



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0031792

(51)⁸ C07K 16/28; G01N 33/68; G01N 33/574 (13) B

(21) 1-2017-04691

(22) 27/04/2016

(86) PCT/EP2016/059338 27/04/2016

(87) WO2016/174053 03/11/2016

(30) 15305642.9 27/04/2015 EP

(45) 25/05/2022 410

(43) 26/02/2018 359A

(73) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)

45, place Abel Gance, 92100 Boulogne-Billancourt, France

(72) JOUHANNEAUD, Alexandra (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT THỤ THỂ YẾU TỔ SINH TRƯỞNG TƯƠNG TỰ
INSULIN-1 VÀ KIT CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1, được đặc trưng bởi các vùng xác định bổ sung để sử dụng trong phương pháp phát hiện tế bào khối u biểu hiện thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1; và kit chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, có thể gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1, cũng như trình tự axit amin và axit nucleic mã hóa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1) là thụ thể có hoạt tính tyrosin kinaza và độ tương đồng với thụ thể insulin bằng 70%. Thụ thể IGF-1R là glycoprotein có khối lượng phân tử khoảng 350000. Thụ thể IGF-1R là thụ thể dị tetrame có mỗi nửa - được liên kết bởi các cầu liên kết disulfua - chứa tiểu đơn vị α ngoại bào và tiểu đơn vị β xuyên màng. Thụ thể IGF-1R gắn kết với IGF1 và IGF2 với ái lực rất mạnh (K_d khoảng 1nM), nhưng cũng có thể gắn kết với insulin với ái lực thấp hơn 100 đến 1000 lần. Ngược lại, thụ thể insulin gắn kết với insulin với ái lực rất mạnh mặc dù yếu tố sinh trưởng tương tự insulin chỉ gắn kết với thụ thể insulin ở ái lực thấp hơn 100 lần. Các vùng tyrosin kinaza của thụ thể IGF-1R và thụ thể insulin có độ tương đồng trình tự rất cao mặc dù các vùng có độ tương đồng thấp hơn tương ứng là vùng chứa nhiều xystein nằm trên tiểu đơn vị α và đầu tận cùng C của tiểu đơn vị β . Mức độ khác biệt về trình tự được quan sát ở tiểu đơn vị α nằm ở vùng gắn kết của các phối tử, do đó tạo ra các ái lực tương đối khác biệt của thụ thể IGF-1R và thụ thể insulin tương ứng với yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 và insulin. Mức độ khác biệt ở đầu tận cùng C của tiểu đơn vị β dẫn đến sự phân kỳ trong các quá trình truyền tín hiệu của hai thụ thể này; quá trình phân bào qua trung gian thụ thể IGF-1R, hiệu ứng biệt hóa và ức chế gây chết tế bào theo chương trình, trong khi đó sự hoạt hóa thụ thể insulin chủ yếu gây ra hiệu ứng ở mức độ của quá trình chuyển hóa.

Vai trò của hệ yếu tố sinh trưởng tương tự insulin trong bệnh ung thư đã được tập trung nghiên cứu trong 20 năm qua. Điều này là do ngoài các đặc tính ức chế chết tế bào theo chương trình và phân bào, IGF-1R là cần thiết để thiết lập và duy trì kiểu hình được biến đổi. Đã biết rằng sự biểu hiện quá mức hoặc hoạt hóa cấu trúc của thụ thể IGF-1R dẫn đến sự phát triển của một loạt các tế bào không phụ thuộc vào thụ thể này trong môi trường không chứa huyết tương bào thai bê, và sự hình thành của các khối u ở chuột thiếu

hạt miễn dịch. Điều này là do nhiều sản phẩm mã hóa bởi các gen được biểu hiện có thể chuyển gen tế bào, bao gồm số lượng lớn các thụ thể của các yếu tố sinh trưởng. Tuy nhiên, nghiên cứu về vai trò quan trọng của IGF-1R trong quá trình chuyển gen đã kiểm chứng được rằng tế bào không biểu hiện thụ thể IGF-1R, trong đó gen mã hóa IGF-1R đã được bất hoạt, khó có thể chuyển được bằng các tác nhân khác nhau vào tế bào, như protein E5 của virus gây bệnh u nhú ở bò, biểu hiện quá mức EGFR hoặc PDGFR, kháng nguyên T của SV 40, Ras hoạt hóa hoặc tổ hợp của kháng nguyên T của SV 40 và Ras hoạt hóa.

Do đó, IGF-1R đã được tập trung nghiên cứu làm tác nhân hướng đích trong bệnh ung thư. Nhiều nghiên cứu hướng đích IGF-1R (kháng thể nhân tạo hoặc kháng thể của người hoặc phân tử kích cỡ nhỏ) đã được thực hiện để phát triển chất đối kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin để điều trị bệnh ung thư và hơn 70 thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện theo các hướng khác nhau. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nghiên cứu nào thành công và chưa có kháng thể gắn kết IGF-1R xuất hiện trên thị trường.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến ít nhất một chất phản ứng có thể được sử dụng làm chất chỉ thị sinh học để phát hiện và/hoặc kiểm soát rối loạn sinh ung thư được đặc trưng bởi biểu hiện của thụ thể IGF-1R hoặc qua trung gian biểu hiện bất thường của thụ thể IGF-1R.

Đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện để phát triển kháng thể có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán hoặc dự đoán, nhưng cho đến nay vẫn chưa có kháng thể nào đáp ứng được hoàn toàn mong muốn này.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng các kháng thể có bán trên thị trường hiện nay được sử dụng để đánh giá điểm số của khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R dường như lại không liên quan đến mục đích nêu trên do các kháng thể này cho kết quả dương tính giả và/hoặc âm tính giả. Vấn đề này dẫn đến sự thất bại của các thử nghiệm lâm sàng với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R do sàng lọc đối tượng bị bệnh chứ không sàng lọc hoạt tính của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R.

Hơn nữa, các nghiên cứu đầu tiên được thực hiện bằng cách sử dụng các kháng thể có bán trên thị trường đã cho thấy khác biệt giữa điểm số đánh giá của thụ thể IGF-1R và

hoạt tính kháng khối u của phương điều trị hướng đích bằng thể tiếp hợp kháng thể-được chất.

Sáng chế đề cập đến kháng thể tương quan với đặc tính dược học của phương pháp điều trị hướng đích thụ thể IGF-1R.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với thụ thể IGF-1R, tốt hơn nếu thụ thể IGF-1R của người, với ái lực cao, do đó có thể hữu ích để chẩn đoán rối loạn sinh ung thư qua trung gian biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa 6 vùng CDR có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa:

i) chuỗi nặng chứa vùng CDR-H1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng CDR-H2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, và vùng CDR-H3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3; và

ii) chuỗi nhẹ chứa vùng CDR-L1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, vùng CDR-L2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, và vùng CDR-L3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

Thuật ngữ “kháng thể”, “ab” hoặc “globulin miễn dịch” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ kháng thể đơn dòng, kháng thể phân lập, kháng thể được thiết kế, kháng thể được tổng hợp hóa học, hoặc kháng thể tái tổ hợp (ví dụ kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ hoặc kháng thể đơn dòng nguyên vẹn), kháng thể đa dòng, kháng thể đa hóa trị hoặc kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ kháng thể đặc hiệu kép) và mảnh kháng thể, miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể tái tổ hợp.

Thuật ngữ “kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R” và “kháng thể kháng thụ thể IGF-1R” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ kháng thể có thể gắn kết với thụ thể IGF-1R.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết thụ thể IGF-1R” hoặc “mảnh gắn kết kháng nguyên của

kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit, polypeptit, hoặc protein bất kỳ vẫn có khả năng gắn kết với thụ thể IGF-1R (cũng được gọi là kháng nguyên) của kháng thể. Theo một phương án, “mảnh gắn kết kháng nguyên” được chọn từ nhóm bao gồm mảnh Fv, Fv chuỗi đơn, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc hoặc kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch, hoặc mảnh bất kỳ có thời gian bán thải tăng bằng cách cải biến hóa học, như bổ sung gốc poly(alkylen)glycol, như poly(etylen)glycol (“gắn gốc PEG”) (mảnh được gắn gốc PEG, được gọi là Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG hoặc Fab'-PEG) (trong đó “PEG” là poly(etylen)glycol), hoặc bằng cách tích hợp vào liposom, các mảnh này có ít nhất một trong số các vùng CDR của kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn nữa, “mảnh gắn kết kháng nguyên” được tạo cấu trúc hoặc chứa một đoạn trình tự của vùng thay đổi chuỗi nặng hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể gốc, đoạn trình tự này đủ để duy trì độ đặc hiệu gắn kết và ái lực tương đương với kháng thể gốc, tốt hơn nữa ái lực của mảnh này với kháng nguyên ít nhất bằng 1/100, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 1/10 ái lực của kháng thể gốc.

Tốt hơn nữa, “mảnh gắn kết thụ thể IGF-1R” hoặc “mảnh gắn kết kháng nguyên” theo sáng chế chứa ít nhất:

i) vùng CDR-H1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng CDR-H2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, và vùng CDR-H3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3; và

ii) vùng CDR-L1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, vùng CDR-L2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, và vùng CDR-L3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

Thuật ngữ “gắn kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, tạo thành phức hợp với kháng nguyên tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Mức độ gắn kết đặc hiệu được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất khoảng 1×10^{-6} M hoặc nhỏ hơn. Phương pháp xác định mức độ gắn kết giữa hai phân tử là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ phương pháp thẩm tách cân bằng, phương pháp cộng hưởng plasma bề mặt, và các phương pháp tương tự. Cần hiểu rằng kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết hoặc tương tác với một kháng nguyên khác ở mức độ thấp. Tuy nhiên, theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chỉ gắn kết với một kháng nguyên.

Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung” hoặc “CDR” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các vùng siêu thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch được xác định bằng hệ thống đánh số thứ tự IMGT.

Hệ thống đánh số thứ tự IMGT đã được phát triển để so sánh các vùng thay đổi của thụ thể kháng nguyên, chuỗi, hoặc các loài bất kỳ [Lefranc M.-P., *Immunology Today* 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)]. Theo hệ thống đánh số thứ tự IMGT, các axit amin bảo thủ luôn có cùng vị trí, ví dụ xystein 23 (Cys thứ nhất), tryptophan 41 (Trp bảo thủ), axit amin kỵ nước 89, xystein 104 (Cys thứ hai), phenylalanin hoặc tryptophan 118 (J-PHE hoặc J-TRP). Hệ thống đánh số thứ tự IMGT tạo ra ranh giới chuẩn giữa vùng khung (FR1-IMGT: vị trí số 1 đến 26, FR2-IMGT: 39 đến 55, FR3-IMGT: 66 đến 104 và FR4-IMGT: 118 đến 128) và vùng xác định bổ sung: CDR1-IMGT: 27 đến 38, CDR2-IMGT: 56 đến 65 và CDR3-IMGT: 105 đến 117. Khi các khoảng trống xuất hiện ở một số vị trí, thì chiều dài CDR-IMGT (được thể hiện giữa các dấu ngoặc đơn và cách nhau bởi dấu chấm, ví dụ [8.8.13]) là thông tin quyết định. Hệ thống đánh số thứ tự IMGT được sử dụng trong không gian hai chiều được định dạng là IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)], và trong không gian ba chiều được định dạng là IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

Cần hiểu rằng, “vùng xác định bổ sung” hoặc “CDR” theo sáng chế có nghĩa là các vùng siêu thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch như được xác định theo hệ thống đánh số thứ tự IMGT.

Tuy nhiên, các vùng CDR cũng có thể được xác định theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Có ba vùng CDR chuỗi nặng và ba vùng CDR chuỗi nhẹ. Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung” và “CDR” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vùng chứa các gốc axit amin chính tạo ra ái lực gắn kết với kháng nguyên hoặc epitop của kháng thể. Để đơn giản hóa, các vùng CDR theo Kabat không được xác định. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong

lĩnh vực này có thể sử dụng các vùng CDR theo IMGT để xác định các vùng CDR theo Kabat.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế chứa vùng thay đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng với trình tự SEQ ID NO.7 ít nhất bằng 90%.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế chứa vùng thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng với trình tự SEQ ID NO.8 ít nhất bằng 90%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng 816C12, chứa vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% và 98% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu so với trình tự SEQ ID NO.7; và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.8 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% và 98% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu so với trình tự SEQ ID NO.8.

Thuật ngữ “tỷ lệ phần trăm tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tỷ lệ phần trăm các gốc nucleotit hoặc axit amin giống hệt nhau giữa hai trình tự cần so sánh, thu được sau khi sắp thẳng hàng tối ưu, tỷ lệ phần trăm này có ý nghĩa thống kê tuyệt đối và mức độ khác biệt giữa hai trình tự được phân bố ngẫu nhiên dọc theo chiều dài của chúng. Hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin thường được so sánh bằng cách so sánh các trình tự sau khi sắp thẳng hàng tối ưu, hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin này có thể được so sánh bằng cách sử dụng phân đoạn hoặc “giao diện sắp thẳng hàng”. Sắp thẳng hàng tối ưu của các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, ngoài so sánh bằng tay, bằng thuật toán độ tương đồng vị trí của Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], bằng thuật toán độ tương đồng vị trí của Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], bằng phương pháp tra cứu độ tương đồng của Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] hoặc bằng phần mềm máy vi tính sử dụng các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA và TFASTA trong gói phần mềm Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, hoặc bằng phần mềm so sánh BLAST NR hoặc BLAST P). Đối với trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 85%, 90%, 95% và 98% so với trình tự axit amin đối chiếu, tốt hơn nếu các

trình tự axit amin này bao gồm các trình tự chứa trình tự đối chiều, một số gốc cải biến, tức là gốc loại bỏ, gốc bổ sung hoặc gốc thay thế ít nhất một axit amin, gốc cắt ngắn hoặc gốc kéo dài. Trong trường hợp của của gốc thay thế một hoặc nhiều axit amin liền kề hoặc không liền kề, tốt hơn nếu các gốc thay thế này là các gốc trong đó các axit amin được thế được thay bằng “các axit amin tương đương”. Thuật ngữ “các axit amin tương đương” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các axit amin bất kỳ có thể được thế cho một trong số các axit amin cấu trúc nhưng không làm biến đổi hoạt tính sinh học của các kháng thể tương ứng và ví dụ cụ thể về các axit amin tương đương này được thể hiện dưới đây.

Các axit amin tương đương có thể được xác định dựa trên độ tương đồng cấu trúc với các axit amin thay thế các axit amin tương đương này hoặc kết quả của các thử nghiệm so sánh hoạt tính sinh học giữa các protein gắn kết kháng nguyên khác nhau có thể được tạo ra.

Các gốc thay thế có thể được thực hiện mà không làm biến đổi đáng kể hoạt tính sinh học của protein gắn kết kháng nguyên được cải biến tương ứng được thể hiện trong Bảng 1; các gốc thay thế ngược chiều có thể được thực hiện một cách tự nhiên trong cùng điều kiện.

Bảng 1

Gốc axit amin ban đầu	Gốc axit amin thế
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, không gắn kết với thụ thể insulin.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc “Mab” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể gần như tương đồng, tức là các kháng thể riêng biệt của quần thể là giống hệt nhau chỉ khác là các đột biến có trong tự nhiên có thể có mặt ở lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có độ đặc hiệu cao chỉ kháng một epitop duy nhất. Kháng thể đơn dòng có thể được sản xuất bởi dòng tế bào B duy nhất hoặc tế bào lai. Kháng thể đơn dòng cũng có thể là kháng thể đơn dòng tái tổ hợp, tức là được sản xuất bằng phương pháp thiết kế di truyền protein. Kháng thể đơn dòng cũng có thể được phân lập từ thư viện kháng thể của thực khuẩn thể. Ngoài ra, trái ngược với kháng thể đa dòng thường bao gồm các kháng thể khác nhau kháng các epitop và yếu tố quyết định kháng nguyên khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng chỉ kháng một epitop duy nhất của kháng nguyên. Sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc thu nhận bằng cách tinh chế từ nguồn tự nhiên hoặc thu nhận bằng phương pháp tái tổ hợp gen hoặc tổng hợp hóa học.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể tái tổ hợp. Thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể được sản xuất bằng cách biểu hiện ADN tái tổ hợp trong tế bào sống. Kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế được thu nhận bằng phương pháp tái tổ hợp gen đã biết trong lĩnh vực này, tạo ra các trình tự ADN không có trong các cơ thể sinh học.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể được tổng hợp hóa học.

Thuật ngữ “kháng thể gắn kết IGF-1R” bao gồm kháng thể của chuột, và kháng thể khảm và kháng thể nhân tạo gắn kết thụ thể IGF-1R.

Các trình tự của kháng thể đơn dòng 816C12, được xác định theo hệ thống đánh số thứ tự IMGT được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Kháng thể	Phương pháp đánh số thứ tự vùng CDR	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO.
816C12 I-4894	IMGT	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
		vùng thay đổi		7
		-	vùng thay đổi	8

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm kháng thể của chuột, kháng thể thể khảm, và kháng thể nhân tạo. Kháng thể này có thể thu được từ tế bào lai có nguồn gốc từ chuột được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, tế bào lai này được thu nhận bằng cách dung hợp tế bào lách/tế bào lympho của chuột được gây miễn dịch Balb/C và dòng tế bào u tủy Sp 2/O-Ag 14.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào lai của chuột có khả năng bài tiết kháng thể đơn dòng theo sáng chế, tức là tế bào lai có nguồn gốc từ chuột được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 17 tháng 09 năm 2014, với mã đăng ký là I-4894.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng 816C12, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được bài tiết bởi tế bào lai I-4894.

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ kháng thể này được bài tiết bởi tế bào lai được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 17 tháng 09 năm 2014, với mã đăng ký là I-4894.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào lai của chuột được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 17 tháng 09 năm 2014, với mã đăng ký là I-4894.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic phân lập được chọn từ các axit nucleic sau:

a) axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế ;

b) axit nucleic chứa trình tự được chọn từ các trình tự SEQ ID NO.9 hoặc SEQ ID NO.10, hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% và 98% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu so với các trình tự SEQ ID NO.9 hoặc SEQ ID NO.10;

và

e) axit nucleic bổ sung của axit nucleic theo mục a) hoặc b).

Các trình tự nucleotit mã hóa kháng thể đơn dòng 816C12 theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Kháng thể	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO.
816C12	vùng thay đổi		9
I-4894		vùng thay đổi	10

Thuật ngữ “axit nucleic”, “trình tự nucleic”, “trình tự axit nucleic”, “polynucleotit”, “oligonucleotit”, “trình tự polynucleotit” và “trình tự nucleotit” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ trình tự chính xác của nucleotit, được cải biến hoặc không, xác định mảnh hoặc vùng axit nucleic, chứa các nucleotit không có trong tự nhiên hoặc không, ví dụ ADN sợi kép, ADN sợi đơn hoặc sản phẩm phiên mã của các ADN này.

Cần hiểu rằng sáng chế không đề cập đến trình tự nucleotit trong môi trường nhiễm sắc thể tự nhiên của nó, tức là ở trạng thái tự nhiên. Các trình tự theo sáng chế được phân lập và/hoặc tinh chế, tức là chúng được lấy mẫu trực tiếp hoặc gián tiếp, ví dụ bằng bản sao, môi trường của chúng đã được cải biến ít nhất một phần. Axit nucleic phân lập được thu nhận bằng phương pháp tái tổ hợp gen bởi tế bào vật chủ, hoặc tổng hợp hóa học cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến vector chứa axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế đề cập đến vector tách dòng và/hoặc biểu hiện chứa trình tự nucleotit theo sáng chế.

Tốt hơn nếu vector theo sáng chế chứa các đoạn cho phép biểu hiện và/hoặc bài tiết trình tự nucleotit trong tế bào vật chủ được chọn. Do đó, vector này phải chứa vùng khởi đầu, trình tự tín hiệu hoạt hóa và kết thúc dịch mã, cũng như các vùng điều hòa phiên mã ổn định. Vector này phải có khả năng được duy trì ổn định trong tế bào vật chủ và tùy ý có thể có các trình tự tín hiệu đặc hiệu mã hóa bài tiết protein được dịch mã. Các đoạn khác nhau này được chọn lọc và tối ưu hóa bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này theo tế bào vật chủ được sử dụng. Đối với mục đích này, trình tự nucleotit có thể được cài vào vector tái bản bên trong vật chủ được chọn hoặc vector tích hợp của vật

chủ được chọn.

Vector này được tổng hợp bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và sản phẩm tách dòng thu được có thể được chèn vào vật chủ thích hợp bằng các phương pháp chuẩn, như phương pháp chuyển gen nhờ liposom, phương pháp xung điện, phương pháp sốc nhiệt hoặc phương pháp hóa học.

Ví dụ về vector này bao gồm vector plasmit hoặc vector virus. Các vector này được sử dụng để chuyển gen tế bào vật chủ để tách dòng hoặc biểu hiện trình tự nucleotit theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào vật chủ được chuyển gen bằng hoặc chứa vector theo sáng chế.

Tế bào vật chủ có thể được chọn từ tế bào nhân thật hoặc tế bào nhân sơ, như tế bào vi khuẩn, và tế bào nấm men hoặc tế bào động vật, tức là tế bào động vật có vú. Tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến động vật không phải là người, có tế bào chuyển gen theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm các bước sau:

a) nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế trên môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho tế bào này; và

b) thu nhận kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được sản sinh từ môi trường nuôi cấy hoặc tế bào được nuôi cấy này.

Tế bào chuyển gen theo sáng chế được sử dụng trong phương pháp sản xuất polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Phương pháp sản xuất polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế, bao gồm bước sử dụng vector và/hoặc tế bào được chuyển gen bằng vector theo sáng chế, cũng được bao gồm sáng chế. Tốt hơn nếu, tế bào được chuyển gen bằng vector theo sáng chế được nuôi cấy trong điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit nêu trên và thu nhận peptit tái tổ hợp này.

Như nêu trên, tế bào vật chủ có thể được chọn từ tế bào nhân thật hoặc tế bào nhân sơ. Cụ thể là, có thể xác định trình tự nucleotit theo sáng chế tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình bài tiết trong tế bào nhân thật hoặc nhân sơ này. Do đó, vector theo sáng chế

chứa trình tự như vậy có thể được sử dụng hữu hiệu để sản xuất protein tái tổ hợp được bài tiết. Thực vậy, protein tái tổ hợp quan tâm này sẽ được tinh chế một cách dễ dàng do protein này có mặt trong dịch nuôi cấy tế bào chứ không nằm trong tế bào vật chủ.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế làm chất chỉ thị sinh học. Phương pháp này có thể được sử dụng để phát hiện hoặc chẩn đoán các rối loạn sinh ung thư khác nhau liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tổ chức liên kết xương, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư nội mạc tử cung, u nguyên bào đệm, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư đầu và cổ hoặc bệnh ung thư bất kỳ khác liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng mức độ biểu hiện kháng thể liên quan đến rối loạn cụ thể sẽ phụ thuộc vào bản chất và/hoặc mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh trước đó.

Các kháng thể theo sáng chế được sử dụng theo đường đưa thuốc bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ đường khu trú, đường tiêm, đường tiêm bắp, v.v) sẽ tạo ra phương pháp rất hữu ích để phát hiện các tế bào phát triển không bình thường trong mẫu cũng như cho phép theo dõi phác đồ điều trị cho đối tượng bị rối loạn tăng sinh liên quan đến hoặc qua trung gian biểu hiện của thụ thể IGF-1R.

Kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó sẽ được sử dụng trong các mục đích nghiên cứu và y học khác nhau, bao gồm phát hiện, chẩn đoán, dự đoán và làm giảm các bệnh lý khác nhau liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên để sử dụng làm hoạt chất để phát hiện tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên, để sử dụng trong chẩn đoán hoặc dự báo *in vitro* hoặc *ex vivo* rối loạn sinh ung thư liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R.

Thuật ngữ “chẩn đoán bệnh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp xác định hoặc phát hiện sự có mặt của rối loạn sinh ung thư liên quan đến hoặc qua trung gian biểu hiện của thụ thể IGF-1R, kiểm soát tiến triển bệnh, và xác định hoặc phát hiện

tế bào hoặc mẫu biểu thị rối loạn liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R.

Thuật ngữ “dự đoán” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khả năng phục hồi từ bệnh hoặc dự đoán sự phát triển có thể xảy ra hoặc hậu quả của bệnh. Ví dụ, khi mẫu từ đối tượng là âm tính để nhuộm bằng kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, thì “dự đoán” là đối tượng này khỏe mạnh hơn khi mẫu là dương tính để nhuộm IGF-1R. Các mẫu có thể được xác định điểm số đánh giá về mức độ biểu hiện IGF-1R theo thang điểm thích hợp sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R có thể được sản xuất ở dạng thể tiếp hợp miễn dịch hoặc kháng thể được đánh dấu để thu được tín hiệu có thể định lượng/phát hiện. Khi được sử dụng với các chất đánh dấu thích hợp hoặc các phân tử sinh học hoặc hóa học có thể phát hiện thích hợp khác, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R đặc biệt hữu ích để chẩn đoán và dự đoán *in vitro* và *in vivo*.

Các chất đánh dấu để sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực này bao gồm enzym, đồng vị phóng xạ, chất phát huỳnh quang, chất phát quang và chất sinh màu, bao gồm hạt màu, như keo vàng hoặc hạt nhựa cao su. Các thử nghiệm miễn dịch thích hợp bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Các loại chất đánh dấu khác nhau và phương pháp tiếp hợp chất đánh dấu vào kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R là đã biết trong lĩnh vực này, như được thể hiện dưới đây.

Thuật ngữ “rối loạn sinh ung thư liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các bệnh và rối loạn khác nhau trong đó sự có mặt của nồng độ cao của thụ thể IGF-1R (bất thường) ở đối tượng bị rối loạn này đã được kiểm chứng là nguyên nhân gây ra rối loạn này hoặc yếu tố góp phần làm trầm trọng thêm rối loạn này. Theo cách khác, các rối loạn này có thể được kiểm chứng bằng mức độ gia tăng nồng độ của thụ thể IGF-1R trên bề mặt tế bào ở tế bào hoặc mô bị ảnh hưởng của đối tượng bị rối loạn này. Mức độ gia tăng nồng độ của IGF-1R có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R.

Theo một số phương án, liên quan đến thụ thể IGF-1R, thuật ngữ “mức độ biểu hiện gia tăng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ biểu hiện protein hoặc gen gia tăng có ý nghĩa thống kê (như được đo bằng mức độ biểu hiện ARN hoặc protein) so với mẫu đối chứng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc

mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên, để sử dụng trong việc xác định xem đối tượng bị rối loạn sinh ung thư có được điều trị hiệu quả bằng chất ức chế hướng đích thụ thể IGF-1R, tốt hơn nếu kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R riêng biệt, được kết hợp hoặc tiếp hợp.

Thuật ngữ “chất ức chế hướng đích thụ thể IGF-1R” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hợp chất có khả năng làm giảm hoặc ức chế hoạt tính tyrosin kinaza của thụ thể IGF-1R, bằng cách gắn kết với các phối tử của thụ thể IGF-1R hoặc với chính IGFR. Ví dụ về các chất ức chế này bao gồm protein, peptit, kháng thể hoặc thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc chất đối kháng IGF-1R bất kỳ, oligonucleotit đối mã hoặc ARN gây nhiễu mạch ngăn ức chế biểu hiện gen mã hóa thụ thể IGF-1R hoặc gen mã hóa một trong số các phối tử của IGFR, hoặc được chất hoặc hoạt chất bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực này.

Cụ thể hơn, chất ức chế hướng đích thụ thể IGF-1R là hợp chất hoặc phân tử có thể gắn kết với thụ thể IGF-1R và ức chế gắn kết các phối tử của nó.

Cụ thể hơn nữa, chất ức chế hướng đích thụ thể IGF-1R là kháng thể đơn dòng gắn kết với thụ thể IGF-1R.

Theo một phương án ưu tiên khác, chất ức chế hướng đích thụ thể IGF-1R bao gồm thể tiếp hợp kháng thể-được chất, trong đó gốc kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R và gốc được chất có thể được chọn từ được chất bất kỳ, như chất gây độc tế bào, chất kìm tế bào, độc tố, v.v. Theo phương án cụ thể, gốc được chất có thể bao gồm auristatin, chất tương tự hoặc dẫn xuất của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phát hiện *in vitro* hoặc *ex vivo* sự có mặt và/hoặc vị trí của tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên; và

(b) phát hiện sự gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với mẫu sinh học nêu trên.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phát hiện và/hoặc định lượng và/hoặc xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R ở tế bào của đối tượng, tốt

hơn nếu ở bề mặt tế bào của đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên; và

(b) phát hiện, và/hoặc định lượng, và/hoặc xác định mức độ gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với mẫu sinh học nêu trên.

Mức độ gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R có thể được phát hiện và/hoặc định lượng và/hoặc xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Mặc dù các phương pháp thích hợp bất kỳ để thực hiện các thử nghiệm này được bao gồm trong sáng chế, nhưng tốt hơn nếu phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang, phương pháp ELISA, phương pháp thấm tách western và phương pháp hóa mô miễn dịch được sử dụng. Tốt hơn nữa nếu phương pháp hóa mô miễn dịch và phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phát hiện *in vitro* hoặc *ex vivo* tỷ lệ phần trăm tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên; và

(b) định lượng tỷ lệ phần trăm tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mẫu sinh học nêu trên.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R ở tế bào khối u hoặc khối u của đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên; và

(b) định lượng mức độ gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với thụ thể IGF-1R trong mẫu sinh học nêu trên.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng mức độ gắn kết của kháng thể kháng thụ thể IGF-1R với thụ thể IGF-1R có thể được định lượng bằng các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Tốt hơn nếu, phương pháp miễn dịch enzym được sử dụng, như phương pháp ELISA, phương pháp miễn dịch huỳnh quang,

phương pháp hóa mô miễn dịch, phương pháp miễn dịch phóng xạ, hoặc phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang.

Theo phương pháp của sáng chế, mức độ gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với thụ thể IGF-1R được định lượng bằng phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang hoặc phương pháp hóa mô miễn dịch.

Thuật ngữ “mẫu sinh học” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mẫu bất kỳ được lấy từ đối tượng. Mẫu sinh học này phải cho phép xác định được mức độ biểu hiện của chất chỉ thị sinh học theo sáng chế. Do đó, bản chất của mẫu sinh học sẽ phụ thuộc vào bản chất của khối u.

Tốt hơn nếu, mẫu sinh học bao gồm mẫu máu, mẫu huyết thanh, hoặc mẫu hạch bạch huyết, khi bệnh ung thư được đặc trưng bởi khối u nhầy.

Tốt hơn nếu, mẫu sinh học bao gồm mẫu sinh thiết hoặc mẫu được lấy từ quá trình phẫu thuật cắt bỏ, khi bệnh ung thư được đặc trưng bởi khối u rắn.

Tốt hơn nếu, mẫu sinh học là dịch sinh học, như huyết tương, tế bào máu toàn phần, mẫu mô hoặc mẫu sinh thiết của người. Ví dụ về mẫu sinh học có thể bao gồm mô sinh thiết, có thể được sử dụng để xác định sự có mặt của rối loạn sinh ung thư liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R.

Khi mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong các mẫu sinh học được thử nghiệm được xác định, thì các kết quả này có thể được so sánh với các kết quả của các mẫu đối chứng, thu được theo cách thức tương tự như các mẫu sinh học được thử nghiệm nhưng từ các đối tượng riêng biệt không bị rối loạn sinh ung thư liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R. Khi mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R tăng đáng kể trong mẫu sinh học được thử nghiệm, thì đối tượng có nguy cơ cao bị hoặc sẽ tiến triển rối loạn này.

Sáng chế đề cập đến phương pháp chẩn đoán hoặc dự đoán *in vitro* hoặc *ex vivo* khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R, bao gồm các bước (i) xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R bằng phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R ở tế bào khối u hoặc khối u của đối tượng theo sáng chế, như mô tả nêu trên, và (ii) so sánh mức độ biểu hiện thu được ở bước (i) với mức độ biểu hiện đối chiếu của thụ thể IGF-1R từ mô bình thường hoặc mô không biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Liên quan đến sự phát triển của liệu pháp kháng khối u hướng đích, phương pháp chẩn đoán bằng hóa mô miễn dịch đưa ra thông tin tại chỗ về mức độ biểu hiện thụ thể, do đó cho phép sàng lọc đối tượng bị bệnh nhạy với điều trị theo mức độ biểu hiện của các thụ thể cần thiết để điều trị như vậy.

Giai đoạn xác định có giá trị dự đoán tiềm năng và cung cấp các tiêu chuẩn để thiết kế liệu pháp tối ưu. Simpson et al., *J. Clin. Oncology* 18:2059 (2000). Ví dụ, phương pháp chọn lọc điều trị đối với các khối u rắn được dựa trên sự tiến triển của khối u, thường được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm đánh giá khối u/bướu/di căn do American Joint Committee on Cancer (AJCC) cung cấp. Đã biết rằng mặc dù thử nghiệm và hệ tiến triển này cung cấp một số thông tin có giá trị liên quan đến giai đoạn ở đó khối u rắn đã được chẩn đoán ở đối tượng bị bệnh, có thể không chính xác và không đầy đủ. Cụ thể là, thử nghiệm này có thể xác định không chính xác các giai đoạn tiến triển sớm của khối u.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* điểm số đánh giá thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên;

(b) định lượng bằng phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang hoặc phương pháp hóa mô miễn dịch mức độ gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với thụ thể IGF-1R trong mẫu sinh học nêu trên; và

(c) xác định điểm số đánh giá tế bào khối u hoặc khối u bằng cách so sánh mức độ gắn kết thu được ở bước (b) với thang điểm thích hợp dựa trên hai thông số là cường độ vết nhuộm và tỷ lệ phần trăm tế bào biểu hiện dương tính.

Theo một phương án, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R có thể gắn kết với IGF-1R khi các mẫu mô được cố định bằng formalin, formol được thế, glycol cố định, nhúng parafin và/hoặc lạnh đông.

Phương pháp phân tích tỷ lệ phần trăm nguy cơ bất kỳ có thể được sử dụng để xác định giá trị chẩn đoán của thụ thể IGF-1R. Ví dụ về các phương pháp phân tích này bao gồm phân tích hồi quy Cox, là phương pháp bán tham số để lập mô hình dữ liệu khả năng

sống sót hoặc dữ liệu thời gian-biến cố trong sự có mặt của trường hợp kiểm định (Hosmer and Lemeshow, 1999; Cox, 1972). Trái ngược với các phân tích khả năng sống sót khác, ví dụ Life Tables hoặc Kaplan-Meyer, phân tích hồi quy Cox cho phép tích hợp các tham số dự đoán (đồng tham số) trong các mô hình. Bằng cách sử dụng phương pháp phân tích thông thường, ví dụ phân tích hồi quy Cox, có thể đánh giá giả thuyết về mối tương quan của tình trạng biểu hiện thụ thể IGF-1R ở khối u nguyên phát với tần suất thời gian khởi phát bệnh (thời gian sống sót không bị bệnh, hoặc thời gian bệnh di căn), hoặc thời gian tử vong bởi bệnh (thời gian sống sót tổng cộng). Phân tích hồi quy Cox cũng được gọi là phân tích tỷ lệ phần trăm nguy cơ Cox. Phương pháp này là phương pháp chuẩn để xác định giá trị chẩn đoán của chất chỉ thị khối u về thời gian sống sót của đối tượng bị bệnh. Khi được sử dụng trong mô hình nhiều tham số, thì tác dụng của một số đồng tham số được đánh giá song song sao cho các đồng tham số riêng biệt có giá trị chẩn đoán độc lập có thể được xác định, tức là các chỉ thị hữu ích nhất. Thuật ngữ “tình trạng của thụ thể IGF-1 âm tính hoặc dương tính” cũng được gọi là [IGF-1R (-)] hoặc [IGF-1R (+)].

Mẫu phân tích có thể “được xác định điểm số đánh giá” trong quá trình chẩn đoán hoặc kiểm soát bệnh ung thư. Theo cách thức đơn giản nhất, điểm số thu được có thể là âm tính hoặc dương tính được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu bằng phương pháp hóa mô miễn dịch. Điểm số có ý nghĩa định lượng hơn bao gồm điểm số đánh giá hai thông số bao gồm cường độ vết và tỷ lệ phần trăm tế bào bắt màu (“dương tính”) được lấy mẫu.

Thuật ngữ “tình trạng của thụ thể IGF-1” liên quan đến phân loại nhóm khối u dương tính với IGF-1R [IGF-1R (+)] hoặc âm tính với IGF-1R [IGF-1R (-)] dựa trên kết quả xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R như được đo bằng phương pháp bất kỳ, như phương pháp hóa mô miễn dịch, phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang, hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, để đảm bảo chuẩn hóa, các mẫu có thể được xác định điểm số đánh giá về mức độ biểu hiện IGF-1R theo các thang điểm khác nhau, hầu hết các thang điểm này là dựa trên đánh giá mật độ hợp chất phản ứng và tỷ lệ phần trăm tế bào dương tính (Payne et al., *Predictive markers in breast cancer - the present, Histopathology* 2008, 52, 82-90).

Theo một phương án khác, bước xác định điểm số đánh giá, đặc biệt là ở bước (c) của phương pháp theo sáng chế, bao gồm việc sử dụng thang điểm thích hợp dựa trên cường độ vết và tỷ lệ phần trăm tế bào dương tính.

Ví dụ về thứ nhất về các thang điểm này bao gồm thang điểm Quick Allred để đánh giá mức độ biểu hiện thụ thể oestrogen và thụ thể progesteron bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, các mẫu có thể được xác định điểm số đánh giá về mức độ biểu hiện IGF-1R theo thang điểm nằm trong khoảng từ 0 đến 8 kết hợp điểm số về cường độ phản ứng và tỷ lệ phần trăm tế bào bắt màu (Harvey JM, Clarck GM, Osborne CK, Allred DC; J. Clin. Oncol. 1999; 17; 1474-1481). Cụ thể hơn, tiêu chuẩn thứ nhất của cường độ phản ứng được xác định điểm số đánh giá theo thang điểm nằm trong khoảng từ 0 đến 3, trong đó 0 tương đương với “không có khả năng phản ứng” và 3 tương đương với “khả năng phản ứng mạnh”. Tiêu chuẩn thứ hai của tỷ lệ phản ứng được xác định điểm số đánh giá theo thang điểm nằm trong khoảng từ 0 đến 5, trong đó 0 tương đương với “không có khả năng phản ứng” và 5 tương đương với “tỷ lệ phản ứng nằm trong khoảng từ 67% đến 100%”. Điểm số cường độ phản ứng, sau đó điểm số tỷ lệ phản ứng được tính tổng để thu được điểm số tổng cộng nằm trong khoảng từ 0 đến 8. Điểm số tổng cộng nằm trong khoảng từ 0 đến 2 được xem là âm tính, trong khi đó điểm số tổng cộng nằm trong khoảng từ 3 đến 8 được xem là dương tính.

Theo thang điểm này, thuật ngữ “tình trạng của thụ thể IGF-1 âm tính hoặc dương tính của khối u hoặc tế bào khối u” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R lần lượt tương đương với điểm số nằm trong khoảng từ 0 đến 2 hoặc nằm trong khoảng từ 3 đến 8 trên thang điểm Allred.

Quy tắc để phân loại kết quả hóa mô miễn dịch theo phương pháp Allred được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

Cường độ phản ứng miễn dịch	Điểm số 1	Tỷ lệ phản ứng	Điểm số 2
Không có khả năng phản ứng	0	Không có khả năng phản ứng	0
Khả năng phản ứng yếu	1	<1%	1
Khả năng phản ứng vừa phải	2	1-10%	2
Khả năng phản ứng mạnh	3	11-33%	3
	-	34-66%	4
	-	67-100%	5
Điểm số tổng cộng (Điểm số 1 + Điểm số 2)		Phân loại	
0-2		Âm tính	
3-8		Dương tính	

Theo sáng chế, phương pháp này khác biệt ở chỗ thang điểm thích hợp này là thang điểm nằm trong khoảng từ 0 đến 8, trong đó “không có khả năng phản ứng” tương đương với điểm số đánh giá bằng 0, và “khả năng phản ứng mạnh ở tỷ lệ phản ứng nằm trong khoảng từ 67% đến 100%” tương đương với điểm số đánh giá bằng 8.

Do đó, theo phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* điểm số đánh giá thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng theo sáng chế, khác biệt ở chỗ ở bước (c) thang điểm thích hợp này là thang điểm nằm trong khoảng từ 0 đến 8, trong đó “không có khả năng phản ứng” tương đương với điểm số đánh giá bằng 0, và “khả năng phản ứng mạnh ở tỷ lệ phản ứng nằm trong khoảng từ 67 đến 100%” tương đương với điểm số đánh giá bằng 8.

Nói cách khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) xác định điểm số đánh giá khối u hoặc tế bào khối u ở đối tượng theo thang điểm Allred; và

(b) - i) khẳng định rằng tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred nằm trong khoảng từ 3 đến 8; hoặc

-ii) khẳng định rằng tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(-)] với điểm số Allred nằm trong khoảng từ 0 đến 2.

Theo một khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 3.

Theo một khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 4.

Theo một khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 5.

Theo một khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 6.

Theo một khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 7.

Theo một khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R

(+)] với điểm số Allred bằng 8.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R (+)] với điểm số Allred nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) xác định điểm số đánh giá của thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng theo phương pháp nêu trên; và

(b) khẳng định rằng tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred nằm trong khoảng từ 3 đến 8; hoặc

(c) khẳng định rằng tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u là [IGF-1R(-)] với điểm số Allred nằm trong khoảng từ 0 đến 2.

Ví dụ thứ hai về các thang điểm này là thang điểm thông thường để đánh giá thụ thể HER-2 bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, ví dụ các mẫu có thể được xác định điểm số đánh giá về mức độ biểu hiện IGF-1R bằng phương pháp xác định điểm số đánh giá tích hợp cường độ vết (tốt hơn nếu vết bắt màu màng) và tỷ lệ phần trăm tế bào bắt màu vào thang điểm kết hợp nằm trong khoảng từ 0 đến 3⁺.

Trong thang điểm này, 0 và 1⁺ là âm tính trong khi đó 2⁺ và 3⁺ là dương tính. Tuy nhiên, điểm số nằm trong khoảng từ 1⁺ đến 3⁺ có thể được xem là dương tính do mỗi điểm số dương tính này có thể liên quan đến nguy cơ tái phát và tử vong cao hơn đáng kể khi so với điểm số 0 (âm tính), tuy nhiên cường độ tăng trong các điểm số dương tính có thể làm giảm nguy cơ.

Thuật ngữ “tình trạng của thụ thể IGF-1 âm tính hoặc dương tính của khối u hoặc tế bào khối u” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R lần lượt tương đương với điểm số nằm trong khoảng từ 0 đến 1⁺ hoặc nằm trong khoảng từ 2⁺ đến 3⁺ trên thang điểm được đơn giản hóa này. Chỉ khả năng phản ứng trên toàn bộ chu vi màng của khối u xâm lấn được xem là có hình dạng “lát mỏng”. Theo các quy tắc hiện nay, các mẫu được xác định điểm số đánh giá dưới dạng điểm số ranh giới (điểm số bằng 2⁺ hoặc 3⁺) đối với IGF-1R cần đánh giá thêm. Phân tích hóa mô miễn dịch cần loại bỏ, và lặp lại hoặc đánh giá bằng phương pháp FISH hoặc phương pháp bất kỳ khác khi,

như các ví dụ không giới hạn, các mẫu đối chứng không như mong muốn, các kết quả khác lạ liên quan đến hầu hết các mẫu và mẫu có độ dương tính màng mạnh của các tế bào ống vú thông thường (đối chứng nội) cho thấy hồi phục nguyên kháng nguyên quá mức.

Các thông số này được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Tình trạng của thụ thể IGF-1R	Phương pháp hóa mô miễn dịch
0	Không có khả năng phản ứng hoặc khả năng phản ứng màng ở ít hơn 10% tế bào khối u
1 ⁺	Khả năng phản ứng màng yếu có thể nhận biết được được phát hiện ở nhiều hơn 10% tế bào khối u. Các tế bào có khả năng phản ứng miễn dịch chỉ ở một phần màng.
2 ⁺	Khả năng phản ứng toàn bộ màng từ yếu đến vừa phải được quan sát ở nhiều hơn 10% tế bào khối u.
3 ⁺	Khả năng phản ứng mạnh hoàn toàn được quan sát ở nhiều hơn 10% tế bào khối u.

Phương pháp theo sáng chế khác biệt ở chỗ thang điểm thích hợp này là thang điểm nằm trong khoảng từ 0 đến 3⁺, trong đó “không có khả năng phản ứng màng của tế bào khối u” tương đương với điểm số đánh giá bằng 0 và “khả năng phản ứng mạnh hoàn toàn ở nhiều hơn 10% tế bào khối u” tương đương với điểm số đánh giá bằng 3⁺.

Cụ thể hơn, như mô tả nêu trên, thang điểm thích hợp này là thang điểm nằm trong khoảng từ 0 đến 3, trong đó “không có khả năng phản ứng màng của tế bào khối u” tương đương với điểm số đánh giá bằng 0; khả năng phản ứng màng yếu có thể nhận biết được ở nhiều hơn 10% tế bào khối u được xác định điểm số đánh giá 1⁺; “khả năng phản ứng toàn bộ màng từ yếu đến vừa phải ở nhiều hơn 10% tế bào khối u” tương đương với điểm số đánh giá bằng 2⁺; và “khả năng phản ứng mạnh hoàn toàn ở nhiều hơn 10% tế bào khối u” tương đương với điểm số đánh giá bằng 3⁺.

Nói cách khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) xác định điểm số đánh giá của khối u hoặc tế bào khối u ở đối tượng theo thang điểm được đơn giản hóa, như mô tả nêu trên; và

(b) khẳng định rằng tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với

điểm số đánh giá bằng 2^+ hoặc 3^+ ;

hoặc (c) khẳng định rằng tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R(-)] với điểm số đánh giá bằng 0 hoặc 1^+ .

Theo một khía cạnh cụ thể, khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R (+)] với điểm số đánh giá bằng 2^+ .

Theo một khía cạnh cụ thể, khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R (+)] với điểm số đánh giá bằng 3^+ .

Theo một khía cạnh cụ thể khác, khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R (+)] với điểm số đánh giá bằng 2^+ hoặc 3^+ .

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) xác định điểm số đánh giá của thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng theo phương pháp nêu trên; và

(b) -i) khẳng định rằng tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số đánh giá bằng 2^+ hoặc 3^+ ; hoặc

-ii) khẳng định rằng tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u là [IGF-1R(-)] với điểm số đánh giá bằng 0 hoặc 1^+ .

Nhìn chung, kết quả của thử nghiệm hoặc đánh giá có thể được trình bày ở định dạng bất kỳ. Các kết quả này có thể là kết quả định lượng. Ví dụ, kết quả thử nghiệm có thể cho thấy polypeptit cụ thể được phát hiện hay không, cùng với các giới hạn phát hiện. Các kết quả này có thể là kết quả bán định lượng. Ví dụ, các khoảng khác nhau có thể được xác định, và các khoảng này có thể được gán điểm số (ví dụ nằm trong khoảng từ 0 đến 3^+ hoặc nằm trong khoảng từ 0 đến 8 phụ thuộc vào thang điểm được sử dụng) tạo mức độ thông tin định lượng nhất định. Điểm số này có thể thể hiện các yếu tố khác nhau, ví dụ số lượng tế bào trong đó IGF-1R được phát hiện, cường độ tín hiệu (có thể biểu thị mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R hoặc tế bào mang IGF-1R), v.v. Các kết quả này có thể là kết quả định lượng, ví dụ dưới dạng tỷ lệ phần trăm tế bào trong đó IGF-1R được phát hiện, dưới dạng nồng độ protein, v.v.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng kết quả đầu ra của

thử nghiệm sẽ thay đổi phụ thuộc vào giới hạn kỹ thuật của thử nghiệm và ý nghĩa sinh học liên quan đến phát hiện polypeptit. Ví dụ, trong trường hợp của một số polypeptit, kết quả đầu ra định lượng tuyệt đối (ví dụ polypeptit có được phát hiện ở mức độ phát hiện nhất định hay không) tạo ra thông tin có ý nghĩa thống kê. Trong các trường hợp khác, kết quả đầu ra định lượng chính xác hơn (ví dụ tỷ lệ mức độ biểu hiện của polypeptit trong mẫu thử nghiệm so với mức độ biểu hiện thông thường) là cần thiết.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp chẩn đoán rối loạn sinh ung thư hoặc khả năng nhạy cảm với tình trạng bệnh lý liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của tế bào mang thụ thể IGF-1R trong mẫu bằng phương pháp phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R và/hoặc xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo sáng chế, và

(b) chẩn đoán tình trạng bệnh lý hoặc khả năng nhạy cảm với tình trạng bệnh lý dựa trên sự có mặt hoặc vắng mặt của tế bào mang thụ thể IGF-1R này.

Theo các phương pháp của sáng chế, tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R hoặc gia tăng mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R được phát hiện là dấu hiệu cho thấy đối tượng bị hoặc có nguy cơ bị bệnh qua trung gian IGF-1R.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp dự đoán nguy cơ tiến triển bệnh ung thư của đối tượng, bao gồm bước phát hiện mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mẫu mô bằng phương pháp phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R và/hoặc xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo sáng chế, trong đó mức độ biểu hiện cao của thụ thể IGF-1R là dấu hiệu của nguy cơ cao tiến triển thành bệnh ung thư.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp đánh giá khả năng xâm lấn của khối u.

Thuật ngữ “khả năng xâm lấn của khối u” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khối u phát triển nhanh và có xu hướng lây lan nhanh.

Theo một phương án, phương pháp đánh giá khả năng xâm lấn của khối u bao gồm các bước:

(a) xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R của tế bào trong mẫu khối u, bằng phương pháp phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R và/hoặc xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo sáng chế,

(b) xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mẫu mô tương đương được lấy từ cùng đối tượng ở thời điểm sau bằng phương pháp phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R và/hoặc xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo sáng chế, và

(c) xác định tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) và tỷ lệ thu được ở bước (b)

trong đó tỷ lệ củamức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mẫu khối u theo thời gian cung cấp thông tin về nguy cơ tiến triển bệnh ung thư.

Theo phương án ưu tiên, tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) và mức độ biểu hiện thu được ở bước (b) lớn hơn 1 thì khối u có khả năng xâm lấn. Theo một phương án khác, tỷ lệ này nhỏ hơn hoặc bằng 1 thì khối u không có khả năng xâm lấn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R đáp ứng với việc sử dụng liệu pháp hướng đích quá trình thụ thể IGF-1R bằng cách tích hợp phương pháp phát hiện và/hoặc định lượng thụ thể IGF-1R, và/hoặc xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế. Phương pháp kiểm soát này có thể rất hữu ích khi liệu pháp này gây điều hòa giảm biểu hiện và/hoặc phân giải thụ thể IGF-1R.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xác định xem rối loạn sinh ung thư nhạy với phương pháp điều trị bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R hay không, bao gồm các bước:

(a) xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u của đối tượng theo phương pháp xác định điểm số đánh giá theo sáng chế, như mô tả nêu trên, và

(b) khẳng định rằng, khi tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u là biểu hiện thụ thể IGF-1R, rối loạn sinh ung thư là nhạy với kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R.

Cụ thể là, phương pháp kiểm soát biểu hiện IGF-1R trên bề mặt tế bào có thể là công cụ quan trọng để đánh giá hiệu lực của phương pháp điều trị trong thử nghiệm lâm sàng và “liệu pháp dùng cho từng đối tượng”.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định phác đồ điều trị thích hợp cho đối tượng.

Sự tăng hoặc giảm mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R có thể được xác định bằng phương pháp phát hiện và/hoặc xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế, là dấu hiệu tiên tri bệnh ung thư liên quan đến thụ thể IGF-1R. Do đó, bằng cách đánh giá mức độ gia tăng số lượng tế bào biểu hiện IGF-1R hoặc mức độ thay đổi về nồng độ của thụ thể IGF-1R có trong các mô và tế bào khác nhau, có thể xác định được xem phác đồ điều trị cụ thể để cải thiện bệnh ung thư ác tính liên quan đến thụ thể IGF-1R có hiệu quả hay không.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* hiệu quả của phương pháp điều trị được thiết kế để làm giảm rối loạn sinh ung thư liên quan đến thụ thể IGF-1R ở đối tượng bị rối loạn này, bao gồm các bước:

(a) xác định mức độ biểu hiện thứ nhất của thụ thể IGF-1R bằng phương pháp phát hiện và/hoặc xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế, như mô tả nêu trên trong mẫu sinh học thứ nhất, mẫu sinh học thứ nhất này tương đương với thời điểm thứ nhất của phương pháp điều trị này;

(b) xác định mức độ biểu hiện thứ hai của thụ thể IGF-1R bằng phương pháp phát hiện và/hoặc xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế, như mô tả nêu trên trong mẫu sinh học thứ hai, mẫu sinh học thứ hai này tương đương với thời điểm thứ hai muộn hơn của phương pháp điều trị này;

(c) tính toán tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thứ nhất thu được ở bước (a) và mức độ biểu hiện thứ hai thu được ở bước (b); và

(d) khẳng định rằng hiệu quả của phương pháp điều trị này là cao khi tỷ lệ thu được ở bước (c) lớn hơn 1; hoặc khẳng định rằng hiệu quả của phương pháp điều trị này là thấp khi tỷ lệ thu được ở bước (c) nhỏ hơn hoặc bằng 1.

Theo phương án ưu tiên, phương pháp điều trị được thiết kế để làm giảm rối loạn sinh ung thư liên quan đến thụ thể IGF-1R ở đối tượng bị rối loạn này bao gồm bước sử dụng liệu pháp hướng đích quá trình thụ thể IGF-1R cho đối tượng này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp chẩn đoán hình ảnh *in vivo* rối loạn sinh ung thư liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện và/hoặc xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế. Phương pháp này hữu ích để phát hiện tế bào khối u *in vivo*, cũng như kiểm soát khả năng xâm lấn của nó. Tương tự,

phương pháp này là hữu ích để theo dõi tiến triển và/hoặc đáp ứng với điều trị ở đối tượng trước đó được chẩn đoán bị bệnh ung thư qua trung gian IGF-1R.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phát hiện sự khu trú của tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng, bao gồm các bước:

a) cho đối tượng sử dụng kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó; và

b) phát hiện gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, trong đó gắn kết này thể hiện sự có mặt của tế bào khối u.

Để phát hiện sự có mặt của khối u biểu hiện, nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Tuy nhiên, tốt hơn nếu phương pháp hóa mô miễn dịch và phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang được sử dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh *in vivo*, trong đó chất phản ứng này chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, tốt hơn nếu kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này được đánh dấu, tốt hơn nữa nếu được đánh dấu phóng xạ.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng chất phản ứng này trong chẩn đoán hình ảnh cho đối tượng bị bệnh ung thư qua trung gian thụ thể IGF-1R.

Phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước:

(a) cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh theo sáng chế; và

(b) phát hiện chất phản ứng này.

Theo phương án ưu tiên, chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh này chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và gốc hoạt tính.

Thuật ngữ “gốc hoạt tính” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hoạt chất cho phép phát hiện *in vivo* chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh này. Gốc hoạt tính theo sáng chế bao gồm các nguyên tố phóng xạ, như tecneti-99m (99mTc), đồng-67 (Cu-67), -47 (Sc-47), luteti-77 (Lu-177), đồng-64 (Cu-64), ytri-86 (Y-86) hoặc iot-124 (I-124).

Chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh này được sử dụng ở lượng hữu hiệu để sử

dụng trong chẩn đoán cho động vật có vú, như người, sau đó sự khu trú và tích tụ của chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh này được phát hiện. Sự khu trú và tích tụ của chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh này có thể được phát hiện bằng phương pháp chụp nuclit phóng xạ, phương pháp ảnh nhận phóng xạ, phương pháp chụp cộng hưởng từ hạt nhân, phương pháp chụp cắt lớp, phương pháp chụp xạ hình cắt lớp positron, phương pháp chụp cắt lớp vi tính theo trục ngang, phương pháp chụp X quang hoặc phương pháp chụp cộng hưởng từ, phương pháp phát hiện huỳnh quang, và phương pháp phát hiện quang hóa.

Liên quan đến sự phát triển của liệu pháp kháng khối u hướng đích, phương pháp chẩn đoán bằng hóa mô miễn dịch đưa ra thông tin tại chỗ về mức độ biểu hiện thụ thể, ví dụ kích cỡ và/hoặc vị trí của khối u. Do đó, phương pháp chẩn đoán này cho phép sàng lọc đối tượng bị bệnh nhạy với điều trị theo mức độ biểu hiện của các thụ thể cần điều trị.

Theo khía cạnh đặc biệt ưu tiên, sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc đối tượng bị bệnh ung thư được dự đoán là có thể được điều trị hiệu quả hoặc không bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R, bao gồm các bước:

(a) xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo phương pháp nêu trên;

(b) so sánh mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) với mức độ biểu hiện đối chiếu;

và

(c) chọn lọc đối tượng bị bệnh được dự đoán là có thể được điều trị hiệu quả bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R, khi tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) và mức độ biểu hiện đối chiếu lớn hơn 1; hoặc

(d) chọn lọc đối tượng bị bệnh được dự đoán là không thể điều trị được hiệu quả bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R, khi tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) và mức độ biểu hiện đối chiếu nhỏ hơn hoặc bằng 1.

Mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R được đo hoặc so sánh với mức độ biểu hiện ở tế bào hoặc mẫu đối chứng cũng được gọi là “mức độ đối chiếu” hoặc “mức độ biểu hiện đối chiếu”. Thuật ngữ “mức độ đối chiếu”, “mức độ biểu hiện đối chiếu”, “mức độ đối chứng” và “đối chứng” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả. Thuật ngữ “mức độ đối chứng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ biểu hiện nền riêng biệt được

đo ở tế bào đối chứng tương đương, không bị bệnh hoặc bệnh ung thư. Tế bào đối chứng có thể thu được từ cùng một đối tượng riêng biệt, do ngay cả ở đối tượng bị bệnh ung thư, mô ở vị trí của khối u vẫn bao gồm mô khỏe mạnh. Tế bào đối chứng cũng có thể có nguồn gốc từ một đối tượng riêng biệt khác là đối tượng bình thường hoặc không bị bệnh mà từ đó mẫu thử hoặc bị bệnh thu được. Thuật ngữ “mức độ đối chiếu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ “mức độ biểu hiện đối chứng của thụ thể IGF-1R” được sử dụng để đánh giá mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mẫu chứa tế bào ung thư của đối tượng. Ví dụ, khi mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mẫu sinh học của đối tượng cao hơn mức độ đối chiếu của thụ thể IGF-1R, tế bào được xem là có mức độ biểu hiện cao hoặc biểu hiện quá mức thụ thể IGF-1R. Mức độ đối chiếu có thể được xác định bằng nhiều phương pháp. Do đó, các mức độ biểu hiện xác định tế bào mang IGF-1R hoặc theo cách khác mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R không phụ thuộc vào số lượng tế bào biểu hiện IGF-1R. Do đó, mức độ đối chiếu đối với mỗi đối tượng bị bệnh có thể được xác định bằng tỷ lệ chuẩn của thụ thể IGF-1R, trong đó tỷ lệ chuẩn này có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ để xác định mức độ đối chiếu như mô tả trong sáng chế.

Ví dụ, mức độ đối chứng có thể là trị số xác định trước, có thể ở nhiều dạng khác nhau. Mức độ đối chứng có thể là trị số giới hạn trên đơn, như trị số trung bình hoặc trung vị. “Mức độ đối chiếu” có thể là trị số đơn, đều có thể áp dụng được cho mọi đối tượng bị bệnh riêng biệt, hoặc mức độ đối chiếu có thể thay đổi theo các phân nhóm cụ thể của đối tượng. Do đó, ví dụ, nam giới lớn tuổi phải có mức độ đối chiếu khác với nam giới trẻ tuổi đối với cùng bệnh ung thư, và phụ nữ phải có mức độ đối chiếu khác với nam giới đối với cùng bệnh ung thư. Theo cách khác, “mức độ đối chiếu” có thể được xác định bằng cách đo mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R ở tế bào ung thư không sinh ung thư từ mẫu mô tương tự như mô chứa tế bào ung thư được thử nghiệm. “Mức độ đối chiếu” cũng phải là tỷ lệ nhất định của thụ thể IGF-1R ở tế bào ung thư của đối tượng so với mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R ở tế bào không ung thư trong cùng đối tượng bị bệnh. “Mức độ đối chiếu” cũng có thể là mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R của tế bào được nuôi cấy *in vitro*, có thể được nhân bội để kích thích tế bào khối u, hoặc có thể được nhân bội theo cách thức bất kỳ khác để thu được mức độ biểu hiện xác định chính xác mức độ đối chiếu. Mặt khác, “mức độ đối chiếu” có thể được thiết lập dựa trên các nhóm so sánh, như nhóm không có mức độ biểu hiện IGF-1R gia tăng và nhóm có mức độ biểu hiện IGF-1R gia tăng. Một ví dụ khác về các nhóm so sánh sẽ là các nhóm bị bệnh, tình

trạng bệnh lý hoặc triệu chứng cụ thể và các nhóm không bị bệnh. Trị số xác định trước có thể được sắp xếp bằng cách chia đều hoặc không đều quần thể thử nghiệm thành các nhóm, như nhóm nguy cơ thấp, nhóm nguy cơ trung bình và nhóm nguy cơ cao.

Mức độ đối chiếu cũng có thể xác định bằng cách so sánh mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong các quần thể đối tượng bị cùng bệnh ung thư. Mức độ đối chiếu cũng có thể được xác định bằng phân tích biểu đồ tần số, trong đó toàn bộ nhóm đối tượng bị bệnh được vẽ đồ thị, trong đó trục thứ nhất thể hiện mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R, và trục thứ hai thể hiện số lượng đối tượng bị bệnh trong nhóm có tế bào khối u biểu hiện IGF-1R ở mức độ xác định. Hai hoặc nhiều nhóm đối tượng bị bệnh riêng biệt có thể được xác định bằng cách phân loại phân nhóm quần thể đối tượng có cùng mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R. Sau đó, mức độ đối chiếu có thể được xác định dựa trên mức độ phân biệt tốt nhất các nhóm riêng biệt này. Mức độ đối chiếu cũng có thể thể hiện mức độ biểu hiện của hai hoặc nhiều chỉ thị, một trong số hai chỉ thị này là IGF-1R. Hai hoặc nhiều chỉ thị có thể được thể hiện bằng tỷ lệ mức độ biểu hiện của mỗi chỉ thị.

Tương tự, quần thể khỏe mạnh sẽ có khoảng “bình thường” khác với quần thể bị tình trạng bệnh lý liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R. Theo đó, trị số xác định trước được chọn có thể được tính đến trị số đầu mút trong đó đối tượng riêng biệt nằm ngoài khoảng này. Các khoảng và trị số đầu mút thích hợp có thể được chọn bằng thử nghiệm thông thường. Thuật ngữ “tăng” hoặc “gia tăng” có nghĩa là cao hơn đối chứng được chọn. Thông thường, mức độ đối chứng sẽ được chọn dựa trên các đối tượng khỏe mạnh riêng biệt ở độ tuổi thích hợp.

Ngoài các trị số xác định trước, cần hiểu rằng mức độ đối chứng có thể là mẫu vật liệu được thử nghiệm song song với vật liệu thử nghiệm. Ví dụ về các mẫu này bao gồm mô hoặc tế bào thu được ở cùng thời điểm từ cùng đối tượng, ví dụ các bộ phận của mẫu sinh thiết duy nhất, hoặc các bộ phận của mẫu tế bào duy nhất từ đối tượng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm để chẩn đoán hình ảnh in vivo rối loạn sinh ung thư liên quan đến biểu hiện của thụ thể IGF-1R chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được đánh dấu và chất mang được dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến kit phát hiện tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng bị bệnh, khác biệt ở chỗ kit này chứa ít nhất một

kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên, và tốt hơn nếu kháng thể đơn dòng 816C12.

Vật liệu bao gói chứa chế phẩm kết hợp bao gồm các chất phản ứng ở lượng xác định trước và tờ hướng dẫn sử dụng để thực hiện thử nghiệm chẩn đoán này, ví dụ kit cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Kit này chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R để phát hiện và định lượng thụ thể IGF-1R *in vitro*, ví dụ trong phương pháp ELISA. Khi kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R được đánh dấu bằng enzym, kit này sẽ bao gồm các cơ chất và đồng yếu tố của enzym (ví dụ tiền cơ chất tạo ra nhóm mang màu hoặc nhóm phát huỳnh quang có thể phát hiện). Ngoài ra, các chất bổ trợ khác có thể được sử dụng, như chất ổn định, dung dịch đệm (ví dụ dung dịch đệm phong bế hoặc dung dịch đệm phân giải) và tương tự. Kit này có thể chứa vật bao gói được chia ngăn để tiếp nhận một hoặc nhiều đồ chứa, như lọ, ống và tương tự, các đồ chứa này đựng các thành phần riêng biệt theo sáng chế. Ví dụ, một đồ chứa có thể chứa kháng thể thứ nhất được gắn kết với chất mang không hòa tan hoặc hòa tan một phần. Đồ chứa thứ hai có thể chứa kháng thể thứ hai hòa tan được đánh dấu có thể phát hiện, ở dạng đông khô hoặc dung dịch. Vật bao gói này cũng có thể chứa đồ chứa thứ ba đựng kháng thể thứ ba được đánh dấu có thể phát hiện ở dạng đông khô hoặc dung dịch. Kit này có thể được sử dụng trong phương pháp ELISA đặc hiệu kép theo sáng chế. Tờ hướng dẫn sử dụng hoặc nhãn hướng dẫn sử dụng cung cấp thông tin về thành phần cũng như hướng dẫn sử dụng chẩn đoán hoặc *in vitro*.

Lượng tương đối của các chất phản ứng khác nhau có thể được thay đổi để tạo ra nhiều nồng độ của các chất phản ứng trong dung dịch để tối ưu hóa độ nhạy của thử nghiệm. Cụ thể, các chất phản ứng có thể ở dạng bột khan, thường là bột đông khô, bao gồm các tá dược khi hòa tan sẽ tạo ra dung dịch chất phản ứng có nồng độ thích hợp.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng IGF-1R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đánh dấu bằng gốc có thể phát hiện, sao cho kháng thể này có thể được bao gói và sử dụng ở dạng kit để chẩn đoán hoặc xác định tế bào có kháng nguyên nêu trên. Ví dụ không hạn chế các chất đánh dấu này bao gồm chất phát huỳnh quang, như fluorescein isothiocyanat; chất mang màu, nuclit phóng xạ, biotin hoặc enzym. Kháng thể kháng IGF-1R được đánh dấu này có thể được sử dụng để xác định vị trí của kháng nguyên bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, ELISA, phương pháp phân loại tế bào, cũng như các phương pháp miễn dịch khác để phát hiện hoặc định lượng IGF-

1R, và tế bào mang kháng nguyên này, ví dụ.

Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R thể khảm hoặc nhân tạo hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có thể thu được từ 6 vùng CDR có các trình tự SEQ ID NO.1 đến 6 của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến kit hữu ích làm mẫu đối chứng dương để tinh chế hoặc kết tủa miễn dịch thụ thể IGF-1R từ tế bào. Để phân lập và tinh chế thụ thể IGF-1R, kit này có thể chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được liên kết với các hạt (ví dụ hạt chứa agarosa). Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa các kháng thể để phát hiện và định lượng thụ thể IGF-1R *in vitro*, ví dụ in an ELISA. Kit này bao gồm đồ chứa và nhãn hướng dẫn sử dụng hoặc tờ hướng dẫn sử dụng trên hoặc liên quan đến đồ chứa này. Các đồ chứa bổ sung có thể được sử dụng chứa tá dược pha loãng và dung dịch đệm, kháng thể đối chứng. Tờ hướng dẫn sử dụng hoặc nhãn hướng dẫn sử dụng cung cấp thông tin về thành phần cũng như hướng dẫn sử dụng chẩn đoán hoặc *in vitro*.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kit phát hiện *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng bằng các phương pháp theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến kit phát hiện tình trạng của thụ thể IGF-1R của khối u hoặc tế bào khối u bằng phương pháp hóa mô miễn dịch và/hoặc phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kit chứa ít nhất một kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên, trong đó kháng thể này được đánh dấu.

Theo phương án ưu tiên, kit này còn chứa chất phản ứng hữu ích để phát hiện mức độ gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này và thụ thể IGF-1R.

Theo một phương án ưu tiên khác, kit này hữu ích để xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R, còn chứa chất phản ứng hữu ích để định lượng mức độ gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-

1R được đánh dấu này và thụ thể IGF-1R.

Theo một phương án khác, kit này còn chứa: i) chứa chất phản ứng hữu ích để phát hiện mức độ gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R được đánh dấu này và thụ thể IGF-1R; và ii) các mẫu đối chứng dương và đối chứng âm hữu ích để xác định tỷ lệ mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Kit này có thể còn chứa kháng thể đa dòng đặc hiệu với kháng thể của chuột hoặc kháng thể của người/nhân tạo, tốt hơn nếu kháng thể đa dòng đặc hiệu với kháng thể của chuột hoặc kháng thể của người/nhân tạo này được đánh dấu.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kit để sàng lọc *in vitro* đối tượng bị bệnh ung thư được dự đoán là được điều trị hiệu quả hoặc không bằng cách sử dụng chất ức chế hướng đích đến quá trình IGF-1R chứa: i) chất phản ứng hữu ích để phát hiện mức độ gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này và thụ thể IGF-1R; ii) mức độ đối chứng đã được tương quan với độ nhạy cảm với chất ức chế IGF-1R và/hoặc iii) mức độ đối chứng đã được tương quan với tính kháng chất ức chế IGF-1R.

Sáng chế cũng đề cập đến kit xác định xem đối tượng bị rối loạn sinh ung thư có thể được điều trị hiệu quả bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R hay không, chứa ít nhất một kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như mô tả nêu trên.

Theo một phương án khác, kit này còn chứa

i) chất phản ứng để phát hiện mức độ gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này và thụ thể IGF-1R trên bề mặt của tế bào khối u; và/hoặc

ii) chất phản ứng để định lượng mức độ gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này và thụ thể IGF-1R trên bề mặt của tế bào khối u.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các phương án dưới đây cùng hình vẽ kèm theo.

Fig.1 là đồ thị thể hiện các trị số mật độ quang thu được từ kháng thể đơn dòng 816C12 theo phương pháp rhIGF1R ELISA. Dữ liệu hiệu chuẩn và nồng độ EC_{50} được xác định bằng thuật toán Prism.

Fig.2A-2C là hình ảnh thể hiện kết quả hóa mô miễn dịch mẫu nhận dạng khối u được nhúng parafin MCF-7 bằng kháng thể đơn dòng 816C12 (Fig.2A), kháng thể G11 kháng IGF-1R (Roche Ventana) (Fig.2B) hoặc kháng thể AF-305 kháng IGF-1R (Hệ thống nghiên cứu và phát triển) (Fig.2C).

Fig.3 là đồ thị thể hiện hoạt tính *in vivo* của thể tiếp hợp kháng thể-được chất kháng IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

Fig.4A-4C là hình ảnh thể hiện kết quả hóa mô miễn dịch mẫu nhận dạng khối u được nhúng parafin SBC-5 bằng kháng thể đơn dòng 816C12, kháng thể G11 kháng IGF-1R (Roche Ventana) (Fig.4B) hoặc kháng thể AF-305 kháng IGF-1R (Hệ thống nghiên cứu và phát triển) (Fig.4C).

Fig.5 là đồ thị thể hiện hoạt tính *in vivo* của thể tiếp hợp kháng thể-được chất kháng IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương án 1: sản xuất và sàng lọc kháng thể đơn dòng 816C12.

Các kháng thể đơn dòng 816C12 kháng IGF-1R được sản xuất và sàng lọc như sau.

Các chuột cái Balb/C được gây miễn dịch bằng cách tiêm dưới da với 10µg protein thụ thể IGF-1R tái tổ hợp của người (Hệ thống nghiên cứu và phát triển, 391-GR) với tá được Freund. Quá trình gây miễn dịch được lặp lại ba lần mỗi lần cách nhau 2 tuần. Lần tiêm thứ tư được thực hiện bằng cách tiêm màng bụng trong sự có mặt của tá được Freund.

Ba ngày sau, các tế bào lách được dung hợp với tế bào u tủy SP2OAg14 bằng PEG 50%. Sau 14 ngày sàng lọc chuyển hóa bằng HAT, dịch nổi thể lai được đánh giá bằng phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang sử dụng tế bào ung thư vú MCF7 của người. Chỉ các kháng thể gắn kết với MCF7 được giữ lại.

Sau đó, các kháng thể quan tâm được tách dòng bằng phương pháp pha loãng tới hạn. Sau 8 ngày tách dòng, các dịch nổi được chọn lọc một lần nữa bằng phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang sử dụng tế bào ung thư vú MCF7 của người. Ba dòng tế bào dương tính được giữ lại. Isotyp của các kháng thể được bài tiết được xác định bằng hệ thống kit tách dòng SBA-HRP from Southern Biotechnologies (Cat: 5300-05).

Cuối cùng, một dòng kháng thể được khuếch đại và lạnh đông.

Sau đó, kháng thể đơn dòng 816C12 tiếp tục được xác định đặc tính cấu trúc bằng cách sử dụng dịch nổi thể lai, như rhIGF-1R hoặc rmIGF-1R hoặc rhIR ELISA. In all direct ELISAs, các protein quan tâm được cố định ($1\mu\text{g/mL}$) vào đáy mỗi giếng. Sau khi bão hòa, dịch nổi thể lai được bổ sung vào các giếng. Sau 1 giờ ủ và bước rửa, dung dịch chứa kháng thể đa dòng của dê được đánh dấu HRP kháng IgG của chuột được sử dụng để phát hiện, trước khi bổ sung cơ chất TMB. Phản ứng này được dừng bằng dung dịch axit sulfuric 1M trước khi đọc mật độ quang bằng máy quang phổ ở bước sóng 450nm. Dữ liệu được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 6

Mật độ quang thu được ở nồng độ $5\mu\text{g/mL}$ bằng phương pháp ELISA			
	Màng rhIGF-1R	Màng rmIGF-1R	Màng rhIR
816C12	2,622	0,065	0,055
Đối chứng dương	2,338	1,293	1,077
Đối chứng âm	0,055	0,065	0,048

Đường cong đáp ứng liều đối với kháng thể đơn dòng 816C12 trên màng rhIGF-1R được thể hiện trên Fig.1. Nồng độ EC_{50} được xác định bằng thuật toán Prism.

Dữ liệu cho thấy kháng thể đơn dòng 816C12 chỉ nhận diện rh IGF-1R với nồng độ EC_{50} bằng $0,41\text{nM}$. Kháng thể đơn dòng 816C12 không gắn kết với thụ thể IGF-1R của chuột cũng như thụ thể insulin của người.

Phương án 2: Đánh giá mối tương quan phân loại dược lý học của khối u bằng kháng thể theo sáng chế và hoạt tính của thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hướng đích đến IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

Để đánh giá mối tương quan phân loại dược lý học của khối u, các khối u đã được đánh giá (phần 2.1), sau đó các thử nghiệm *in vivo* trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7 đã được thực hiện với thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa gốc kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R và gốc dược chất là auristatin (phần 2.2).

2.1: Phát hiện biểu hiện của thụ thể IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7 bằng phương pháp hóa mô miễn dịch.

Các lát mô từ mô hình ghép ngoại lai MCF-7 được loại parafin, bù nước, và đặt vào dung dịch đệm thu hồi đích 1X (Dako S1699) trong bể nước sôi đã được gia nhiệt trước ở nhiệt độ 98°C để thu hồi epitop đã được cảm ứng nhiệt ở nhiệt độ 98°C trong 40

phút tiếp theo 20 phút nữa trong dung dịch đệm thu hồi đích. Sau 3 lần rửa trong dung dịch đệm Tris nước muối-0,05% tween 20 (TBS-T) (Dako S3006), hoạt tính peroxidaza nội sinh được phong bế bằng chất phản ứng phong bế peroxidaza (Dako K4007) trong 5 phút. Các lát mô được rửa bằng TBS-T và ủ với chất phản ứng phong bế (UltraV block-TA-125UB- LabVision) trong 5 phút trước khi ủ với kháng thể đơn dòng 816C12 (ở nồng độ = 5µg/mL) hoặc IgG1/kappa của chuột (5µg/mL, X0931, Dako) là mẫu đối chứng âm trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các lát mô được rửa bằng TBS-T và ủ với with Envision (Dako) trong 30 phút. Diaminobenzidin được sử dụng để khai triển sản phẩm phản ứng màu nâu (Dako K3468). Các lát mô được ngâm trong hematoxylin trong 2 phút để loại bỏ chất nhuộm diaminobenzidin (Dako S3309).

Kháng thể đơn dòng 816C12 kháng IGF-1R theo sáng chế nhuộm khác biệt màng tế bào MCF-7. Trong phương pháp hóa mô miễn dịch này, sản phẩm phản ứng màu nâu tương đương với vết nhuộm dương tính của màng tế bào và không có sản phẩm phản ứng màu nâu tương đương với vết nhuộm âm tính và không quan sát được màng tế bào. Bằng cách sử dụng thuật toán màng, điểm số để nhuộm tế bào khối u MCF-7 bằng 3⁺ (Fig.2A). Bằng cách sử dụng kháng thể G11 kháng IGF-1R (Roche Ventana) hoặc kháng thể AF-305 kháng IGF-1R (Hệ thống nghiên cứu và phát triển), lát mô của cùng khối u có điểm số đánh giá bằng 2⁺ (Fig.2B và Fig.2C).

2.2: Hoạt tính *in vivo* của thể tiếp hợp kháng thể-được chất kháng IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

Thể tiếp hợp kháng thể-được chất kháng IGF-1R đã được đánh giá *in vivo*, trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

Toàn bộ các quy trình thử nghiệm trên động vật được thực hiện theo hướng dẫn của quy định 2010/63/UE về việc bảo vệ động vật được sử dụng cho các mục đích nghiên cứu khoa học. Quy trình này được chấp thuận bởi Ủy ban bảo vệ động vật, thuộc viện Pierre Fabre. Các tế bào MCF-7 (5 triệu) được tiêm dưới da vào các chuột Swiss/Nude 7 tuần tuổi. Trước khi tiêm tế bào, các hạt cải chứa oestrogen (Innovative Research of America) được cấy vào sườn bên trái của chuột để giải phóng estrogen cần cho sự sinh trưởng *in vivo* của các khối u MCF-7.

Hai mươi ngày sau khi cấy ghép tế bào MCF-7, khi khối u đã đạt được kích cỡ trung bình nằm trong khoảng từ 120 đến 150mm³, các chuột thử nghiệm được chia thành

các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 chuột theo kích cỡ và hình dạng khối u. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất kháng IGF-1R được tiêm màng bụng 6 lần mỗi lần cách nhau 4 ngày (Q4d4). Tình trạng sức khỏe của các chuột thử nghiệm được theo dõi hàng ngày. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần bằng thước cặp điện tử cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Thể tích khối u được tính toán theo công thức sau:

$$\pi/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$$

Độc tính được đánh giá theo cân nặng của các chuột thử nghiệm ba lần một tuần. Các phân tích thống kê được thực hiện ở mỗi lần đo bằng phép kiểm định Mann-Whitney.

Thể tiếp hợp kháng thể-được chất kháng IGF-1R sử dụng theo đường tiêm đã ức chế đáng kể và thậm chí đã làm giảm hoàn toàn sinh trưởng của khối u (Fig.3) như kỳ vọng đối với khối u có điểm số đánh giá bằng 3⁺ nhưng không kỳ vọng đối với khối u có điểm số đánh giá bằng 2⁺.

Phương án 3: Đánh giá mối tương quan phân loại được lý học của khối u bằng kháng thể theo sáng chế và hoạt tính của thể tiếp hợp kháng thể-được chất hướng đích đến IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

Để đánh giá mối tương quan phân loại được lý học của khối u, các khối u đã được đánh giá (phần 3.1), sau đó các thử nghiệm in vivo trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5 đã được thực hiện với thể tiếp hợp kháng thể-được chất chứa gốc kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R và gốc được chất là auristatin (phần 3.2).

3.1 Phát hiện biểu hiện của thụ thể IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5 bằng phương pháp hóa mô miễn dịch.

Mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R được phân tích bằng cách sử dụng quy trình tương tự được mô tả trong phần 2.1 của phương án 2.

Khi IGF-1R được phát hiện bằng kháng thể đơn dòng 816C12, mức độ biểu hiện thấp được phát hiện (1⁺). (Fig.4A). Khi IGF-1R được phát hiện bằng kháng thể G11 kháng IGF-1R (Roche Ventana) hoặc kháng thể AF-305 kháng IGF-1R (Hệ thống nghiên cứu và phát triển), các lát mô từ cùng khối u có điểm số đánh giá bằng 3⁺ (Fig.4B và Fig.4C).

3.2: Hoạt tính *in vivo* của thể tiếp hợp kháng thể-dược chất kháng IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất kháng IGF-1R đã được đánh giá *in vivo*, trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

Toàn bộ các quy trình thử nghiệm trên động vật được thực hiện theo hướng dẫn của quy định 2010/63/UE về việc bảo vệ động vật được sử dụng cho các mục đích nghiên cứu khoa học. Quy trình này được chấp thuận bởi Ủy ban bảo vệ động vật, thuộc viện Pierre Fabre. Các tế bào SBC-5 (5 triệu) được tiêm dưới da vào chuột 7 tuần tuổi. Mười hai ngày sau khi cấy tế bào, khi khối u đã đạt được kích cỡ trung bình nằm trong khoảng từ 150 mm³, các chuột thử nghiệm được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 chuột theo kích cỡ và hình dạng khối u. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất kháng IGF-1R được tiêm màng bụng 6 lần mỗi lần cách nhau 4 ngày (Q4d6). Tình trạng sức khỏe của các chuột thử nghiệm được theo dõi hàng ngày. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần bằng thước cặp điện tử cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Thể tích khối u được tính toán theo công thức sau:

$$\pi/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$$

Độc tính được đánh giá theo cân nặng của các chuột thử nghiệm ba lần một tuần. Các phân tích thống kê được thực hiện ở mỗi lần đo bằng phép kiểm định Mann-Whitney.

Sự tiến triển khối u từ tế bào khối u SBC-5 không bị ảnh hưởng bởi tiêm thể tiếp hợp kháng thể-dược chất kháng IGF-1R. (Fig.5) như kỳ vọng đối với khối u có điểm số đánh giá bằng 1⁺ nhưng không kỳ vọng đối với khối u có điểm số đánh giá bằng 3⁺.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1), hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này chứa:

i) chuỗi nặng chứa tương ứng ba vùng CDR sau, vùng CDR-H1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng CDR-H2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, và vùng CDR-H3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3; và

ii) chuỗi nhẹ chứa tương ứng ba vùng CDR sau, vùng CDR-L1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, vùng CDR-L2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, và vùng CDR-L3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng thay đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng với trình tự SEQ ID NO.7 ít nhất bằng 90%; và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng với trình tự SEQ ID NO.8 ít nhất bằng 90%.

3. Kháng thể gắn kết thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1), hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ kháng thể này được bài tiết bởi tế bào lai được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 17 tháng 09 năm 2014, với mã đăng ký là I-4894.

4. Kit phát hiện tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng bị bệnh, trong đó kit này chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và kháng thể này chứa:

i) chuỗi nặng chứa tương ứng ba vùng CDR sau, vùng CDR-H1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng CDR-H2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, và vùng CDR-H3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3; và

ii) chuỗi nhẹ chứa tương ứng ba vùng CDR sau, vùng CDR-L1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, vùng CDR-L2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, và vùng CDR-L3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

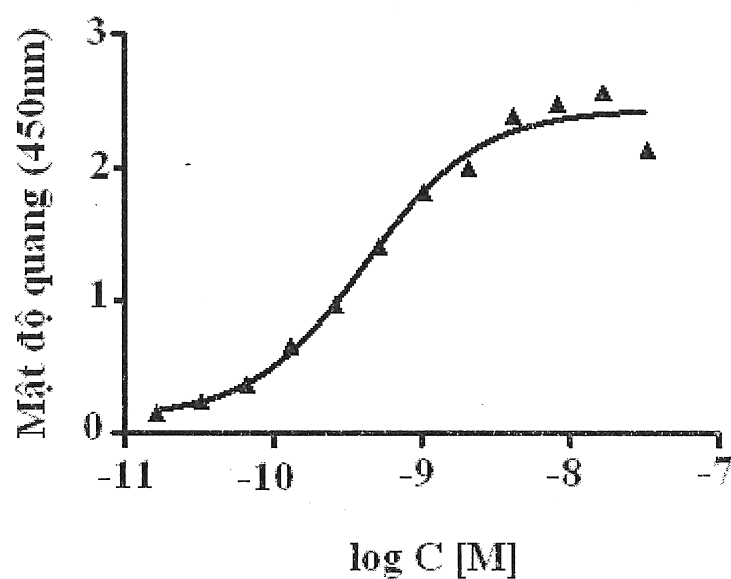
kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đánh dấu bằng gốc

có thể phát hiện.

5. Kit theo điểm 4, trong đó gốc có thể phát hiện được chọn từ nhóm bao gồm chất phát huỳnh quang, chất mang màu, nuclit phóng xạ, biotin, và enzym.

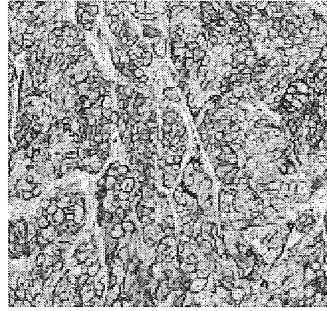
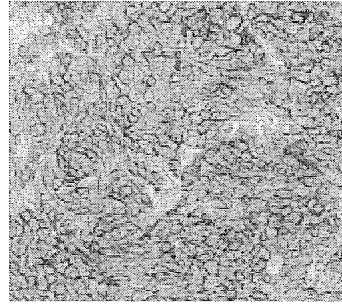
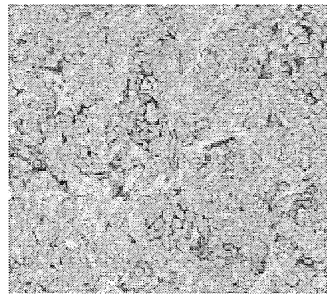
rh IGF-1R ELISA

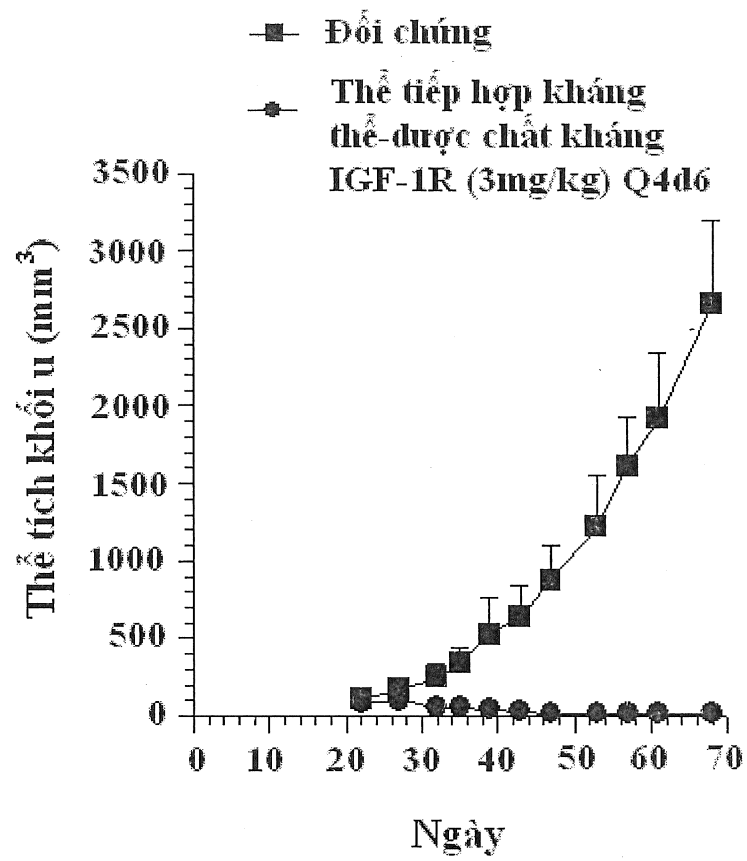
▲ Kháng thể đơn dòng 816C12

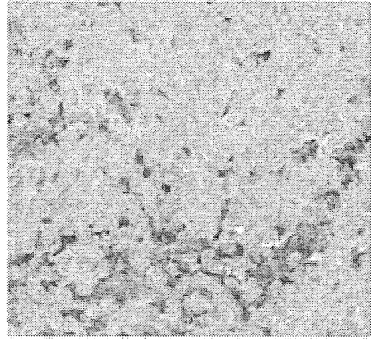


	Kháng thể đơn dòng 816C12
Đáp ứng liên xichma (độ dốc thay đổi)	
Các trị số phù hợp nhất	
Đáy	0,1163
Đỉnh	2,438
Log(EC ₅₀)	-9,380
Độ dốc đồng biến	1,116
EC ₅₀	4,173 x 10 ⁻¹⁰

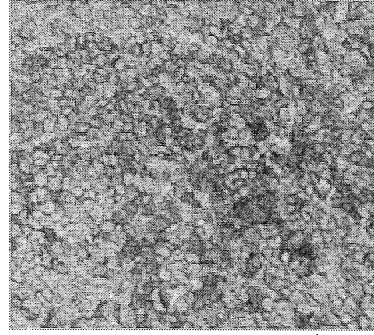
Fig.1

**A****B****C****Fig.2**

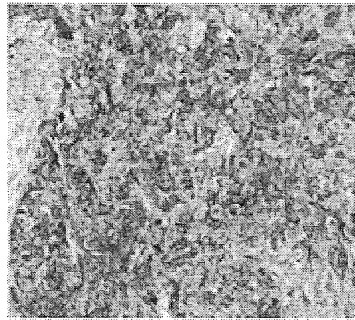
**Fig.3**



A

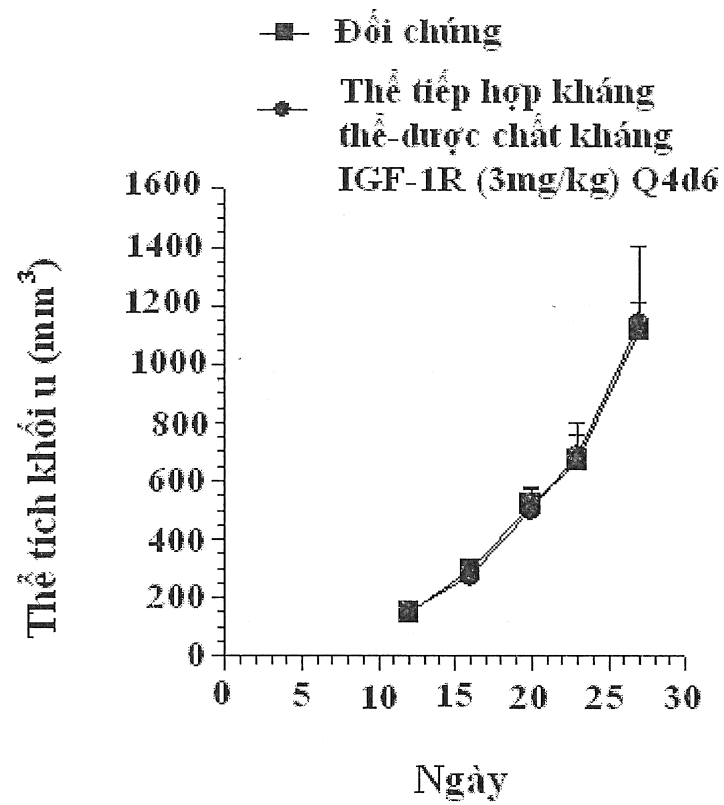


B



C

Fig.4

**Fig.5**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
      JOUHANNEAUD, Alexandra
<120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT THỤ THỂ YẾU TỔ SINH TRƯỞNG TUƠNG TỰ INSULIN-1 VÀ KIT CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
<130> D34866
<140> PCT/EP2016/059338
<141> 2016-04-27
<150> EP 15305642,9
<151> 2015-04-27
<160> 10
<170> PatentIn version 3,5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 816C12 I-4894, chuỗi nặng, CDR-H1
<400> 1
Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr Val
1           5
<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 816C12 I-4894, chuỗi nặng, CDR-H2
<400> 2
Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr
1           5
<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 816C12 I-4894, chuỗi nặng, CDR-H3
<400> 3
Val Ser Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val
1           5           10
<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 816C12 I-4894, chuỗi nhẹ, CDR-L1
<400> 4
Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
1           5
<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 816C12 I-4894, chuỗi nhẹ, CDR-L2
<400> 5
Tyr Thr Ser
1
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 816C12 I-4894, chuỗi nhẹ, CDR-L3
<400> 6
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1           5
<210> 7
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 816C12 I-4894, chuỗi nặng, vùng thay đổi
<400> 7
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr
           20           25           30
Val Leu His Trp Met Lys Arg Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45

```

Gly Tyr Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ser Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 816C12 I-4894, chuỗi nhẹ, vùng thay đổi
 <400> 8

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

<210> 9
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 816C12 I-4894, chuỗi nặng, vùng thay đổi
 <400> 9

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggaca cacattcact agctatgttt tgcactggat gaagcggaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatacctc acaatgatgt tactaagtac 180
 aatgagaatt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatactccag cacagtctac 240
 atggaggtca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtgt attactgtgt aagtaccgcc 300
 tactatggta acggccggta cttcgatgtc tggggcgagc ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 10
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 816C12 I-4894, chuỗi nhẹ, vùng thay đổi
 <400> 10

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa actgggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtctcatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatatgg ccacttattt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321