIIB chứa trong vùng biến đổi của chuỗi nặng của nó H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 14, 15 và 16 và trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của nó L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 17, 18 và 19, hoặc có trong vùng biến đổi của chuỗi nặng của nó H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 20, 21 và 22 và trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của nó L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 23, 24 và 25 là các kháng thể được ưu tiên. Các kháng thể được ưu tiên này tốt hơn là làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIB trong tế bào Daudi từ 4 đến 10 lần so với tế bào Daudi không được xử lý bằng kháng thể này.

“Kháng thể” theo sáng chế là protein chứa một hoặc nhiều polypeptit (chứa một hoặc nhiều vùng liên kết, tốt hơn là vùng liên kết kháng nguyên) được mã hóa về cơ bản hoặc một phần bởi các gen globulin miễn dịch hoặc các đoạn của gen globulin miễn dịch. Thuật ngữ "globulin miễn dịch" (Ig) được dùng thay thế với "kháng thể" theo sáng chế. Gen globulin miễn dịch được nhận diện bao gồm các gen vùng hằng định kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon và mu, cũng như vô số gen vùng biến đổi của globulin miễn dịch. Cụ thể là, “kháng thể” khi được sử dụng ở đây, thường là protein tetrame được glycosyl hóa gồm hai chuỗi nhẹ (L), mỗi chuỗi khoảng 25 kDa và hai chuỗi nặng (H), mỗi chuỗi khoảng 50 kDa. Hai loại chuỗi nhẹ, là lambda và kappa, có thể được tìm thấy trong các kháng thể. Tùy thuộc vào trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nặng, globulin miễn dịch có thể được chia thành năm lớp chính: A, D, E, G, và M,

và một vài trong số các lớp này có thể còn được chia thành các lớp phụ (isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, và IgA2, với IgG được ưu tiên trong phạm vi sáng chế. Kháng thể theo sáng chế cũng được dự tính có vùng hằng định IgE hoặc phần của nó mà được liên kết bởi thụ thể I epsilon Fc. Kháng thể IgM gồm 5 tiểu phần cơ bản là heterotetrame cùng với một polypeptit bổ sung được gọi là chuỗi J, và chứa 10 vị trí liên kết với kháng nguyên, trong khi các kháng thể IgA chứa từ 2-5 tiểu phần gồm 4 chuỗi mà có thể polyme hóa tạo ra tổ hợp đa trị kết hợp với chuỗi J. Trong trường hợp IgG, tiểu phần gồm 4 chuỗi thường là 150.000 dalton. Mỗi chuỗi nhẹ gồm vùngn biến đổi (V) (VL) và vùng hằng định (C) (CL) đầu tận N. Mỗi chuỗi nặng gồm vùng V (VH) đầu N, ba hoặc bốn domain C (CH), và vùng bản lề.

Các vùng hằng định không tham gia trực tiếp vào liên kết của kháng thể với kháng nguyên, nhưng có thể biểu hiện nhiều chức năng phản ứng khác nhau, như sự tham gia của hiện tượng gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC). Nếu kháng thể gây ra ADCC, tốt hơn kháng thể này là typ phụ IgG1, trong khi typ phụ IgG4 không có khả năng gây ra ADCC.

Khi được sử dụng ở đây thuật ngữ "kháng thể" không những để chỉ globulin miễn dịch (hoặc kháng thể nguyên vẹn), mà còn chỉ phân đoạn của nó, và bao gồm polypeptit bất kỳ chứa phân đoạn liên kết với kháng nguyên hoặc vùng liên kết với kháng nguyên. Tốt hơn là, phân đoạn như Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, Fvs có liên kết disulfit (sdFv), và các phân đoạn kháng thể khác mà giữ lại chức năng liên kết với kháng nguyên như được mô tả ở đây. Thông thường, các phân đoạn này sẽ chứa vùng liên kết với kháng nguyên và có đặc tính giống với các kháng thể được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “kháng thể” còn bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, mà bao gồm các kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu đơn, kháng thể đa đặc hiệu như kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể được làm tương thích với lạc đà, kháng thể người, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể thể khảm, kháng thể tổng hợp, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể lai, kháng thể đột biến, kháng thể ghép, và kháng thể được tạo ra in vitro, với kháng thể thể khảm hoặc kháng thể được làm tương thích với người là được ưu tiên. Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người" được định nghĩa phổ biến đối với kháng thể mà trong đó CDR mã hóa tính đặc hiệu của HC và LC được chuyển vào khung biến đổi thích hợp của người ("ghép CDR "). Thuật ngữ “kháng thể” còn gồm scFv, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể nhị phân (diabody), hoặc kháng thể

tứ phân (tetrabody), các kháng thể vùng (domain antibodies-dAbs) và nanobody. Trong phạm vi sáng chế, thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm các kháng thể hai, ba hoặc nhiều tiểu phần hoặc hai, ba hoặc nhiều chức năng có một số vị trí liên kết với kháng nguyên, tốt hơn ít nhất một trong số chúng là vị trí liên kết đặc hiệu FcγRIIB.

Hơn thế nữa, thuật ngữ "kháng thể" như được sử dụng trong sáng chế còn để chỉ các dẫn xuất của kháng thể (bao gồm các phân đoạn) được mô tả ở đây. "Dẫn xuất" của kháng thể chứa trình tự axit amin đã được thay đổi bằng cách đưa vào các sự thay thế, loại bỏ hoặc thêm gốc axit amin. Ngoài ra, dẫn xuất bao gồm các kháng thể mà đã được cải biến bằng cách gắn kết cộng hóa trị của phân tử loại bất kỳ với kháng thể hoặc protein. Ví dụ về các phân tử này gồm đường, PEG, các nhóm hydroxyl-, etoxy-, carboxy- hoặc amin nhưng không chỉ giới hạn ở các phân tử này. Thực vậy, các cải biến cộng hóa trị của các kháng thể dẫn đến quá trình glycosyl hóa, pegyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, mà không chỉ giới hạn ở các cải biến này.

Kháng thể theo sáng chế tốt hơn là kháng thể “phân lập được”. “Phân lập được” khi được sử dụng để mô tả các kháng thể được bộc lộ ở đây, chỉ kháng thể mà đã được nhận dạng, phân tách và/hoặc thu hồi từ thành phần của môi trường sản xuất nó. Tốt hơn là, kháng thể phân lập được không chứa các thành phần khác từ môi trường sản xuất nó. Các thành phần tạp nhiễm từ môi trường sản xuất nó, như từ tế bào chuyển nhiễm tái tổ hợp, là vật liệu mà thường gây cản trở đối với việc sử dụng để chẩn đoán hoặc điều trị đối với polypeptit, và có thể bao gồm enzym, hormon, và các chất hòa tan có bản chất là protein hoặc không phải protein khác. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể sẽ được tinh chế (1) đến mức độ đủ để thu được ít nhất 15 gốc của đầu N hoặc trình tự axit amin bên trong bằng cách sử dụng máy giải trình tự cột quay tròn, hoặc (2) đến khi đồng nhất bằng SDS-PAGE trong các điều kiện không khử hoặc khử nhờ sử dụng thuốc nhuộm xanh Coomassie hoặc, tốt hơn là, bạc. Tuy nhiên, thông thường, kháng thể phân lập được sẽ được điều chế bằng ít nhất một bước tinh chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” chỉ các kháng thể hoặc các phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó mà liên kết đặc hiệu với FcγRIIB hoặc phân đoạn của nó và không liên kết đặc hiệu với thụ thể Fc khác. Các kháng thể hoặc các phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế liên kết với FcγRIIB thông qua vùng biến đổi của kháng thể. Tuy nhiên, các kháng thể này cũng có thể được liên kết bởi Fc gamma RIIB thông qua vùng Fc của chúng.

Việc bắt cặp của VH và VL với nhau tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên đơn nhất. Vùng CH ở gần nhất với VH được ký hiệu là CH1. Mỗi chuỗi L được liên kết với chuỗi H bằng một liên kết disulfit cộng hóa trị, trong khi hai chuỗi H được liên kết với nhau bằng một hoặc nhiều liên kết disulfit tùy thuộc vào isotyp chuỗi H. Các vùng VH và VL gồm bốn vùng trình tự tương đối bảo thủ được gọi là vùng khung (FR1, FR2, FR3, và FR4), tạo thành giá đỡ cho ba vùng trình tự siêu biến (vùng quyết định bổ thể, complementarity determining region -CDR). CDR chứa hầu hết gốc chịu trách nhiệm đối với các tương tác đặc hiệu của kháng thể với kháng nguyên. CDR được gọi là CDR 1, CDR2, và CDR3. Theo đó, CDR cấu thành trên chuỗi nặng được gọi là H1 hoặc H-CDR1, H2 hoặc H-CDR2 và H3 hoặc H-CDR3, trong khi CDR cấu thành trên chuỗi nhẹ được gọi là L1 hoặc L-CDR1, L2 hoặc L-CDR2, và L3 hoặc L-CDR3.

Thuật ngữ "biến đổi" chỉ các phần của vùng globulin miễn dịch mà biểu hiện sự biến đổi trong trình tự của chúng và liên quan đến việc xác định tính đặc hiệu và ái lực liên kết của kháng thể cụ thể (tức là, "(các) vùng biến đổi"). Sự thay đổi không được phân bố đều khắp các vùng biến đổi của kháng thể; nó tập trung ở các vùng phụ của mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các vùng phụ này được gọi là "vùng quyết định bổ thể" (CDR). Thuật ngữ "CDR", và số nhiều của nó "các CDR", chỉ vùng quyết định bổ thể (CDR) trong đó ba vùng tạo nên đặc tính liên kết của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (L1-CDR1, L2-CDR và L3-CDR) và trong đó ba vùng tạo nên đặc tính liên kết của vùng biến đổi của chuỗi nặng (H1-CDR, H2-CDR và H3-CDR). CDR góp phần vào hoạt tính chức năng của phân tử kháng thể và được phân tách bởi trình tự axit amin mà chứa các vùng giàn hoặc khung. Đường ranh giới và chiều dài chính xác của CDR xác định được đưa vào hệ thống đánh số và phân loại khác nhau. CDR do đó có thể được gọi bằng Kabat, Chothia, liên hệ hoặc định nghĩa ranh giới bất kỳ khác, bao gồm hệ thống đánh số được mô tả ở đây. Mặc dù khác nhau các đường ranh giới, mỗi hệ thống này có mức độ trùng lặp nào đó cấu thành nên "vùng siêu biến" bên trong các trình tự biến đổi. Định nghĩa CDR theo các hệ thống này do đó có thể khác nhau về chiều dài và vùng ranh giới đối với vùng khung lân cận. Xem ví dụ Kabat, Chothia, và/hoặc MacCallum et al., (Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196: 901; và MacCallum et al, J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Tuy nhiên, việc đánh số theo hệ thống Kabat được ưu tiên.

Các vùng biến đổi được ưu tiên của kháng thể theo sáng chế có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, 2, 3, và 4.

Thuật ngữ "vùng khung" chỉ phần được nhận dạng trong lĩnh vực của vùng biến đổi của kháng thể mà tồn tại giữa các CDR khác nhau nhiều hơn (tức là, siêu biến). Các vùng khung này thường được gọi là các khung 1 đến 4 (FR1, FR2, FR3, và FR4) và tạo ra giàn để trình diện sáu CDR (ba từ chuỗi nặng và ba từ chuỗi nhẹ) trong không gian ba chiều, tạo ra bề mặt liên kết với kháng nguyên.

Các kháng thể (bao gồm các phân đoạn và dẫn xuất của nó) theo sáng chế tốt hơn là hoặc có lợi thế là làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIB trong tế bào Daudi khoảng 4 hoặc cao hơn 4 lần, như khoảng 4 lần hoặc cao hơn, khoảng 5 lần hoặc cao hơn, khoảng 6 lần hoặc cao hơn, khoảng 7 lần hoặc cao hơn, khoảng 8 lần hoặc cao hơn, khoảng 9 lần hoặc cao hơn hoặc khoảng 10 lần (tức là gần bằng 10 lần) so với tế bào Daudi không được xử lý bằng kháng thể này. Để so sánh, cả hai kháng thể theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 5μg/ml đến 50μg/ml, như 10, 15, 20, hoặc 25μg/ml.

Từ kết quả được thể hiện trên Fig.6, 7 và 8, thấy rằng hoặc kháng thể thể khảm 8A6 (ch8A6) (chứa vùng biến đổi của chuột và vùng hằng định của người) hoặc kháng thể được làm tương thích với người 8A6 (hu8A6) làm tăng đáng kể quá trình phosphoryl hóa ITIM so với kháng thể GB3 trong giải pháp đã biết. Lưu ý rằng CDR giữa các kháng thể 8A6 thể khảm và được làm tương thích với người gần như giống nhau, trong khi các khung của nó (FR) khác nhau, và hiệu lực của cả hai kháng thể làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIBs là gần như giống nhau (xem Fig.8), sẽ là hợp lý khi kết luận rằng CDR là nguyên nhân dẫn đến đặc tính có lợi của các kháng thể theo sáng chế để làm tăng đáng kể quá trình phosphoryl hóa ITIM, ví dụ, so với kháng thể GB3.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dễ dàng thực hiện ghép CDR như được mô tả ở đây đối với các kháng thể theo sáng chế vào khung thích hợp hoặc, ngược lại, ghép các khung đọc vào kháng thể có CDR của kháng thể theo sáng chế sao cho kháng thể thu được từ đó có đặc tính có lợi, cụ thể là đặc tính làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của CD32B như được mô tả ở đây.

Như đã đề cập, kháng thể theo sáng chế có đặc tính tốt hơn hoặc có lợi hơn để làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIB (CD32B) trong tế bào Daudi, ví dụ, so

với kháng thể GB3 trong giải pháp đã biết được mô tả trong WO 2005/051999, kháng thể này được xác định đặc trưng là có vùng biến đổi của chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 của WO 2005/051999 (xem SEQ ID NO. 26) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 của WO 2005/051999 (xem SEQ ID NO. 27).

Việc làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của Fc γ RIIB (CD32B) trong tế bào Daudi có hiệu quả nhờ kháng thể được đề xuất theo sáng chế tốt hơn là khoảng 4 lần hoặc cao hơn, khoảng 5 lần hoặc cao hơn, khoảng 6 lần hoặc cao hơn, khoảng 7 lần hoặc cao hơn, khoảng 8 lần hoặc cao hơn, khoảng 9 lần hoặc cao hơn hoặc khoảng 10 lần (tức là gần bằng 10 lần) so với tế bào Daudi không được xử lý bằng kháng thể này.

Quá trình phosphoryl hóa ITIM của CD32B (thụ thể Fc gamma IIB) trong tế bào Daudi tốt hơn là được xác định như sau:

3×10^5 tế bào Daudi được tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung 1% FBS (huyết thanh bào thai bò) hoặc là để không xử lý (đối chứng) hoặc được ủ trong 25 phút ở 37°C, 5% CO₂ với hỗn hợp kháng thể gồm kháng thể kháng IgM (kháng người, chuột) và kháng IgG của chuột (thỏ) trong đó hỗn hợp kháng thể này chứa 2 μ g/ml α -hIgM (mAB, dòng UHB) và 20 μ g/ml α -mIgG. Sau đó tế bào hoặc được xử lý 20 phút ở 37°C, 5% CO₂ với kháng thể được đề xuất theo sáng chế hoặc với kháng thể đích như được định nghĩa dưới đây, như kháng thể GB3 của WO 2005/051999, tương ứng, cả hai kháng thể tốt hơn là được dùng ở nồng độ bằng nhau, và tùy ý với dung dịch đệm làm đối chứng (không có kháng thể). Tế bào được thu gom sau khi ủ ở 4°C, ly giải và đưa vào phân tích thẩm tách Western, nhờ đó quá trình phosphoryl hóa được phát hiện bằng kháng thể (kháng) phosphotyrosin (kháng thể kháng CD32B (phospho Y292)). Thẩm tách Western tùy ý được dò với kháng thể thăm dò ví dụ β -Actin được dùng làm đối chứng tải đối với phân tích thẩm tách Western. Để thay thế cho tế bào Daudi, PBMC hoặc tế bào Raji có thể được sử dụng. Theo đó, trong tất cả các phương án mà sử dụng tế bào Daudi khi xác định quá trình phosphoryl hóa ITIM tế bào Daudi có thể được thay thế bằng tế bào Raji hoặc PBMC.

Kháng thể phosphotyrosin tốt hơn là được ghép nối với nhóm tạo tín hiệu. Nhóm tạo tín hiệu chỉ thành phần có thể phát hiện được bằng phương pháp quang phổ, quang hóa, sinh hóa, hóa miễn dịch, hoặc hóa học. Ví dụ, chất đánh dấu hữu dụng bao gồm chất đánh dấu phóng xạ như ³²P, ³⁵S, hoặc ¹²⁵I; thuốc nhuộm huỳnh quang (ví dụ, Cy-3, Cy-5); chất mang màu, thuốc thử dày điện tử; enzym mà tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được

(ví dụ, như thường được sử dụng trong ELISA); hoặc nhãn spin. Chất đánh dấu hoặc gốc có thể phát hiện được có hoặc tạo ra tín hiệu có thể đo được, như phóng xạ, sinh màu, hoặc tín hiệu huỳnh quang, mà có thể được sử dụng để định lượng gốc liên kết có thể phát hiện được trong mẫu.

Nhóm tạo tín hiệu có thể được liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với kháng thể phosphotyrosin. Tín hiệu này có thể được xác định nhờ tín hiệu được tạo ra bởi nhóm tạo tín hiệu của kháng thể phosphotyrosin. Tín hiệu này có thể là tín hiệu bất kỳ mà có thể phát hiện được bằng các phương pháp, ví dụ, quang phổ, quang hóa, sinh hóa, hóa miễn dịch, hoặc hóa học.

Việc làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM được xác định bằng cách so sánh (i) tín hiệu được phát ra từ nhóm tạo tín hiệu của kháng thể phosphotyrosin được liên kết với môtip ITIM của CD32B của tế bào không được xử lý (“trị số tham chiếu”) với (ii) tín hiệu được phát ra từ nhóm tạo tín hiệu của kháng thể phosphotyrosin được liên kết với môtip ITIM của CD32B của tế bào được xử lý với kháng thể được đề xuất theo sáng chế, nhờ đó nếu tín hiệu (ii) cao hơn tín hiệu (i) việc làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của CD32B có hiệu quả nhờ kháng thể được đề xuất theo sáng chế. Để so sánh kháng thể theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 5 $\mu\text{g/ml}$ đến 50 $\mu\text{g/ml}$, như 10, 15, 20, hoặc 25 $\mu\text{g/ml}$. Ví dụ, khi so sánh kháng thể GB3 trong giải pháp đã biết hoặc kháng thể bất kỳ khác liên kết với CD32B (nói chung được gọi là “kháng thể đích”), tốt hơn là kháng thể liên kết với epitop trên CD32B như được mô tả ở đây và/hoặc là không phong bế như được mô tả ở đây với kháng thể được đề xuất theo sáng chế để xác định khả năng của kháng thể đích và kháng thể được đề xuất theo sáng chế xem mỗi kháng thể có thể làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của CD32B lên bao nhiêu lần, quá trình phosphoryl hóa ITIM được xác định như được định mô tả trên đây đối với kháng thể đích và kháng thể được đề xuất theo sáng chế. Cụ thể là, trị số để so sánh của kháng thể đích với tế bào không được xử lý và trị số để so sánh của kháng thể được đề xuất theo sáng chế với tế bào được xử lý được thu nhận. Các trị số này có thể được so sánh với nhau để xác định xem kháng thể được đề xuất theo sáng chế có khả năng là tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM đến mức độ cao hơn, như 4 đến 10 lần (bao gồm 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) so với kháng thể đích không. Để so sánh, kháng thể đích và kháng thể theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 5 $\mu\text{g/ml}$ đến 50 $\mu\text{g/ml}$, như 10, 15, 20, hoặc 25 $\mu\text{g/ml}$.

Thuật ngữ “thụ thể Fc gamma IIB” được sử dụng ở đây hoán đổi với thuật ngữ “FcγRIIB” hoặc “thụ thể Fc gamma IIB” hoặc “thụ thể Fcγ IIB” hoặc “FcγRIIB” và bao gồm cả FcγRIIB màng và FcγRIIB tan được (tức là phần ngoại bào của thụ thể FcγIIB). Thuật ngữ này còn bao gồm các biến thể của FcγRIIB như FcγRIIB1 và FcγRIIB2 mà khác nhau ở vị trí chèn trình tự 19 axit amin trong vùng nội bào của FcγRIIB1. Biến thể khác được bao gồm trong thuật ngữ này là FcγRIIB3 giống với FcγRIIB2, nhưng thiếu thông tin về vị trí cắt nhờ peptidaza tín hiệu giả định.

Đôi khi, FcγRIIB còn được gọi ở đây là “CD32B”. Do đó, thuật ngữ này cũng như các thuật ngữ khác được dùng để chỉ thụ thể Fc gamma IIB như được mô tả trên đây, có thể được dùng thay thế nhau với thuật ngữ “CD32B”. Thụ thể Fc gamma IIB thuộc siêu họ protein globulin miễn dịch và được tìm thấy ở nhiều dòng tạo máu. Như tên của nó cho thấy, thụ thể Fc IIB nhận diện và liên kết với phần Fc (phân đoạn, có thể kết tinh được) của kháng thể, tức là phân đoạn tương ứng với vùng đầu C của cả hai chuỗi nặng của kháng thể và thường tương tác với các phân tử và tế bào đáp ứng. FcγRIIB được ưu tiên có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5. FcγRIIB tan được được ưu tiên có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 12.

“FcγRIIB tan được” còn được gọi là “sFcγRIIB”. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Fcγ thụ thể IIB tan được” và thuật ngữ tương tự chỉ phần ngoại bào của Fcγ thụ thể IIB. Phần này có thể được hòa tan trong chất lỏng. Nói chung, các dạng tan được của lớp FcγR bất kỳ, đồng dạng hoặc alen có thể được nhận dạng bằng chữ “s” ở trước, ví dụ, sCD32 hoặc sFcγRII chỉ thụ thể Fc gamma RII tan được. Thông thường, trái ngược với FcγR màng (tức là, liên kết với màng), FcγR tan được không chứa vùng xuyên màng hoặc đuôi nội bào.

Tốt hơn là, FcγRIIB theo sáng chế có nguồn gốc từ người hoặc là FcγRIIB của người. Thuật ngữ “có nguồn gốc từ người” được hiểu theo nghĩa rộng nhất của nó. Nói chung, nó có nghĩa là FcγR (hoặc vùng hoặc phân đoạn của nó) giống hoặc tương tự với FcγR của người (tức là, protein được tìm thấy trong cơ thể người) về trình tự axit amin và/hoặc cấu trúc.

Theo cách khác, FcγRIIB “có nguồn gốc từ người” có thể là FcγRIIB tái tổ hợp mà thu được nhờ sự biểu hiện của axit nucleic tái tổ hợp ở tế bào chủ, ví dụ như được mô tả bởi Sondermann and Jacob (1999), *Bioll. Chem.* 380(6), 717-721. Vắn tắt là, gen đích

thu được từ sinh vật và được đưa vào vectơ, ví dụ plasmit hoặc virus, sau đó được sử dụng để chuyển gen vào tế bào chủ mà biểu hiện gen tái tổ hợp này và tạo ra sản phẩm protein tái tổ hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng biết rằng tế bào chủ nào để chọn lọc để thu được FcγRIIB mà phù hợp, ví dụ để điều chế được phẩm. Ví dụ, theo một số phương án, FcγRIIB không được glycosyl hóa có thể được mong muốn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này do đó có thể chọn lọc tế bào chủ nhân sơ để biểu hiện FcγRIIB mà không có cơ chế enzym cần thiết cho quá trình glycosylation protein. Theo một phương án, FcγRIIB có thể được biểu hiện ở tế bào nhân sơ và sau đó được tinh chế và cuộn gấp lại theo mô tả của WO 00/32767.

Theo phương án khác FcγRIIB có thể được sản xuất dễ dàng và không tốn kém có độ tinh khiết cao trong hệ biểu hiện nhân thật. Các hệ hữu dụng bao gồm tế bào nhân thật và thiết bị chuyên hóa để sản xuất protein ngoại bào, ví dụ tế bào B. Các hệ biểu hiện nhân thật có thể khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào CHO hoặc HEK. FcγRIIB tan được này do đó là FcγRIIB tái tổ hợp, tan được và được glycosyl hóa.

FcγRIIB như được đề cập ở đây còn bao gồm FcγRIIB mà, so với FcγR kiểu đại, đã được cải biến hoặc biến đổi về trình tự axit amin, và bao gồm, ví dụ, vị trí glycosyl hóa bổ sung hoặc vị trí tương tự. Tuy nhiên, còn các dạng không được glycosyl hóa của FcγRIIB được dự tính và là phương án được ưu tiên của FcγRIIBs.

Về vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế, ưu tiên là vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế chứa trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3, với ít nhất một đột biến được chọn từ nhóm bao gồm axit amin Q ở vị trí 1 được thay thế bằng E, axit amin V ở vị trí 11 được thay thế bằng L, axit amin G ở vị trí 42 được thay thế bằng K, axit amin S ở vị trí 50 được thay thế bằng V, axit amin Y ở vị trí 53 được thay thế bằng S, axit amin K ở vị trí 58 được thay thế bằng T, axit amin G ở vị trí 61 được thay thế bằng A, axit amin S ở vị trí 75 được thay thế bằng T, axit amin K ở vị trí 76 được thay thế bằng R, axit amin N ở vị trí 77 được thay thế bằng S, và axit amin T ở vị trí 78 được thay thế bằng N. Kháng thể này tốt hơn được xác định đặc trưng là chứa trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 6 và/hoặc trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 7.

Kháng thể theo sáng chế tốt hơn được đặc trưng là chứa trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 6 và/hoặc trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 7.

Trong kháng thể được ưu tiên theo sáng chế, vùng hằng định của chuỗi nặng chứa gốc alanin ở vị trí 297 (N297A) theo đánh số protein của EU như được mô tả bởi Edelman *et al.* 1969 (tương ứng với việc đánh số trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO.6 như được thể hiện trên Fig.2). Các kháng thể có chuỗi nặng chứa alanin (Ala, A) gốc ở vị trí 297 (N297A) được ký hiệu ở đây với hậu tố “_N297A”, trong khi các kháng thể có gốc asparagin (Asn, N) ở vị trí này là “kiểu đại” và do đó được ký hiệu ở đây với hậu tố “(wt)”. Như có thể được thấy trên Fig.2, vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người 8A6 kiểu đại kết thúc với gốc axit amin “S” ở vị trí 113 theo đánh số protein của EU. Vùng hằng định của kháng thể này bắt đầu ở vị trí 118. Chỗ trống gồm 4 gốc axit amin rõ ràng được tạo ra bởi sự chuyển đổi hệ thống đánh số protein của EU đối với vùng hằng định và không có nghĩa là bị thiếu gốc axit amin bất kỳ.

Các kháng thể theo sáng chế có gốc alanin ở vị trí 297 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO.6 không có hoặc có tính gây độc tế bào thuộc tế bào phụ thuộc kháng thể giảm do giảm hoặc không tồn tại liên kết của phần Fc của kháng thể với thụ thể Fc. Trình tự axit amin của vùng hằng định N297A này có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 28. Theo đó, kháng thể theo sáng chế có thể chứa trình tự axit amin làm vùng hằng định có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 28. Các kháng thể này không có sự glycosyl hóa ở vị trí 297 theo đánh số protein của EU. Do đó, sáng chế bao gồm các kháng thể mà không có sự glycosyl hóa ở vị trí 297 theo đánh số protein của EU của vùng hằng định của chuỗi nặng, mà còn bao gồm các kháng thể được glycosyl hóa ở vị trí 297 theo đánh số protein của EU của vùng hằng định của chuỗi nặng.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, vùng hằng định (Vùng Fc) của kháng thể theo sáng chế có alotyp G1m17 chứa axit amin K (Lys) ở vị trí 214, E (Glu) ở vị trí 356, M (Met) ở vị trí 358 và A (Ala) ở vị trí 431, không có K (Lys) ở đầu tận cùng C (Beck et al., 2010).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “alotyp” chỉ alotyp của các kháng thể người theo sáng chế. Alotyp là các biến thể alen/gen trong trình tự vùng hằng định của isotyp cụ thể. Alotyp được di truyền theo cách thức của alen. Các thành viên khác nhau của loài

do đó sẽ khác với thành viên khác về alen cụ thể của isotyp xác định chúng được di truyền từ cha mẹ. Km1 và Km2 là alotyp của chuỗi kappa của người; G1m(4) và G1m(17) là alotyp của chuỗi gamma-1 của người.

Về vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế, ưu tiên là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế chứa trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 4, với ít nhất một đột biến được chọn từ nhóm bao gồm axit amin Q ở vị trí 1 được thay thế bằng N, axit amin S ở vị trí 28 được thay thế bằng N, axit amin S ở vị trí 31 được thay thế bằng T, axit amin V ở vị trí 33 được thay thế bằng L, axit amin D ở vị trí 34 được thay thế bằng A, axit amin Y ở vị trí 49 được thay thế bằng F, axit amin T ở vị trí 53 được thay thế bằng N, axit amin Y ở vị trí 55 được thay thế bằng A, axit amin L ở vị trí 89 được thay thế bằng Q, và axit amin N ở vị trí 93 được thay thế bằng Y. Kháng thể này tốt hơn được xác định đặc trưng là chứa trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 6 và/hoặc trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 7

Theo phương án khác nữa của sáng chế, vùng hằng định của chuỗi nhẹ là alotyp Km3 chứa axit amin A (Ala) ở vị trí 153 và V (Val) ở vị trí 191.

Kháng thể theo sáng chế tốt hơn là chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc 3 và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 hoặc 4. Theo đó, kháng thể theo sáng chế tốt hơn là chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 hoặc nó gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 4.

Kháng thể theo sáng chế tốt hơn là chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2, trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 6 và trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 7.

Theo cách khác, kháng thể theo sáng chế tốt hơn là chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 4, trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nặng có trình tự

nêu trong SEQ ID NO. 6 và trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 7.

Kháng thể theo sáng chế tốt hơn là liên kết đặc hiệu với epitop trong các axit amin số 20-40 của FcγRIIB của người theo SEQ ID NO. 5.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop" chỉ một phần của polypeptit hoặc protein mà tạo ra hoạt tính sinh miễn dịch ở động vật và kháng thể liên kết đặc hiệu với nó.

Tốt hơn là, kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop chứa môtip GTHSPES trong trình tự SEQ ID NO. 5. Môtip axit amin này được thấy là có môtip rất đặc hiệu của FcγRIIB. Các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với epitop này không liên kết với FcγRIIA của người. Liên kết của kháng thể theo sáng chế với epitop này thông qua (các) vùng biến đổi của nó tốt hơn là không cản trở liên kết của phần Fc của kháng thể với thụ thể và không phong bế chức năng sinh lý bình thường của thụ thể.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế liên kết *in vitro* với FcγRIIB của người với ái lực có hằng số phân ly ít nhất bằng $4,9 \times 10^{-4}$ giây⁻¹. Hằng số phân ly (k_{off}) có thể được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt. Cụ thể là, kháng thể liên kết với sFcγRIIB có thể được phân tích bằng cộng hưởng plasmon bề mặt nhờ sử dụng bộ cảm ứng sinh học BIAcore T200 (GE Healthcare / Biacore).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ái lực” chỉ cường độ liên kết giữa vùng biến đổi của một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó và kháng nguyên của chúng (ví dụ, thụ thể FcγRIIB) và được đo *in vitro*. Ái lực quyết định cường độ của tương tác giữa epitop và vị trí liên kết với kháng nguyên của kháng thể. Ái lực có thể được tính bằng cách sử dụng công thức sau:

$$KA = [AB-AG]/[AB]*[AG] = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$$

trong đó:

KA = hằng số ái lực

[AB] = nồng độ mol của vị trí liên kết trống trên kháng thể

[AG] = nồng độ mol của vị trí liên kết trống trên kháng nguyên

[AB-AG] = nồng độ mol của phức hợp kháng thể-kháng nguyên

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ái lực” chỉ số đo của cường độ tổng thể của phức hợp kháng thể-kháng nguyên, thực tế phụ thuộc vào các thông số (1) ái lực của kháng thể đối với epitop, (2) hóa trị của kháng thể và kháng nguyên và (3) sự sắp xếp cấu trúc của các phân tương tác.

Sáng chế còn đề xuất trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể được mô tả ở đây. Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “axit nucleic” hoặc “trình tự nucleotit” chỉ phân tử ADN (ví dụ cADN hoặc ADN hệ gen), ARN (mARN), tổ hợp của chúng hoặc các phân tử lai gồm ADN và ARN. Axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi đôi và có thể chứa các phân đoạn sợi đôi hoặc sợi đơn đồng thời. Được ưu tiên nhất là phân tử ADN sợi đôi.

Theo sáng chế, trình tự axit nucleic mã hóa cho kháng thể theo sáng chế chứa nucleotit mà mã hóa ít nhất các phần này của kháng thể mà tạo ra đặc tính liên kết đặc hiệu của kháng thể theo sáng chế.

Tốt hơn là trình tự axit nucleic theo sáng chế mã hóa vùng biến đổi, tốt hơn, ít nhất CDR là như được mô tả ở đây.

Ví dụ về trình tự axit nucleic được ưu tiên theo sáng chế được thể hiện bởi SEQ ID NO. 8 – 11. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cần biết rằng các trình tự nucleotit này có thể khác nhau tùy thuộc vào phương pháp biểu hiện được sử dụng và hệ được dùng để biểu hiện.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất vector axit nucleic chứa ít nhất một trong số các trình tự axit nucleic được mô tả ở đây mã hóa kháng thể theo sáng chế. Vector này tốt hơn là chứa promoter dưới sự kiểm soát mà trình tự axit nucleic nêu trên được đặt vào. Vector này có thể là vector biểu hiện nhân sơ hoặc nhân thật, trong đó axit nucleic tái tổ hợp hoặc là được biểu hiện riêng hoặc dung hợp với peptit hoặc protein khác.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ được chuyển nhiễm vector nêu trên. Tế bào chủ này có thể là tế bào bất kỳ, tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thật và có thể được sử dụng để tạo ra ít nhất các phần của kháng thể hoặc phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế.

Cũng được đề xuất bởi sáng chế là phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế, bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ được mô tả ở đây trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện của trình tự axit nucleic chứa trong vector axit nucleic theo sáng chế và thu hồi kháng thể được tạo ra nhờ việc nuôi cấy đó.

Kháng thể hoặc phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được sử dụng một cách có lợi trong dược phẩm. Dược phẩm này có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn, tốt hơn là bệnh tự miễn.

Kháng thể đặc hiệu Fc γ RIIB theo sáng chế ức chế đáp ứng miễn dịch trong tế bào B, tế bào tua và tế bào hạt được hoạt hóa (ví dụ, đại thực bào) mà dẫn đến sự giảm sản sinh chất trung gian kích thích miễn dịch và dẫn đến sự giảm sản sinh kháng thể cũng như sự trình diện kháng nguyên (ví dụ, trên tế bào tua và đại thực bào dẫn đến sự giảm huy động tế bào T). Tóm lại vòng phản hồi của việc sản sinh kháng thể và tái kích thích hệ miễn dịch bị ức chế.

Quan trọng là, liên kết của kháng thể kháng Fc γ RII theo sáng chế với thụ thể thông qua vùng biến đổi của nó không ảnh hưởng đến liên kết của phân đoạn Fc của IC hoặc kháng thể với thụ thể, và trái ngược với các kháng thể phong bế đã biết, chức năng bình thường của thụ thể Fc được duy trì.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể hoặc phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế làm thành phần hoạt tính. Dược phẩm này có thể chứa ít nhất một chất mang hoặc chất phụ trợ hoặc tá dược được dụng.

Kháng thể có thể được đề xuất trong chế phẩm được dụng như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được liệt kê trong được điển được nhận biết phổ biến để sử dụng cho động vật, và cụ thể hơn là người.

Chế phẩm này, nếu muốn, có thể chứa lượng nhỏ chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa, hoặc chất đệm pH. Các chế phẩm này có thể ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, bột, dạng bào chế giải phóng duy trì và dạng tương tự.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế là dạng trung tính hoặc dạng muối.

Muối được dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các muối được tạo với anion như các muối được tạo từ axit clohydric, phosphoric, axetic, oxalic, tartaric, v.v., và các muối được tạo với cation như các muối được tạo từ natri, kali, amoni, canxi, sắt hydroxit, isopropylamin, triethylamin, 2-etylamin ethanol, histidin, procain, v.v..

Dược phẩm nêu trên có thể có thể được dùng để điều trị hoặc ngăn ngừa hoặc chẩn đoán bệnh hoặc rối loạn bất kỳ, tốt hơn là bệnh tự miễn, và tốt nhất là bệnh tự miễn được đặc trưng bởi sự sản sinh các tự kháng thể.

Lượng và tần suất liều dùng của việc sử dụng được bao hàm bởi các điều kiện có hiệu quả chữa bệnh và có hiệu quả phòng bệnh. Liều dùng và tần suất dùng thường sẽ còn thay đổi theo các yếu tố cụ thể đối với mỗi người bệnh tùy thuộc vào tác nhân chữa bệnh hoặc phòng bệnh cụ thể được dùng, loại bệnh, đường sử dụng, cũng như độ tuổi, cân nặng, đáp ứng, và lịch sử dùng thuốc trong quá khứ của người bệnh. Các chế độ thích hợp có thể được chọn lựa bởi chuyên gia trong lĩnh vực này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” chỉ lượng của thành phần hoặc tác nhân có hoạt tính chữa bệnh hoặc đủ để điều trị hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn, để làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc tạo ra lợi ích chữa bệnh trong điều trị hoặc kiểm soát bệnh.

Đối với các kháng thể được đề xuất theo sáng chế, liều được dùng cho người bệnh thường nằm trong khoảng từ 0,0001 mg/kg đến 100 mg/kg khối lượng cơ thể của người bệnh. Tốt hơn, liều được dùng là khoảng 15 mg/kg. Được biết rằng các kháng thể của người có chu kỳ bán hủy dài hơn trong cơ thể người so với các kháng thể từ các loài khác. Do đó, liều và tần suất dùng kháng thể theo sáng chế hoặc các phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó có thể giảm so với liều được dùng thông thường của các kháng thể từ các loài khác.

Việc điều trị cho đối tượng bằng lượng có hiệu quả chữa bệnh hoặc lượng có hiệu quả phòng bệnh của kháng thể hoặc phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể bao gồm một lần điều trị hoặc, tốt hơn là, có thể bao gồm loạt điều trị. Theo phương án được ưu tiên, đối tượng có thể được điều trị bằng kháng thể hoặc các phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế với liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 30 mg/kg khối lượng cơ thể, một lần mỗi tuần trong khoảng thời gian từ 1 đến 10 tuần, tốt hơn là từ 2 đến 8 tuần, tốt hơn là từ 3 đến 7 tuần. Dạng và cách thức sử dụng có lợi nhất có thể được chọn để mang lại lợi ích tốt nhất cho người bệnh được điều trị.

Phương pháp dùng kháng thể hoặc phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong bì, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), trên màng cứng, và niêm mạc (ví dụ, trong mũi và qua đường miệng). Theo phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế được dùng theo đường trong cơ, trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Chế phẩm này có thể được dùng theo đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm liều lượng lớn, bằng cách hấp thụ qua lớp biểu mô hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc

trực tràng và ruột, v.v.) và có thể được dùng cùng với chất có hoạt tính sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc khu trú. Ngoài ra, việc dùng trong phổi cũng có thể được sử dụng, ví dụ, bằng cách sử dụng máy xông hít hoặc ống phun, và bào chế với tác nhân tạo sol khí.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "điều trị" và "việc điều trị" chỉ việc cho đối tượng dùng lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm theo sáng chế. "Lượng có hiệu quả điều trị" chỉ lượng dược phẩm hoặc kháng thể đủ để điều trị hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn, để làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc để tạo ra lợi ích chữa bệnh trong điều trị hoặc kiểm soát bệnh.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ngăn ngừa" chỉ việc sử dụng một tác nhân để ngăn ngừa sự khởi phát bệnh hoặc rối loạn. "lượng có hiệu quả phòng ngừa" xác định lượng của thành phần hoạt tính hoặc tác nhân được đủ để ngăn ngừa sự khởi phát hoặc tái phát bệnh.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "rối loạn" và "bệnh" được sử dụng thay thế nhau để chỉ tình trạng bệnh lý ở đối tượng. Cụ thể là, thuật ngữ "bệnh tự miễn" được sử dụng thay thế nhau với thuật ngữ "rối loạn tự miễn" chỉ tình trạng bệnh lý ở đối tượng được đặc trưng bởi tổn thương ở tế bào, mô và/hoặc cơ quan được gây ra bởi phản ứng tự miễn của đối tượng với chính tế bào, mô và/hoặc cơ quan của nó.

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng cho mục đích chẩn đoán để phát hiện, chẩn đoán hoặc theo dõi bệnh, hoặc rối loạn, cụ thể là bệnh tự miễn. Các kháng thể hoặc các phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được dùng để đánh giá mức FcγRIIB trong mẫu sinh học nhờ sử dụng phương pháp phân loại mô miễn dịch như được mô tả ở đây hoặc như đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (ví dụ, xem Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101: 976-985; Jalkanen et al., 1987, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096). Các phương pháp dựa trên kháng thể khác hữu dụng để phát hiện sự biểu hiện gen của protein bao gồm thử nghiệm miễn dịch, như thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme linked immunosorbent assay-ELISA) và thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (radioimmunoassay-RIA).

Do đó, sáng chế còn đề xuất chế phẩm chẩn đoán chứa kháng thể theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chẩn đoán" chỉ việc sử dụng kháng thể theo sáng chế bất kỳ để chẩn đoán sự có mặt của bệnh tự miễn liên quan đến FcγRIIB, ví dụ

việc xác định lượng hoặc mức độ biểu hiện trên bề mặt của FcγRIIB nội sinh trên tế bào của cá thể hoặc người bệnh. Thuật ngữ này cũng chỉ việc xác định tỷ lệ của FcγRII hoạt hóa so với FcγRII ức chế, ví dụ tỷ lệ của FcγRIIA so với FcγRIIB được biểu hiện.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, chế phẩm chẩn đoán như được mô tả trên đây là để phát hiện và chẩn đoán bệnh hoặc rối loạn bất kỳ, đặc biệt là bệnh tự miễn được đặc trưng bởi sự sản sinh các tự kháng thể. Ví dụ về bệnh tự miễn bao gồm chứng giảm tiểu cầu tự miễn, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh Addison, đái tháo đường typ 1, bệnh viêm khớp dạng thấp, hội chứng Sjogren, viêm bì cơ, đa xơ cứng, chứng nhược cơ năng, hội chứng Reiter, bệnh Graves, pemphigut thông thường và bong nước, viêm gan tự miễn, viêm loét đại tràng, bệnh ngưng kết tổ lạnh, bệnh lý thần kinh ngoại biên tự miễn, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này.

Theo phương án được ưu tiên các kháng thể theo sáng chế được dùng để chẩn đoán bệnh tự miễn ở người. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng để xác định sự biểu hiện trên bề mặt của FcγRIIB trên tế bào của các thể mắc bệnh tự miễn. Tốt hơn là sự biểu hiện của FcγRIIB trên tế bào B hoặc tế bào huyết tương được phát hiện nhờ sử dụng kháng thể trong phân tích FACS. Để thực hiện phân tích này, kháng thể có thể được cải biến bằng chất đánh dấu, chất đánh dấu huỳnh quang hoặc chất đánh dấu bất kỳ khác đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể phát hiện bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn. Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được dùng làm công cụ chẩn đoán kết hợp với kháng thể đặc hiệu với FcγRIIA của người đã biết trong tình trạng kỹ thuật này. Do đó, sự biểu hiện của FcγRIIB và FcγRIIB trên tế bào của cá thể mắc bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm có thể được xác định và tỷ số có thể được tính toán để làm chỉ báo cho tình trạng bệnh hoặc sự tiến triển của bệnh hoặc là chỉ báo để chẩn đoán bệnh.

Sáng chế còn đề xuất kit chẩn đoán để phát hiện bệnh tự miễn chứa kháng thể hoặc phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế, và tùy ý các chất đánh dấu, chất mang và/hoặc đồ chứa phù hợp và cần thiết.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO. 1: Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 8A6 của chuột

SEQ ID NO. 2: Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 8A6 của chuột

SEQ ID NO. 3: Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 4: Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 5: Trình tự axit amin của FcγRIIB của người

SEQ ID NO. 6: Trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6_wt

SEQ ID NO. 7: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ vùng hằng định của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6_wt

SEQ ID NO. 8: Trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 9: Trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 10: Trình tự axit nucleic mã hóa vùng hằng định của chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6_wt

SEQ ID NO. 11: Trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ vùng hằng định của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6_wt

SEQ ID NO. 12: Trình tự axit amin của FcγRIIA tan được của người (sFcγRIIA)

SEQ ID NO. 13: Trình tự axit amin của FcγRIIA đột biến tan được của người (sFcγRIIAmut)

SEQ ID NO. 14: Trình tự axit amin của CDR1 của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 8A6 của chuột

SEQ ID NO. 15: Trình tự axit amin của CDR2 của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 8A6 của chuột

SEQ ID NO. 16: Trình tự axit amin của CDR3 của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể 8A6 của chuột

SEQ ID NO. 17: Trình tự axit amin của CDR1 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 8A6 của chuột

SEQ ID NO. 18: Trình tự axit amin của CDR2 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 8A6 của chuột

SEQ ID NO. 19: Trình tự axit amin của CDR3 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể 8A6 của chuột

SEQ ID NO. 20: Trình tự axit amin của CDR1 của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 21: Trình tự axit amin của CDR2 của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 22: Trình tự axit amin của CDR3 của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 23: Trình tự axit amin của CDR1 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 24: Trình tự axit amin của CDR2 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 25: Trình tự axit amin của CDR3 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hu8A6

SEQ ID NO. 26: Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể GB3 (cũng xem SEQ ID NO. 7 của WO 2005/051999)

SEQ ID NO. 27 Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể GB3 (cũng xem SEQ ID NO. 5 của WO 2005/051999)

SEQ ID NO. 28 Trình tự axit amin của vùng hằng định của chuỗi nặng chứa ở vị trí 297 đột biến thay thế N thành A (cho rằng vị trí 1 của trình tự này như được thể hiện trong danh mục trình tự là vị trí 118)

SEQ ID NO. 29 Trình tự axit amin của CDR1 của vùng biến đổi của chuỗi nặng mà chứa gốc axit amin then chốt từ kháng thể 8A6 thể khảm và được làm tương thích với người

SEQ ID NO. 30 Trình tự axit amin của CDR2 của vùng biến đổi của chuỗi nặng mà chứa gốc axit amin then chốt từ kháng thể 8A6 thể khảm và được làm tương thích với người

SEQ ID NO. 31 Trình tự axit amin của CDR3 của vùng biến đổi của chuỗi nặng mà chứa gốc axit amin then chốt từ kháng thể 8A6 thể khảm và được làm tương thích với người

SEQ ID NO. 32 Trình tự axit amin của CDR1 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà chứa gốc axit amin then chốt từ kháng thể 8A6 thể khảm và được làm tương thích với người

SEQ ID NO. 33 Trình tự axit amin của CDR2 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà chứa gốc axit amin then chốt từ kháng thể 8A6 thể khảm và được làm tương thích với người

SEQ ID NO. 34 Trình tự axit amin của CDR3 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà chứa gốc axit amin then chốt từ kháng thể 8A6 thể khảm và được làm tương thích với người

Ví dụ thực hiện sáng chế

Điều chế kháng thể đơn dòng 8A6

Kháng thể đơn dòng 8A6 được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho chuột Long-Evans bằng thụ thể FcγRIIB tái tổ hợp tan được của người. Dòng tế bào lai từ tế bào lách chuột được tạo ra và sàng lọc đối với kháng thể liên kết đặc hiệu với FcγRIIB của người với ái lực lớn hơn FcγRIIA. Các kháng thể thứ cấp được tạo ra bằng dòng tế bào lai nêu trên được sàng lọc về đặc tính không phong bế, tức là các kháng thể này vẫn cho phép liên kết của IgG hoặc IC với FcγRIIB được liên kết với màng, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực.

50 μg FcγRIIB tái tổ hợp, tinh sạch, tan được của người (sFcγRIIB, SEQ ID NO. 5) được tiêm qua đường bụng (i.p.) và dưới da (s.c.) vào LOU/C chuột nhờ sử dụng tá được Freund không đầy đủ có bổ sung 5 nmol CpG 2006 (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany). Sau khoảng cách sáu tuần, tiêm nhắc lại lần cuối với 50μg sFcγRIIB và CpG 2006 được đưa vào qua đường bụng và dưới da ba ngày trước khi dung hợp. Sự dung hợp của dòng tế bào u tủy với tế bào miễn dịch ở lách chuột được thực hiện theo quy trình chuẩn. Dịch

nồi chứa dòng lai được thử nghiệm trong thử nghiệm miễn dịch pha rắn với sFcγRIIB hoặc protein sFcγRIIA không tương thích (SEQ ID NO. 12) được phủ lên đĩa ELISA. MAb từ dịch nổi nuôi cấy mô được liên kết với protein được phát hiện với mAb liên hợp HRP kháng isotyp IgG của chuột (TIB173 kháng IgG2a, TIB174 kháng IgG2b, TIB170 kháng IgG1 tất cả đều từ ATCC, R-2c kháng IgG2c tự tạo tại phòng thí nghiệm), do đó tránh được các mAb thuộc lớp IgM. mAb 8A6 (IgG2a của chuột) nhận diện FcγRIIB và không liên kết với FcγRIIA nhờ sử dụng thử nghiệm ELISA đặc hiệu kháng nguyên. Thử nghiệm dựa trên FACS được sử dụng để sàng lọc kháng thể cho liên kết đặc hiệu của kháng nguyên nguyên thể). Ngoài ra các kháng thể được sàng lọc về đặc tính không phong bế, tức là các kháng thể này vẫn cho phép liên kết của IgG hoặc phức hợp miễn dịch với FcγRIIB được liên kết với màng.

Để sản sinh lượng kháng thể đủ để xác định đặc tính của các cấu trúc thể khảm và được làm tương thích với người, tế bào CHO-S FreeStyle™ được chuyển nhiễm tạm thời.

Vào ngày trước khi chuyển nhiễm, các tế bào được cấy với mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Tế bào được ly tâm và được tạo huyền phù lại trong môi trường để thu được nồng độ tế bào cuối là 20×10^6 tế bào/ml. Đối với mỗi chuyển nhiễm 3 ml huyền phù tế bào được chuyển vào đĩa 6 lỗ. ADN plasmit để chuyển nhiễm được tách bằng cách sử dụng Kit HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được rửa giải trong H₂O không chứa nội độc tố.

Đối với mỗi chuyển nhiễm, 75 µg ADN plasmit mã hóa chuỗi nhẹ và 75 µg ADN plasmit mã hóa chuỗi nặng được bổ sung vào huyền phù tế bào và được trộn nhẹ nhàng. Sau đó, PEI (Polyplus) được bổ sung và được trộn nhẹ nhàng. Tế bào được ủ trong 3 giờ ở 37°C và 5 % CO₂ trong điều kiện lắc liên tục (100 vòng/phút). Huyền phù tế bào được nạp đầy bằng môi trường đến thể tích cuối là 15 ml để đạt nồng độ cuối của tế bào là 4×10^6 tế bào/ml và chuyển vào bình 125 ml. Tế bào được ủ ở 37°C và 5 % CO₂ trong điều kiện lắc liên tục (100 vòng/phút) và sau 6 ngày dịch nổi được thu gom bằng cách ly tâm nó 2 lần (4000 vòng/phút, 5 phút). Dịch nổi được lọc qua màng 0,2 µm và xác định độ chuẩn kháng thể (xem dưới đây).

Xác định độ chuẩn kháng thể được thực hiện bằng hai phương pháp HPLC khác nhau, HPLC pha đảo (RP) và HPLC Protein A. Phân tích RP-HPLC được thực hiện với

hệ Agilent 1200 Series HPLC. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm “Chem Station for LC Systems” Rev. B.04.02. Các thành phần dung môi là: Isopropanol (Loại dùng cho HPLC; Roth), Axetonitril (Loại Gradient HPLC; Roth), H₂O (được lọc 0,2 µm) và Tetrafloaxetat (TFA) (để tổng hợp peptit; Sigma). Dung môi A: H₂O, 0,1% TFA; Dung môi B: 60% Isopropanol, 30% Axetonitril, 9,9% H₂O, và 0,1% TFA. Cột Phenomenex Jupiter (#525166-6) với độ rỗng là 300Å và vật liệu phân tách có đường kính hạt là 5 µm được sử dụng. Kháng thể liên kết được rửa giải với dung môi B gradient tuyến tính từ 30% đến 43% trong 10 phút. Dò ở $\lambda = 210$ nm bằng thiết bị dò UV/VIS.

Phân tích HPLC Protein A được thực hiện với hệ Agilent 1200 Series HPLC. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm “Chemstation” phiên bản Rev. B.04.02. Các dung môi sau được sử dụng, dung môi A: 0,05M Tris/HCl, 0,1M Glyxin, 0,15M NaCl, pH 8,0; dung môi B: 0,05M Tris/HCl, 0,1M Glyxin, 0,15M NaCl, pH 3,0. Để phân tích, cột chắn phân tích Upchurch 2x 20 mm được nạp 120 µl môi trường sắc ký truyền Applied Biosystems Poros® 20A (Life technologies). Kháng thể liên kết được rửa giải bằng 100% dung môi B. Trong trường hợp kháng thể tinh sạch được thu gom, các phân đoạn được trung hòa bằng 56 mM Tris pH 8,0.

Các kháng thể được biểu hiện được tinh chế bằng cột 1 ml HiTrapTM rProtein A FF (GE Healthcare) bằng sắc ký lỏng protein nhanh (Äkta Explorer). Dung dịch đệm chạy chứa 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, dung dịch đệm rửa giải gồm 100 mM glyxin, 150 mM NaCl, pH 2,7. Các kháng thể được rửa giải được trung hòa với 60 mM Tris-HCl pH 8,0, cô, lọc vô trùng và giữ ở -80°C.

Sàng lọc kháng thể và xác định đặc tính của 8A6

Sàng lọc dịch nổi tế bào lai được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ thử nghiệm liên kết ELISA, thử nghiệm Biacore hoặc phân tích liên kết FACS. Để kiểm tra liên kết đặc hiệu kháng nguyên của 8A6 thể khảm hoặc biến thể được làm tương thích với người, các đĩa ELISA (Nunc-Immuno Plate, F96 Maxisorp) được phủ 1 µg/ml sFcγRIIB, sFcγRIIA (SEQ ID NO. 12) hoặc sFcγRIIAmut (SEQ ID NO. 13) trong PBS (100 µl/lỗ) qua đêm ở 4°C. Sau 3 bước rửa trong 0,01% Tween trong PBS, phong bế bằng 2% BSA trong PBS (300 µl/lỗ) được thực hiện trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau ba bước rửa, các dịch pha loãng tuần tự của kháng thể tinh chế hoặc dịch nổi được bơm vào (100 µl/lỗ) và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các kháng thể tinh sạch được pha loãng trong PBS, 2% BSA. Dịch nổi được bỏ

sung 10 lần PBS và 20 % BSA để thu được nồng độ cuối là 2% BSA trong PBS. Làm đối chứng dương cho FcγRIIA, FcγRIIA của dê kháng người (R&D Systems, AF1875) được sử dụng. Sau ba bước rửa trong 0,01% Tween trong PBS, kháng thể thứ cấp tương ứng HRP (F(ab')₂ của lừa-kháng dê, Jackson-Immuno-Research) hoặc HRP (F(ab')₂ của dê kháng người, Dianova) được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (100 μl/lỗ). Các lỗ được rửa 6 lần trong 0,01% Tween trong PBS. Cơ chất (OPD chứa 0,03 % H₂O₂) được bổ sung (100 μl/lỗ) và phản ứng được dừng bằng 4 M H₂SO₄ (50 μl/lỗ). Sau đó, đo độ hấp phụ trong phổ kế ở bước sóng 492 nm.

Phân tích liên kết với kháng nguyên nguyên thể của biến thể thể khảm 8A6 hoặc được làm tương thích với người, các biến thể này được thực hiện thông qua liên kết tế bào trên tế bào Raji (ATCC[®] CCL-86[™]) và K-562 (ATCC[®] CCL-243[™]).

Tế bào được tạo vón bằng cách ly tâm (400 g, 5 phút) và được rửa trong dung dịch đệm FACS (dung dịch muối cân bằng Hanks, 1% FCS, 0,01% NaN₃). Sau bước ly tâm bổ sung, tế bào được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS để thu được nồng độ tế bào cuối là 2 x 10⁶ tế bào/ml và 50μl huyền phù tế bào được chia trong đĩa đáy chữ U 96 lỗ. Các dịch pha loãng tuần tự của biến thể được làm tương thích với người và ch8A6 được chuẩn bị trong dung dịch đệm FACS.

Để xác nhận sự biểu hiện của FcγRIIA lên tế bào K-562, kháng thể của chuột kháng CD32 của người (Stem Cell Technologies Inc., Dòng VI.3) được pha loãng trong dung dịch đệm FACS. 50 μl các kháng thể được pha loãng được bổ sung vào tế bào và được ủ trong 30 phút ở 4°C. Tế bào được rửa 2 lần trong dung dịch đệm FACS. Sau đó, 50 μl kháng thể thứ cấp của dê liên hợp với PE kháng IgG của người (F(ab')₂, Dianova) hoặc kháng thể thứ cấp của dê liên hợp với PE kháng IgG của chuột (F(ab')₂, Dianova) được pha loãng trong dung dịch đệm FACS, được bổ sung vào tế bào và được ủ trong 30 phút ở 4°C. Sau 2 bước rửa trong dung dịch đệm FACS, tế bào được tạo huyền phù lại trong 300 μl dung dịch đệm FACS và được đo trong BD FACSCanto[™] II (Phần mềm: BD FACSDiva[™]).

Để xác định xem kháng thể FcγRIIB vẫn cho phép liên kết của IgG hoặc phức hợp miễn dịch với FcγRIIB liên kết màng, thử nghiệm dựa trên FACS được thực hiện. Tế bào được tạo vón bằng cách ly tâm (400 g, 5 phút) và được rửa trong dung dịch đệm FACS (dung dịch muối cân bằng Hanks, 1% FCS, 0,01 % NaN₃). Sau bước ly tâm bổ sung, tế bào được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS để thu được nồng độ tế bào cuối

là 2×10^6 tế bào/ml. Các dịch pha loãng tuần tự của các kháng thể (ch8A6_N297A, chGB3_N297A, R&D Ab mab1875) được chuẩn bị trong dung dịch đệm FACS. 25 μ l kháng thể được pha loãng được trộn trong đĩa đáy chữ U có 96 lỗ với 25 μ l Beriglobin kết tụ được đánh dấu Alexa488 (2,5 μ l/lỗ). IgG kết tụ của người được phân lập bằng sắc ký loại cỡ trên Superdex-200 (16/60) từ sản phẩm IgG gom lại có bán trên thị trường (Beriglobin).

50 μ l huyền phù tế bào được bổ sung vào hỗn hợp kháng thể-Beriglobin và được ủ trong 1 giờ ở 4°C. Tế bào được rửa 2 lần trong dung dịch đệm FACS. Sau đó, 50 μ l kháng thể thứ cấp liên hợp PE của dê kháng IgG của người (F(ab')₂, Dianova) hoặc kháng thể thứ cấp PE kháng chuột được pha loãng trong dung dịch đệm FACS, được bổ sung vào tế bào và được ủ trong 30 phút ở 4°C. Sau 2 bước rửa trong dung dịch đệm FACS, tế bào được tạo huyền phù lại trong 300 μ l dung dịch đệm FACS và được đo trong thiết bị BD FACSCanto™ II (Software: BD FACSDiva™) (FIG.3).

Thử nghiệm liên kết FACS

Phân tích liên kết đặc hiệu với kháng nguyên nguyên thể của 8A6 thể khảm hoặc các biến thể được làm tương thích với người được thực hiện thông qua liên kết tế bào trên tế bào Raji và K-562.

Tế bào được tạo vón bằng cách ly tâm (400 g, 5 phút) và được rửa trong dung dịch đệm FACS (dung dịch muối cân bằng Hanks, 1 % FCS, 0,01% NaN₃). Sau bước ly tâm bổ sung, tế bào được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS để thu được nồng độ tế bào cuối là 2×10^6 tế bào/ml và 50 μ l huyền phù tế bào được chia phần nhỏ trong đĩa đáy chữ U có 96 lỗ. Các dịch pha loãng tuần tự của biến thể được làm tương thích với người và ch8A6 được chuẩn bị trong dung dịch đệm FACS.

Tế bào Raji và K562 được ủ với nồng độ tăng dần của kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể thể khảm làm đối chứng. Tế bào Raji được dùng để kiểm tra liên kết trên FcγRIIB (FIG.4), tế bào K562 để phân tích liên kết không đặc hiệu với FcγRIIA (FIG.5). Các kháng thể liên kết với tế bào được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp liên hợp với PE. Tất cả các biến thể được làm tương thích với người liên kết với FcγRIIB với ái lực tương đương như ch8A6_N297A và tất cả biến thể được làm tương thích với người vẫn liên kết với FcγRIIB với ái lực cao hơn FcγRIIA.

Kháng thể liên kết với sFcγRIIB và sFcγRIIA được phân tích bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng bộ cảm biến sinh học Biacore T200 (GE Healthcare / Biacore). Các thử nghiệm được thực hiện ở LMU, Khoa Sinh học và Vi sinh vật học, Service Unit Bioanalytic. Các kháng thể được phân tích được bắt giữ trên chip cảm biến Series S Sensor Chip CM5 nhờ sử dụng Humantibody Capture Kit theo quy trình chuẩn của nhà sản xuất. Các biến thể Hu8A6 hoặc ch8A6 được bắt giữ ở nồng độ 10 nM trong 1 phút. sFcγRIIB ly giải được tiêm với các nồng độ khác nhau trong 3 phút. Tiến hành đo ở 25°C và dòng liên tục (10 µl/phút). Dữ liệu được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 Evaluation Software (phiên bản 1.0) cho rằng liên kết tỷ lệ 1:1.

Khảm hóa kháng thể 8A6 của chuột

Kháng thể 8A6 đơn dòng, thể khảm kháng FcγRIIB được tạo cấu trúc bằng cách dung hợp vùng VH của 8A6 của chuột với peptit tín hiệu và vùng hằng định của IgG1 của người. Ngoài ra, biến thể được khử glycosyl của chuỗi nặng được tạo ra nhờ sử dụng vùng hằng định của IgG1 chứa đột biến N297A. Để tạo cấu trúc của gen mã hóa chuỗi nhẹ của 8A6, vùng VL của 8A6 của chuột được dung hợp theo cách tương tự với trình tự tín hiệu và trình tự đối với vùng hằng định kappa của người. Tổng hợp ADN của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được thực hiện ở Geneart/Life Technologies sau đó tách dòng phụ vào vector biểu hiện là động vật có vú.

Thử nghiệm in vitro

Tế bào, chất phản ứng và kháng thể

Tế bào u lympho Burkitt của người dòng Daudi và Ramos được mua từ DSMZ (ACC 78 và ACC 603) và được giữ trong RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen) có bổ sung 10% FBS (Gibco/Invitrogen), MEM NEAA (Gibco/Invitrogen), 1mM natri pyruvat (Gibco/Invitrogen) và 2 mM L-Glutamin (Gibco/Invitrogen) ở 37°C và 5% CO₂. Tế bào B nguyên thủy của người được tinh sạch từ máu của người hiến khỏe mạnh được xử lý bằng heparin bằng cách sử dụng gradien tỷ trọng Ficoll (Leucosep, Greiner Bio-One, Biocoll Separating Solution, Biochrom) và phân lập bằng từ tính âm (Dynabeads Untouched Human B cells, Invitrogen). Độ tinh sạch của tế bào B được làm giàu được nghiên cứu bằng phân tích FACS bằng cách nhuộm với kháng thể kháng hCD19-APC (BD Pharmingen #555415), kháng thể kháng hCD3-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences

#332771) và kháng thể kháng hCD56-PE (BD Pharmingen #555515). Tế bào B nguyên thủy được sử dụng trực tiếp cho các thử nghiệm mà không cần nuôi cấy thêm. Việc phong bế kháng thể kháng FcγRIIB 2B6 theo EP1534335.

Quy trình kích thích chuẩn bằng cách sử dụng hỗn hợp kích thích gồm kháng thể tan được

Để kích thích đồng thời BCR và FcγRIIB hệ kháng thể được thiết lập bằng cách sử dụng hỗn hợp kháng thể gồm 2 µg/ml kháng thể đơn dòng của chuột kháng hIgM (Southern Biotech #9022-01, dòng UHB) và 20 µg/ml kháng thể đơn dòng của thỏ kháng mIgG(1,2a,3) (Epitomics #3020-1, dòng M111-2) trong đó phần Fc của nó phản ứng chéo với thụ thể FcγRIIB của người. Đối chứng được thực hiện với 20 µg/ml kháng thể đa dòng của thỏ kháng hIgM (các kháng thể trực tuyến #ABIN117299) hoặc hỗn hợp chứa 2 µg/ml kháng thể kháng hIgM và đối chứng isotyp mIgG2b (dòng MPC-11, BD Pharmingen #557351).

3×10^5 tế bào của dòng tế bào u lympho Daudi hoặc Ramos và tế bào B nguyên thủy được thu bằng cách ly tâm và được ủ với các hỗn hợp kích thích khác nhau trong môi trường thử nghiệm (RPMI 1640 + 1% FBS) trong 20 phút ở 37°C.

Sau đó 5 µg/ml kháng thể ch8A6 kháng FcγRIIB (0,8 µl độ pha loãng 1:10), 2B6 (1,5 µl độ pha loãng 1:10) hoặc chGB3_N297A (1,1 µl độ pha loãng 1:10) được bổ sung vào mẫu và tế bào được ủ thêm trong 25-30 phút. Tiến hành ly giải như được mô tả một cách riêng rẽ.

Phân tích thẩm tách Western các mẫu phosphoryl hóa

Ly giải tế bào

Tế bào được tạo vón ở 4°C, rửa bằng PBS giữ trong nước đá lạnh và ủ trong 10 µL dung dịch đệm ly giải (dung dịch đệm RIPA (Cell Signaling) có bổ sung chất ức chế phosphatase (PhosStop, Roche), chất ức chế protease (Complete Ultra Mini, EDTA-free, Roche) và 1 mM PMSF (Fluka Biochemica) trong 30-45 phút trên nước đá.

SDS-PAGE

Sau khi ly tâm, dịch nổi được nạp cùng với dung dịch đệm mẫu (dung dịch đệm mẫu NuPAGE LDS, chất khử mẫu NuPAGE, Invitrogen) dùng cho SDS PAGE (NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels, dung dịch đệm chạy MES SDS (Invitrogen)). Đối

với SDS-PAGE, dung dịch đệm mẫu LDS và chất khử được bổ sung và mẫu được làm nóng đến 95°C trong 5 phút. Mẫu được giữ ở -20°C hoặc được phân tích luôn bằng SDS-PAGE và thẩm tách Western.

Chuyển protein lên màng PVDF và dò

Sau đó, protein được chuyển lên màng PVDF (Roti-PVDF, Roth, dung dịch đệm chuyển 10 mM Tris, 100 mM Glyxin, 10% Metanol, điều kiện chuyển 240 mA const., 90 phút ở 4°C). Màng được phong bế bằng 5% BSA trong TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) và được nhuộm với kháng thể kháng Fc γ RIIB/CD32 Phospho (pY292) (Cell Epitomics # 2308-1, 1:50000, 4°C qua đêm) hoặc kháng phosphoSHIP (1:1000, Cell Signaling #3941) và kháng HRP của thỏ (Jackson ImmunoResearch #111-036-045, 1:50,000 trong TBS-T, thời gian chạy 1 giờ). Sự phát quang hóa học (được hiện bằng thiết bị WesternLightning Plus, Perkin Elmer) được phát hiện trên phim tia X.

Tẩy rửa

Để phân tích tiếp theo các kháng thể trực tiếp kháng các protein được phosphoryl hóa khác, màng được tẩy (Re-Blot Plus, Millipore) trong 10 phút, rửa và phong bế trước khi nhuộm với kháng thể kháng β -Actin (Sigma-Aldrich # A1978, 1:50.000 và kháng IgG-HRP của chuột, Sigma-Aldrich # A9044) hoặc các kháng thể cho các protein phát tín hiệu khác.

Quá trình phosphoryl hóa Fc γ RIIB-ITIM ở PBMC từ người hiến khỏe mạnh được làm tăng rõ rệt nhờ kháng thể theo sáng chế

PBMC từ người hiến khỏe mạnh được phân lập và hoặc để không xử lý hoặc được ủ trong 25 phút với hỗn hợp kích thích (kháng thể đơn dòng của chuột kháng hIgM và kháng thể đơn dòng của thỏ kháng mIgG). Sau đó, tế bào được xử lý hoặc với ch8A6 hoặc dung dịch đệm làm đối chứng. Dịch ly giải tế bào được đưa vào phân tích thẩm tách Western bằng cách sử dụng các kháng thể dò thích hợp như đề cập trên đây. Sự tăng rõ rệt ở quá trình phosphoryl hóa môtip Fc γ RIIB-ITIM của tế bào (PBMC, tế bào B) được phát hiện (FIG.6a). Thử nghiệm đối chứng với việc kích thích tế bào bằng chỉ hỗn hợp kích thích, hoặc chỉ kháng thể đơn dòng của chuột kháng hIgM, kháng thể đơn dòng của thỏ kháng mIgG kết hợp với ch8A6 không thể hiện việc làm tăng quá trình phosphoryl hóa Fc γ RIIB-ITIM (FIG.6b). Các kháng thể theo sáng chế do đó thể hiện hiệu quả rõ rệt lên quá trình phosphoryl hóa ITIM ở tế bào người có BCR được liên kết ngang và

Fc γ RIIB (được biểu hiện nội sinh) được liên kết với màng và không có hiệu quả trên tế bào không được kích thích, tức là tế bào không có BCR được liên kết ngang và Fc γ RIIB được liên kết vào màng. Trong bệnh tự miễn, BCR và Fc γ RIIB được liên kết vào màng sẽ không được liên kết ngang bởi các tự kháng nguyên hoặc phức hợp miễn dịch (IC). Các kháng thể theo sáng chế có thể ức chế tế bào B tự phản ứng gây bệnh ở bệnh tự miễn bằng cách làm tăng quá trình phosphoryl hóa Fc γ RIIB-ITIM. Tuy nhiên, kháng thể theo sáng chế cũng có thể làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM mà không có BCR liên kết ngang (FIG.6c).

So sánh hiệu quả của ch8A6 với kháng thể từ tình trạng kỹ thuật đã biết (chGB3_N297A)

So sánh hiệu quả của dòng ch8A6_N297A và dòng chGB3_N297A lên quá trình phosphoryl hóa ITIM. Tế bào Daudi của người được xử lý với hỗn hợp kháng thể và, sau đó với ch8A6_N297A, chGB3_N297A hoặc 2B6 như được mô tả trên đây. Kháng thể chGB3_N297A như ch8A6_N297A là kháng thể không phong bế kháng Fc γ RIIB và nhận diện epitop tương tự.

Bổ sung ch8A6_N297A vào tế bào được xử lý bằng hỗn hợp kháng thể cho thấy làm tăng quá trình phosphoryl hóa Fc γ RIIB-ITIM ở nồng độ 0,05 μ g/ml. Mặc dù tăng nồng độ chGB3_N297A cho thấy sự kích thích phụ thuộc liều quá trình phosphoryl hóa môtip ức chế, ngạc nhiên là, dòng kháng thể này không thể đạt tới mức phosphoryl hóa tương đương với 8A6. Định lượng tỷ trọng bằng phim tia X với phần mềm “ImageJ” tính toán được trị số tối đa bằng 2,8 lần tín hiệu phospho, trong khi đó hu8A6_N297A dẫn đến sự tăng 9,8 lần so với tế bào không được xử lý (FIG.7). Do đó, các kháng thể theo sáng chế thể hiện một cách rõ ràng và ngạc nhiên là làm tăng quá trình phosphoryl hóa Fc γ RIIB-ITIM so với các kháng thể trong giải pháp đã biết.

So sánh hiệu quả của biến thể được làm tương thích với người hu8A6, thể khám 8A6_N297A và chGB3_N297A lên quá trình phosphoryl hóa ITIM ở PBMC nguyên thủy

Kháng thể chGB3_N297A, ch8A6_N297A và 8A6 được làm tương thích với người được so sánh về ảnh hưởng của chúng lên quá trình phosphoryl hóa Fc γ RIIB-ITIM ở PBMC nguyên thủy của người. Sau khi liên kết ngang của BCR và Fc γ RIIB nhờ hỗn hợp kháng thể này, các kháng thể khác nhau được bổ sung ở nồng độ 5 μ g/ml và phân tích thấm tách Western đối với quá trình phosphoryl hóa ITIM được thực hiện. Một lần nữa,

ngoài mong đợi, các kháng thể theo sáng chế có hiệu quả một cách rõ rệt lên quá trình phosphoryl hóa *FcγRIIB*-ITIM so với kháng thể trong giải pháp đã biết (FIG.8).

Quá trình kết tủa miễn dịch đồng thời của môtip FcγRIIB-ITIM được phosphoryl hóa và SHIP-1

Sau khi liên kết ngang vào thụ thể, phosphatase SHIP được huy động vào màng thông qua liên kết của vùng SH2 của nó với phospho-tyrosin trong môtip *FcγRIIB*-ITIM, sau đó quá trình phosphoryl hóa tyrosin ở môtip NPXY trong vùng đầu C của SHIP-1. Việc tái định vị trên màng và quá trình phosphoryl hóa môtip NPXY sau đó là cần thiết cho chức năng điều hòa của SHIP-1. Tác động của nó lên dòng canxi, sự sống của tế bào, sự sinh trưởng, chu kỳ nghỉ của tế bào và sự chết tế bào theo chương trình qua trung gian các con đường PI3K và Akt. Tyr1021 có trong một trong số các môtip NPXY của SHIP-1, và quá trình phosphoryl hóa nó là quan trọng cho chức năng của SHIP-1 (Nimmerjahn, Ravetch, 2008).

Tế bào Daudi của người được kích thích bằng hỗn hợp kháng thể như được xác định trong phần trên và sau khi ly giải trong dung dịch đệm ly giải nhẹ (dung dịch đệm ly giải CoIP), mẫu được ủ với 2B6 để bắt giữ *FcγRIIB*. Phức hợp được liên kết với các hạt sắt từ liên kết với Protein G và được phân lập bằng giá từ.

Dịch ly giải chứa 1×10^7 tế bào/mẫu được chuẩn bị trong 500 μ l dung dịch đệm ly giải CoIP, ủ tế bào trong 30 phút trên nước đá và xoáy trộn mỗi 10 phút. Xác tế bào được xoáy trộn xuống dưới ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và phần dịch nổi được chuyển vào ống mới. 500 μ l dịch ly giải được ủ với 10 μ g 2B6 trong 2-3 giờ ở 4°C trộn đảo đầu cuối. Các hạt từ liên kết với Protein G được rửa hai lần với 500 μ l dung dịch đệm ly giải và 50 μ l hạt (1,5 mg) được bổ sung vào phức hợp dịch ly giải-kháng thể qua đêm ở 4°C (bánh xe quay). Phức hợp được rửa giải từ hạt bằng cách rửa hai lần với 200 μ l dung dịch đệm ly giải và đun nóng hạt trong 5 phút trong 25 μ l dung dịch đệm mẫu LDS1x chứa tác nhân khử. Sau khi ly tâm ở 4000 x g trong 30 giây, 10 μ l dịch nổi được cho chạy SDS-PAGE để phân tích thâm tách Western.

Phân tích thâm tách Western dịch ly giải cho thấy mức phospho-SHIP-1 tăng đáng kể trong các mẫu của tế bào được xử lý với hỗn hợp kháng thể và ch8A6_N297A. Khi quá trình kết tủa được thực hiện với kháng thể 2B6 đặc hiệu *FcγRIIB*, chỉ SHIP-1 phân lập được kết tủa đồng thời mà đã được liên kết với *FcγRIIB*. Màng sau khi làm sạch và

nhuộm lại đã cho thấy quá trình phosphoryl hóa môtip Fc γ RIIB-ITIM tăng trong các mẫu được xử lý với ch8A6_N297A, tương quan với tín hiệu phospho-SHIP1. Việc nhuộm lại lần hai với α -hFc γ RIIB a, b, c cho thấy lượng tương đương của thụ thể Fc γ RIIB được kết tủa trong tất cả các mẫu, dùng làm đối chứng tải cho SDS-PAGE (FIG 9).

Được làm tương thích với người ch8A6

ch8A6 được làm tương thích với người bằng cách ghép trình tự vùng xác định bổ thể từ kháng thể của chuột vào khung của người. Để chọn lọc khung của người, trình tự V_H và V_L được so sánh với trình tự của các phân đoạn mầm vùng bản lề và vùng biến đổi của Ig của người, thu được từ cơ sở dữ liệu có sẵn (IMGT; V-BASE). VH_3_30 cùng với trình tự mầm IGHJ4 của người và VK3_15 cùng với trình tự mầm IGKJ2 của người lần lượt được chọn cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Một số biến thể đối với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra. Các gen mã hóa trình tự được chỉ rõ của V_H và V_L được làm tương thích với người được tổng hợp ở Life Science Technologies / Geneart, sau đó được tách dòng phụ vào vector biểu hiện là động vật có vú. Quy trình sàng lọc các biến thể kháng thể được thực hiện một cách trực tiếp từ dịch nổi của tế bào CHO-S được chuyển nhiễm (Invitrogen). Kháng thể 8A6 thể khảm được dùng làm đối chứng chuyển nhiễm và chuẩn trong quá trình sàng lọc các biến thể được làm tương thích với người. Biến thể Hu8A6 được phân tích về liên kết trên sFc γ RIIB và sFc γ RIIA bằng phương pháp ELISA và trên Fc γ RIIB nguyên thể thông qua FACS trên tế bào Raji (xem trên đây). Ngoài ra việc xác định đặc tính độc học của các biến thể kháng thể được thực hiện bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

Thử nghiệm với các biến thể 8A6 được làm tương thích với người

Để thử nghiệm hoạt tính phosphoryl hóa của các biến thể được làm tương thích với người 8A6, tế bào Daudi được kích thích bằng hỗn hợp kháng thể này, được xử lý bằng 0,5 hoặc 5 μ g/ml các biến thể 8A6 khác nhau, và phân tích thâm tách Western đối với quá trình phosphoryl hóa ITIM được thực hiện.

So sánh các biến thể 8A6 được làm tương thích với người với ch8A6_N297A

Tất cả các biến thể được làm tương thích với người được thử nghiệm của 8A6 có khả năng gây ra quá trình phosphoryl hóa thụ thể và mức phosphoryl hóa tương đương với mức được gây ra bởi ch8A6_N297A từ cùng một mẻ tinh chế. Do đó, không phát

hiện sự mất hoạt tính sau vòng được làm tương thích với người thứ hai. Mặc dù dữ liệu Biacore đề xuất ái lực khác nhau đối với các tổ hợp khác nhau của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, những sự khác nhau này là không thể phát hiện bằng phân tích thẩm tách Western (FIG.10)

So sánh các biến thể 8A6 được làm tương thích với người với ch8A6_N297A, kháng FcγRIIB phong bế (2B6) và chGB3_N297A

Sau khi tổ hợp chuỗi được làm tương thích với người cuối cùng được chọn, biến thể này, kết hợp chuỗi nặng V_H10 với chuỗi nhẹ V_L6, cuối cùng được so sánh với các kháng thể ch8A6_N297A, 2B6 và chGB3_N297A (FIG.11).

Thử nghiệm in vivo

Mô hình SLE-PBL-Model

Chuột Rag2/gamma-c/Fcγ-/- được chiếu xạ với liều 6 Gy và được tiêm qua đường bụng với lượng thay đổi của bạch cầu máu ngoại vi của người trong 500μl PBS.

Việc điều trị cho chuột bắt đầu 2 tuần sau khi tiêm tế bào sau khi việc ghép PBL của người bệnh-SLE người vào chuột được xác nhận nhờ sự có mặt của người globulin miễn dịch M hoặc G. Chuột được xử lý với 200μl dung dịch đệm (PBS) hoặc 20μg kháng thể (ch8A6_N297A) trong 200μl PBS qua đường bụng hai lần mỗi tuần trong 4 tuần. Chuột được cân và lấy máu để thu huyết thanh một lần mỗi tuần. Mẫu huyết thanh được để đông băng ở -80°C cho đến khi sử dụng tiếp theo (FIG.12).

ELISA

Các mẫu huyết thanh được phân tích bằng ELISA về sự có mặt của tổng IgG, IgM của người và IgM và IgG kháng ADN.

Để định lượng tổng IgM và IgG huyết thanh trong các mẫu huyết thanh, Kit Bethyl định lượng IgM của người bằng ELISA và Kit định lượng IgG của người bằng ELISA (Biomol) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. OD được đo bằng thiết bị đọc vi đĩa điều hưởng được VersaMax (Thiết bị phân tử) ở 450 và 650 nm.

Để phát hiện các kháng thể kháng ADN, đĩa ELISA được phủ 10 μg/mL BSA được methyl hóa (Sigma) trong PBS trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, các đĩa này được phủ 50 μg/mL ADN tuyến ức của bê (Sigma) trong PBS ở 4°C qua đêm. Việc phong bế liên kết không đặc hiệu được thực hiện bằng PBS/0,1% Gelatin/3% BSA/1mM

EDTA trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Huyết thanh được pha loãng tỷ lệ 1:100 trong dung dịch phong bế và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Để làm kháng thể thăm dò, kháng thể liên hợp HRP của kit định lượng IgM của người (Bethyl) được sử dụng và được pha loãng tỷ lệ 1:10.000 trong dung dịch phong bế sau đó ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. PBS được sử dụng cho tất cả các bước rửa. Để phát hiện, dung dịch TMB được bổ sung và phản ứng được dừng bằng axit orthophosphoric 6%.

Mô hình SLE PBL, tổng globulin miễn dịch trong huyết thanh người

Tổng mức IgG của người [$\mu\text{g/mL}$] được phân tích ở chuột được ghép PBL từ đối tượng cho là người mắc SLE. Không có sự khác biệt đáng kể về tổng IgG của người giữa PBS hoặc kháng Fc γ RIIB được phát hiện. Kháng thể theo sáng chế không có ảnh hưởng đáng kể lên tổng IgG của người (FIG.13).

Mô hình SLE PBL, ảnh hưởng lên các kháng thể kháng ADN (IgG đặc hiệu bệnh)

Sự giảm đáng kể IgG đặc hiệu bệnh kháng ADN của người ở chuột kháng Fc γ RIIB bắt đầu trong tuần 4 sau khi chuyển/ghép SLE-PBL được ghi nhận. Các kháng thể theo sáng chế làm giảm rõ rệt lượng kháng thể kháng ADN tương ứng bệnh (FIG.14).

Tài liệu tham khảo

- Almagro J.C. and Fransson J. (2008), Humanization of antibodies. *Front Biosci* 13:1619-33.
- Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Webster, P., Sautes, C., Mellman, I., Fridman, W.H. (1992), Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes, *Science* 256, 1808-1812.
- Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. 2010. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 345-352.
- Bolland S, Ravetch JV (2000), Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13(2), 277-85.
- Cassel DL, Keller MA, Surrey S, Schwartz E, Schreiber AD, Rappaport EF, McKenzie SE Differential expression of Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIB and Fc gamma RIIC in hematopoietic cells: analysis of transcripts. *Mol Immunol.* 1993 Apr; 30(5):451-60.

- Chan AC and Carter PJ. 2010. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation, *Nat. Rev., Immunol.* 10(5):301-16.
- Daeron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, Fridman WH. 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* 3:635-46.
- Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. 1969. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 63(1):78-85.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. & Fleit, H.B. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with FcγRII and monocytic THP-1 cells, *J.Biol. Chem.* 269, 8878-8884 (1994)
- Hammerling et al. *Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas*, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)
- Harlow et al. (2nd Ed. 1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Isakov N. (1997), ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res.* 16, 85-100.
- Jones, P.T. et al. (1968), Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature* 321:522-525.
- Malmborg AC, Borrebaeck CA. (1995) BIAcore as a tool in antibody engineering. *J Immunol Methods.* 195 Jun 14;183(1):7-13.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 8, 34-47.
- Presta L.G. (2008), Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol.* 20(4):460-70.
- Ravetch, J. V. and Bolland, S. (2001), IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290.
- Reichert JM. (2012) Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 4(3):413-5
- Santos A.D. and Padlan E.A. (1998), Development of more efficacious antibodies for medical therapy and diagnosis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 60:169-94.

- Winter G, Milstein C. (1991) Man-made antibodies. *Nature*. 349(6307):293-9.
- Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM, Smith KG. 2007. FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol*. 8(4):419-29.
- Zhou, M.-J., Todd, R.F., van de Winkel, J.G.J., Petty, H.R. (1993), Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with FcγRIII on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions, *J. Immunol*. 150, 3030-3041.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng FcγRIIB, trong đó kháng thể này:

(a) chứa, ở vùng biến đổi chuỗi nặng của nó, H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 14, 15 và 16 và ở vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 17, 18 và 19; hoặc

(b) chứa, ở vùng biến đổi chuỗi nặng của nó, H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO. 20, 21 và 22 và, ở vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó, L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 23, 24 và 25;

trong đó kháng thể này làm tăng quá trình phosphoryl hóa ITIM của FcγRIIB của các tế bào Daudi khoảng 4 đến 10 lần so với các tế bào Daudi không được xử lý bằng kháng thể này.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là thể khảm hoặc được làm tương thích với người.

3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa, ở vùng biến đổi chuỗi nặng của nó, H-CDR1, H-CDR2 và H-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 20, 21 và 22 và, ở vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó, L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 23, 24 và 25, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 3.

4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này liên kết đặc hiệu với các axit amin từ vị trí 20 đến 40 của FcγRIIB của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5.

5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này liên kết in vitro với FcγRIIb của người với ái lực có hằng số tốc độ phân ly ít nhất là $4,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

6. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa, ở vùng hằng định chuỗi nặng của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 6.

7. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa, ở vùng hằng định chuỗi nhẹ của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 7.

8. Kháng thể kháng FcγRIIB trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc 3 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 hoặc 4.
9. Kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể này chứa, ở vùng hằng định chuỗi nặng của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 6.
10. Kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể này chứa, ở vùng hằng định chuỗi nhẹ của nó, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 7.
11. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 1 làm thành phần hoạt tính.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SuppreMol GmbH

<120> Kháng thể kháng FcγRIIB và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> 02043198PCT

<150> EP13004094.2

<151> 2013-08-16

<160> 34

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(113)

<223> VH r8A6

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> Đặc tính hỗn tạp

<223> VL r8A6

<220>

<221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(108)

<223> VL r8A6

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> kháng thể được làm tương thích với người

<220>

<221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(113)

<223> VH hu8A6

<400> 3

```

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

```

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> kháng thể được làm tương thích với người
 <220>
 <221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(108)

<223> VL hu8A6

<400> 4

```

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

<210> 5
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <220>
 <221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(181)

<223> FcγRIIB của người

<400> 5

```

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

```

Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu
65              70              75              80
Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln
              85              90              95
Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys
              100             105             110
His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn
              115             120             125
Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro
              130             135             140
Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile
145              150             155             160
Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala
              165             170             175
Pro Ser Ser Ser Pro
              180

```

<210> 6

<211> 329

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> kháng thể được làm tương thích với người

<220>

<221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(329)

<223> CH hu8A6_wt

<400> 6

```

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

```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> kháng thể được làm tương thích với người

<220>

<221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(106)

<223> CL hu8A6_wt

<400> 7

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210>	8
<211>	339
<212>	ADN
<213>	Nhân tạo
<220>	
<223>	kháng thể được làm tương thích với người
<220>	
<221>	đặc tính hỗn tạp

```
<222>    (1) .. (339)
<223>    VH hu8A6
<400>    8
```

caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	gactattaca	tggcctgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcatcc	atatcatacg	atggaagcaa	taagtactac	180
ggagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agctgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagaccggga	300
gactactggg	gccaaggaac	cctggtcacc	gtcagctca			339

<210>	9
<211>	324
<212>	ADN
<213>	Nhân tạo
<220>	
<223>	kháng thể được làm tương thích với người
<220>	
<221>	đặc tính hỗn tạp

```
<222>    (1) .. (324)
<223>    VL hu8A6
<400>    9
```

cagatagtga	tgacgcagtc	tccagccacc	ctgtctgtgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gtccgtttggc	tctatgtcg	actggtacca	gcagaaacct	120
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatggt	gcattccacca	ggtacactgg	tatcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagag	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagtct	240
gaagattttg	cagttttatta	ctgtctgcag	tataacaacc	atccttacac	ttttggccag	300
gggaccaagc	tggagatcaa	acgt				324

<210>	10
<211>	990
<212>	ADN
<213>	Nhân tạo
<220>	
<223>	kháng thể được làm tương thích với người

<220>

<221> đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(990)

<223> CH hu8A6_wt

<400> 10

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg      120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggttgagccc      300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga      360
ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct      420
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      540
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag      720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg      840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggttaa      990

```

<210> 11

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> kháng thể được làm tương thích với người

<220>

<221> đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(321)

<223> CL hu8A6_wt

<400> 11

```

acgggtggctg caccatcggg cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga      60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg      120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc      180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa      240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc      300
ttcaacaggg gagagtgtta g      321

```

<210> 12

<211> 125

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(125)

<223> FcγRIIA hòa tan được của người

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 179

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> Đặc tính hỗn tạp

<222> (1)..(179)

<223> FCγRIIA đột biến hòa tan được của người

<400> 13

```

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

```


Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys
 115 120 125
 Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His
 130 135 140
 Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu
 145 150 155 160
 Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser Met Gly
 165 170 175
 Ser Ser Pro

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR1 chuỗi nặng từ kháng thể 8A6 của chuột
 <400> 14

Asp Tyr Tyr Met Ala
 1 5

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR2 chuỗi nặng từ kháng thể 8A6 của chuột
 <400> 15

Ser Ile Ser Ser Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR3 chuỗi nặng từ kháng thể 8A6 của chuột
 <400> 16

Ala Arg Pro Gly Asp Tyr
 1 5

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR1 chuỗi nhẹ từ kháng thể 8A6 của chuột

<400> 17

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Tyr Val Asp

1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR2 chuỗi nhẹ từ kháng thể 8A6 của chuột

<400> 18

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR3 chuỗi nhẹ từ kháng thể 8A6 của chuột

<400> 19

Leu Gln Tyr Asn Tyr His Pro Tyr Thr

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR1 từ kháng thể được làm tương thích với người 8A6

<400> 20

Asp Tyr Tyr Met Ala

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR2 chuỗi nặng từ kháng thể được làm tương thích với người 8A6

<400> 21

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

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR3 chuỗi nặng từ kháng thể được làm tương thích với người 8A6

<400> 22

Ala Arg Pro Gly Asp Tyr

1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR1 chuỗi nhẹ từ kháng thể được làm tương thích với người 8A6

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Val Asp

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR2 chuỗi nhẹ từ kháng thể được làm tương thích với người 8A6

<400> 24

Gly Ala Ser Thr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR3 chuỗi nhẹ từ kháng thể được làm tương thích với người 8A6

<400> 25

Leu Gln Tyr Asn Asn His Pro Tyr Thr

1 5

<210> 26

<211> 104

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể GB3

<400> 26

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

20 25 30

Ile Tyr Trp Val Lys Gln Trp Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Trp Ile Phe Pro Gly Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe Lys

50 55 60

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Leu Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Tyr
 85 90 95
 Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100

<210> 27

<211> 104

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể GB3

<400> 27

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

<210> 28

<211> 329

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng hằng định của chuỗi nặng của IgG có sự thay đổi N thành A ở vị trí 297 khi đề cập vị trí 1 là vị trí 118

<400> 28

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

29557

				85					90					95					
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
				100					105					110					
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro				
				115					120					125					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				
				130					135					140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp				
145					150					155					160				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu				
				165					170					175					
Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu				
				180					185					190					
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				
				195					200					205					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly				
				210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu				
225					230					235					240				
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
				245					250					255					
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
				260					265					270					
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
				275					280					285					
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
				290					295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
305					310					315					320				
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly											
				325															

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> CDR1 từ vùng biến đổi của chuỗi nặng

 $\langle 220 \rangle$

$\langle 221 \rangle$ hỗn tạp

$$\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (1)$$

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

 $\langle 220 \rangle$

$\langle 221 \rangle$ hỗn tạp

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (1)$

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (3)..(3)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (3)..(3)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<400> 29

Xaa Xaa Xaa Met Ala

1

5

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR2 từ vùng biến đổi của chuỗi nặng

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (8)..(8)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (9)..(9)

<223> Xaa có thể là K hoặc T

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (10)..(10)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (11)..(11)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (16)..(16)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (17)..(17)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (17)..(17)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<400> 30

Ser Xaa Ser Tyr Asp Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Ser Val Xaa

1

5

10

15

Xaa

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> CDR3 từ vùng biến đổi của chuỗi nặng

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (3)..(3)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (3)..(3)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (5)..(5)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> hỗn tạp

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <400> 31
 Ala Arg Xaa Gly Xaa Xaa
 1 5
 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR1 từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là S hoặc T
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <400> 32
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Val Asp
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR2 từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa có thể là T hoặc N
 <400> 33
 Gly Xaa Xaa Xaa Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR3 từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ
 <220>
 <221> hỗn tạp

 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (3)..(3)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (4)..(4)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (7)..(7)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (9)..(9)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <220>
 <221> hỗn tạp

<222> (9)..(9)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ
 <400> 34

Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Xaa Xaa Xaa

1

5

Fig. 1

Phân tích SPR các biến thể 8A6WT tương thích với người và N297A, GB3WT và ch8A6WT

	k_{off} [giây ⁻¹]
hu8A6_wt	$9,5 \times 10^{-4}$
hu8A6_N297A	$8,8 \times 10^{-4}$
ch8A6_wt	$4,9 \times 10^{-4}$
chGB3_N297A	1×10^{-2}

Fig. 1: Phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt của 8A6 tương thích với người (hu8A6_VH10+VL6) theo SEQ.ID. No. 3 và 4 ở dạng kiểu đại hoặc N297A, ch8A6_WT (theo SEQ.ID. No. 1 và 2) và chGB3_N297A

Fig.2



Fig. 3

Phân tích FACS thể hiện đặc tính không phong bế của ch8A6_N297A

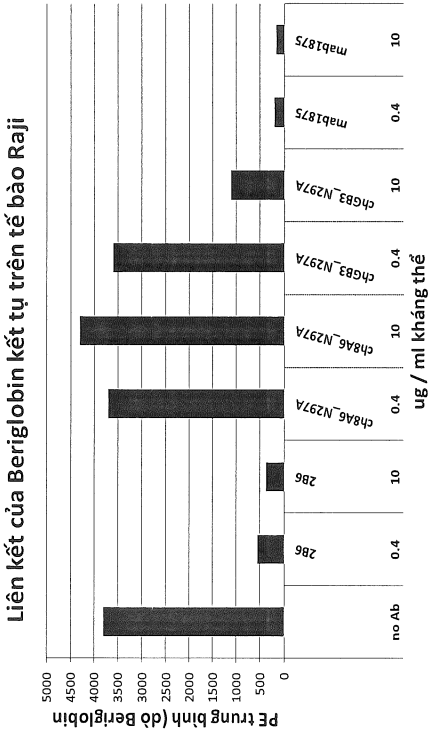


FIG.3: Xác định đặc tính không chặn của ch8A6_N297A. Tế bào Raji được ủ với lượng không đổi IgG kết tụ của người và lượng thay đổi của ch8A6_N297A, ch8B3_N297A hoặc kháng thể chặn 2B6 hoặc mab1875 (R&D). Các kháng thể theo sáng chế là không chặn

Fig. 4
Phân tích FACS tính đặc hiệu liên kết của biến thể 8A6 tương thích với người

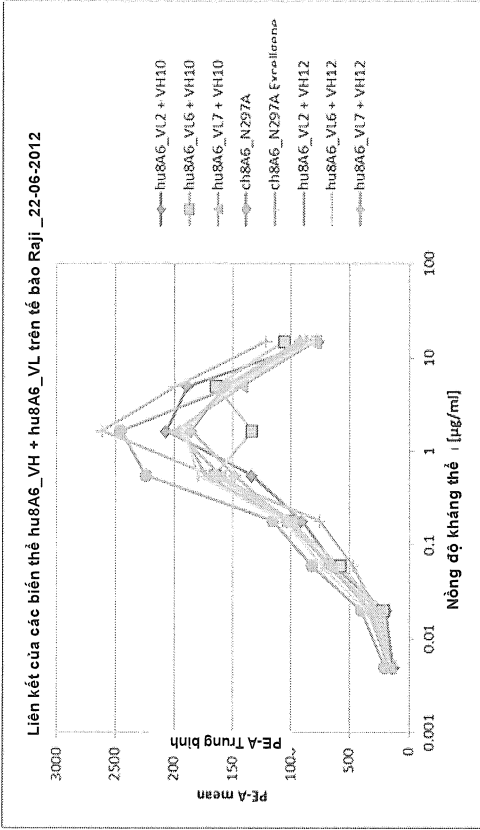


Fig. 4: Liên kết từ 15µg/ml đến 0,005µg/ml của kháng thể Protein A được tinh sạch (hu8A6_VL + hu8A6_VH và ch8A6_N297A) với FcγRIIB nguyên thể được biểu hiện trên tế bào Raji. Các biến thể 8A6 tương thích với người liên kết với ái lực cao với Fcγ RIIB được biểu hiện trên tế bào Raji.

Fig. 6

Quá trình phosphoryl hóa ITIM được làm tăng nhờ ch8A6 trong PBMC từ người cho khỏe mạnh

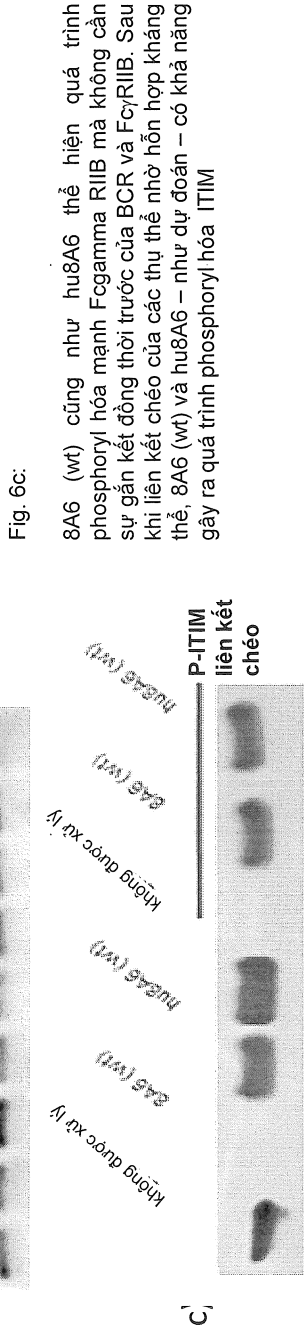
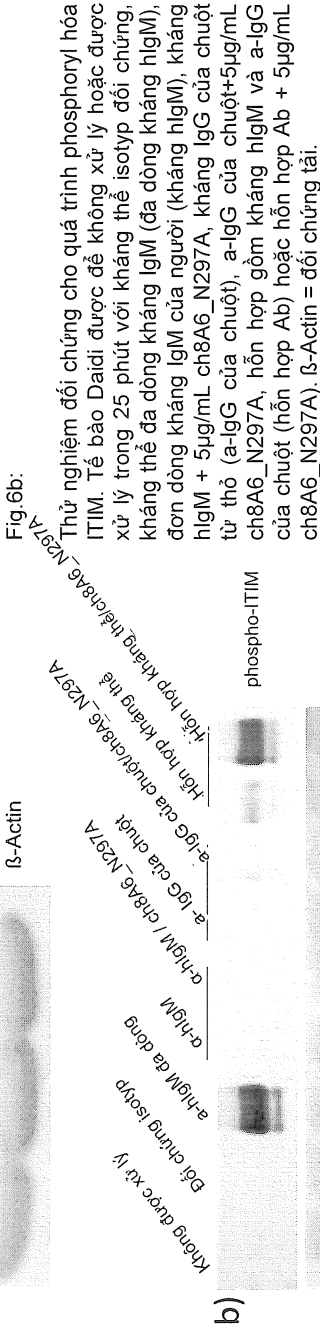
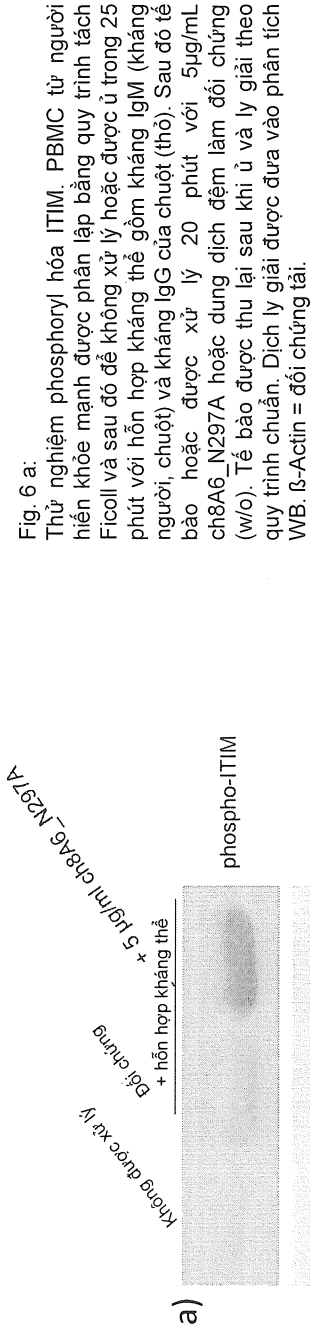


Fig. 7

So sánh ch8A6_N297A với kháng thể từ tình trạng kỹ thuật đã biết (GB3)

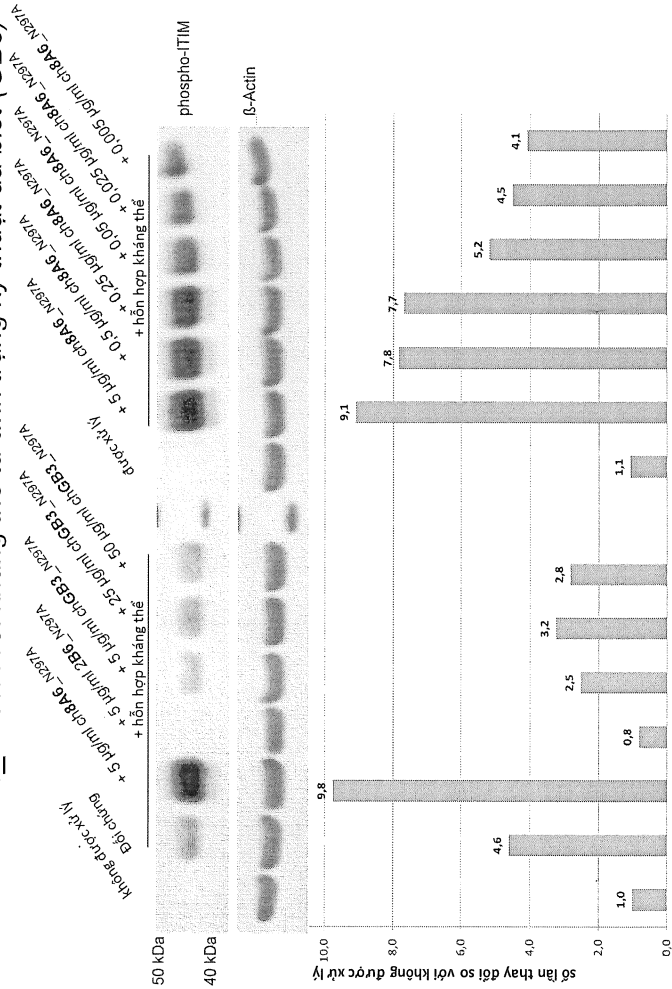


Fig. 7: Thử nghiệm phosphoryl hóa ITIM. Tế bào Daudi được để không xử lý hoặc được ủ trong 25 phút với hỗn hợp kháng thể gồm kháng IgM (kháng người, chuột) và kháng IgG của chuột (thỏ). Sau đó tế bào hoặc được xử lý 20 phút với lượng thay đổi của ch8B3_N297A hoặc ch8A6_N297A hoặc dung dịch đậm làm đối chứng (w/o). Tế bào được thu lại sau khi ủ và ly giải theo quy trình chuẩn. Dịch ly giải được đưa vào phân tích WB. β-Actin = đối chứng tải.

Fig. 8

So sánh hiệu quả của biến thể tương thích với người hu8A6_N297A và chGB3_N297A và ch8A6_N297A lên quá trình phosphoryl hóa ITIM trong PBMC nguyên thủy

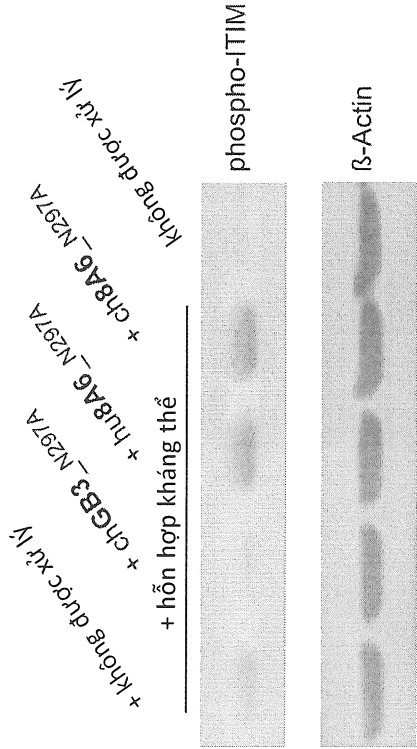


Fig. 8: So sánh hiệu quả của biến thể tương thích với người hu8A6_N297A và chGB3_N297A và ch8A6_N297A về quá trình phosphoryl hóa ITIM trong PBMC nguyên thủy. Sau khi liên kết chéo của BCR và FcγRIIB nhờ hỗn hợp kháng thể này, các kháng thể khác nhau được bổ sung ở nồng độ 5 μg/ml và phân tích thấm tách Western đối với quá trình phosphoryl hóa ITIM được thực hiện. β-Actin = đối chứng tải.

Fig. 9

Sự đồng kết tủa miễn dịch của SHIP-1 được phosphoryl hóa với FcgRIIB

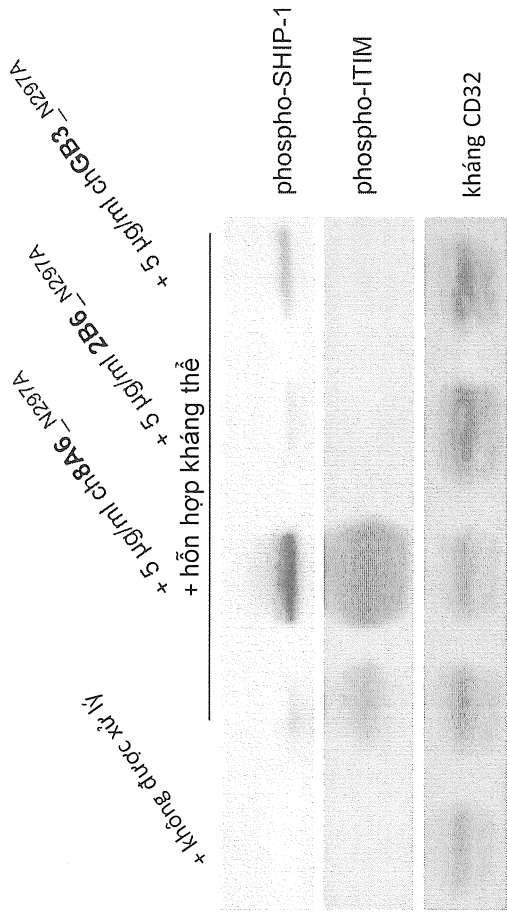


Fig.9: Quá trình kết tủa miễn dịch đồng thời của SHIP-1 được phosphoryl hóa với ITIM của FcgRIIB. Sau khi kích thích tế bào Daudi bằng hỗn hợp kháng thể này và hoặc ch8A6_N297A, kháng thể phong bế kháng FcgRIIB 2B6 hoặc chGB3_N297A (5µg /mL), FcgRIIB được kết tủa từ dịch ly giải tế bào và phân tích thấm tách Western được thực hiện đối với phosphatase SHIP-1. kháng CD32 sử dụng kháng thể pan kháng CD32 (AF1330) = đối chứng tái.

Fig. 10

So sánh các biến thể 8A6 tương thích với người với ch8A6_N297A

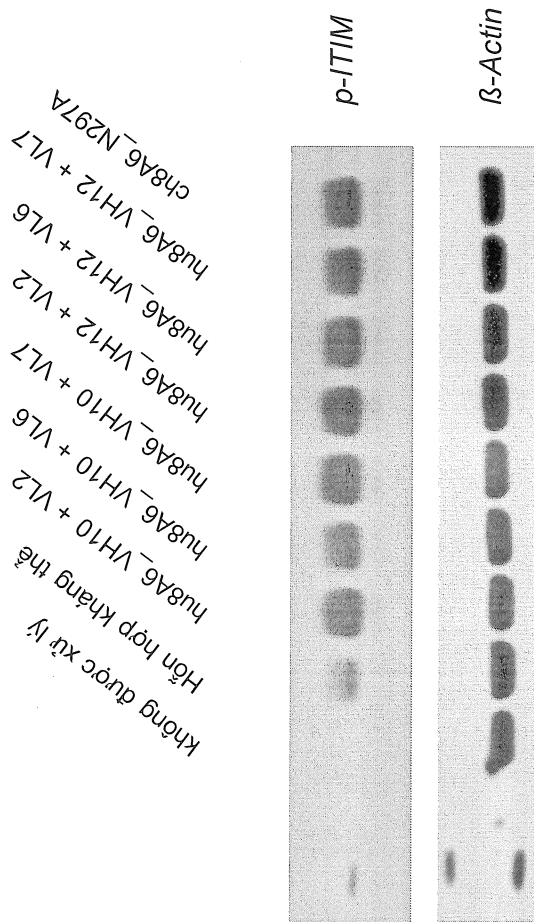


Fig.10:

Thử nghiệm phosphoryl hóa ITIM. Tế bào Daudi được để ủ trong 25 phút với dung dịch đệm (không được xử lý) hoặc hỗn hợp (hỗn hợp kháng thể) chứa kháng IgM (kháng người, chuột) và kháng IgG của chuột (thỏ). Sau đó tế bào hoặc được xử lý 20 phút với 0,25μg/mL ch8A6_N297A hoặc các biến thể 8A6 người hóa (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/ VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7). Tế bào được thu lại sau khi ủ và ly giải theo quy trình chuẩn. Dịch ly giải được đưa vào phân tích WB. β-Actin = đối chứng tải.

Fig. 11

So sánh các biến thể 8A6 tương thích với người với ch8A6_N297A, 2B6 và chGB3_N297A

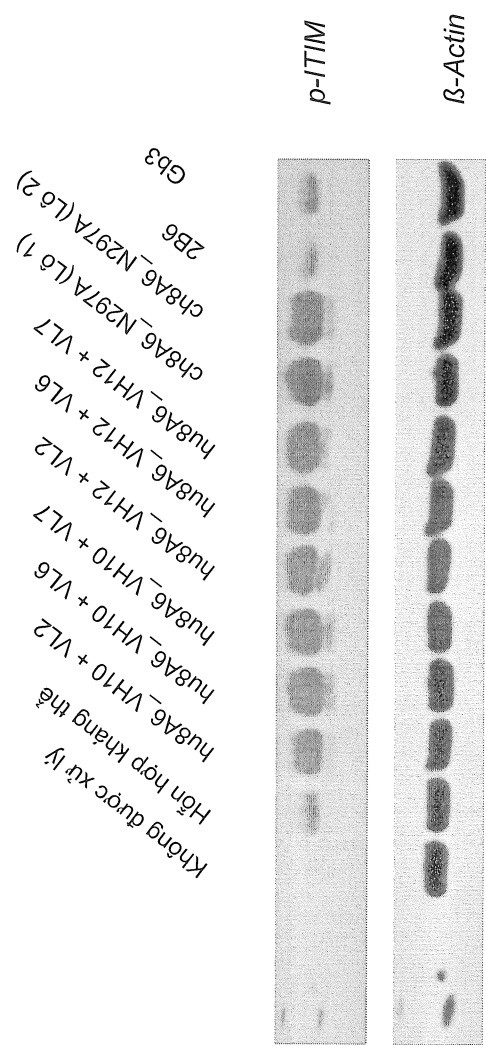


Fig. 11:

Thử nghiệm phosphoryl hóa ITIM. Tế bào Daudi được để ủ trong 25 phút với dung dịch đệm (không được xử lý) hoặc hỗn hợp (hỗn hợp kháng thể) chứa kháng IgM (kháng người, chuột) và kháng IgG của chuột (thỏ). Sau đó tế bào hoặc được xử lý 20 phút với 0,25μg/mL ch8A6_N297A, các biến thể 8A6 tương thích với người (hu8A6-VH10+VL2/VH10+VL6/ VH10+VL7/VH12+VL2/VH12+VL6/VH12+VL7), chèn 2B6 hoặc chGB3_N297A. Tế bào được thu lại sau khi ủ và ly giải theo quy trình chuẩn. Dịch ly giải được đưa vào phân tích WB. β-Actin = đối chứng tải.

Fig.12

Mô hình SLE: Thiết lập thử nghiệm

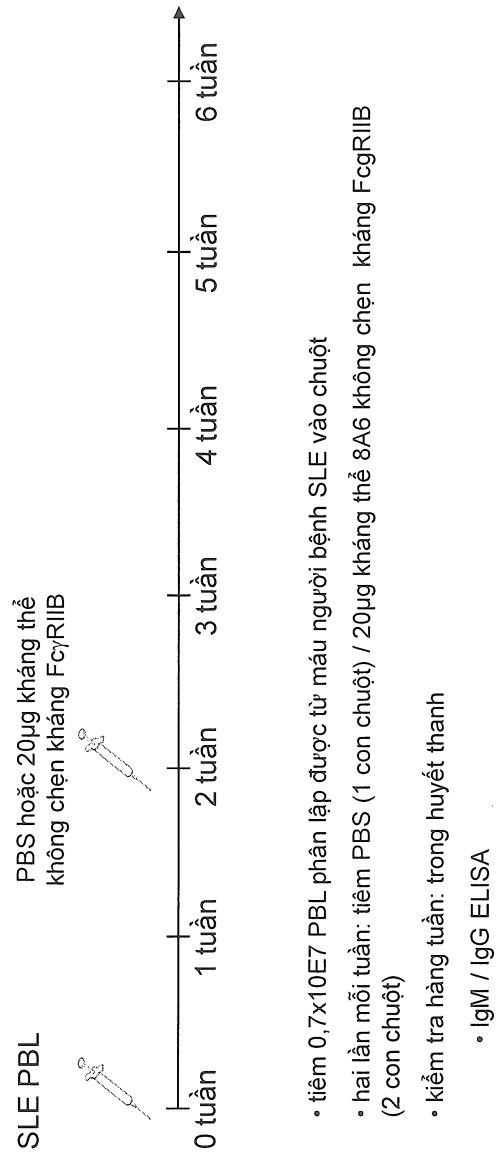


Fig. 12: Thiết lập thử nghiệm cho mô hình chuột SLE-PBL. PBL từ người bệnh SLE của người được chuyển vào chuột gây tổn thương miễn dịch. Tế bào PBL được ghép và sau đó chuột được xử lý với đối chứng (PBS) hoặc kháng thể ch8A6_N297A kháng Fc γ RIIb theo sáng chế.

Fig.13

Mô hình SLE PBL, tổng globulin miễn dịch trong huyết thanh người

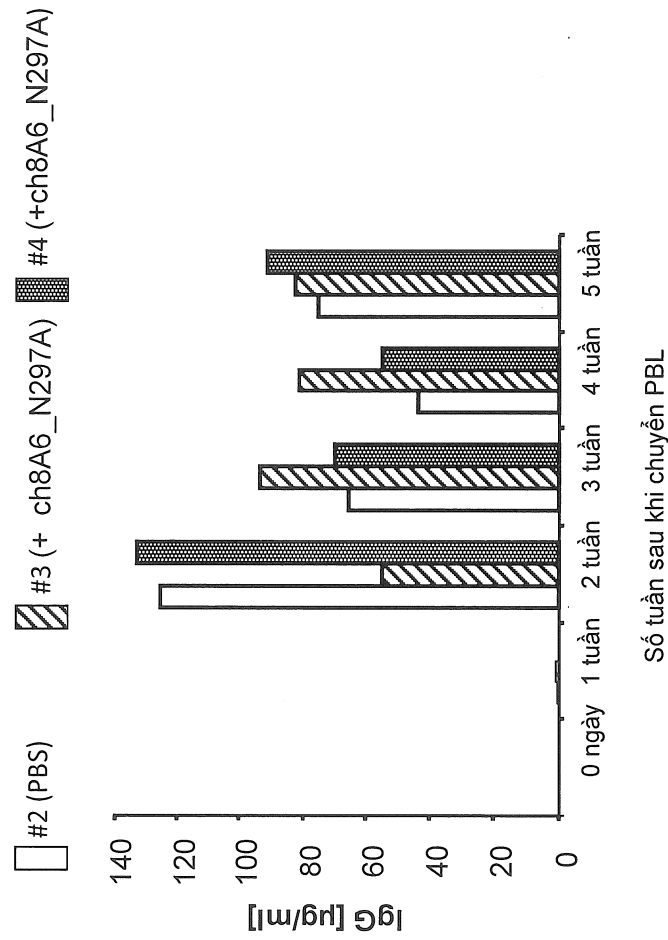


Fig. 13:
Tổng mức IgG của người [µg/mL] ở chuột được ghép PBL từ đối tượng cho là người mắc SLE.
Được mô tả là chuột được xử lý với đối chứng (#2, PBS) hoặc 8A6 thể khảm = ch8A6_N297A (#3 và #4, kháng thể kháng FcgRIIB, dạng N297A). Không có khác biệt đáng kể về tổng IgG của người giữa PBS hoặc kháng FcgRIIB.

Fig. 14

Mô hình SLE PBL, ảnh hưởng lên kháng thể kháng ADN (IgG đặc hiệu bệnh)

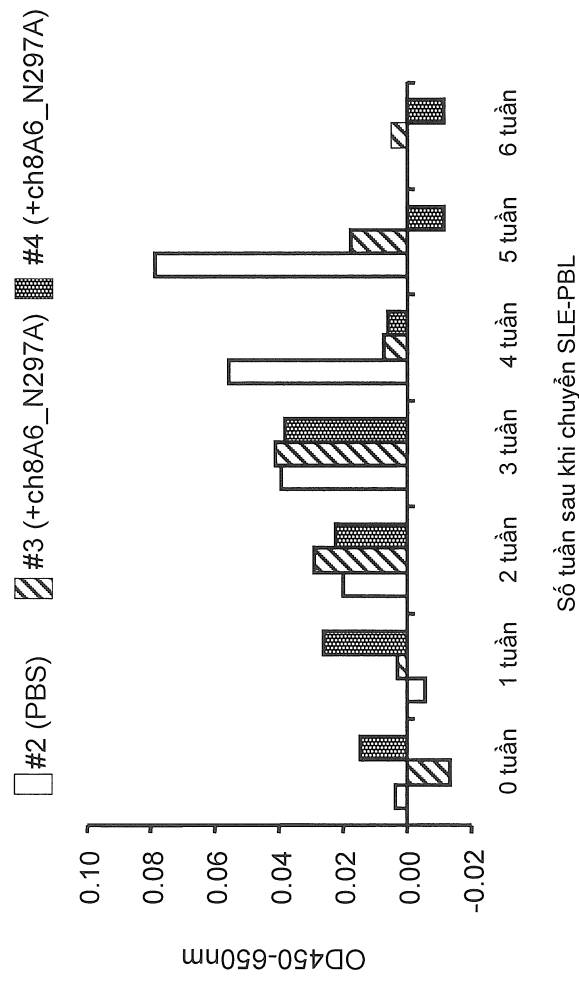


Fig. 14:
Sự giảm IgG đặc hiệu bệnh kháng ADN của người ở chuột được xử lý bằng ch8A6_N297A bắt đầu trong tuần 4 sau khi chuyển/ghép SLE-PBL nhờ sử dụng PBL từ đối tượng cho là người mắc SLE. Được mô tả là độ chuẩn IgG kháng ADN ở hai con chuột khác nhau, #3 và #4 (được xử lý với ch8A6_N297A), #2 thể hiện đối chứng PBS