



(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)



1-0030664

(51)⁷ C12P 21/06

(13) B

(21) 1-2015-03902

(22) 14/03/2014

(86) PCT/US2014/028310 14/03/2014

(87) WO 2014/144061 18/09/2014

(30) 61/792,336 15/03/2013 US

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/03/2016 336A

(73) DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. (US)

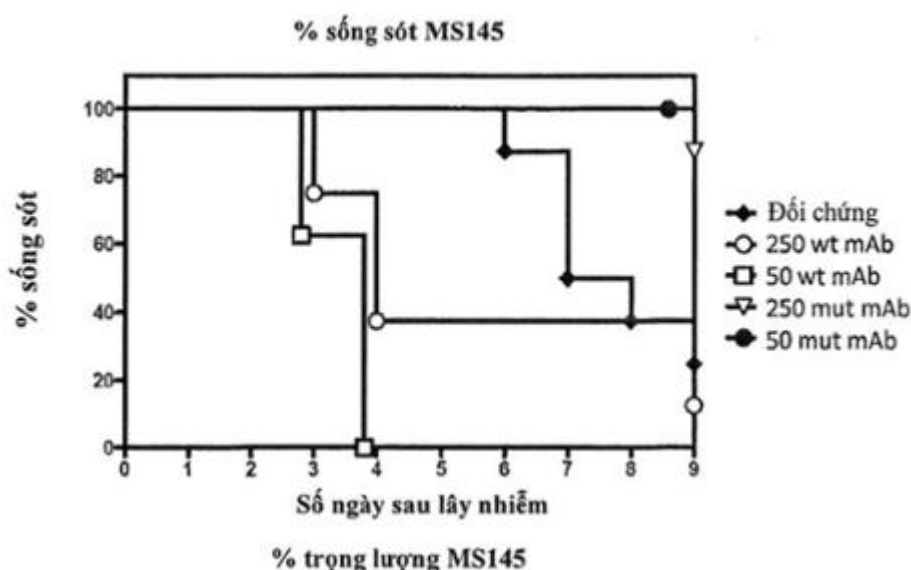
450 Brookline Avenue, Boston, MA 02215, United States of America

(72) MARASCO, Wayne, A. (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ TRUNG HÒA FLAVIVIRUT, TRÌNH TỰ AXIT NUCLEIC, CHUỖI POLYPEPTIT, VECTƠ CHỨA AXIT NUCLEIC VÀ TẾ BÀO SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể trung hòa flavivirut và chế phẩm chứa kháng thể này. Các kháng thể này có nguồn gốc từ mAb 11 mà nhận ra protein E của virut Tây sông Nin và tương tác chéo với các thành viên của họ flavivirut, bao gồm virut sốt xuất huyết. Các kháng thể theo sáng chế ngăn ngừa sự tăng cường lây nhiễm virut phụ thuộc vào kháng thể bằng cách chứa vùng Fc được cải biến không liên kết với thụ thể Fcγ. Kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị lây nhiễm flavivirut và các triệu chứng của nó.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể trung hòa flavivirus, trình tự axit nucleic, chuỗi polypeptit, vector chứa axit nucleic và tế bào sản xuất kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Flavivirus, như virus Tây sông Nin và virus sốt xuất huyết, là mối đe dọa lớn với sức khỏe toàn cầu. Virus Tây sông Nin gây ra bệnh sốt rét có thể dẫn đến viêm màng não gây tử vong hoặc viêm não ở nhiều loài. Cả chim và muỗi đều có thể mang virus Tây sông Nin, cho phép virus này được lan truyền với tốc độ đáng báo động trên toàn thế giới. Tương tự, bốn kiểu huyết thanh của virus sốt xuất huyết có thể được truyền qua vết cắn của muỗi, và gây ra mười triệu ca mắc sốt xuất huyết ở người hàng năm, bao gồm 500000 ca nhập viện và 20000 ca tử vong, với gánh nặng kinh tế sánh ngang với bệnh sốt rét.

Các liệu pháp vaccin và kháng thể gần đây đang được phát triển để ngăn ngừa và điều trị sự lây nhiễm flavivirus. Tuy nhiên, bằng chứng từ sự lây nhiễm virus sốt xuất huyết chỉ ra rằng chiến lược chủng ngừa cho flavivirus có thể không dễ dàng như virus khác. Sự lây nhiễm lần đầu với một kiểu huyết thanh virus sốt xuất huyết kích thích tính miễn dịch bảo vệ đối với kiểu huyết thanh tương đồng. Tuy nhiên, không có sự bảo vệ chéo chống lại sự lây nhiễm bởi kiểu huyết thanh khác. Thay vào đó, tính miễn dịch có sẵn liên quan tới nguy cơ lây nhiễm và bệnh tăng lên do sự tăng cường lây nhiễm phụ thuộc vào kháng thể (ADE). Trong ADE, các kháng thể tăng lên bởi lây nhiễm flavivirus trước đó hoặc được truyền thụ động từ mẹ sang con làm cho tốc độ lây nhiễm và gây độc tăng lên. Do đó, phương pháp thông thường của các liệu pháp sử dụng kháng thể hoặc vaccin chống lại flavivirus có thể tăng theo cấp số nhân tỷ lệ lây nhiễm flavivirus và mắc bệnh.

Do đó, tồn tại nhu cầu cấp bách cho các liệu pháp và phương pháp để ngăn ngừa lây nhiễm flavivirus, và các bệnh và rối loạn liên quan tới nó, mà không tăng nguy cơ tăng cường lây nhiễm phụ thuộc vào kháng thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được đề xuất nhằm mục đích đáp ứng nhu cầu nêu trên.

Sáng chế dựa trên việc phát hiện ra các kháng thể đơn dòng liên kết và trung hòa flavivirus, và không tham gia vào sự tăng cường lây nhiễm flavivirus phụ thuộc vào kháng thể. Kháng thể đơn dòng là hoàn toàn của người. Các kháng thể nhận ra protein vỏ E của virus Tây sông Nin (WNE), và có tương tác chéo rộng giữa các thành viên của họ flavivirus. Quan trọng là, các kháng thể chứa các đột biến trong vùng Fc ngăn chặn liên kết với thụ thể Fc γ . Các kháng thể này trong bản mô tả được gọi là các kháng thể huFV.

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được làm giống như của người được phân lập có chuỗi nặng với ba CDR, trong đó CDR1 bao gồm trình tự axit amin GYSTH (SEQ ID NO:4), trong đó CDR2 bao gồm trình tự axit amin WDNPSSGDTTYAENFRG (SEQ ID NO:5), và trong đó CDR3 bao gồm trình tự axit amin GGDDYSFDH (SEQ ID NO:6), theo thứ tự; chuỗi nhẹ với ba CDR, trong đó CDR1 bao gồm trình tự axit amin RGDSLRSYYAS (SEQ ID NO:7), trong đó CDR2 bao gồm trình tự axit amin GENNRPS (SEQ ID NO:8), và trong đó CDR3 bao gồm trình tự axit amin NSRDSSDHLLL (SEQ ID NO:8), theo thứ tự. Kháng thể có vùng Fc được cải biến để vùng Fc này không liên kết với thụ thể Fc γ , và liên kết với flavivirus. Vùng Fc minh họa được bộc lộ ở đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được làm giống như của người được phân lập có trình tự axit amin V_H có SEQ ID NO: 1, trình tự axit amin V_L có SEQ ID NO: 3. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được làm giống như của người được phân lập chứa trình tự nucleotit V_H có SEQ ID NO: 2, trình tự nucleotit V_L có SEQ ID NO: 4. Kháng thể còn chứa

vùng Fc được cải biến để vùng Fc này không liên kết với thụ thể Fc γ , và liên kết với flavivirut.

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được làm giống như của người được phân lập trung hòa flavivirut.

Sáng chế đề xuất các kháng thể với vùng Fc được cải biến để vùng Fc này không liên kết với thụ thể Fc γ . Vùng Fc được cải biến chứa các đột biến ở các vị trí axit amin 234 và 235. Theo một khía cạnh, các đột biến là L234A và L235A. Theo một phương án, vùng Fc được cải biến chứa vùng CH2 trong đó axit amin ở các vị trí 4 và 5 của vùng CH2 bị đột biến. Ví dụ, axit amin leuxin ở các vị trí 4 và 5 bị đột biến thành axit amin khác, tốt hơn là, alanin. Theo các phương án khác, vùng Fc được cải biến chứa vùng Fc mà axit amin ở các vị trí 108 và 109 bị đột biến. Ví dụ, leuxin ở các vị trí 108 và 109 của vùng Fc bị đột biến thành axit amin khác, tốt hơn là, alanin. Theo phương án khác, vùng Fc được cải biến chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7. Vùng Fc được cải biến liên kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn).

Theo một khía cạnh, kháng thể không tham gia vào sự tăng cường lây nhiễm flavivirut phụ thuộc vào kháng thể.

Theo một khía cạnh, kháng thể được liên kết với chất trị liệu. Chất trị liệu là chất độc, chất đánh dấu phóng xạ, siARN, phân tử nhỏ, hoặc xytokin. Ví dụ, xytokin là TGF-beta.

Sáng chế còn đề xuất tế bào sản xuất kháng thể huFV. Tế bào có thể là tế bào động vật có vú (*nghĩa là*, chuột, thỏ, dê, hoặc cừu), hoặc tế bào thực vật (*nghĩa là* cây thuốc lá).

Sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa sự tăng cường lây nhiễm flavivirut phụ thuộc vào kháng thể bằng cách sử dụng kháng thể huFV cho đối tượng. Theo một khía cạnh, kháng thể được sử dụng sau khi lây nhiễm flavivirut lần đầu.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hiệu quả của vacxin bằng cách cho đối tượng sử dụng kháng thể huFV và vacxin. Theo một khía cạnh, kháng thể huFV và vacxin được sử dụng tuần tự hoặc đồng thời. Theo một khía cạnh, vacxin là vacxin virut.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc làm giảm triệu chứng của lây nhiễm flavivirut bằng cách cho đối tượng có nhu cầu sử dụng chế phẩm chứa kháng thể huFV. Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm lại sự tấn công hoặc tiến triển của một hoặc nhiều triệu chứng lây nhiễm flavivirut. Các triệu chứng lây nhiễm flavivirut bao gồm, nhưng không giới hạn ở, giảm cân, liệt, sốt, đau đầu, buồn nôn, nôn, nổi mẩn da, và đau toàn thân. Theo một khía cạnh, chất kháng virut cũng được sử dụng cho đối tượng. Theo một khía cạnh, kháng thể huFV và chất kháng virut được sử dụng tuần tự hoặc đồng thời. Chất kháng virut là kháng thể, kháng thể liên kết với chất trị liệu, hoặc phân tử nhỏ.

Flavivirut là virut Tây sông Nin, virut sốt xuất huyết (kiểu huyết thanh 1-4), virut viêm não St. Louis, virut sốt vàng da, virut viêm não Nhật Bản, và virut viêm não thung lũng Murray.

Sáng chế còn đề xuất trình tự axit nucleic chứa trình tự axit nucleic là SEQ ID NO: 2, 4 và 8.

Sáng chế còn đề xuất trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi polypeptit là SEQ ID NO: 1 và 3. Sáng chế còn đề xuất chuỗi polypeptit chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, 3 và 7.

Sáng chế còn đề xuất vectơ chứa trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO: 2, 4 và 8, hoặc mã hóa chuỗi polypeptit là SEQ ID NO: 1, 3 và 7.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất tế bào mang vectơ chứa trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO: 2, 4 và 8, hoặc mã hóa chuỗi polypeptit là SEQ ID NO: 1, 3 và 7.

Các dấu hiệu và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ là rõ ràng từ và được bao hàm bởi bản mô tả chi tiết và bộ yêu cầu bảo hộ sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện lược đồ của vector biểu hiện chứa mAb-11 kiểu đại.

Fig. 2 thể hiện lược đồ của vector biểu hiện chứa mAb-11-LALA được thiết kế.

Fig. 3 là một dãy gồm ba biểu đồ thể hiện sự bảo vệ của mAb11 (LALA) chống lại sự lây nhiễm của virus sốt xuất huyết 2 gây chết. (A) Đường cong của sự sống sót Kaplan Meier so sánh sự sống của chuột được sử dụng mAb11 với kiểu đại (wt) hoặc thể đột biến (mut) của vùng Fc. (B) Phần trăm của trọng lượng ban đầu được theo dõi ở chuột được sử dụng mAb11 với kiểu đại (wt) hoặc thể đột biến (mut) của vùng Fc. (C) Điểm lâm sàng được xác định dựa trên vẻ bề ngoài, khả năng di chuyển và thái độ thông thường của chuột được sử dụng mAb11 với kiểu đại (wt) hoặc thể đột biến (mut) của vùng Fc.

Fig. 4 là một dãy gồm ba biểu đồ so sánh tỷ lệ sống sót của chuột được sử dụng mAb11 của động vật có vú với đột biến LALA (mutAb) có nguồn gốc từ tế bào động vật có vú hoặc tế bào thực vật, và sau đó được thách thức với lây nhiễm virus sốt xuất huyết 2 gây chết. (A) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ động vật có vú được so sánh với thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ thực vật. (B) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ động vật có vú được so sánh với kháng thể đối chứng. (C) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ thực vật được so sánh với kháng thể đối chứng.

Fig. 5 là một dãy gồm ba biểu đồ so sánh phần trăm trọng lượng của chuột được sử dụng mAb11 của động vật có vú với đột biến LALA (mutAb) có nguồn gốc từ tế bào động vật có vú hoặc tế bào thực vật, và sau đó được thách thức với lây nhiễm virus sốt xuất huyết 2 gây chết. (A) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ động vật có vú được so sánh với thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ thực vật. (B) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ động vật có vú được so sánh với kháng thể đối chứng. (C) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ thực vật được so sánh với kháng thể đối chứng.

Fig. 6 là một dãy gồm ba biểu đồ so sánh điểm lâm sàng của chuột được sử dụng mAb11 của động vật có vú với đột biến LALA (mutAb) có nguồn gốc từ tế bào động vật có vú hoặc tế bào thực vật, và sau đó được thách thức với lây nhiễm virus sốt xuất huyết 2 gây chết. (A) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ động vật có vú được so sánh với thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ thực vật. (B) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ động vật có vú được so sánh với kháng thể đối chứng. (C) Thể đột biến của kháng thể mAb11 có nguồn gốc từ thực vật được so sánh với kháng thể đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể trung hòa sự lây nhiễm bởi các thành viên của họ flavivirus mà không tham gia vào sự tăng cường lây nhiễm virus phụ thuộc vào kháng thể. Các kháng thể liên kết và trung hòa virus Tây sông Nin được mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO 2005/123774, nội dung của nó được đưa vào bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng cách cải biến kháng thể chống lại virus Tây sông Nin, mAb11, để vùng Fc của kháng thể không liên kết với thụ thể Fc-gamma. Do đó, kháng thể được cải biến không tham gia vào sự tăng cường lây nhiễm phụ thuộc vào kháng thể. Các kháng thể và phương pháp được bộc lộ ở đây liên quan tới kháng thể này, và phương pháp để điều trị hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm bởi flavivirus, và các bệnh và các rối loạn liên quan. Kháng thể theo sáng chế, mAb11-LALA thể hiện khả năng ngăn ngừa và điều trị lây nhiễm flavivirus tăng lên được so sánh với mAb11 kiểu đại, như được mô tả ở đây và thể hiện trong các ví dụ.

mAb11 được nhận diện sử dụng sàng lọc biểu hiện thực khuẩn thể và liên kết với protein vỏ E của virus Tây sông Nin, trong miền DI và DII và cụ thể là ở peptit vòng dung hợp (Gould et al., Journal of Virology, 2005, 79(23):14606-14613; Sultana et al., Journal of Immunology, 2009, 183: 650-660, nội dung của chúng được đưa vào bằng cách viện dẫn toàn bộ). Kháng thể mAb11 được thiết kế với các đột biến ở các vị trí axit amin 234 và 235 trong vùng Fc được chỉ ra ở đây là “mAb11-LALA”.

Các kháng thể theo sáng chế có tương tác chéo rộng với các thành viên của họ flavivirus. Ví dụ, kháng thể thể hiện tương tác chéo và trung hòa của một vài flavivirus khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở virus Tây sông Nin, virus sốt xuất huyết (kiểu huyết thanh 1, 2, 3 và 4), virus viêm não St. Louis, virus sốt vàng da, virus viêm não Nhật Bản, và virus viêm não thung lũng Murray.

Các kháng thể trung hòa đã và đang được phát triển gần đây để điều trị và ngăn ngừa lây nhiễm virus, cụ thể là lây nhiễm bởi các thành viên của chi Flavivirus. Các nghiên cứu ban đầu thể hiện rằng các kháng thể này thể hiện khả năng trung hòa và bảo vệ tăng lên từ sự lây nhiễm bởi các thành viên của họ flavivirus (*nghĩa là*, virus Tây sông Nin hoặc một trong bốn kiểu huyết thanh của virus sốt xuất huyết). Tuy nhiên, các nghiên cứu thách thức virus tiếp theo, trong đó đối tượng thử nghiệm được điều trị với các kháng thể trung hòa và sau đó được thách thức với liều lượng flavivirus (*nghĩa là*, virus sốt xuất huyết), không thể hiện sự giảm lượng virus trong máu. Trong một số trường hợp, điều trị với các kháng thể này dẫn đến sự lây nhiễm tăng cường so với các đối chứng, mà được tin rằng là được trung gian bởi cơ chế được gọi là sự tăng cường phụ thuộc vào kháng thể (ADE). Các kết quả này thể hiện sự quan trọng của việc phát triển các liệu pháp và phương pháp ngăn ngừa sự tăng cường lây nhiễm flavivirus phụ thuộc vào kháng thể.

Sự tăng cường lây nhiễm phụ thuộc vào kháng thể có thể được thiết lập bởi liên kết của vùng Fc của kháng thể với thụ thể Fc γ (Fc γ R) trên tế bào chủ. Do đó, các hạt virus lây nhiễm liên kết với các kháng thể này được đưa vào các tế bào chủ hiệu quả hơn bởi liên kết vùng Fc-thụ thể Fc. Điều này làm tăng sự lây nhiễm và tốc độ tái bản của virus, từ đó tăng cường khả năng lây nhiễm và tính độc của virus.

Trái ngược với các kháng thể kháng virus tiêu chuẩn, các kháng thể theo sáng chế giảm liên kết với thụ thể Fc γ s (Fc γ R) hoặc không liên kết với Fc γ R. Thụ thể Fc γ bao gồm, ví dụ, Fc γ RI, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb, và Fc γ RIIIc. Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế chứa một hoặc nhiều đột biến trong vùng Fc. (Các) đột biến có thể là đột biến bất kỳ làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể với

Fc γ R. Các đột biến có thể là thay thế, chèn thêm, hoặc xóa bỏ axit amin trong vùng Fc. Mặc dù các kháng thể theo sáng chế có vùng Fc đột biến, các kháng thể vẫn truyền khả năng trung hòa flavivirus tiềm năng.

Vùng Fc của kháng thể chứa hai miền, CH2 và CH3. Các miền này, hoặc axit amin cụ thể trong các miền này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, trung gian cho sự tương tác với Fc γ R. Các kháng thể theo sáng chế chứa đột biến bất kỳ (*nghĩa là*, thay thế, chèn thêm, hoặc xóa bỏ một hoặc nhiều hơn một axit amin) trong miền CH2 hoặc CH3, hoặc cả hai, làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể với Fc γ R. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế chứa đột biến hoặc thay thế của ít nhất một axit amin ở các vị trí 233, 234, 235, 236, 237, 250, 314, hoặc 428 của vùng Fc kiểu đại. Tốt hơn là, thay thế axit amin thành alanin.

Theo một phương án, vùng Fc của kháng thể theo sáng chế chứa sự thay thế ở các vị trí 234 hoặc 235 của chuỗi nặng của kháng thể, hoặc cả hai. Nói chung, axit amin ở các vị trí 234 và 235 của vùng Fc kiểu đại là leuxin ("L"). Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế chứa axit amin ở vị trí 234, 235, hoặc cả hai, không phải là leuxin. Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế chứa alanin ("A") ở vị trí 234, 235 hoặc cả hai. Kháng thể chứa các đột biến ở các vị trí 234 và 235 của vùng Fc nơi mà leuxin bị đột biến thành alanin được chỉ ra ở đây là biến thể của "LALA".

Theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể có chiều dài đầy đủ, hoặc nguyên thể, trong đó các kháng thể chứa vùng liên kết kháng nguyên (*nghĩa là*, vùng Fab hoặc mảnh Fab) và vùng Fc (được cải biến hoặc được đột biến, như được mô tả ở đây). Các kháng thể được phát triển trước đây trong lĩnh vực kỹ thuật này được thiết kế để tránh ADE thường thiếu vùng Fc để ngăn ngừa liên kết với Fc γ R. Các kháng thể theo sáng chế cung cấp các đặc tính vượt trội bằng cách giữ lại vùng Fc. Một đặc tính như vậy là khả năng liên kết với thụ thể mới sinh (FcRn) được biểu hiện trên các tế bào nội mô, đóng vai trò quan trọng trong sự cân bằng bên trong của các mức IgG tuần hoàn. Liên kết của các kháng thể tuần hoàn với FcRn kích thích nội bộ hóa qua sự ẩm bào, trong đó các

kháng thể được quay vòng tới bề mặt tế bào, và được giải phóng ở độ pH kiềm của máu. Cơ chế này bảo vệ các kháng thể theo sáng chế không bị phân hủy và làm tăng chu kỳ bán rã được so sánh với các kháng thể không được cải biến khác hoặc các mảnh kháng thể thiếu vùng Fc. Độ bền của các kháng thể theo sáng chế tăng trong huyết thanh dẫn đến hiệu quả tăng bằng cách cho phép mức độ tuần hoàn cao hơn, tần suất sử dụng thấp hơn, và liều lượng giảm đi. Đặc tính khác của các kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm khả năng liên kết với các yếu tố hỗ trợ. Liên kết của các yếu tố hỗ trợ, như C1q, với vùng Fc của kháng thể kích thích tăng tín hiệu để kích hoạt khả năng gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC).

Đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này là các vị trí liên kết trên vùng Fc của thụ thể Fc γ là khác biệt với vị trí liên kết của thụ thể Fc mới sinh (FcRn). Do đó, các kháng thể theo sáng chế có vùng Fc được cải biến sao cho chúng giảm liên kết hoặc không thể liên kết với thụ thể Fc γ , tuy nhiên vẫn là khả biến để liên kết với thụ thể FcRn. Các kháng thể theo sáng chế có thể được cải biến bằng cách đưa đột biến axit amin ngẫu nhiên vào vùng cụ thể của miền CH2 hoặc CH3 của chuỗi nặng để thay đổi ái lực của liên kết với Fc γ R và/hoặc FcRn và/hoặc chu kỳ bán rã huyết thanh của chúng khi so sánh với các kháng thể không được cải biến. Các ví dụ về các biến đổi như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thay thế ít nhất một axit amin từ vùng của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin 234, 235, 236, 237, 250, 314, và 428. Đồng thời, các kháng thể theo sáng chế có chu kỳ bán rã dài hơn các kháng thể không được cải biến, truyền cho hiệu quả tăng lên trong việc ngăn ngừa và điều trị lây nhiễm flavivirus và bệnh sau đó.

Theo một khía cạnh, các kháng thể theo sáng chế có vùng Fc được cải biến sao cho có liên kết giảm hoặc không thể liên kết với thụ thể Fc γ , tuy nhiên vẫn là khả biến để liên kết với các yếu tố hỗ trợ, như C1q.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng tạo ra các kháng thể được cải biến theo sáng chế. Các kỹ thuật ADN tái tổ hợp để đưa các đột biến hoặc thay thế vào trong vùng Fc của kháng thể đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc xác định khả năng liên kết hay không liên kết với thụ

thể Fc (Fc γ hoặc FcRn) của vùng Fc có thể được tiến hành dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ bằng kỹ thuật kết tua miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch, sắc ký ái lực, hoặc kỹ thuật màng.

Các kháng thể được làm giống như của người được mô tả ở đây có thể được tạo ra trong hệ thống biểu hiện của động vật có vú, như tế bào lai. Các kháng thể được làm giống như của người được mô tả ở đây có thể còn được tạo ra bởi hệ thống biểu hiện không phải của động vật có vú, ví dụ, bởi thực vật chuyển gen. Ví dụ, các kháng thể được mô tả ở đây được tạo ra trong cây thuốc lá chuyển gen (*N. benthamiana* và *N. tabaccum*).

Axit nucleic khác nhau và trình tự axit amin của mAb11 theo sáng chế được đề xuất dưới đây:

Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi (V_H):

TRVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSGYSTHW
LRQVPGQGLEWIGWDNPSSGDTTYAENFRGRVTLTRDTSITT
DYLEVRGLRSDDTAVYYCARGGDDYSFDHWGQGTLTVSS
(SEQ ID NO:1)

Trình tự axit nucleic của chuỗi nặng biến đổi (V_H):

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaagtctect
gcaaggcttctggatacaccttcageggctactctacacactggctgcgacaggtccctggacag
ggacttgagtggattggatgggacaaccctagtagtggtgacacgacccatgeagagaatfficgg
ggcaggggtcaccetgaccagggacacgtccatcaccacagattacttgaagtgaggggtetaag
atctgacgacacggccgtetattattglgccagaggeggagatgactacagctttgaccattgggggt
cagggcacctggtcacctctcctca (SEQ ID NO:2)

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi (V_H):

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCRGDSLRSYYASWYQQKPGQ
APVLVIYGENNRPSGIPDRFSGSSSGDTASLTITGAQAEDEADY
YCNSRDSSDHLLFLFG QGTKL (SEQ ID NO: 3)

Trình tự axit nucleic của chuỗi nhẹ biến đổi (V_H):

Tcttctgagctgactcaggaccagctgtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcacatgc
cgaggagacagcctcagaagttattatgcaagctggtagcaacagaagccaggacaggccccctgt
acttgtcatctatgggtgaaaacaaccgaccctcaggatcccagaccgattctctggctccagctca
ggagacacagcttccttgaccatcactggggctcaggcggaagatgaggctgactattactgtaac
tcccgggacagcagtgatcacctctctattcggtggaggggaccaagttgacctcctaggt
(SEQ ID NO: 4)

Vùng Fc chứa ba miền cố định của chuỗi nặng, miền CH1, CH2 hoặc CH3. Vùng bản lề nối vùng CH1 với CH2. Trình tự vùng Fc minh họa cho kiểu đại và vùng Fc được cải biến theo sáng chế được đề xuất dưới đây.

Trình tự axit amin của vùng Fc của mAb-11 kiểu đại được đề xuất như sau:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 5)

Trình tự axit nucleic của vùng Fc của mAb-11 kiểu đại được đề xuất như sau:

CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC
CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAATC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA

ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
 CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
 AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
 CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
 GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
 TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
 AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
 GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
 CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
 GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
 CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 6)

Trình tự axit amin của vùng Fc được cải biến của mAb-11-LALA được đề xuất dưới đây. Ví dụ, axit amin ở các vị trí 108 và 109 bị đột biến. Trong trình tự được đề xuất dưới đây, axit amin leuxin ở vị trí 108 và 109 bị đột biến thành alanin (được gạch chân).

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
 TKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG

QPENNYKTTPVLDSDFSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:7)

Trình tự axit nucleic của vùng Fc được cải biến của mAb-11-LALA được đề xuất dưới đây. Ví dụ, axit amin ở các vị trí 108 và 109 được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được đề xuất bị đột biến từ leuxin thành alanin (được gạch chân).

CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC
CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAATC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA
ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAG
CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 8)

Trình tự axit amin cho vùng CH1 được đề xuất dưới đây:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDDK (SEQ ID NO: 9)

Trình tự axit nucleic cho vùng CH1 được đề xuất dưới đây:

CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC
CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA
ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA (SEQ ID
NO: 10)

Kháng thể mAb11 được mô tả ở đây có thể chứa đột biến cụ thể là trong vùng CH2 mà làm giảm hoặc ức chế liên kết với thụ thể Fcγ. Tốt hơn là, đột biến này không ảnh hưởng đến liên kết với thụ thể FcRn. Tốt hơn là, kháng thể mAb11 chứa hai đột biến trong vùng CH2, để hai leuxin liền kề bị đột biến thành alanin được mô tả dưới đây. Ví dụ, các đột biến nằm ở các vị trí axit amin 4 và 5 của vùng CH2. Tốt hơn là, các đột biến là thành alanin.

Trình tự axit amin cho vùng CH2 của kháng thể mAb11 kiểu đại được đề xuất dưới đây:

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO: 11)

Trình tự axit nucleic cho vùng CH2 của kháng thể mAb11 kiểu đại được đề xuất dưới đây:

GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
 TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
 CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC
 CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA (SEQ ID
 NO: 12)

Trình tự axit amin cho vùng CH₂ của thể đột biến của kháng thể mAb11
 được đề xuất dưới đây (đột biến LALA được gạch chân):

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO: 13)

Trình tự axit nucleic cho vùng CH₂ của thể đột biến của kháng thể mAb11
 được đề xuất dưới đây (đột biến LALA được gạch chân):

GCACCTGAAGCCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
 TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
 CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC
 CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA (SEQ ID
 NO: 14)

Trình tự axit amin cho vùng CH₃ của kháng thể mAb11 được đề xuất dưới
 đây:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15)

Trình tự axit nucleic cho vùng CH3 của kháng thể mAb11 được đề xuất dưới đây:

GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
 CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA
 CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
 AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 16)

Trình tự axit amin cho vùng bản lề được đề xuất dưới đây:

AEPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 17)

Trình tự axit nucleic cho vùng bản lề được đề xuất dưới đây:

GCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGC
 CCA (SEQ ID NO: 18)

Trình tự axit amin của chuỗi nặng (bao gồm cả hai vùng biến đổi và cố định) của mAb-11 kiểu đại được đề xuất dưới đây:

TRVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSGYSTHWLR
 QVPGQGLEWIGWDNPSSGDTTYAENFRGRVTLTRDTSITTDYLE
 VRGLRSDDTAVYYCARGGDDYSFDHWGQGTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDSFGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)

Trình tự axit amin của chuỗi nặng (bao gồm cả hai vùng biến đổi và cố định) của thể đột biến của mAb-11 được đề xuất dưới đây (đột biến LALA được gạch chân):

TRVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSGYSTHWLR
 QVPGQGLEWIGWDNPSSGDTTYAENFRGRVTLTRDTSITTDYLE
 VRGLRSDDTAVYYCARGGDDYSFDHWGQGTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TTPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KAEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDSFGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)

Các kháng thể

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" chỉ phân tử globulin miễn dịch và các phần hoạt hóa miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch (Ig), *nghĩa là*, các phân tử chứa vị trí liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu (tương tác miễn dịch với) kháng nguyên. Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc "tương tác miễn dịch với" nghĩa là kháng thể tương tác với một hoặc nhiều yếu tố quyết định kháng nguyên của kháng nguyên mong muốn và không tương tác với chuỗi polypeptit khác. Các kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, và kháng thể khảm.

Nói chung, các phân tử kháng thể thu được từ người liên quan tới lớp bất kỳ trong số các lớp IgG, IgM, IgA, IgE và IgD, khác nhau về bản chất của chuỗi nặng có trong phân tử. Các lớp nhất định cũng có các phân lớp, như IgG₁, IgG₂, và các phân lớp khác. Hơn nữa, ở người, chuỗi nhẹ có thể là chuỗi kappa hoặc chuỗi lambda. Thuật ngữ "vị trí liên kết kháng nguyên," hoặc "phần liên kết" chỉ phần của phân tử globulin miễn dịch mà tham gia vào liên kết kháng nguyên. Vị trí liên kết kháng nguyên được tạo thành bởi các gốc axit amin của vùng biến đổi ("V") của đầu tận N của chuỗi nặng ("H") và nhẹ ("L"). Ba đoạn kéo dài rất khác nhau bên trong vùng V của chuỗi nặng và nhẹ, chỉ "vùng siêu biến đổi," được xen vào giữa các đoạn kéo dài hai bên được bảo toàn hơn được biết đến là "vùng khung," hoặc "FR". Do đó, thuật ngữ "FR" chỉ trình tự axit amin được tìm thấy tự nhiên giữa, và liền kề với, vùng siêu biến đổi trong globulin miễn dịch. Trong phân tử kháng thể, ba vùng siêu biến đổi của chuỗi nhẹ và ba vùng siêu biến đổi của chuỗi nặng được bố trí liên quan tới nhau trong không gian ba chiều để tạo thành bề mặt liên kết kháng nguyên. Bề mặt liên kết kháng nguyên là bổ trợ với bề mặt ba chiều của kháng nguyên liên kết, và ba vùng siêu biến đổi của mỗi chuỗi nặng và nhẹ chỉ "vùng quyết định bổ trợ," hoặc "CDR."

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "epitop" chứa yếu tố quyết định protein bất kỳ có khả năng liên kết đặc hiệu với globulin miễn dịch, scFv, hoặc thụ thể của tế bào T. Yếu tố quyết định epitop thường chứa nhóm phân tử bề mặt hoạt hóa về mặt hóa học như axit amin hoặc nhánh bên của đường và thường có các đặc tính cấu trúc ba chiều, cũng như các đặc tính điện tích đặc hiệu. Ví dụ, các kháng thể có thể tăng lên chống lại peptit của đầu tận N hoặc đầu tận C của chuỗi polypeptit.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "liên kết miễn dịch," và "các đặc tính liên kết miễn dịch" chỉ kiểu tương tác không phải cộng hóa trị xảy ra giữa phân tử globulin miễn dịch và kháng nguyên mà globulin miễn dịch là đặc hiệu. Độ mạnh, hoặc ái lực của tương tác liên kết miễn dịch có thể được biểu hiện là hằng số phân ly (K_d) của tương tác, trong đó K_d càng nhỏ thể hiện ái lực càng lớn. Các đặc tính liên kết miễn dịch của chuỗi polypeptit được chọn có thể được định lượng sử dụng

phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp như vậy dẫn đến xác định tỷ lệ của vị trí liên kết kháng nguyên/sự tạo thành và phân ly của phức hệ kháng nguyên, trong đó các tỷ lệ đó phụ thuộc vào hàm lượng của các thành viên của phức hệ, ái lực của tương tác, và các thông số hình học có ảnh hưởng tương đương lên tỷ lệ này trong cả hai hướng. Do đó, cả "hằng số tỷ lệ liên kết" (K_{on}) và "hằng số tỷ lệ phân ly" (K_{off}) có thể được xác định bằng cách tính toán hàm lượng và tỷ lệ liên kết và phân ly thực tế. (Xem Nature 361:186-87 (1993)). Tỷ số K_{off}/K_{on} cho phép hủy bỏ tất cả các thông số liên quan tới ái lực, và bằng hằng số phân ly K_d . (Xem, thông thường, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Kháng thể theo sáng chế được cho là liên kết đặc hiệu với epitop của flavivirut khi hằng số liên kết cân bằng (K_d) $\leq 1 \mu M$, tốt hơn là ≤ 100 nM, tốt hơn nữa là ≤ 10 nM, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ ≤ 100 pM đến khoảng 1 pM, được xác định bởi các thử nghiệm như các thử nghiệm liên kết phối tử phóng xạ hoặc các thử nghiệm tương tự đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Protein của flavivirut (nghĩa là, protein vỏ hoặc protein vỏ E của virut Tây sông Nin) theo sáng chế, hoặc dẫn xuất của nó, mảnh của nó, protein tương đồng của nó, protein đồng dạng của nó hoặc protein cùng nguồn với nó, có thể được sử dụng làm chất gây miễn dịch trong việc sản xuất các kháng thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với các thành phần protein này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng có thể xác định, không có thử nghiệm bất thường, nếu kháng thể đơn dòng của người có tính đặc hiệu giống với kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế bằng cách xác định liệu rằng kháng thể trước có ngăn kháng thể sau liên kết với flavivirut không. Nếu kháng thể đơn dòng của người đang được thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế, như được thể hiện bởi việc giảm liên kết bởi kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế, thì có khả năng là hai kháng thể đơn dòng liên kết với cùng một epitop, hoặc với epitop có liên hệ gần.

Phương pháp khác để xác định liệu rằng kháng thể đơn dòng của người có tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế là cho kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế được ủ trước với protein vỏ của flavivirut, như protein E của virut Tây sông Nin, với phản ứng bình thường, và sau đó bổ sung kháng thể đơn dòng của người đang được thử nghiệm để xác định xem liệu khả năng liên kết protein vỏ của flavivirut của kháng thể đơn dòng của người đang được thử nghiệm có bị ức chế, như protein E của virut Tây sông Nin. Nếu kháng thể đơn dòng của người đang được thử nghiệm bị ức chế thì, trong tất cả trường hợp, nó có tính đặc hiệu epitop giống với, hoặc tương đương về chức năng với, kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Sàng lọc các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế, có thể còn được tiến hành bằng cách sử dụng WNE và xác định liệu rằng kháng thể đơn dòng thử nghiệm có khả năng trung hòa các thành viên của họ flavivirut không.

Các quy trình khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể đa dòng hoặc các kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại protein theo sáng chế, hoặc chống lại các dẫn xuất của nó, các mảnh của nó, các protein tương đồng của nó, các protein đồng dạng của nó hoặc các protein cùng nguồn với nó. (*Xem, ví dụ, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, và Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn*).

Các kháng thể có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi, như sắc ký ái lực sử dụng protein A hoặc protein G, cung cấp chủ yếu phân đoạn IgG của huyết thanh miễn dịch. Sau đó, hoặc theo cách khác, kháng nguyên đặc hiệu là đích tìm kiếm của globulin miễn dịch, hoặc epitop của nó, có thể được cố định trên cột để tinh chế kháng thể đặc hiệu miễn dịch bởi sắc ký ái lực miễn dịch. Tinh chế globulin miễn dịch được thảo luận, ví dụ, bởi D. Wilkinson (*The Scientist, được công bố bởi The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28*).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "MAb" hoặc "chế phẩm kháng thể đơn dòng", như được dùng ở đây, chỉ tập hợp các phân tử kháng thể bao gồm chỉ một loại phân tử của phân tử kháng thể chứa sản phẩm của gen chuỗi nhẹ duy nhất và sản phẩm của gen chuỗi nặng duy nhất. Cụ thể là, vùng quyết định bổ trợ (CDR) của kháng thể đơn dòng là giống nhau trong tất cả các phân tử của tập hợp. MAb chứa vị trí liên kết kháng nguyên có khả năng tương tác miễn dịch với epitop đặc hiệu của kháng nguyên được xác định bởi ái lực liên kết duy nhất với nó.

Các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra sử dụng phương pháp tế bào lai, như các phương pháp được mô tả bởi Kohler và Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Trong phương pháp tế bào lai, chuột, chuột lang, hoặc động vật chủ thích hợp khác, thường được chủng ngừa với chất tiêm chủng để kích thích các limphô bào sản xuất hoặc có khả năng sản xuất các kháng thể sẽ liên kết đặc hiệu với chất tiêm chủng. Nói cách khác, các limphô bào có thể được tiêm chủng *in vitro*.

Chất tiêm chủng sẽ thường bao gồm kháng nguyên protein, mảnh của nó hoặc protein dung hợp của nó. Thông thường, mong muốn các limphô bào ngoại biên của máu được sử dụng nếu các tế bào có nguồn gốc từ người, hoặc mong muốn các tế bào lá lách hoặc các tế bào hạch bạch huyết được sử dụng nếu nguồn động vật có vú không phải người. Các limphô bào sau đó được dung hợp với dòng tế bào được làm cho bất tử sử dụng chất dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo thành tế bào lai tế bào (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Dòng tế bào được làm cho bất tử thường là tế bào động vật có vú được biến nạp, cụ thể là các tế bào u tủy có nguồn gốc động vật gặm nhấm, bò và người. Thông thường, dòng tế bào u tủy của chuột *rattus* hoặc chuột được sử dụng. Các tế bào lai có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp mà tốt hơn là chứa một hoặc nhiều cơ chất ức chế sinh trưởng hoặc khả năng sống sót của các tế bào được làm cho bất tử và không được dung hợp. Ví dụ, nếu các tế bào bố mẹ thiếu enzym hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), môi trường nuôi cấy cho các tế

bào lai thường sẽ bao gồm hypoxanthin, aminopterin, và thymidin ("môi trường HAT"), cơ chất ngăn ngừa sinh trưởng của các tế bào thiếu HGPRT.

Dòng tế bào được làm cho bất tử được ưu tiên là các dòng mà dung hợp hiệu quả, hỗ trợ mức độ biểu hiện cao ổn định của kháng thể bởi các tế bào sản xuất kháng thể được chọn, và nhạy cảm với môi trường như môi trường HAT. Dòng tế bào được làm cho bất tử được ưu tiên hơn là dòng u tủy ở chuột, có thể thu được, ví dụ, từ Trung tâm phân phối tế bào Viện Salk, San Diego, California và Bộ sưu tập kiểu nuôi cấy ở Mỹ, Manassas, Virginia. Dòng tế bào dị u tủy chuột-người và u tủy người cũng được mô tả để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người. (Xem Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

Môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào lai được nuôi cấy có thể sau đó được thử nghiệm cho sự có mặt của các kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại kháng nguyên. Tốt hơn là, tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể đơn dòng được sản xuất bởi các tế bào lai được xác định bởi kết tủa miễn dịch hoặc bởi thử nghiệm liên kết *in vitro*, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Các kỹ thuật và các thử nghiệm này đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng có thể, ví dụ, được xác định bởi phân tích Scatchard của Munson và Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Hơn nữa, trong các ứng dụng trị liệu của các kháng thể đơn dòng, quan trọng là nhận diện các kháng thể có mức độ đặc hiệu cao và ái lực liên kết cao với kháng nguyên đích.

Sau khi các tế bào lai mong muốn được nhận diện, các dòng có thể được tách dòng bằng cách hạn chế các quy trình pha loãng và nuôi cấy bởi các phương pháp tiêu chuẩn. (Xem Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Môi trường nuôi cấy thích hợp cho mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường Eagle được cải biến Dulbecco và môi trường

RPMI-1640. Nói cách khác, các tế bào lai có thể được nuôi cấy *in vivo* như cổ trướng ở động vật có vú.

Các kháng thể đơn dòng được tiết ra bởi các dòng tách dòng có thể được phân lập hoặc được tinh chế từ môi trường nuôi cấy hoặc dịch lỏng của cổ trướng bằng các quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharosa, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực.

Các kháng thể đơn dòng có thể còn được tạo ra nhờ phương pháp ADN tái tổ hợp, như các phương pháp được mô tả trong Patent Mỹ số 4816567. ADN mã hóa các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn dò oligonucleotit có khả năng liên kết đặc hiệu với các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể của chuột). Các tế bào lai theo sáng chế đóng vai trò nguồn được ưu tiên của ADN này. Sau khi được phân lập, ADN có thể được đặt trong vectơ biểu hiện, sau đó được gây nhiễm vào các tế bào chủ như các tế bào COS của khi, các tế bào trứng của chuột lang Trung Quốc (CHO), hoặc các tế bào u tủy không sản xuất protein globulin miễn dịch, để thu được các kháng thể đơn dòng tổng hợp trong các tế bào chủ tái tổ hợp. ADN còn có thể được cải biến, ví dụ, bằng cách thay thế trình tự mã hóa cho miền cố định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người ở vị trí của trình tự đồng dạng ở chuột (xem Patent Mỹ số 4816567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) hoặc bằng cách liên kết cộng hóa trị trình tự mã hóa globulin miễn dịch với tất cả hoặc một phần của trình tự mã hóa chuỗi polypeptit không phải globulin miễn dịch. Chuỗi polypeptit không phải globulin miễn dịch này có thể được thay thế cho miền cố định của kháng thể theo sáng chế, hoặc có thể được thay thế cho miền biến đổi của vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế để tạo ra kháng thể khảm hóa trị hai.

Các kháng thể toàn vẹn của người là các phân tử kháng thể trong đó toàn bộ trình tự của cả hai chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, bao gồm CDR, tạo ra từ các gen của người. Các kháng thể này được gọi là “các kháng thể được làm giống như của người”, “các kháng thể của người”, hoặc “các kháng thể toàn vẹn của người” trong

bản mô tả này. Các kháng thể đơn dòng của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật lai tế bào; kỹ thuật lai tế bào B của người (xem Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72); và kỹ thuật tế bào lai EBV để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người (xem Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Các kháng thể đơn dòng của người có thể được sử dụng và có thể được sản xuất bằng cách sử dụng tế bào lai của người (xem Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) hoặc bằng cách biến đổi *in vitro* tế bào B của người với virut Epstein Barr (xem Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Ngoài ra, các kháng thể được làm giống như của người có thể được sản xuất ở thực vật chuyển gen, là phương pháp sản xuất khác rẻ hơn hệ động vật có vú đang sẵn có. Ví dụ, thực vật chuyển gen có thể là cây thuốc lá, *nghĩa là, Nicotiana benthamiana*, và *Nicotiana tabaccum*. Các kháng thể được tinh chế từ lá cây. Sự biến đổi ổn định của thực vật có thể đạt được bằng cách sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* hoặc kỹ thuật bắn hạt. Ví dụ, vectơ biểu hiện axit nucleic chứa ít nhất là trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được biểu hiện trong nuôi cấy vi khuẩn, *nghĩa là, chủng A. tumefaciens* BLA4404, qua chuyển gen. Có thể thiết lập sự thâm vào thực vật nhờ việc tiêm. Phần chiết của lá dạng hòa tan có thể được tạo ra bằng cách nghiền mô lá trong cối và bằng cách ly tâm. Phân lập và tinh chế các kháng thể có thể dễ dàng được tiến hành bởi nhiều phương pháp đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp khác để sản xuất kháng thể trong thực vật được mô tả trong, ví dụ, Fischer et al., Vaccine, 2003, 21:820-5; và Ko et al, Current Topics in Microbiology và Immunology, Vol. 332, 2009, pp. 55-78. Như vậy, sáng chế còn đề xuất tế bào hoặc thực vật bất kỳ chứa vectơ mã hóa kháng thể theo sáng chế, hoặc sản xuất kháng thể theo sáng chế.

Ngoài ra, các kháng thể của người có thể còn được sản xuất sử dụng kỹ thuật bổ sung, bao gồm thư viện biểu hiện thực khuẩn thể. (Xem Hoogenboom và Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Tương

tự, các kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách đưa các locus của globulin miễn dịch của người vào động vật chuyển gen, ví dụ, chuột trong đó các gen globulin miễn dịch nội sinh được kích hoạt một phần hoặc hoàn toàn. Sau khi thách thức, việc sản xuất kháng thể của người được quan sát, gần giống với việc sản xuất kháng thể được thấy ở người về mọi mặt, bao gồm sự sắp xếp lại gen, sự lắp ghép gen, và kho kháng thể. Phương thức này được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016, và trong Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); và Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Ngoài ra, các kháng thể của người có thể được sản xuất sử dụng động vật chuyển gen không phải người được cải biến để sản xuất các kháng thể toàn vẹn của người hơn là các kháng thể nội sinh của động vật để đáp ứng thách thức bởi kháng nguyên. (Xem công bố đơn PCT WO94/02602). Các gen nội sinh mã hóa chuỗi globulin miễn dịch nặng và nhẹ ở vật chủ không phải người là bất lực, và các locus hoạt hóa mã hóa globulin miễn dịch của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người được chèn vào hệ gen của vật chủ. Các gen của người được đưa vào, ví dụ, sử dụng nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men chứa phân đoạn ADN cần thiết của người. Sau đó thu được động vật mà cung cấp tất cả các biến đổi mong muốn là thế hệ con cháu bằng cách lai giống động vật chuyển gen trung gian chứa ít hơn hỗ trợ đầy đủ của các biến đổi. Phương án được ưu tiên của động vật không phải người này là chuột, và được gọi là XenomouseTM như được bộc lộ trong công bố đơn PCT WO 96/33735 và WO 96/34096. Động vật này sản xuất các tế bào B tiết ra globulin miễn dịch toàn vẹn của người. Có thể thu được trực tiếp các kháng thể từ động vật sau khi tiêm chủng với chất gây miễn dịch được quan tâm, ví dụ, sản xuất kháng thể đa dòng, hoặc nói cách khác từ các tế bào B có nguồn gốc từ động vật được làm cho bất tử, như tế bào lai sản xuất các kháng thể đơn dòng. Ngoài ra, các gen mã hóa globulin miễn dịch với vùng biến đổi của người có thể được khôi phục và được

biểu hiện để thu được các kháng thể trực tiếp, hoặc có thể còn được cải biến để thu được các kháng thể tương đồng, ví dụ, các phân tử chuỗi đơn Fv (scFv).

Ví dụ của phương pháp sản xuất vật chủ không phải người, được minh họa là chuột, thiếu sự biểu hiện của chuỗi nặng của globulin miễn dịch nội sinh được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5939598. Có thể thu được bởi phương pháp, bao gồm xóa bỏ gen phân đoạn J ở ít nhất một locus của chuỗi nặng nội sinh trong tế bào gốc phôi để ngăn chặn sự sắp xếp lại của locus và ngăn chặn sự tạo thành sản phẩm phiên mã của locus của chuỗi nặng của globulin miễn dịch được sắp xếp lại, sự xóa bỏ bị ảnh hưởng bởi vector đích chứa gen mã hóa chỉ thị chọn lọc; và sản xuất từ tế bào gốc phôi của chuột chuyển gen có các tế bào sinh dưỡng và các tế bào mầm chứa gen mã hóa chỉ thị chọn lọc.

Một phương pháp sản xuất kháng thể được quan tâm, như kháng thể của người, được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5916771. Phương pháp này bao gồm bước đưa vector biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng vào một tế bào chủ của động vật có vú trong nuôi cấy, bước đưa vector biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ vào tế bào chủ của động vật có vú khác, và bước dung hợp hai tế bào này để tạo thành tế bào lai. Tế bào lai này biểu hiện kháng thể chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã nêu.

Theo quy trình được cải biến khác từ quy trình này, phương pháp nhận diện epitop có liên quan về mặt lâm sàng trên chất gây miễn dịch và phương pháp tương quan để chọn lọc kháng thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với epitop có liên quan với ái lực cao, được bộc lộ trong công bố đơn PCT WO 99/53049.

Kháng thể có thể được biểu hiện bởi vector chứa phân đoạn ADN mã hóa kháng thể chuỗi đơn được mô tả phía trên.

Chúng có thể bao gồm vector, liposom, ADN trần, ADN phụ hỗ trợ, súng bắn gen, ống dò, v.v.. Vector bao gồm các tiếp hợp hóa học như được mô tả trong WO 93/64701, mang nhóm đích (ví dụ phối tử với thụ thể bề mặt tế bào), và nhóm liên kết axit nucleic (ví dụ polylysine), vector virus (ví dụ vector virus ADN hoặc ARN),

protein dung hợp như được mô tả trong PCT/US 95/02140 (WO 95/22618) là protein dung hợp chứa nhóm đích (ví dụ kháng thể đặc hiệu cho tế bào đích) và nhóm liên kết axit nucleic (ví dụ protamin), plasmit, thực khuẩn thể, v.v.. Vector có thể là nhiễm sắc thể, không phải nhiễm sắc thể hoặc tổng hợp.

Vector được ưu tiên bao gồm vector virus, protein dung hợp và các tiếp hợp hóa học. Vector retrovirus bao gồm vi rút bệnh bạch cầu ở chuột moloney. Vector virus ADN được ưu tiên. Các vector này bao gồm vector virus đậu mùa như vector orthopox hoặc avipox, vector herpesvirus như vector virus herpes simplex I (HSV) (xem Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., trong DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990), Adenovirus Vectors (xem LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Gent 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995) và Adeno-associated Virus Vector (xem Kaplitt, M. G.. et al., Nat. Gent. 8:148 (1994).

Vector virus đậu mùa đưa gen vào tế bào chất của các tế bào. Vector virus avipox chỉ dẫn đến biểu hiện ngắn hạn của axit nucleic. Vector adenovirus, vector virus liên quan tới adenovirus và vector virus herpes simplex (HSV) được ưu tiên để đưa axit nucleic vào các tế bào trung hòa. Vector adenovirus dẫn đến biểu hiện ngắn hạn hơn (khoảng 2 tháng) vector virus liên quan tới adenovirus (khoảng 4 tháng), vector mà ngắn hạn hơn vector HSV. Vector cụ thể được chọn sẽ phụ thuộc vào tế bào đích và tình trạng bệnh đang được điều trị. Có thể sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn để đưa vector vào, ví dụ sự lây nhiễm, gây nhiễm, tải nạp hoặc biến nạp. Các ví dụ về phương thức chuyển gen bao gồm ví dụ, ADN trần, kết tủa CaPO_4 , dextran DEAE, sự mở lỗ bằng điện, dung hợp tế bào trần, lây nhiễm qua hạt liposom, vi tiêm tế bào, và vector virus.

Vector có thể được sử dụng để nhắm đích tế bào đích mong muốn bất kỳ thiết yếu. Ví dụ, tiêm ứng theo tiếp xúc thể rắn có thể được sử dụng để định hướng vector (ví dụ adenovirus, HSV) tới vị trí mong muốn. Ngoài ra, các hạt có thể được

vận chuyển bằng cách truyền qua não thất bên trong (intracerebroventricular - icv) sử dụng hệ thống truyền qua bơm nhỏ, như hệ thống truyền SynchroMed. Phương pháp dựa trên dòng chảy số lượng lớn, được gọi là đối lưu, còn chứng minh được hiệu quả khi vận chuyển các phân tử lớn tới vùng mở rộng của não và có thể là hữu dụng trong việc vận chuyển vector tới tế bào đích. (Xem Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)). Các phương pháp khác có thể được sử dụng bao gồm ống dò, tiêm trong ven, ngoài đường tiêu hóa, trong màng bụng và dưới da, và sử dụng qua miệng hoặc các cách thức sử dụng đã được biết đến khác.

Các vector này có thể được sử dụng để biểu hiện lượng lớn các kháng thể có thể được sử dụng với hàng loạt cách thức. Ví dụ, để phát hiện sự có mặt của flavivirut trong mẫu. Kháng thể có thể còn được sử dụng để thử liên kết với và phá vỡ hoạt tính của protein vỏ của flavivirut.

Theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể có chiều dài đầy đủ, chứa vùng Fc tương tự với vùng Fc kiểu đại liên kết với thụ thể Fc.

Các kháng thể dị tiếp hợp cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các kháng thể dị tiếp hợp bao gồm hai kháng thể được kết nối cộng hóa trị. Các kháng thể này, ví dụ, được đề xuất là đưa các tế bào của hệ miễn dịch tới các tế bào không mong muốn (xem Patent Mỹ số 4676980), và để điều trị sự lây nhiễm HIV (xem WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Được dự đoán rằng các kháng thể có thể được tạo ra *in vitro* sử dụng phương pháp đã được biết đến trong hóa học protein tổng hợp, bao gồm các phương pháp liên quan tới chất liên kết chéo. Ví dụ, chất độc miễn dịch có thể được xây dựng sử dụng phản ứng trao đổi disulfit hoặc bằng cách tạo thành cầu thioete. Các ví dụ về chất thích hợp cho mục đích này bao gồm iminothiolat và metyl-4-mercaptobutyrimidat và các chất được bộc lộ, ví dụ, trong Patent Mỹ số 4676980.

Việc biến đổi kháng thể theo sáng chế có thể là mong muốn về mặt chức năng tác dụng, để tăng cường, *ví dụ*, hiệu quả của kháng thể để trung hòa hoặc ngăn ngừa sự lây nhiễm virus. Ví dụ, (các) gốc xystein có thể được đưa vào vùng Fc, từ đó cho phép tạo thành cầu disulfit liên chuỗi trong vùng này. Do đó, kháng thể homodime được tạo ra có thể cải thiện khả năng nội bộ hóa và/hoặc làm tăng sự giết tế bào trung gian bởi bổ thể và tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC). (Xem Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) và Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Nói cách khác, kháng thể có thể được thiết kế để có vùng Fc kép và có thể từ đó có khả năng phân giải bổ thể và ADCC được tăng cường. (Xem Stevenson et al., Kháng -Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)). Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế có các biến đổi của vùng Fc, để vùng Fc này không liên kết với thụ thể Fc. Tốt hơn là, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ . Được ưu tiên cụ thể là các kháng thể với biến đổi của vùng Fc để vùng Fc này không liên kết với Fc γ , nhưng vẫn liên kết với thụ thể Fc mới sinh.

Sáng chế còn gắn liền với tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể được tiếp hợp với chất gây độc tế bào như chất độc (*ví dụ*, chất độc hoạt hóa về mặt enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các mảnh của nó), hoặc isotop hoạt hóa phóng xạ (*nghĩa là*, tiếp hợp phóng xạ).

Chất độc hoạt hóa về mặt enzym và mảnh của nó có thể được sử dụng bao gồm chuỗi A diphtheria, mảnh hoạt hóa không liên kết của chất độc diphtheria, chuỗi A chất độc ngoại tế bào (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A ricin, chuỗi A abrin, chuỗi A modeccin, alpha-sarcin, protein Aleurites fordii, protein dianthin, protein Phytolacca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crocin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và tricothecene. Hàng loạt hạt nhân phóng xạ là có sẵn để sản xuất các kháng thể được tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , và ^{186}Re .

Các tiếp hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào được tạo ra sử dụng hàng loạt chất kết đôi protein hai chức năng như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)

propionat (SPDP), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức năng của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCL), este hoạt hóa (như disuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutareldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediain), dẫn xuất bis-diazonium (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiain), diisoxyanat (như tolyen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất fluorin hoạt hóa kép (như 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, chất độc miễn dịch ricin có thể được tạo ra như được mô tả trong Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaacetic (MX-DTPA) được đánh dấu cacbon-14 là chất chelat hóa minh họa cho sự tiếp hợp của nucleotit phóng xạ với kháng thể. (Xem WO94/11026).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng một lượng lớn các nhóm có thể được kết hợp với các kháng thể thu được hoặc với các phân tử khác theo sáng chế. (Xem, ví dụ, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse và R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), toàn bộ nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Việc kết hợp này có thể được hoàn thành bởi phản ứng hóa học bất kỳ mà sẽ liên kết hai phân tử miễn là kháng thể và nhóm khác giữ được hoạt tính tương ứng của nó. Liên kết này có thể bao gồm nhiều cơ chế hóa học, ví dụ liên kết cộng hóa trị, liên kết ái lực, sự chèn thêm, liên kết ngang hàng và phức hợp. Tuy nhiên, liên kết được ưu tiên là, liên kết cộng hóa trị. Liên kết cộng hóa trị có thể đạt được bằng cách ngưng tụ trực tiếp chuỗi bên có sẵn hoặc bằng cách đưa vào các phân tử cầu nối bên ngoài. Nhiều chất liên kết hóa trị hai hoặc đa hóa trị là hữu dụng trong việc kết hợp các phân tử protein, như các kháng thể theo sáng chế, với các phân tử khác. Ví dụ, chất kết hợp đại diện có thể bao gồm hợp chất hữu cơ như thioeste, carbodiimit, suxinimit este, diisoxyanat, glutaraldehyt, diazobenzen và hexametylen diamin. Danh mục này không dự định hạn chế các lớp khác nhau của chất kết hợp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này nhưng, hơn là, minh họa cho các chất kết hợp phổ biến hơn. (Xem Killen and Lindstrom, Jour. Immun.

133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); và Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)). Chất liên kết được ưu tiên được mô tả trong tài liệu tham khảo. (Xem, ví dụ, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) mô tả việc sử dụng MBS (M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuxinimit este). Cũng xem, Patent Mỹ số 5030719, mô tả việc sử dụng dẫn xuất hydrazit axetyl halogenat hóa được kết hợp với kháng thể nhờ chất liên kết oligopeptit. Cụ thể là chất liên kết được ưu tiên bao gồm: (i) EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimit hydroclorua; (ii) SMPT (4-suxinimidylloxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)-toluen (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (suxinimidyl-6 [3-(2-pyridyldithio) propionamido]hexanoat (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuxinimidyl 6 [3-(2-pyridyldithio)-propionamide] hexanoat (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); và (v) sulfo-NHS (N-hydroxysulfo-suxinimit: Pierce Chem. Co., Cat. #24510) được tiếp hợp với EDC.

Các chất liên kết được mô tả phía trên chứa các thành phần có các thuộc tính khác nhau, do đó dẫn đến các tiếp hợp với các đặc tính lý-hóa khác nhau. Ví dụ, sulfo-NHS este của alkyl carboxylat là ổn định hơn sulfo-NHS este của carboxylat thơm. Các chất liên kết chứa NHS-este là ít hòa tan hơn sulfo-NHS este. Hơn nữa, chất liên kết SMPT chứa cầu disulfit bị hạn chế không gian, và có thể tạo thành các tiếp hợp với tính ổn định tăng lên. Liên kết disulfit, nói chung là, ít ổn định hơn các liên kết khác vì liên kết disulfit bị cắt *in vitro*, dẫn đến có ít tiếp hợp hơn. Sulfo-NHS, cụ thể là, có thể tăng cường tính ổn định của cặp carbodimit. Cặp carbodimit (như EDC) khi được sử dụng kết hợp với sulfo-NHS, tạo thành este kháng sự thủy phân nhiều hơn so với chỉ phản ứng kết hợp carbodimit.

Các kháng thể được bộc lộ ở đây có thể còn được điều chế như các liposom miễn dịch. Liposom chứa kháng thể được tạo ra bởi phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả trong Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); và Patent Mỹ số 4485045 và 4544545. Liposom với thời gian tuần hoàn được tăng cường được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5013556.

Cụ thể là liposom hữu dụng có thể được tạo ra bằng phương pháp bay hơi pha ngược với chế phẩm lipid chứa phosphatidylcholin, cholesterol, và phosphatidyletanolamin dẫn xuất bởi PEG (PEG-PE). Liposom được ép đùn qua màng lọc có kích thước lỗ xác định để tạo ra liposom với đường kính mong muốn. Mảnh Fab của kháng thể theo sáng chế có thể được tiếp hợp với liposom như được mô tả trong Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) qua phản ứng hoán đổi disulfit.

Việc sử dụng các kháng thể chống lại Flavivirus

Phương pháp sàng lọc các kháng thể mang tính đặc hiệu mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và các kỹ thuật trung gian bởi miễn dịch khác đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các kháng thể được định hướng chống lại protein vỏ của flavivirus như WNE (hoặc mảnh của nó) có thể được sử dụng trong phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này liên quan tới việc định vị và/hoặc định lượng protein vỏ của flavivirus như WNE (ví dụ, để dùng trong việc đo mức độ protein của flavivirus trong mẫu sinh lý thích hợp, để dùng trong phương pháp chẩn đoán, để dùng trong phương pháp hình ảnh protein, và tương tự). Theo phương án đã biết, các kháng thể đặc hiệu cho protein vỏ của flavivirus như WNE, hoặc dẫn xuất, mảnh, tương đồng hoặc đồng dạng của nó, chứa miễn dịch kháng nguyên có nguồn gốc kháng thể, được sử dụng làm hoạt chất được học (được nhắc đến từ đây là "chất trị liệu").

Kháng thể đặc hiệu cho protein vỏ của flavivirus như WNE theo sáng chế có thể được sử dụng để phân lập chuỗi polypeptit của flavivirus bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, như ái lực miễn dịch, sắc ký hoặc kết tủa miễn dịch. Các kháng thể được định hướng chống lại protein của flavivirus (hoặc mảnh của nó) có thể được sử dụng chẩn đoán để theo dõi mức độ của protein trong mô là một phần của quy trình thử nghiệm lâm sàng, ví dụ, để xác định hiệu quả của phác đồ điều trị đã biết. Sự phát hiện có thể được tạo thuận lợi bằng cách kết đôi (nghĩa là, liên kết về mặt vật

lý) kháng thể với cơ chất có thể phát hiện được. Các ví dụ về cơ chất có thể phát hiện được bao gồm các enzym khác nhau, các nhóm giả được, vật liệu huỳnh quang, vật liệu phát quang, vật liệu phát quang sinh học, và vật liệu hoạt hóa phóng xạ. Các ví dụ về enzym thích hợp bao gồm peroxidaza của cây cải ngựa, alkaline phosphatase, β -galactosidase, hoặc acetylcholinesterase; các ví dụ về phức hệ nhóm giả được thích hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; các ví dụ về vật liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride hoặc phycoerythrin; ví dụ về vật liệu phát quang bao gồm luminol; các ví dụ về vật liệu phát quang sinh học bao gồm luciferase, luciferin, và aequorin, và các ví dụ về vật liệu hoạt hóa phóng xạ thích hợp bao gồm ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S hoặc ^3H .

Các kháng thể theo sáng chế, bao gồm các kháng thể đa dòng, các kháng thể đơn dòng, các kháng thể được làm giống như của người và các kháng thể toàn vẹn của người, có thể được dùng làm chất trị liệu. Chất này sẽ thường được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc bệnh lý liên quan tới flavivirus (ví dụ, sốt xuất huyết) ở đối tượng. Sự tạo ra kháng thể, tốt hơn là kháng thể có tính đặc hiệu cao và ái lực cao với kháng nguyên đích của nó, được sử dụng cho đối tượng và sẽ thường có tác dụng do liên kết của nó với đích. Việc sử dụng kháng thể có thể loại bỏ hoặc ức chế hoặc can thiệp vào sự nội bộ hóa của virus vào tế bào. Trong trường hợp này, kháng thể liên kết với đích và ngăn ngừa liên kết với tế bào biểu hiện thụ thể Fc, từ đó khóa sự dung hợp của virus với màng tế bào và làm ức chế sự nội bộ hóa của virus trong sự tăng cường lây nhiễm phụ thuộc vào kháng thể.

Lượng hiệu quả trị liệu của kháng thể theo sáng chế thường liên quan tới lượng cần để đạt được mục tiêu trị liệu. Như được lưu ý phía trên, điều này có thể là tương tác liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên đích của nó, trong các trường hợp nhất định, can thiệp vào chức năng của đích. Lượng cần sử dụng sẽ còn phụ thuộc vào ái lực liên kết của kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu của nó, và sẽ còn phụ thuộc vào tốc độ kháng thể được sử dụng hết thể tích tự do của đối tượng sử dụng khác. Phạm vi phổ biến cho liều lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể hoặc

mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được, bởi các ví dụ không hạn chế, từ khoảng 0,1 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 50 mg/kg trọng lượng cơ thể. Tần suất liều lượng phổ biến có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ hai lần một ngày tới một lần mỗi tuần.

Các kháng thể liên kết đặc hiệu protein của flavivirut hoặc mảnh của nó theo sáng chế, cũng như các phân tử khác được nhận diện bởi các thử nghiệm sàng lọc được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn liên quan tới flavivirut dưới dạng dược phẩm. Nguyên lý và các chú ý liên quan tới việc sản xuất các chế phẩm này, cũng như hướng dẫn chọn lọc các thành phần đã được đề xuất, ví dụ, trong Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; và Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Theo các phương án theo sáng chế, mảnh kháng thể không được ưu tiên, cụ thể là mảnh kháng thể thiếu vùng Fc. Các phân tử peptit có thể được thiết kế mà giữ lại khả năng liên kết trình tự protein đích. Peptit này có thể được tổng hợp hóa học và/hoặc được sản xuất bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. (Xem, ví dụ, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). Chế phẩm có thể còn chứa nhiều hơn một hoạt chất cần thiết cho dấu hiệu cụ thể đang được điều trị, tốt hơn là các hợp chất với hoạt tính bổ trợ mà không có tác dụng phụ lên nhau. Nói cách khác, hoặc ngoài ra, chế phẩm có thể chứa chất tăng cường chức năng của nó, như, ví dụ, chất gây độc tế bào, xytokin, chất hóa trị liệu, hoặc chất ức chế sinh trưởng. Các phân tử này kết hợp thích hợp với lượng có hiệu quả cho mục đích dự kiến.

Các thành phần hoạt tính có thể còn được giữ trong vi nang được tạo ra, ví dụ, bởi kỹ thuật giọt tự hoặc bởi polyme hóa giao diện, ví dụ, hydroxymethylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmetylacrylat), theo thứ tự, trong hệ thống phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi hạt

albumin, nhũ tương siêu nhỏ, các hạt nano, và viên nang nano) hoặc trong nhũ tương lớn.

Chế phẩm được sử dụng *in vivo* phải vô trùng. Điều này dễ dàng được thực hiện bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng.

Chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được tạo ra. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm chất nền bán thấm của polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, chất nền là dưới dạng vật phẩm được tạo hình dạng, ví dụ, màng, hoặc vi nang. Các ví dụ về chất nền giải phóng kéo dài bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyethyl-metacrylat), hoặc poly(vinylalcohol)), polylactit (U.S. Pat. No. 3773919), copolyme của axit L-glutamic và γ etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không thể phân hủy, copolyme axit lactic-axit glycolic có thể phân hủy như LUPRON DEPOTTM (vi hạt tiêm được chứa copolyme axit lactic-axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric. Trong khi polyme như etylen-vinyl axetat và axit lactic-axit glycolic có thể giải phóng các phân tử trong 100 ngày, protein giải phóng hydrogel nhất định trong khoảng thời gian ngắn hơn.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất phát hiện sự có mặt của flavivirus (hoặc protein hoặc mảnh protein của nó) trong mẫu. Tốt hơn là, kháng thể chứa nhãn có thể phát hiện được. Các kháng thể có thể là kháng thể đa dòng, hoặc tốt hơn nữa là, kháng thể đơn dòng. Kháng thể nguyên thể được ưu tiên. Thuật ngữ "được đánh dấu", nói tới đoạn dò hoặc kháng thể, được dự định bao hàm đánh dấu trực tiếp đoạn dò hoặc kháng thể bằng cách kết đôi (*nghĩa là*, liên kết về mặt vật lý) cơ chất có thể phát hiện được với đoạn dò hoặc kháng thể, cũng như đánh dấu gián tiếp đoạn dò hoặc kháng thể bởi phản ứng với chất khác mà được đánh dấu trực tiếp. Các ví dụ đánh dấu gián tiếp bao gồm phát hiện kháng thể sơ cấp sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu huỳnh quang và nhãn cuối của đoạn dò ADN với biotin để nó có thể được phát hiện với streptavidin được đánh dấu huỳnh quang. Thuật ngữ "mẫu sinh học" được dự định bao gồm mô, các tế bào và dịch sinh học được phân lập từ đối tượng, cũng như mô, các tế bào và dịch có trong đối tượng. Do đó, chứa trong việc sử dụng thuật ngữ "mẫu sinh học", là máu và

phân đoạn hoặc thành phần của máu bao gồm huyết thanh máu, huyết tương máu, hoặc bạch huyết. Đó là, phương pháp phát hiện theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện chất phân tích mARN, protein, hoặc ADN của hệ gen trong mẫu sinh học *in vitro* cũng như *in vivo*. Ví dụ, kỹ thuật *in vitro* để phát hiện chất phân tích mARN bao gồm thể lai Northern và thể lai *in situ*. Kỹ thuật *in vitro* để phát hiện chất phân tích protein bao gồm các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thấm tách Westen, kết tủa miễn dịch, và huỳnh quang miễn dịch. Kỹ thuật *in vitro* để phát hiện chất phân tích ADN của hệ gen bao gồm thể lai Southern. Các quy trình tiến hành thử nghiệm miễn dịch được mô tả, ví dụ trong "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis và T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; và "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Hơn nữa, kỹ thuật *in vivo* để phát hiện chất phân tích protein bao gồm đưa vào đối tượng kháng thể protein kháng chất phân tích được đánh dấu. Ví dụ, kháng thể có thể được đánh dấu với chỉ thị hoạt hóa phóng xạ mà sự có mặt và vị trí của nó ở đối tượng có thể được phát hiện bởi kỹ thuật ghi hình ảnh tiêu chuẩn.

Dược phẩm

Các kháng thể hoặc chất theo sáng chế (còn chỉ ra ở đây là "hoạt chất"), và dẫn xuất của nó, mảnh của nó, tương đồng và đồng dạng của nó, có thể được đưa vào dược phẩm thích hợp để sử dụng. Chế phẩm này thường chứa kháng thể hoặc chất và chất mang dược dụng. Như được dùng ở đây, thuật ngữ "chất mang dược dụng" được dự định bao gồm dung môi bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, vỏ, chất kháng vi khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và làm chậm hấp thụ, và tương tự, tương thích với sử dụng dược phẩm. Chất mang thích hợp được mô tả trong ấn bản gần nhất của Remington's Pharmaceutical Sciences, tài liệu tham khảo tiêu chuẩn trong lĩnh vực này, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các ví dụ được ưu tiên về chất mang hoặc chất pha loãng như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước, nước muối, dung dịch ringer, dung dịch dextroza,

và 5% albumin huyết thanh người. Liposom và chất dẫn thuốc không phải nước như dầu cố định có thể còn được sử dụng. Việc dùng môi trường và chất như vậy đối với dược chất hoạt hóa đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Ngoại trừ trong phạm vi môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ là không tương thích với hoạt chất, sử dụng nó trong chế phẩm được dự liệu. Hoạt chất bổ sung có thể còn được đưa vào chế phẩm.

Dược phẩm theo sáng chế được bào chế để tương thích với phương thức sử dụng được dự định của nó. Các ví dụ về phương thức sử dụng bao gồm tiêm, *ví dụ*, trong ven, trong biểu mô, dưới da, sử dụng qua miệng (*ví dụ*, nuốt vào), qua da (*nghĩa là*, bôi), qua niêm mạc, và qua trực tràng. Dung dịch hoặc huyền phù được dùng cho tiêm, trong biểu mô, hoặc dưới da có thể bao gồm các thành phần sau: chất pha loãng vô trùng như nước để tiêm, dung dịch nước muối, dầu cố định, polyetylen glycol, glycerin, propylen glycol hoặc dung môi tổng hợp khác; chất kháng vi khuẩn như rượu benzylic hoặc methyl paraben; chất kháng oxy hóa như axit ascorbic hoặc natri bisulfit; chất chelat hóa như axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA); dung dịch đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat, và chất điều chỉnh tính ưu trương như natri clorua hoặc dextroza. pH có thể được điều chỉnh với axit hoặc bazơ, như axit hydrocloric hoặc natri hydroxit. Chế phẩm tiêm có thể được kèm trong ống thuốc tiêm, ống tiêm dung một lần hoặc lọ đa liều làm bằng thủy tinh hoặc nhựa.

Dược phẩm thích hợp để dung cho tiêm bao gồm dung dịch nước vô trùng (nước hòa tan) hoặc các phần phân tán và bột vô trùng cho chế phẩm tạm thời của dung dịch tiêm vô trùng hoặc phần phân tán. Để sử dụng trong ven, chất mang thích hợp bao gồm nước muối sinh lý, nước vi khuẩn tĩnh, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) hoặc dung dịch muối đệm phosphat (PBS). Trong tất cả các trường hợp, chế phẩm phải vô trùng và nên là chất lỏng với khía cạnh để dễ dàng tiêm. Nó phải ổn định dưới điều kiện sản xuất và bảo quản và phải được bảo quản chống lại việc nhiễm tạp vi sinh vật như vi khuẩn và nấm. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ,

glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol dạng lỏng, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của nó. Tính lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng việc sử dụng chất phủ như lecithin, bằng việc duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp phân tán và bằng việc sử dụng chất hoạt hóa bề mặt. Ngăn ngừa hoạt động của vi sinh vật có thể đạt được nhờ chất kháng vi khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clorobutanol, phenol, axit ascorbic, thimerosal, và tương tự. Trong nhiều trường hợp, sẽ được ưu tiên để bổ sung chất đẳng trương, ví dụ, đường, polyalcohol như manitol, sorbitol, natri clorua trong chế phẩm. Sự hấp thụ kéo dài chế phẩm tiêm có thể đạt được bằng cách cho vào chế phẩm chất làm chậm sự hấp thụ, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin.

Dung dịch tiêm được vô trùng có thể được tạo ra bằng cách kết hợp hoạt chất với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một thành phần hoặc hỗn hợp các thành phần được liệt kê phía trên, là cần thiết, theo sau bước lọc vô trùng. Thông thường, các phần phân tán được tạo ra bằng cách kết hợp hoạt chất vào chất dẫn thuốc vô trùng chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần cần thiết khác từ các thành phần được liệt kê phía trên. Trong trường hợp bột vô trùng để sản xuất dung dịch tiêm được vô trùng, phương pháp sản xuất là sấy chân không và sấy đông lạnh tạo ra bột của thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch được lọc vô trùng của nó trước đó.

Chế phẩm dùng qua đường miệng thường bao gồm chất pha loãng trợ hoặc chất mang ăn được. Chúng có thể được kèm trong viên nang gelatin hoặc được nén thành dạng viên nén. Đối với mục đích sử dụng cho điều trị dùng qua đường miệng, hoạt chất có thể được kết hợp với tá dược và được dùng dưới dạng viên nén, viên thuốc nhỏ và tròn, hoặc viên nang. Chế phẩm dùng qua đường miệng có thể còn được tạo ra bằng cách sử dụng chất mang dạng lỏng để dùng làm nước súc miệng, trong đó sử dụng qua đường miệng và súc và nhổ hoặc nuốt hợp chất trong chất mang dạng lỏng. Chất liên kết tương thích về mặt dược học, và/hoặc vật liệu tá dược có thể chứa trong chế phẩm. Viên nén, viên tròn, viên nang, viên thuốc nhỏ và tròn và dạng tương tự có thể chứa thành phần bất kỳ trong các thành phần sau, hoặc

hợp chất có tính chất tương tự: chất liên kết như tinh thể siêu nhỏ xenluloza, nhựa tragacanth hoặc gelatin; tá dược như tinh bột hoặc lactoza, chất tan như axit alginic, Primogel, hoặc tinh bột ngô; chất làm trơn như magie stearat hoặc Sterot; chất trượt như silicon dioxit dạng keo; chất tạo ngọt như sucroza hoặc sacarin; hoặc chất tạo mùi hương như peppermint, metyl salicylat, hoặc hương cam.

Đối với việc sử dụng bằng cách hít vào, hợp chất được phân phối dưới dạng phun từ vật chứa hoặc bình phân phát có áp lực chứa chất đẩy thích hợp, *ví dụ*, khí như cacbon dioxit, hoặc máy phun sương.

Việc sử dụng toàn thân có thể còn bằng phương pháp qua niêm mạc hoặc qua da. Với việc sử dụng qua niêm mạc hoặc qua da, sử dụng trong chế phẩm chất thấm thích hợp tới rào chắn được thấm qua. Chất thấm như vậy thường đã được biết đến trong lĩnh vực này, và bao gồm, *ví dụ*, với việc sử dụng qua niêm mạc, chất tẩy rửa, muối mật, và dẫn xuất của axit fusidic. Với việc sử dụng qua niêm mạc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phun vào mũi hoặc thuốc đặt. Với việc sử dụng qua da, hoạt chất được bào chế thành thuốc dạng mỡ, thuốc dạng cao, gel, hoặc kem như thường được biết đến trong lĩnh vực này.

Hợp chất có thể còn được tạo ra dưới dạng thuốc đặt (*ví dụ*, với bản chất của thuốc đặt thông thường là bơ ca cao và các glyxerit khác) hoặc giữ lại rửa ruột để phân phối qua trực tràng rectal delivery.

Theo một phương án, hoạt chất được tạo ra với chất mang sẽ bảo vệ hợp chất chống lại sự loại bỏ nhanh chóng ra khỏi cơ thể, như chế phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm viên cấy và hệ thống phân phối được bao nang siêu nhỏ. Có thể phân hủy sinh học, polyme tương thích sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Phương pháp sản xuất chế phẩm này sẽ là rõ ràng với người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Vật liệu có thể còn thu được trên thị trường từ Alza Corporation và Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (bao gồm liposom được nhắm đích tới các tế bào nhiễm bệnh với các kháng thể đơn dòng tới kháng nguyên

virut) có thể còn được sử dụng làm chất mang được dụng. Chúng có thể được tạo ra theo phương pháp đã được biết đến với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như được mô tả trong Patent Mỹ số 4522811.

Đặc biệt thuận lợi nếu bào chế chế phẩm dùng qua đường miệng hoặc dùng để tiêm ở dạng đơn vị liều lượng để dễ sử dụng và thống nhất liều lượng. Dạng đơn vị liều lượng như được dùng ở đây chỉ đơn vị gián đoạn về mặt vật lý thích hợp làm liều đơn cho đối tượng được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng hoạt chất được xác định trước được tính toán để tạo ra hiệu quả trị liệu mong muốn kết hợp với chất mang được học cần thiết. Sự mô tả cho dạng đơn vị liều lượng theo sáng chế được quy định bởi và phụ thuộc trực tiếp vào tính chất duy nhất của hoạt chất và hiệu quả trị liệu cụ thể đạt được, và có hạn chế thuộc về lĩnh vực này về việc bào chế hoạt chất như vậy để điều trị các cá thể.

Dược phẩm có thể được đựng trong vật chứa, gói, hoặc bình phân phát cùng với hướng dẫn sử dụng.

Phương pháp sàng lọc

Sáng chế đề xuất phương pháp (còn được chỉ ra ở đây là "các thử nghiệm sàng lọc") để nhận diện chất điều biến, *ngheĩa là*, hợp chất hoặc chất ứng viên hoặc thử nghiệm (*ví dụ*, peptit, peptidomimetic, phân tử nhỏ hoặc được chất khác) hoặc điều biến hoặc nếu không thì can thiệp vào sự dung hợp của flavivirus với màng tế bào. Phương pháp nhận diện hợp chất hữu dụng để điều trị lây nhiễm flavivirus còn được đề xuất. Sáng chế còn bao hàm hợp chất được nhận diện sử dụng các thử nghiệm sàng lọc được mô tả ở đây.

Ví dụ, sáng chế đề xuất các thử nghiệm để sàng lọc hợp chất ứng viên hoặc thử nghiệm mà điều biến sự tương tác giữa flavivirus và màng tế bào. Hợp chất thử nghiệm theo sáng chế có thể thu được sử dụng vô số các phương pháp bất kỳ kết hợp với phương pháp thư viện đã được biết đến trong lĩnh vực này, bao gồm: thư viện sinh học; pha rắn song song với vị trí không gian hoặc thư viện pha dung dịch; phương pháp thư viện tổng hợp cần sự tháo cuộn; phương pháp thư viện "một-hạt

một-hợp chất”; và phương pháp thư viện tổng hợp sử dụng chọn lọc sắc ký ái lực. Phương pháp thư viện sinh học bị hạn chế bởi thư viện peptit, trong khi bốn phương pháp khác có liên quan tới peptit, thư viện hợp chất oligome hoặc phân tử không phải peptit nhỏ. (*Xem, ví dụ, Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145*).

"Phân tử nhỏ" như được dùng ở đây, nghĩa là chỉ chế phẩm có trọng lượng phân tử ít hơn khoảng 5 kD và tốt hơn nhất là ít hơn khoảng 4 kD. Phân tử nhỏ có thể là, *ví dụ*, axit nucleic, peptit, polypeptit, peptidomimetic, carbohydrat, lipid hoặc các phân tử hữu cơ hoặc vô cơ khác. Thư viện các hỗn hợp hóa học và/hoặc sinh học, như nấm, vi khuẩn, hoặc phần chiết của tảo, đã được biết đến trong lĩnh vực này và có thể được sàng lọc với thử nghiệm bất kỳ trong các thử nghiệm theo sáng chế.

Các ví dụ về phương pháp để tổng hợp thư viện phân tử có thể được tìm thấy trong lĩnh vực này, ví dụ trong: DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al., 1993. Science 261: 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; và Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233.

Thư viện hợp chất có thể có trong dung dịch (*xem ví dụ, Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421*), hoặc trên hạt (*xem Lam, 1991. Nature 354: 82-84*), trên chip (*xem Fodor, 1993. Nature 364: 555-556*), vi khuẩn (*xem Patent Mỹ số 5,223,409*), lỗ (*xem U.S. Patent 5,233,409*), plasmit (*xem Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869*) hoặc trên thực khuẩn thể (*xem Scott và Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; và Patent Mỹ số 5,233,409.*).

Theo một phương án, hợp chất ứng viên được đưa vào phức hợp kháng thể-kháng nguyên và xác định liệu rằng hợp chất ứng viên phá vỡ phức hợp kháng thể-kháng nguyên không, trong đó sự phá vỡ phức hợp này thể hiện rằng hợp chất ứng

viên điều biến sự tương tác giữa flavivirut và màng tế bào. Ví dụ, kháng thể có thể là kháng thể đơn dòng mAb11, mAb11-LALA, hoặc biến thể bất kỳ của nó, và kháng nguyên có thể được bố trí trên protein vỏ của flavivirut (*nghĩa là*, protein E của virut Tây sông Nin).

Theo phương án khác, ít nhất một protein vỏ của flavivirut được đề xuất, tiếp xúc với ít nhất một kháng thể đơn dòng trung hòa. Sự tạo thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên được phát hiện, và một hoặc nhiều hợp chất ứng viên được đưa vào phức hợp. Nếu phức hợp kháng thể-kháng nguyên được phá vỡ sau sự đưa vào của một hoặc nhiều hợp chất ứng viên, hợp chất ứng viên là hữu dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan tới flavivirut, *ví dụ* Sốt xuất huyết. Ví dụ, ít nhất một protein của flavivirut có thể được đề xuất là phân tử flavivirut.

Xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm để can thiệp vào hoặc phá vỡ phức hợp kháng thể-kháng nguyên có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách kết đôi hợp chất thử nghiệm với isotop phóng xạ hoặc nhãn enzym để liên kết hợp chất thử nghiệm với kháng nguyên hoặc phần hoạt hóa sinh học của nó có thể được xác định bằng cách phát hiện hợp chất được đánh dấu trong phức hợp. Ví dụ, hợp chất thử nghiệm có thể được đánh dấu với ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , hoặc ^3H , hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp, và isotop phóng xạ được phát hiện bằng cách đếm trực tiếp sự phát xạ hoặc bằng cách đếm sự nhấp nháy. Nói cách khác, hợp chất thử nghiệm có thể được đánh dấu về mặt enzym với, ví dụ, peroxidaza của cây cải ngựa, alkaline phosphatase, hoặc luciferase, và nhãn enzym được phát hiện bằng cách xác định sự chuyển hóa của cơ chất thích hợp thành sản phẩm.

Theo một phương án, thử nghiệm bao gồm việc cho phức hợp kháng thể-kháng nguyên tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm, và xác định khả năng tương tác của hợp chất thử nghiệm với kháng nguyên hoặc nếu không thì phá vỡ phức hợp kháng thể-kháng nguyên đang có. Theo phương án này, việc xác định khả năng tương tác của hợp chất thử nghiệm với kháng nguyên và/hoặc phá vỡ phức hợp kháng thể-kháng nguyên gồm bước xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm để

liên kết ưu tiên với kháng nguyên hoặc với phần hoạt hóa sinh học của nó, như được so sánh với kháng thể.

Theo phương án khác, thử nghiệm gồm việc cho phức hợp kháng thể-kháng nguyên tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm và xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm để điều biến phức hợp kháng thể-kháng nguyên. Xác định khả năng của hợp chất thử nghiệm để điều biến phức hợp kháng thể-kháng nguyên có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách xác định khả năng liên kết hoặc tương tác của kháng nguyên với kháng thể, với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm.

Người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng, trong phương pháp sàng lọc bất kỳ được bộc lộ ở đây, kháng thể có thể là kháng thể trung hòa flavivirut, như kháng thể đơn dòng Ab-11 hoặc biến thể bất kỳ của nó trong đó vùng Fc được cải biến để nó làm giảm liên kết không liên kết với thụ thể Fc-gamma. Ngoài ra, kháng nguyên có thể là protein vỏ của flavivirut, hoặc phần của nó.

Phương pháp sàng lọc được bộc lộ ở đây có thể được tiến hành như thử nghiệm dựa trên tế bào hoặc như thử nghiệm không có tế bào. Thử nghiệm không có tế bào theo sáng chế sử dụng cả dạng hòa tan hoặc dạng gắn màng của protein và mảnh của nó. Trong trường hợp thử nghiệm không có tế bào chứa protein gắn màng, sử dụng chất làm tan có thể là mong muốn để protein gắn màng được duy trì trong dung dịch. Các ví dụ về chất làm tan như vậy bao gồm chất tẩy rửa không phải dạng ion như n-octylglucosit, n-dodexylglucosit, n-dodexylmaltosit, octanoyl-N-metylglucamit, decanoyl-N-metylglucamit, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridexypoly(etylen glycol ete)_n, N-dodexyl--N,N-dimetyl-3-ammonio-1-propan sulfonat, 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-1-propan sulfonat (CHAPS), hoặc 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propan sulfonat (CHAPSO).

Theo nhiều hơn một phương án, cố định hoặc kháng thể hoặc kháng nguyên có thể là mong muốn để tạo điều kiện phân tách dạng phức hợp từ dạng không phức

hợp của một hoặc cả hai sự đưa vào sau đây của hợp chất ứng viên, cũng như để chứa thử nghiệm tự động hóa. Quan sát phức hợp kháng thể-kháng nguyên với sự có mặt và vắng mặt hợp chất ứng viên, có thể được thực hiện trong vật chứa thích hợp bất kỳ để chứa chất phản ứng. Các ví dụ về vật chứa này bao gồm đĩa vi chuẩn, ống thử nghiệm, và ống vi ly tâm. Theo một phương án, protein dung hợp có thể được đề xuất để chèn thêm miền cho phép một hoặc cả hai protein liên kết với chất nền. Ví dụ, protein dung hợp GST-kháng thể hoặc protein dung hợp GST-kháng nguyên có thể được hấp thụ trên hạt glutation sepharoza (Sigma Chemical, St. Louis, MO) hoặc đĩa vi chuẩn dẫn xuất glutation, sau đó được kết hợp với hợp chất thử nghiệm, và hỗn hợp được ủ với điều kiện thử nghiệm để tạo thành phức hợp (ví dụ, ở điều kiện sinh lý cho muối và pH). Sau khi ủ, các hạt hoặc các giếng của đĩa vi chuẩn được rửa để loại bỏ thành phần không liên kết bất kỳ, chất nền được cố định trong trường hợp các hạt, phức hợp được xác định hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp. Nói cách khác, phức hợp có thể được phân ly từ chất nền, và mức độ tạo thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên có thể được xác định sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn.

Các kỹ thuật khác để cố định protein trên chất nền có thể còn được sử dụng trong các thử nghiệm sàng lọc theo sáng chế. Ví dụ, hoặc kháng thể hoặc kháng nguyên (ví dụ có thể được cố định sử dụng tiếp hợp giữa biotin và streptavidin. Các phân tử kháng thể hoặc kháng nguyên biotinyl hóa có thể được tạo ra từ biotin-NHS (N-hydroxy-suxinimit) sử dụng kỹ thuật đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này (ví dụ, kit biotinyl hóa, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), và được cố định trong giếng của đĩa 96 giếng được phủ streptavidin (Pierce Chemical). Nói cách khác, các kháng thể khác phản ứng với kháng thể hoặc kháng nguyên được quan tâm, nhưng không can thiệp vào sự tạo thành của phức hợp kháng thể-kháng nguyên được quan tâm, có thể được dẫn xuất tới giếng của đĩa, và kháng thể hoặc kháng nguyên không liên kết được giữ trong giếng bởi tiếp hợp kháng thể. Phương pháp phát hiện phức hợp này, ngoài các phương pháp được mô tả phía trên cho phức hợp được cố định GST, bao gồm phát hiện miễn dịch phức hợp sử dụng các kháng thể khác phản ứng với kháng thể hoặc kháng nguyên.

Sáng chế còn gắn với chất mới được nhận diện bởi thử nghiệm sàng lọc bất kỳ trong các thử nghiệm sàng lọc nêu trên và cách sử dụng nó để điều trị như được mô tả ở đây.

Các thử nghiệm chẩn đoán

Các kháng thể theo sáng chế có thể được phát hiện bởi các thử nghiệm thích hợp, *ví dụ*, kiểu thử nghiệm miễn dịch thông thường. Ví dụ, thử nghiệm có thể được tiến hành trong đó protein vỏ của flavivirus (*ví dụ*, protein E của virus Tây sông Nin) hoặc mảnh của nó được gắn với pha rắn. Sự ủ được duy trì trong khoảng thời gian đủ để cho phép kháng thể trong mẫu liên kết với chuỗi polypeptit được cố định trên pha rắn. Sau lần ủ đầu tiên này, pha rắn được tách ra từ mẫu. Pha rắn được rửa để loại bỏ vật liệu không liên kết và can thiệp vào cơ chất như protein không đặc hiệu cũng có thể có trong mẫu. Pha rắn chứa kháng thể được quan tâm liên kết với chuỗi polypeptit được cố định sau đó được ủ với kháng thể hoặc kháng thể liên kết với chất kết đôi như biotin hoặc avidin thứ hai được đánh dấu. Kháng thể thứ hai này có thể là kháng thể kháng flavivirus khác hoặc kháng thể khác. Nhãn cho các kháng thể đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này và bao gồm hạt nhân phóng xạ, enzym (*ví dụ* maleate dehydrogenaza, peroxidaza của cây cải ngựa, glucoza oxidaza, catalaza), huỳnh thạch (fluorescein isothioxyanat, rhodamin, phycoxyanin, fluorescarmin), biotin, và tương tự. Các kháng thể được đánh dấu được ủ với chất rắn và nhãn liên kết với pha rắn được xác định. Các thử nghiệm miễn dịch này và các thử nghiệm miễn dịch khác có thể dễ dàng được tiến hành bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Phương pháp minh họa để phát hiện sự có hoặc không có mặt của flavivirus (trong mẫu sinh học dẫn đến thu được mẫu sinh học từ đối tượng thử nghiệm và mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể đơn dòng được đánh dấu theo sáng chế để sự có mặt của flavivirus được phát hiện trong mẫu sinh học).

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "được đánh dấu", khi nói tới đoạn dò hoặc kháng thể, được dự định bao hàm đánh dấu trực tiếp đoạn dò hoặc kháng thể bằng

cách kết đôi (*nghĩa là*, liên kết về mặt vật lý) cơ chất có thể phát hiện được với đoạn dò hoặc kháng thể, cũng như đánh dấu gián tiếp đoạn dò hoặc kháng thể bởi phản ứng với chất khác mà được đánh dấu trực tiếp. Các ví dụ đánh dấu gián tiếp bao gồm phát hiện kháng thể sơ cấp sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu huỳnh quang và nhãn cuối của đoạn dò ADN với biotin để nó có thể được phát hiện với streptavidin được đánh dấu huỳnh quang. Thuật ngữ "mẫu sinh học" được dự định bao gồm mô, các tế bào và dịch sinh học được phân lập từ đối tượng, cũng như mô, các tế bào và dịch có trong đối tượng. Nghĩa là, phương pháp phát hiện theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện flavivirus trong mẫu sinh học *in vitro* cũng như *in vivo*. Ví dụ, kỹ thuật *in vitro* để phát hiện flavivirus bao gồm các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thấm tách Westen, kết tủa miễn dịch, và huỳnh quang miễn dịch. Hơn nữa, kỹ thuật *in vivo* để phát hiện flavivirus bao gồm đưa vào đối tượng kháng thể kháng flavivirus được đánh dấu. Ví dụ, kháng thể có thể được đánh dấu với chỉ thị hoạt hóa phóng xạ mà sự có mặt và vị trí của nó ở đối tượng có thể được phát hiện bởi kỹ thuật ghi hình ảnh tiêu chuẩn.

Theo một phương án, mẫu sinh học chứa các phân tử protein từ đối tượng thử nghiệm. Một mẫu sinh học được ưu tiên là mẫu bạch cầu của máu ngoại biên được phân lập bằng các phương pháp thông thường từ đối tượng.

Sáng chế còn bao hàm các kit phát hiện sự có mặt flavivirus trong mẫu sinh học. Ví dụ, kit có thể gồm: hợp chất hoặc chất có khả năng phát hiện flavivirus được đánh dấu (*ví dụ*, kháng thể đơn dòng kháng flavivirus) trong mẫu sinh học; phương pháp xác định lượng flavivirus trong mẫu; và phương pháp so sánh lượng flavivirus trong mẫu với mẫu chuẩn. Hợp chất hoặc chất có thể được bao gói trong vật chứa thích hợp. Kit có thể còn gồm hướng dẫn sử dụng kit để phát hiện flavivirus trong mẫu.

Chủng ngừa bị động

Chủng ngừa bị động được chứng minh là chiến lược hiệu quả và an toàn để ngăn ngừa và điều trị bệnh virus. (*Xem Keller et al., Clin. Microbiol. Rev.* 13:602-

14 (2000); Casadevall, Nat. Biotechnol. 20:114 (2002); Shibata et al., Nat. Med. 5:204-10 (1999); và Igarashi et al., Nat. Med. 5:211-16 (1999), mỗi tài liệu được đưa vào ở đây bằng cách viện dẫn)). Chúng ngừa bị động sử dụng các kháng thể đơn dòng trung hòa của người có thể dẫn tới chiến lược điều trị trung gian cho dự phòng và điều trị khẩn cấp lây nhiễm flavivirus và bệnh và các rối loạn có liên quan trong khi phương án thay thế và sự phát triển vaccin và dược chất mới mất nhiều thời gian hơn đang được thực hiện.

Vaccin dạng tiểu phần có tiềm năng đem lại ưu điểm đáng kể so với chất gây miễn dịch thông thường. Chúng tránh được mối nguy về mặt an toàn tồn tại trong sản xuất, phân phối, và vận chuyển vaccin chứa toàn bộ tác nhân gây bệnh được giảm độc lực hoặc bị giết thông thường. Hơn nữa, chúng có thể được thiết kế hợp lý để chỉ chứa epitop bảo vệ được xác nhận, từ đó tránh được epitop T kích thích (xem Steward et al., J. Virol. 69:7668 (1995)) hoặc epitop B ưu thế miễn dịch phá hoại hệ miễn dịch bằng cách kích thích đáp ứng không có tác dụng, không bảo vệ (ví dụ epitop “mồi”). (Xem Garrity et al., J. Immunol. 159:279 (1997)).

Hơn nữa, người có hiểu biết trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng có mối tương quan tốt tồn tại giữa hoạt tính trung hòa của kháng thể *in vitro* và sự bảo vệ *in vivo* đối với nhiều virus, phương thức thách thức, và mô hình động vật khác nhau. (Xem Burton, Natl. Rev. Immunol. 2:706-13 (2002); Parren et al., Adv. Immunol. 77:195-262 (2001)). Dữ liệu có ở đây thể hiện rằng kháng thể đơn dòng của người mAb-11 và biến thể mAb khác có thể còn được phát triển và thử nghiệm trong nghiên cứu động vật *in vivo* để xác định tính ứng dụng lâm sàng của nó làm chất ức chế ADE tiềm năng cho phòng ngừa và điều trị lây nhiễm flavivirus và bệnh và các rối loạn có liên quan.

Thế khả của kháng nguyên-Ig trong chủng vaccin

Đã hơn một thập kỷ từ khi các kháng thể đầu tiên được sử dụng như khung protein đối với sự có mặt hiệu quả của yếu tố quyết định kháng nguyên với hệ miễn dịch. (Xem Zanetti, Nature 355:476-77 (1992); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 92:631-35 (1995)). Khi peptit được gắn trong phân tử IgG (ví dụ, kháng thể đơn dòng 11A hoặc 256 IgG1 được mô tả ở đây), tính kháng nguyên và tính gây miễn dịch của epitop peptit được tăng cường mạnh như được so sánh với peptit tự do. Sự tăng cường này có thể do thể khảm của kháng nguyên IgG có chu kỳ bán rã dài hơn, sự thể hiện tốt hơn và cấu hình hạn chế, mô phỏng cấu trúc nguyên thể của chúng.

Hơn nữa, ưu điểm bổ sung của việc sử dụng thể khảm của kháng nguyên IgG là hoặc vùng biến đổi hoặc vùng Fc của thể khảm của kháng nguyên IgG có thể được sử dụng để nhắm đích các tế bào biểu hiện kháng nguyên chuyên biệt (APC). Để cập nhật, Ig tái tổ hợp được tạo ra trong đó vùng quyết định hỗ trợ (CDR) của gen biến đổi chuỗi nặng (V_H) được thay thế bởi peptit kháng nguyên khác nhau được nhận ra bởi các tế bào B hoặc T. Thể khảm của kháng nguyên IgG này được sử dụng để kích thích cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và đáp ứng miễn dịch tế bào. (Xem Bona et al., Immunol. Today 19:126-33 (1998)).

Các thể khảm với epitop đặc hiệu được ghép vào vòng CDR3 được dùng để kích thích đáp ứng miễn dịch thể dịch với hoặc HIV-1 gp120 vòng V3 hoặc miền ngoại tế bào đầu tiên (D1) của thụ thể CD4 ở người. (Xem Lanza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11683-87 (1993); Zaghoulani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35 (1995)). Huyết thanh miễn dịch có khả năng ngăn ngừa sự lây nhiễm các tế bào CD4 SupT1 bởi HIV-1MN (kháng-gp120 V3C) hoặc ức chế sự tạo thành hỗn bào (kháng-CD4-D1). Đồng thời CDR2 và CDR3 có thể được thay thế bởi epitop peptit, và chiều dài của peptit được chèn vào có thể dài tới 19 axit amin.

Nói cách khác, một nhóm đã phát triển chiến lược “troybody” trong đó kháng nguyên peptit có trong vòng của vùng cố định Ig (C) và vùng biến đổi của thể khảm có thể được sử dụng để nhắm đích IgD trên bề mặt của các tế bào B hoặc các phân tử MHC lớp II trên APC chuyên biệt bao gồm các tế bào B, các tế bào hình sao (DC) và đại thực bào. (Xem Lunde et al., Biochem. Soc. Trans. 30:500-6 (2002)).

Thể khảm của kháng nguyên IgG có thể còn được tạo ra bằng cách dung hợp trực tiếp kháng nguyên với phần Fc của phân tử IgG. You et al., Cancer Res. 61:3704-11 (2001) có khả năng thu được tất cả các mục đích của đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, bao gồm mức độ các kháng thể rất cao cho kháng nguyên có lõi là virus hepatitis B sử dụng phương pháp này.

Chủng ngừa ADN

ADN vaccin là ổn định, có thể tạo cho kháng nguyên cơ hội để được xử lý một cách tự nhiên, và có thể kích thích đáp ứng kéo dài lâu hơn. Mặc dù chiến lược miễn dịch rất hấp dẫn, vaccin ADN thường có công hiệu rất giới hạn đối với việc kích thích các đáp ứng miễn dịch. Sự hấp thu ADN được tiêm kém bởi các APC chuyên nghiệp, như các tế bào đuôi gai (DC), có thể là nguyên nhân chính của sự giới hạn này. Được kết hợp với vaccin kháng nguyên-thể khảm Ig, chiến lược vaccin AND mới đầy hứa hẹn dựa trên sự tăng cường có mặt kháng nguyên APC được thông báo (xem Casares, et al., Viral Immunol. 10:129-36 (1997); Gerloni et al., Nat. Biotech. 15:876-81 (1997); Gerloni et al., ADN Cell Biol. 16:611-25 (1997); You et al., Cancer Res. 61:3704-11 (2001)), mà tận dụng sự có mặt của thụ thể Fc (FcγR) trên bề mặt của các DC.

Có thể tạo ra vaccin ADN mã hóa kháng nguyên (Ag)-thể khảm Ig. Khi miễn dịch hóa, protein dung hợp Ag-Ig sẽ được biểu hiện và tiết ra bởi các tế bào hấp thu các phân tử ADN. Protein dung hợp Ag-Ig đã được tiết ra, trong khi kích thích các đáp ứng tế bào B, có thể được bắt và tiếp nhận nhờ sự tương tác của mảnh Fc với FcγR trên bề mặt DC, mà sẽ thúc đẩy sự có mặt của kháng nguyên hiệu quả và thường tăng cường đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên. Áp dụng cùng một nguyên tắc, ADN mã hóa kháng nguyên-thể khảm Ig mang gen của vùng scFv đặc hiệu kháng MHC II chức năng còn có thể hướng đích các chất gây miễn dịch đến tất cả ba loại APC. Các đáp ứng miễn dịch còn có thể được thúc đẩy với việc sử dụng cùng một kháng nguyên protein được tạo ra *in vitro* (nghĩa là, “gốc và đỉnh”), nếu cần. Bằng cách sử dụng chiến lược này, đáp ứng tế bào đặc hiệu và đáp ứng miễn dịch thể dịch chống lại sự lây nhiễm của flavivirus được thực hiện thông

qua việc tiêm vaccin AND trong cơ (intramuscular-i.m.). (Xem Casares et al., *Viral. Immunol.* 10:129-36 (1997)).

Chế phẩm vaccin

Chế phẩm điều trị bệnh hoặc phòng ngừa bệnh được đề xuất ở đây, mà thông thường bao gồm các hỗn hợp của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng hoặc ScFv và các tổ hợp của nó. Vaccin phòng ngừa bệnh có thể được sử dụng để ngăn ngừa sự lây nhiễm flavivirus và vaccin điều trị bệnh có thể được sử dụng để điều trị cho các cá thể sau khi bị lây nhiễm flavivirus. Việc sử dụng để phòng ngừa bệnh bao gồm việc cung cấp độ chuẩn kháng thể gia tăng cho flavivirus ở đối tượng cần chủng ngừa. Theo cách này, đối tượng có nguy cơ nhiễm flavivirus cao (nghĩa là, trong các vùng cận nhiệt đới mà muỗi mang virus phát triển mạnh) có thể được đề xuất có tính miễn dịch thụ động đối với flavivirus.

Các chế phẩm vaccin này có thể được sử dụng kết hợp với chất điều hòa miễn dịch phụ thuộc. Ví dụ, xytokin, lymphokin, và chemokin, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IL-2, IL-2 được cải biến (Cys125 → Ser125), GM-CSF, IL-12, γ -interferon, IP-10, MIP1 β , và RANTES.

Phương pháp tiêm chủng

Vaccin theo sáng chế có tính chất bảo vệ miễn dịch và trị liệu miễn dịch ưu việt hơn vaccin kháng virus khác.

Sáng chế đề xuất phương pháp miễn dịch hóa, ví dụ, kích thích đáp ứng miễn dịch, của đối tượng. Đối tượng được tiêm chủng bằng cách cho đối tượng dùng chế phẩm chứa protein dung hợp màng của virus có vỏ bọc ngoài sinh bệnh. Protein dung hợp này được bọc hoặc nhúng trong chất nền tương thích sinh học.

Protein dung hợp này được glycosyl hóa, ví dụ, chứa nhóm hydrat cacbon. Nhóm hydrat cacbon này có thể có dạng monosacarit, (các) disacarit. (các) oligosacarit, (các) polysacarit, hoặc dẫn xuất của chúng (ví dụ, được thể sulfo hoặc phospho). Hydrat cacbon này là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Nhóm hydrat

cacbon này được liên kết bằng N hoặc liên kết bằng O với chuỗi polypeptit. Việc glycosyl hóa được liên kết bằng N là đối với amit nitơ của chuỗi bên asparagin và việc glycosyl hóa được liên kết bằng O là đối với hydroxy oxy của chuỗi bên serin và threonin.

Nhóm hydrat cacbon là nội sinh đối với đối tượng được tiêm chủng. Theo một phương án khác, nhóm hydrat cacbon này là ngoại sinh đối với đối tượng được tiêm chủng. Nhóm hydrat cacbon là nhóm hydrat cacbon mà không thường được biểu hiện trên chuỗi polypeptit của đối tượng được tiêm chủng. Ví dụ, nhóm hydrat cacbon là hydrat cacbon đặc hiệu đối với thực vật. Các nhóm hydrat cacbon đặc hiệu đối với thực vật bao gồm, ví dụ, glycan được liên kết bằng N có α 1,3 fucosa được liên kết lõi hoặc β 1,2 xyloza được liên kết lõi. Theo một phương án khác, nhóm hydrat cacbon là nhóm hydrat cacbon mà được biểu hiện trên chuỗi polypeptit hoặc lipid của đối tượng được tiêm chủng. Ví dụ, các tế bào chủ đã được thiết kế theo phương pháp di truyền để tạo ra protein người với các điểm gắn đường giống ở người.

Ví dụ, protein dung hợp là protein ngưng kết tổ hồng cầu trime. Tùy ý, protein ngưng kết tổ hồng cầu được sản xuất trong tế bào động vật không phải động vật có vú như tế bào thực vật.

Đối tượng nêu trên có nguy cơ phát triển triển hoặc mắc bệnh lây nhiễm virus. Các thành viên họ flavivirus bao gồm, ví dụ, virus tây sông Nin, virus sốt xuất huyết (kiểu huyết thanh 1-4), virus viêm não St. Louis, virus sốt vàng da, virus viêm não Nhật Bản, hoặc virus viêm não thung lũng Murray. Ví dụ, đối tượng đi đến các vùng hoặc các nước mà trong đó các bệnh lây nhiễm flavivirus khác được thông báo.

Phương pháp được mô tả ở đây dẫn đến sự giảm tính nghiêm trọng hoặc sự làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh lây nhiễm virus. Bệnh lây nhiễm được chẩn đoán và hoặc được theo dõi, thường bởi bác sỹ bằng cách sử dụng các phương pháp luận tiêu chuẩn. Đối tượng cần miễn dịch hóa được nhận diện bằng

phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, đối tượng được tiêm chủng như được nêu sơ lược trong CDC's Genral Recommendation on Immunization (51(RR02) pp1-36) Cancer được chẩn đoán, ví dụ, bằng thử nghiệm vật lý, sinh thiết, thử nghiệm máu, hoặc tia x.

Đối tượng nêu trên là, ví dụ, động vật có vú bất kỳ, ví dụ, người, động vật linh trưởng, chuột nhắt, chuột cống, chó, mèo, bò, ngựa, lợn, ca hoặc chim.

Việc điều trị được sử dụng trước khi chẩn đoán bệnh lây nhiễm. Theo một phương án khác, việc điều trị được sử dụng sau khi chẩn đoán. Tính hiệu nghiệm của việc điều trị được xác định kết hợp với phương pháp đã được biết đến bất kỳ về chẩn đoán hoặc điều trị rối loạn hoặc bệnh lây nhiễm cụ thể. Việc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn chỉ ra rằng hợp chất mang lại lợi ích lâm sàng.

Phương pháp điều trị

Sáng chế đề xuất cả hai phương pháp phòng ngừa và điều trị bệnh để điều trị đối tượng có nguy cơ (hoặc dễ mắc) bệnh hoặc rối loạn liên quan đến flavivirut. Các bệnh hoặc các rối loạn như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ, sốt, viêm màng não, viêm não, sốt vàng da, sốt xuất huyết sốt.

Phương pháp điều trị bệnh

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn liên quan đến flavivirut ở đối tượng bằng cách cho đối tượng sử dụng kháng thể đơn dòng theo sáng chế hoặc chất được nhận diện theo phương pháp theo sáng chế. Ví dụ, kháng thể đơn dòng mAb-11, mAb11- LALA, và các biến thể bất kỳ của nó, trong đó vùng Fc được cải biến, từ đó làm giảm hoặc hủy bỏ sự liên kết với thụ thể Fc-gama, có thể được sử dụng với lượng hữu hiệu dùng để điều trị bệnh. Tùy ý, hai hoặc nhiều kháng thể kháng flavivirut được sử dụng đồng thời.

Đối tượng có nguy cơ mắc các bệnh hoặc các rối loạn liên quan đến flavivirut bao gồm bệnh nhân đã tiếp xúc với flavivirut từ động vật chân đốt đã bị nhiễm (nghĩa là, muỗi hoặc ve). Ví dụ, đối tượng đã đi tới các vùng hoặc các nước

trên thế giới mà ở đó các bệnh lây nhiễm flavivirus khác đã được thông báo và xác nhận. Việc sử dụng chất phòng ngừa bệnh có thể xảy ra trước khi bộc lộ các triệu chứng đặc trưng của bệnh hoặc rối loạn liên quan đến flavivirus, để bệnh hoặc rối loạn được ngăn ngừa hoặc, nói cách khác, trì hoãn sự tiến triển của nó.

Chất thích hợp có thể được xác định dựa trên các thử nghiệm sàng lọc được mô tả ở đây. Nói cách khác, hoặc ngoài ra, chất để được sử dụng là kháng thể đơn dòng mà trung hòa flavivirus mà đã được nhận diện theo the phương pháp theo sáng chế. Theo phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng với các kháng thể khác hoặc mảnh kháng thể đã được biết đến để trung hòa flavivirus. Việc sử dụng các kháng thể này có thể là tuần tự, đồng thời, hoặc thay đổi.

Phương pháp trị liệu

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến flavivirus ở bệnh nhân. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân bị bệnh hoặc rối loạn này sử dụng chất (*ví dụ*, chất được xác định bằng thử nghiệm sàng lọc được mô tả ở đây và/hoặc kháng thể đơn dòng được xác định bằng phương pháp theo sáng chế), hoặc kết hợp của chất làm trung hòa flavivirus.

Phương pháp kết hợp

Sáng chế đề xuất việc điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến flavivirus, như sốt Tây sông Nin, viêm màng não, Sốt xuất huyết, sốt vàng da hoặc viêm não, ở bệnh nhân bằng cách sử dụng hai hoặc nhiều kháng thể, như mAb11-LALA hoặc biến thể của mAb11, trong đó vùng Fc của biến thể này không liên kết hoặc liên kết giảm với thụ thể Fc gamma, với kháng thể trung hòa flavivirus khác đã được biết đến trong lĩnh vực này, như mAb11. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến flavivirus ở bệnh nhân bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế, như mAb11-LALA hoặc biến thể mAb11 như được mô tả ở đây, với chất kháng virus bất kỳ đã được biết đến trong lĩnh vực

này. Chất kháng virus có thể là peptit, axit nucleic, phân tử nhỏ, chất ức chế, hoặc ARNi.

Sáng chế sẽ được mô tả hơn nữa trong các ví dụ sau, nó không làm giới hạn phạm vi của sáng chế được mô tả trong yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phòng chống nhiễm virus sốt xuất huyết 2 gây tử vong ở chuột

Ở đây mô tả nghiêm cứu thử nghiệm tác dụng phòng bệnh của việc dùng kháng thể mAb11 (cả kiểu đại và dạng đột biến có vùng Fc được cải biến) ở chuột. Bốn mươi con chuột được đánh giá trong thử nghiệm này và được chia thành 5 nhóm, mỗi nhóm gồm 8 con chuột. Trong nhóm 1, chuột được sử dụng isotyp đối chứng của kháng thể đối chứng IgG. Nhóm 2 được sử dụng 250ug/chuột (~12,5mg/kg) mAb11 kiểu đại. Nhóm 3 được sử dụng 50ug/chuột (~2,5mg/kg) mAb11 kiểu đại (wt mAb). Nhóm 4 được sử dụng 250ug/chuột (~12,5mg/kg) mAb11 có đột biến LALA ở vùng Fc của chúng (mut mAb). Nhóm 5 được sử dụng 50ug/chuột (~2,5mg/kg) mAb11 có đột biến LALA ở vùng Fc của chúng (mut mAb).

Sau khoảng thời gian sau khi sử dụng kháng thể điều trị (đối chứng, mAb11 kiểu đại hoặc mAb11 thể đột biến), ví dụ, 4 giờ hoặc 24 giờ, chuột được tiêm với liều gây chết virus sốt xuất huyết-2. Sau đó chuột được quan sát hàng ngày trong 10 ngày đối với một loạt các yếu tố, như giảm cân, trạng thái bệnh và điểm lâm sàng bao gồm vẻ bề ngoài (vẻ bề ngoài của mắt và lông), khả năng di chuyển, và thái độ (và như được minh họa trong bảng phía dưới).

Bảng 1: Điểm lâm sàng

Điểm	Chữ cái đầu	Mô tả	Vẻ bề ngoài, khả năng di chuyển, và thái độ
1	H	Khỏe	Lông mượt và mắt sáng. Hoạt bát, tắt bật, và đào bới. Cảnh báo
2	SR	Hơi xù	Lông xù nhẹ (thường là quanh đầu/cổ). Hoạt bát, tắt bật, và đào bới. Tỉnh táo

3	R	Xù	Lông xù toàn thân - vẻ bề ngoài "ướt". hoạt bát, tất bật, và đào bới. Tỉnh táo
4	S	Ốm	Lông rất xù. mắt khép hờ, cố định. Đi lại nhưng không tất bật. Hơi hôn mê
5	VS	Rất ốm	Lông rất xù. Mắt nhắm, cố định. Cử động rất chậm hoặc không cử động. Sẽ trở nên thẳng đứng nếu động vào một bên của nó. Hôn mê sâu
6	E	Để chết	Lông rất xù. Mắt nhắm, inset. Hấp hối. Cần gây chết nhân đạo ngay lập tức.
7	D	Đã chết	Không cử động hoặc cử động co cứng không kiểm soát. Sẽ không trở nên đứng thẳng dậy nên tác động vào một bên. Hoàn toàn không có ý thức hoặc hiểm nghèo đáng kể

Chuột được gây chết nhân đạo nếu chúng đạt điểm 5 trở lên và/hoặc khi chúng giảm cân 20%.

Các kết quả nghiên cứu được định lượng và trình bày trong Fig. 3. Cụ thể là, Fig. 3A thể hiện đường cong Kaplan-Meier chứng minh tỷ lệ sống sót của các nhóm chuột khác nhau. Các kết quả thể hiện rằng đối chứng kháng thể và liều kiểu đại của mAb11 không hiệu quả trong việc bảo vệ chuột khỏi chết/gây chết nhân đạo do bệnh. Ngược lại, tất cả các con chuột nhận một trong hai liều thể đột biến của mAb11 theo sáng chế sống sót sau liều lây nhiễm gây chết. Các kết quả này chứng minh rằng thể đột biến của mAb11 có hiệu quả phòng bệnh đối với sự lây nhiễm flavivirus, đặc biệt khi được so sánh với kiểu đại kháng thể.

Khi so sánh phân trăm giảm cân từ trước khi lây nhiễm (Fig. 3B), động vật được sử dụng thể đột biến của mAb11 mất ít trọng lượng hơn so với động vật được sử dụng kháng thể đối chứng hoặc mAb11 kiểu đại mất trọng lượng trong cả quá trình nghiên cứu. Nghiên cứu điểm lâm sàng kết hợp các quan sát định tính khác liên quan đến vẻ bề ngoài và thái độ của đối tượng để tính điểm mức độ sức khỏe quan sát được của động vật. Như được thể hiện trong Fig. 3C, sức khỏe của động vật nhận đối chứng hoặc mAb11 kiểu đại giảm nhanh chóng (số điểm lâm sàng

tăng đến trên 4), trong khi động vật nhận mAb11 thể đột biến vẫn khỏe, tỉnh táo, và di chuyển ngay cả 10 ngày sau lây nhiễm.

Tóm lại, tất cả các kết quả chỉ ra rằng mAb11 thể đột biến ngăn ngừa hiệu quả chết liên quan đến nhiễm flavivirus, làm chậm sự tiến triển của các triệu chứng của bệnh, và có hiệu quả phòng bệnh chung trên chuột bị nhiễm virus sốt xuất huyết.

Ví dụ 2: So sánh giữa các kháng thể có nguồn gốc từ tế bào động vật có vú và tế bào thực vật

Như được mô tả ở đây, các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất trong thực vật chuyển gen. Các nghiên cứu khác cho thấy rằng kháng thể được làm giống như của người thích hợp để sử dụng trong điều trị ở người đã được sản xuất thành công ở thực vật. Hơn nữa, sản xuất kháng thể điều trị ở thực vật là hiệu quả và không đắt đỏ thay cho việc sản xuất kháng thể trong tế bào động vật có vú, và hơn nữa, thiếu chất lây truyền mầm bệnh động vật. Để kiểm tra hiệu quả của kháng thể mAb11 theo sáng chế (chứa đột biến LALA trong vùng Fc; mutAb) các kháng thể được sản xuất từ hệ thống biểu hiện của động vật có vú và từ thực vật (cây thuốc lá) được so sánh *in vivo*.

Chuột A129 được sử dụng trong nghiên cứu này. Chuột A129 thiếu thụ thể IFN α/β , cản giới hạn sự tái bản của virus trong hệ thần kinh trung ương. Chuột A129 đại diện cho mô hình nghiêm ngặt nhất trong lĩnh vực sơ lược lại bệnh ở người liên quan đến sự lây nhiễm flavivirus. Chuột A129 được nhiễm với 1 PFU (đơn vị tạo mảng) của virus sốt xuất huyết gây liệt. (Preshaiod et al., J. Virol, 2012,

Bốn mươi năm con chuột được đánh giá trong nghiên cứu này, và được chia thành 5 nhóm mỗi nhóm gồm 9 con chuột. Trong nhóm 1, chuột được sử dụng kháng thể IgG đối chứng. Kháng thể đối chứng được sử dụng là Z-MAB (kháng thể đơn dòng không liên kết; AB Biosciences). Nhóm 2 được sử dụng 250ug/chuột (~12,5mg/kg) mAb11 có đột biến LALA ở vùng Fc (mut mAb) được sản xuất trong hệ thống biểu hiện của động vật có vú (mutAb động vật có vú). Nhóm 3 được sử

dùng 50ug/chuột (~2,5mg/kg) mAb11 thể đột biến được sản xuất trong hệ thống biểu hiện của động vật có vú. Nhóm 4 được sử dụng 250ug/chuột (~12,5mg/kg) mAb thể đột biến được sản xuất trong hệ thống biểu hiện của thực vật (mutAb thực vật). Nhóm 5 được sử dụng 50ug/chuột (~2,5mg/kg) mAb11 thể đột biến được sản xuất trong hệ thống biểu hiện của thực vật.

Chuột được sử dụng liều kháng thể như được mô tả phía trên, sau đó được thách thức với liều gây chết của Virut sốt xuất huyết. Sau đó chuột được quan sát hàng ngày trong 20 ngày về nhiều yếu tố, như giảm cân, tình trạng bệnh, và điểm lâm sàng bao gồm vết bề ngoài (vết bề ngoài của mắt và bộ lông), khả năng di chuyển, và thái độ (như được mô tả trong Bảng 1).

Các kết quả của những nghiên cứu này được tóm tắt trong Fig. 4, 5 và 6. Fig. 5 thể hiện sự sống sót chung của chuột. Cả hai liều mAb11 thể đột biến được sản xuất từ hệ thống động vật có vú thể hiện hiệu quả phòng chống lại sự lây nhiễm virut, được so sánh với đối chứng (Fig. 4A). Tương tự với các kết quả thể hiện trong Ví dụ 1 và Fig. 3, tất cả chuột được sử dụng kháng thể mutAb sống sót trên ngày 10 nghiên cứu. Cả hai liều mutAb từ thực vật cũng thể hiện hiệu quả bảo vệ, như thể hiện trong Fig. B. So sánh giữa hai mutAb từ động vật có vú và thực vật được thể hiện trong Fig. 3, thể hiện rằng mutAb từ thực vật chỉ hiệu quả, nếu không như vậy, trong bảo vệ chuột khỏi sự tiến triển của bệnh và tử vong.

Fig. 5 thể hiện phần trăm giảm cân ở động vật trong quá trình nghiên cứu. Cả các kháng thể mutAb động vật có vú và mutAb thực vật đều bảo vệ chuột tránh giảm cân khi so sánh với kháng thể đối chứng (Fig. 5B và 5C). So sánh giữa động vật có vú và có nguồn gốc từ thực vật mutAb thể hiện khác biệt không đáng kể giữa việc mất trọng lượng là kết quả của phương pháp sản xuất kháng thể (Fig. 5A).

Fig. 6 thể hiện điểm lâm sàng của động vật trong quá trình nghiên cứu. Việc sử dụng kháng thể mutAb động vật có vú và mutAb thực vật bảo vệ chuột khỏi sự tiến triển hoặc nghiêm trọng của các triệu chứng được so sánh với kháng thể đối chứng (Fig. 6B và 6C). So sánh giữa động vật có vú và có nguồn gốc từ thực vật

mutAb thể hiện rằng hai kháng thể được tiến hành tương tự, với chuột nhận liều mutAb có nguồn gốc từ thực vật cao hơn (250ug) thể hiện thức khỏe tổng thể tốt hơn một chút được xác định bằng điểm lâm sàng (Fig. 6A).

Tóm lại, các kết quả thể hiện rằng sản xuất các kháng thể thể đột biến theo sáng chế chỉ hiệu quả bảo vệ và giảm tính nghiêm trọng của bệnh như kháng thể được sản xuất bằng hệ thống biểu hiện của động vật có vú chuẩn. Đối với một số tham số đo được, cụ thể là ở liều cao của kháng thể mutAb có nguồn gốc từ thực vật, các kháng thể có nguồn gốc từ thực vật cho thấy có tăng nhẹ tác dụng trị liệu khi so sánh với các kháng thể có nguồn gốc từ động vật có vú. Do đó, kháng thể có nguồn gốc từ thực vật các theo sáng chế có thể hữu dụng để bảo vệ và điều trị sự lây nhiễm flavivirut.

Các phương án khác

Trong khi sáng chế được mô tả chi tiết, các mô tả ở trên được dự tính để minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, phạm vi của sáng chế được xác định bởi phạm vi của yêu cầu bảo hộ. Các khía cạnh, lợi ích và biến đổi khác nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ sau.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được làm giống như của người được phân lập nhận ra protein vỏ E của virus Tây sông Nin (WNE), chứa:
 - a. chuỗi nặng với CDR 1-3 chứa trình tự axit amin GYSTH (SEQ ID NO:21), WDNPSGDTTYAENFRG (SEQ ID NO:22), và GGDDYSFDH (SEQ ID NO:23) theo thứ tự;
 - b. chuỗi nhẹ với CDR 1-3 chứa trình tự axit amin RGDSLRSYYAS (SEQ ID NO:24), GENNRPS (SEQ ID NO:25), và NSRDSSDHLLL (SEQ ID NO:26) theo thứ tự; và
 - c. vùng Fc được cải biến chứa các miền CH2 và CH3 và các đột biến ở các vị trí axit amin 234 và 235, để vùng Fc này không liên kết với thụ thể Fc γ , trong đó các đột biến là L234A và L235A, và các vị trí 234 và 235 tương ứng với các vị trí 240 và 241 của SEQ ID NO: 20; trong đó kháng thể không tham gia vào sự tăng cường lây nhiễm flavivirus phụ thuộc vào kháng thể và trong đó kháng thể liên kết và trung hòa flavivirus.
2. Kháng thể theo điểm 1, chứa trình tự axit amin V_H có SEQ ID NO: 1 và trình tự axit amin V_L có SEQ ID NO: 3.
3. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng Fc chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 13.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này liên kết với chất trị liệu, tùy ý trong đó chất trị liệu là chất độc, chất đánh dấu phóng xạ, siARN, phân tử nhỏ, hoặc xytokin, tùy ý trong đó xytokin nêu trên là TGF-beta.
5. Trình tự axit nucleic chứa trình tự axit nucleic là SEQ ID NO: 2, 4 và 8 hoặc mã hóa chuỗi polypeptit chứa SEQ ID NO: 1, 3 và 7 hoặc 13.
6. Chuỗi polypeptit chứa trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 1, 3 và 7 hoặc 13.
7. Vectơ chứa axit nucleic theo điểm 5.

8. Tế bào sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-4 hoặc chứa vectơ theo điểm 7.

9. Tế bào theo điểm 8, trong đó tế bào này là tế bào thực vật.

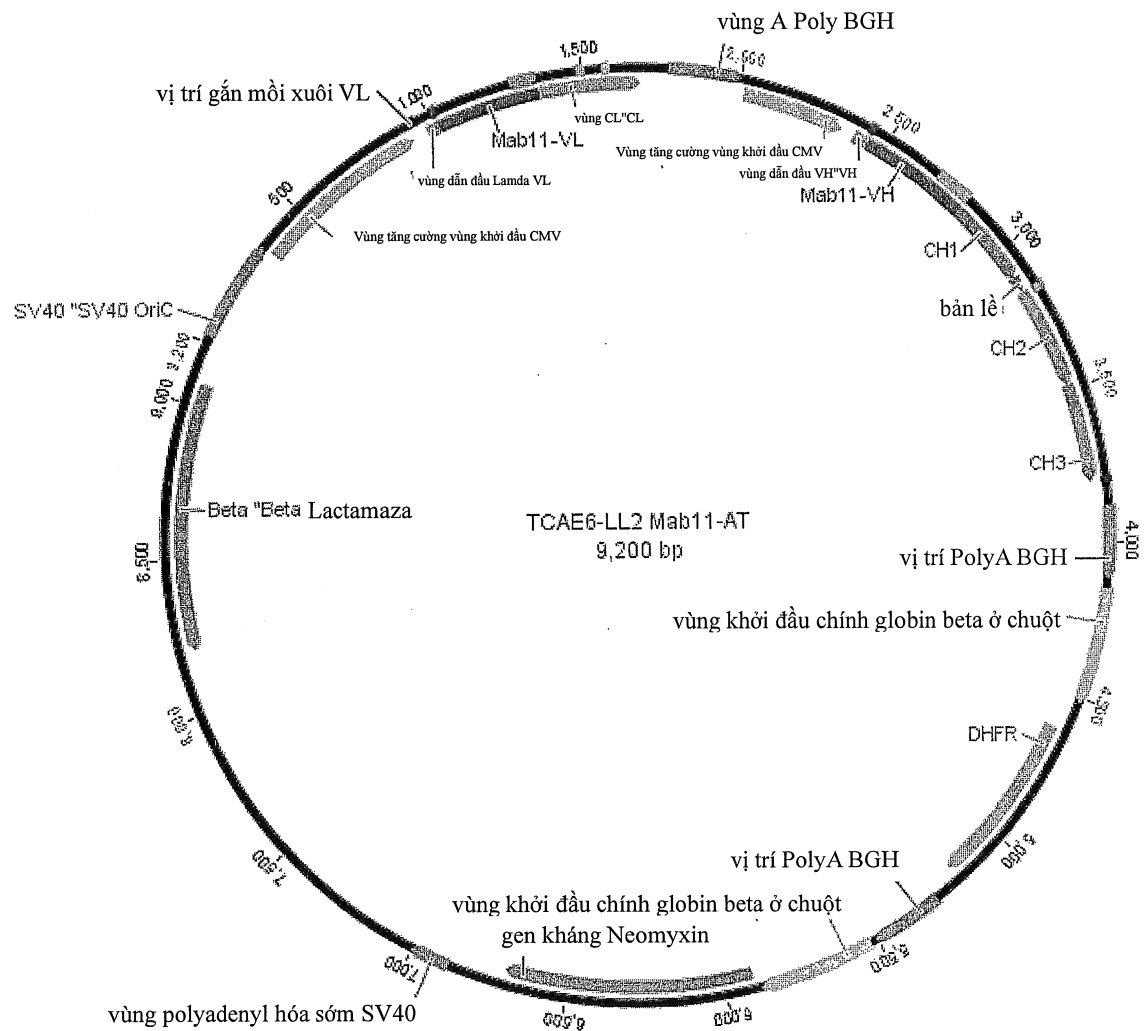


FIG. 1

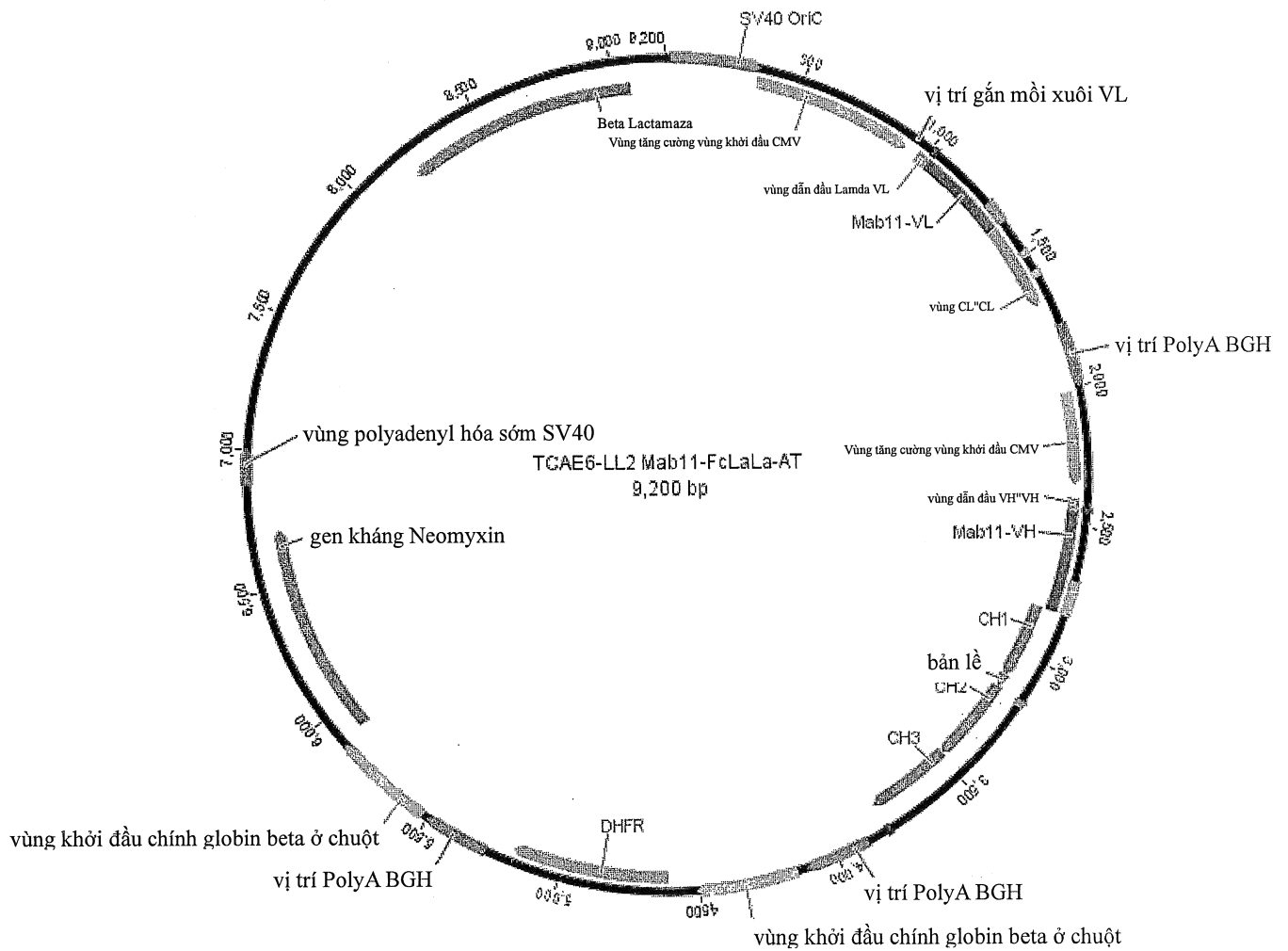


FIG. 2

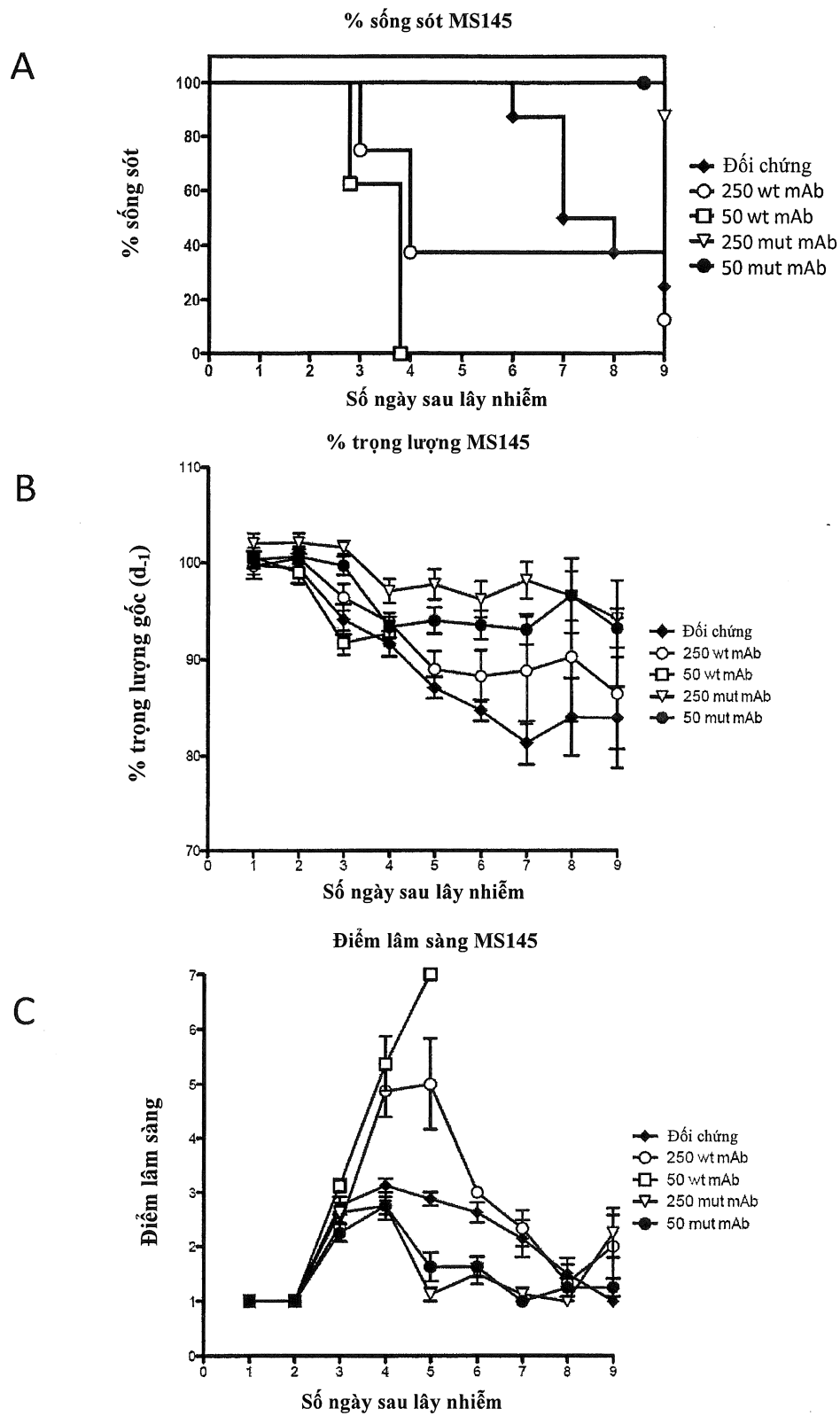
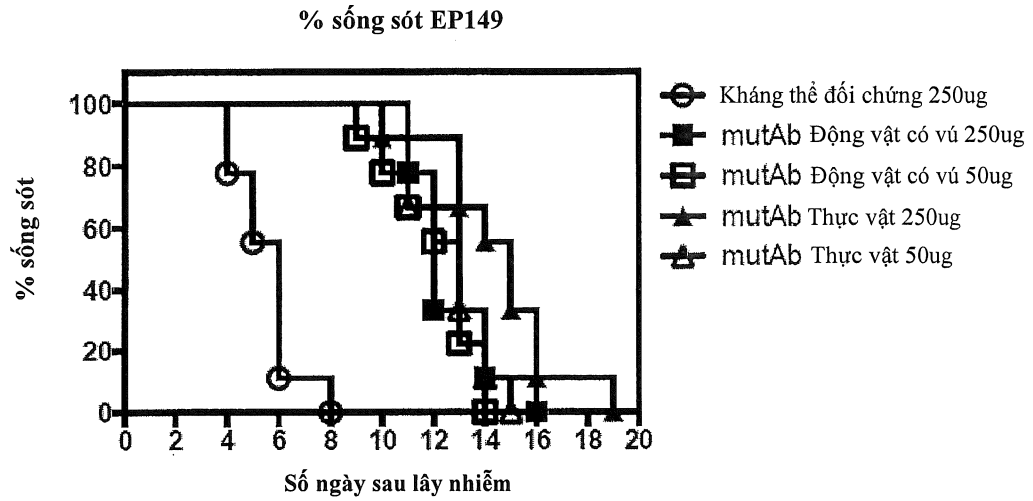


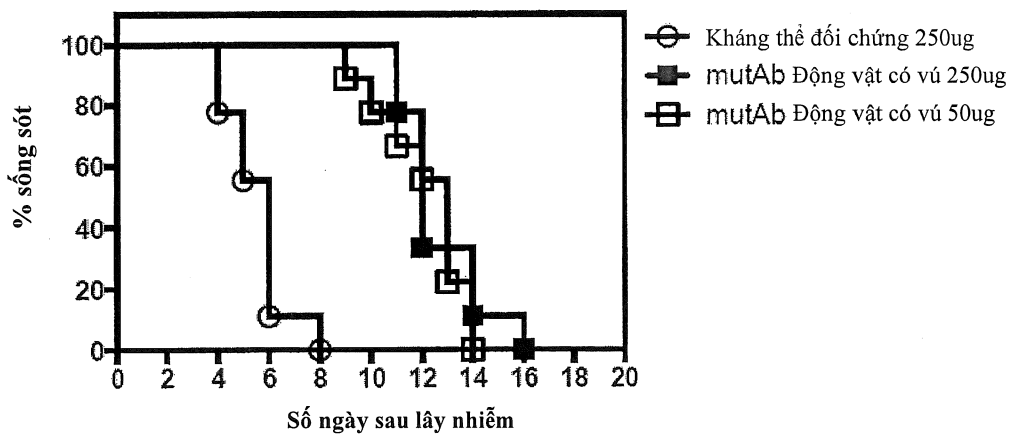
FIG. 3

A



% sống sót EP149: Động vật có vú so với Đối chứng |

B



% sống sót EP149: Thực vật so với Đối chứng

C

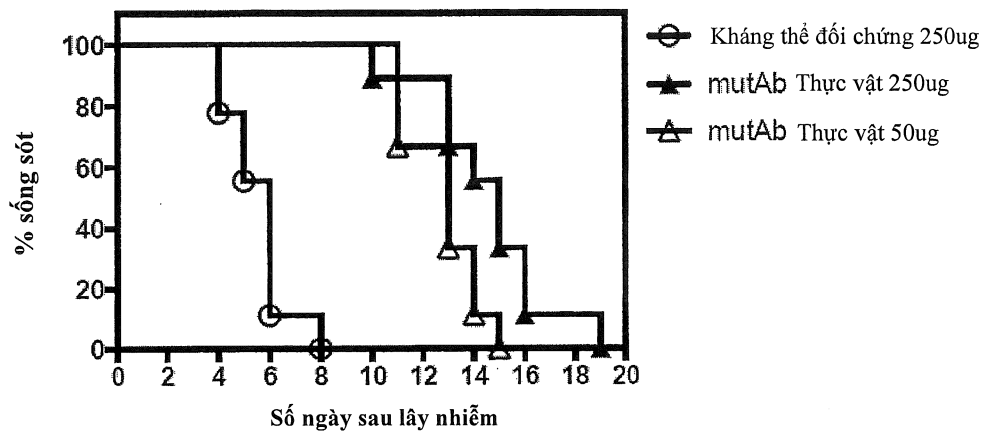


FIG. 4

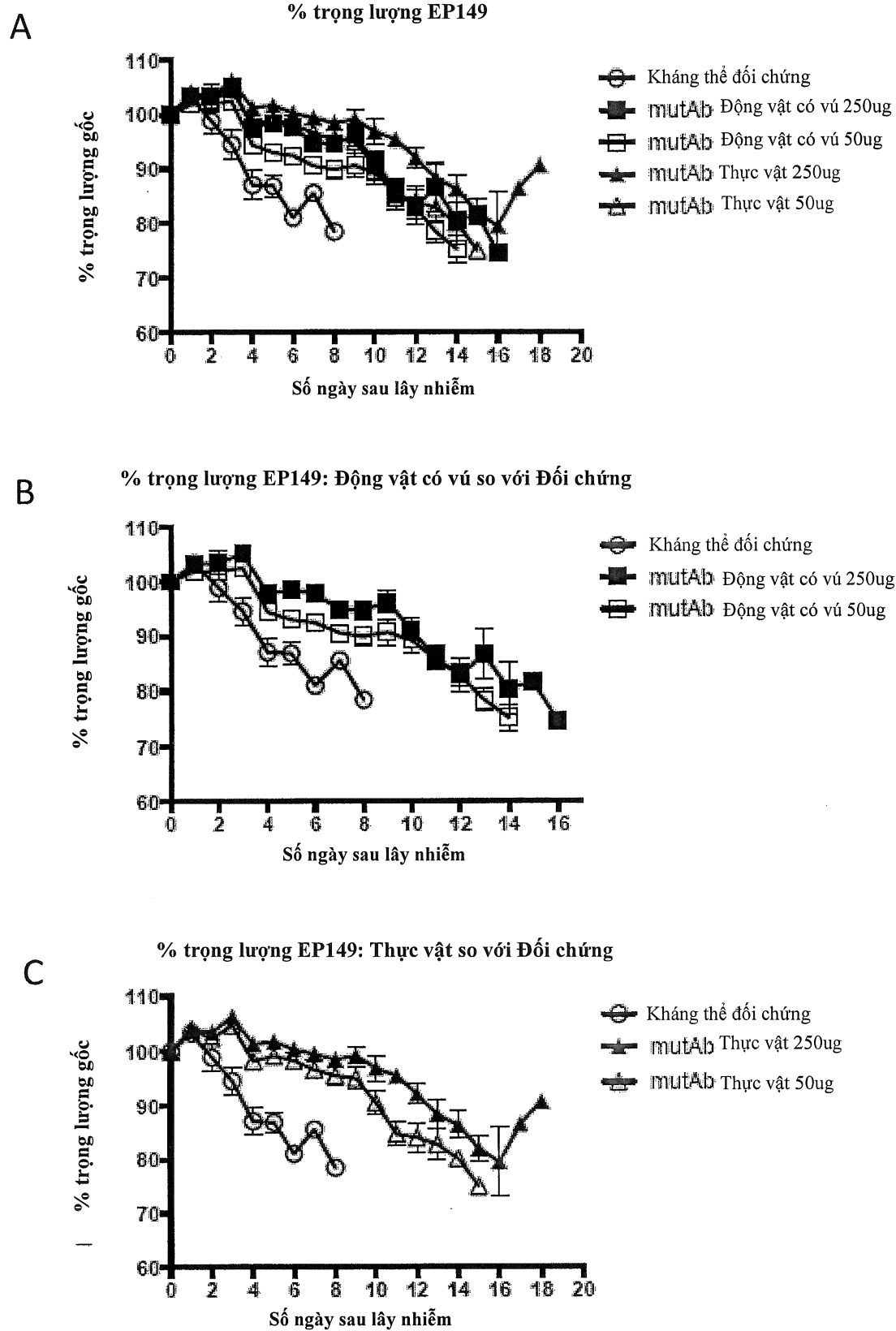


FIG. 5

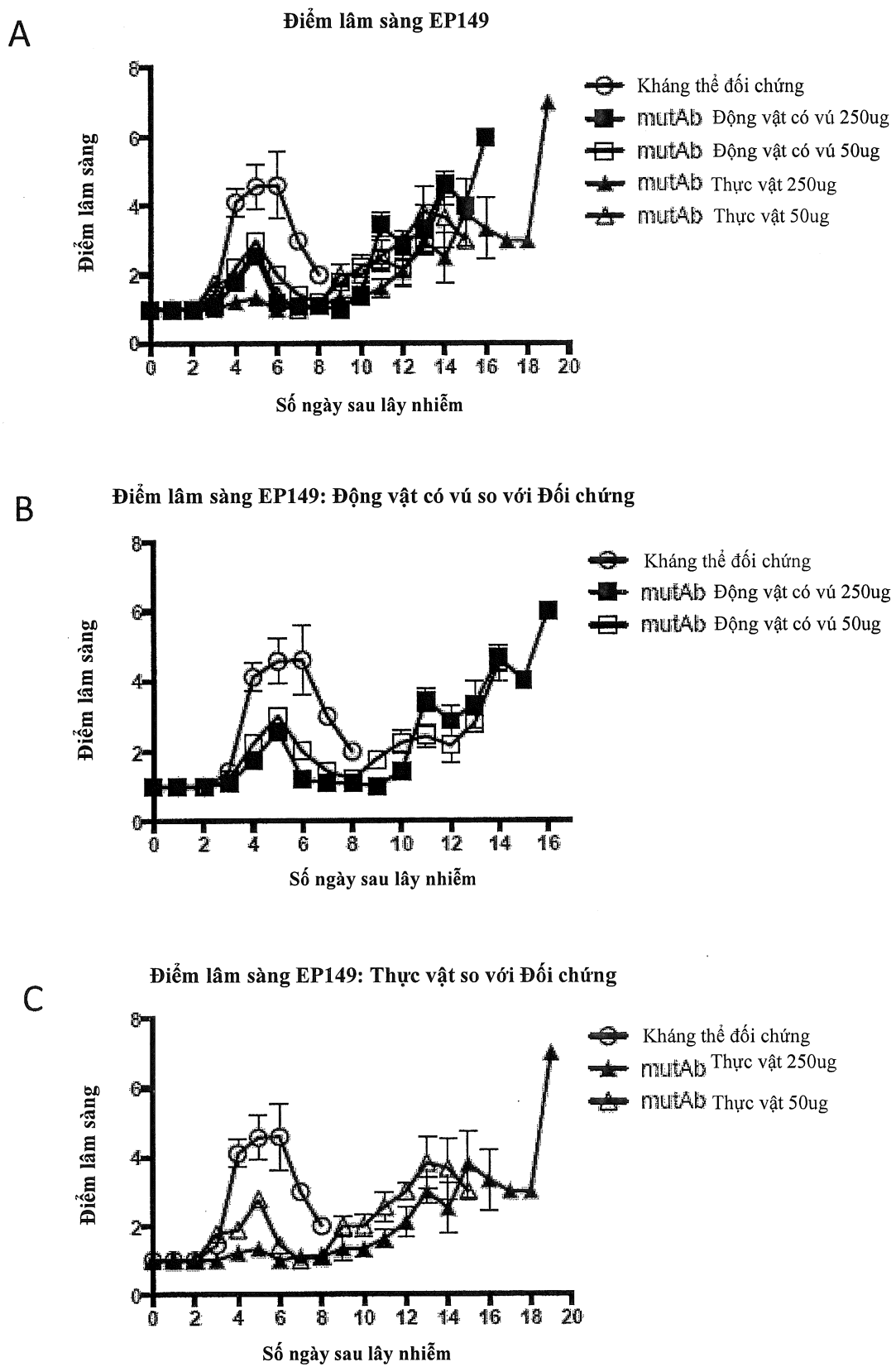


FIG. 6