



(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)



1-0031886

(51)⁷ C07K 16/40

(13) B

(21) 1-2014-04206

(22) 24/05/2013

(86) PCT/GB2013/051373 24/05/2013

(87) WO/2013/175229 28/11/2013

(30) 1209096.5 24/05/2012 GB

(45) 25/05/2022 410

(43) 27/04/2015 325A

(73) MEDICAL RESEARCH COUNCIL TECHNOLOGY (GB)

7th Floor Lynton House, 7-12 Tavistock Square, London WC1H 9LT, Great Britain

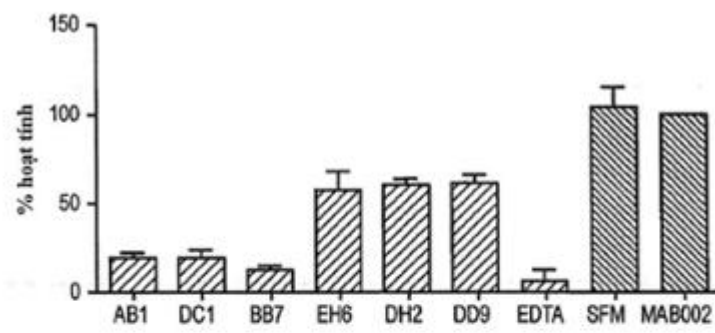
(72) JOHNSON, Tim (GB); WATSON, Phil (GB); MATTHEWS, David (GB); BROWN, Alex (GB).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

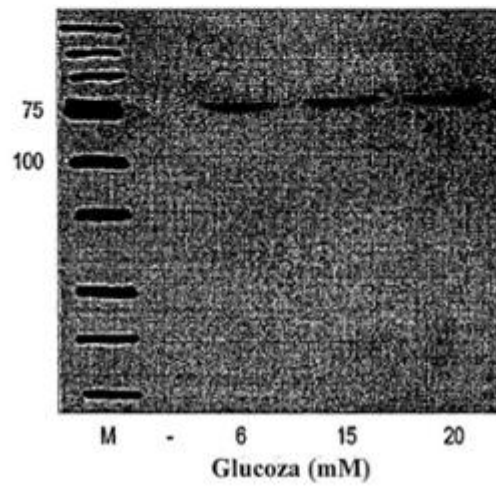
(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT CHỌN LỌC VỚI EPITOP TRONG VÙNG LỖI CỦA
TRANSGLUTAMINAZA TYP 2 (TG2), PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết
chọn lọc với epitop trong vùng lõi của transglutaminaza typ 2 (TG2). Sáng chế đề cập đến
các epitop mới trong lõi TG2. Sáng chế đề cập đến kháng thể ức chế TG2 của người và
ứng dụng của nó, cụ thể là làm thuốc, ví dụ, để điều trị và/hoặc chẩn đoán các tình trạng
bệnh lý bao gồm bệnh Celiac, sự tạo sẹo, bệnh liên quan đến xơ hóa, bệnh thoái hóa thần
kinh/bệnh thần kinh và bệnh ung thư.

A: Ưc chế TG



B: Thẩm tách protein



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất ức chế TG2 và phương pháp sản xuất chất ức chế này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Transglutaminaza typ 2 (TG2; còn gọi là transglutaminaza mô, tTg) là một phần của họ transglutaminaza rộng gồm 9 thành viên, bao gồm cả Yếu tố XIIIa, là yếu tố quan trọng trong quá trình đông máu, cũng như Transglutaminaza tế bào sừng (TG1) và Transglutaminaza biểu mô (TG3) là các chất liên quan đến quá trình biệt hóa cuối cùng của tế bào sừng. Ngoài ra, có các thành viên khác của họ TG như TG typ 4 đến typ 7 mà đến nay vai trò xác định của chúng chưa được nhận dạng.

TG2 hoạt động chủ yếu dưới dạng enzym liên kết ngang với protein bằng cách xúc tác quá trình tạo liên kết $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysin iso-dipeptit. Mức biểu hiện TG2 gia tăng dẫn đến sự tạo liên kết ngang với protein một cách bất thường, dấu hiệu này liên quan đến một số bệnh lý bao gồm các loại khác nhau gồm tạo mô sẹo, tạo đám rối sợi thần kinh trong một số rối loạn não và kháng hóa liệu pháp trong một số bệnh ung thư. TG2 cũng có khả năng khử amit trong protein. TG2 khử amit trong gliadin và phức chất TG2/Gliadin là tự kháng nguyên chủ yếu trong bệnh Celiac. Ngoài ra, TG2 có chức năng liên kết với GTP và có thể đóng vai trò là GTPaza, mặc dù điều này không liên quan đến vai trò gây bệnh.

Hoạt tính TG2 gia tăng chủ yếu liên quan đến quá trình làm lành vết thương bất thường [1] dẫn đến xơ gan [2], xơ phổi [3], xơ tim [4] và xơ thận, [5] cũng như xơ vữa động mạch [6]. Quá trình tạo sẹo và xơ liên quan đến sự gia tăng tổng hợp TG2 và, quan trọng nhất, sự gia tăng xuất TG2 vào vùng gian bào. Ngay khi ra khỏi tế bào, TG2 có khả năng liên kết ngang với các protein thuộc chất nền ngoại bào (extracellular matrix: ECM) như fibronectin và collagen [7] bằng cách đưa vào

liên kết $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysin di-peptit [8]. Các nghiên cứu chứng minh rằng điều này có thể làm gia tăng quá trình lắng đọng các thành phần ECM hiện có, trong khi đồng thời chống lại quá trình thanh thải do phân hủy protein bởi hệ metalloproteinaza chất nền (matrix metalloproteinase:mMP) [9, 10]. Nói tóm lại, điều này gây tích tụ protein ECM và do đó tạo ra mô sẹo [9]. Ngoài ra, TG2 có vai trò nổi trội trong việc hoạt hóa TGF- β 1 tiềm tàng trong quá trình tạo sẹo [11] và cũng liên quan đến các con đường hoạt hóa intolokin-6 [12] và yếu tố hoại tử u- α [13].

Sự ức chế TG2 *in vitro* làm giảm mức chất nền ngoại bào [14] trong khi các tế bào được tạo ra từ chuột nhất khuyết TG2 có mức ECM trưởng thành thấp hơn [9]. Việc sử dụng *in vivo* chất ức chế liên TG trong mô hình bệnh thận mạn tính làm giảm sự phát triển của bệnh xơ cứng thận tiểu cầu và xơ hóa kẽ ống nhằm bảo tồn chức năng thận [15, 16].

Các lợi ích tương tự được ghi nhận ở chuột nhất khuyết TG2 bị tắc nghẽn niệu quản một bên [17].

Có một số bệnh thoái hóa thần kinh được đặc trưng bởi sự có mặt của các kết tụ protein trong vùng thoái hóa của não mà TG2 được cho là hình thành trong đó. Đặc trưng nhất là bệnh tả Huntington. Protein Huntington (htt) chứa các đoạn lặp polyglutamin kéo dài ở vùng đầu tận cùng N của nó. Htt kiểu dại chứa dưới 35 glutamin liên tiếp trong khi htt liên quan đến bệnh thường chứa trên 40 glutamin liên tiếp khiến cho nó trở thành cơ chất TG2 tuyệt hảo. Kết quả là, các kết tụ không hòa tan được tạo ra trong thể vân và vỏ não của bệnh nhân bị bệnh Huntington. Tần suất kết tụ tương quan rõ rệt với mức độ nghiêm trọng của bệnh này.

Bệnh Alzheimer được đặc trưng bởi sự có mặt của các đám rối amyloid ngoại bào chứa protein dạng tinh bột β và các đám rối sợi thần kinh nội bào chứa dạng phosphoryl hóa cao của protein tau. Các đám này chứa lượng lớn liên kết $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysin iso-dipeptit.

Cuối cùng, dấu hiệu nhận biết của bệnh Parkinson là sự có mặt của các kết tụ alpha-synuclein gọi là thể Lewy trong tế bào chất của neuron bị ảnh hưởng cũng

chứa liên kết $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysin iso-dipeptit. Tất cả các protein nêu trên đều là các cơ chất tốt của TG2 *in vitro*. Hơn thế nữa, vùng bị ảnh hưởng của não chứa mức protein TG2 cao hơn so với các vùng không bị ảnh hưởng của não ở cùng bệnh nhân. Tương quan giữa tính đặc hiệu cơ chất TG2 với các protein kết tụ liên quan đến bệnh và mức biểu hiện TG2 gia tăng cho thấy vai trò của TG2 có hoạt tính enzym ở mỗi bệnh.

Chất ức chế TG đã được chứng minh là tạo ra tác dụng điều trị trong nhiều mô hình sinh học về bệnh thoái hóa thần kinh. Trong mô hình nuôi cấy tế bào về bệnh Parkinson bằng cách chuyển nhiễm tế bào COS-7 đồng thời bằng alpha-synuclein và TG2, các kết tụ synuclein cộng hóa trị, gọi lại thể Lewy ở bệnh Parkinson, tạo ra và phụ thuộc vào TG2 có hoạt tính enzym do thể đột biến TG2 bất hoạt C277S không cảm ứng quá trình tạo kết tụ. Việc xử lý các tế bào chuyển nhiễm đồng thời này bằng xystamin làm giảm đáng kể lượng kết tụ alpha-synuclein cũng như tỷ lệ phần trăm số tế bào chứa các kết tụ này. Đã có hai thông báo trong đó các protein có chiều dài bình thường và các protein có đoạn lặp polyglutamin kéo dài, đại diện cho các bệnh CAG kéo dài, như bệnh Huntington, đã được chuyển nhiễm vào các dòng tế bào và được chứng minh là tạo ra kết tụ. Việc xử lý các dòng tế bào này bằng chất ức chế cạnh tranh với TG monodansylcadaverin dẫn đến làm giảm sự phân mảnh nhân, trong khi việc xử lý bằng xystamin dẫn đến cả làm giảm sự phân mảnh nhân lẫn làm giảm sự tạo kết tụ protein. Ví dụ về chất ức chế liên TG là 1,3-dimetyl-2-[(2-oxopropyl)thio]imidazoli clorua mà có thể thu mua được từ Zedira GmbH và được ký hiệu trong một số công bố là NTU283 hoặc r283.

Xystamin có một số tác dụng điều trị *in vivo* có lợi khi được định liều trong mô hình chuột nhắt bị bệnh Huntington. Chuột nhắt R6/2 bị bệnh Huntington được định liều xystamin có chức năng vận động được cải thiện, mức độ sút cân nghiêm trọng giảm và khả năng sống gia tăng so với đối chứng không được điều trị. Điều quan trọng là hoạt tính TG2 *ex vivo* trong dịch não đồng nhất thấp hơn sau khi định liều xystamin ít nhất 60 phút sau tiêm. Trong mô hình chuột nhắt bị bệnh Huntington khác, giống YAC128, xystamin có khả năng làm giảm mức độ teo thể vân nhưng không có khả năng cải thiện thể trọng hoặc chức năng vận động của

chuột này, chỉ ra tác dụng có lợi của xystamin ở cấp độ tế bào và cấp độ mô mà không có lợi về triệu chứng bệnh.

Có thể bằng chứng thuyết phục nhất về tác dụng điều trị có lợi của xystamin đối với chuột nhất bị bệnh Huntington độc lập với sự ức chế TG2 là việc lai chuột nhất R6/2 Huntington với chuột nhất khuyết TG2 để tạo ra giống dễ bị thoái hóa thần kinh khi không có TG2. Khi chuột R6/2 TG2^{-/-} được điều trị bằng xystamin, chức năng vận động được cải thiện và tuổi thọ gia tăng là không khác biệt về mặt thống kê so với mức cải thiện ghi nhận được ở chuột R6/2 TG2^{+/+} được điều trị bằng xystamin. Ngoài ra, các chuột R6/1 và R6/2 TG2^{-/-} có mức kết tụ protein neuron gia tăng so với các chuột R6/1 và R6/2 TG2^{+/+}, chứng tỏ cơ chế kết tụ protein độc lập với hoạt tính chuyển amit của TG2 trong các mô hình này. Tuy nhiên, lưu ý rằng chuột R6/2 TG2^{-/-} chậm khởi phát chứng loạn chức năng vận động và cải thiện khả năng sống so với chuột R6/2 TG2^{+/+}, chứng tỏ vai trò của TG2 trong quá trình phát sinh bệnh thoái hóa thần kinh trong mô hình R6/2.

TG2 cũng liên quan đến nhiều đến bệnh Celiac ảnh hưởng đến 1% dân số Tây Âu. Bệnh Celiac spure là rối loạn viêm qua trung gian tế bào T ở ruột non được gây ra do lớp protein gọi là prolamin có trong lúa mỳ, lúa mạch và lúa mạch đen. Hàm lượng prolin và glutamin cao của các protein này khiến cho chúng kháng các proteaza tự nhiên của dạ dày, tuyến tụy và ruột, và các peptidaza trong quá trình tiêu hóa. Các đoạn peptit thu được vẫn không được tiêu hóa hoàn toàn trong ruột non và có khả năng truy cập lớp đệm niêm mạc ruột mà tại đó, sau quá trình cải biến bởi TG2, chúng có thể kích thích đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T dẫn đến gây viêm và phá hủy cấu trúc ruột. TG2 của ruột khử amit của các gốc glutamin đặc hiệu trong peptit prolamin thành các gốc glutamat. Ở các cá thể HLA-DQ2/8, các peptit được cải biến này được trình diện cho các tế bào T tự phản ứng tương ứng nhờ các phân tử MHC lớp II. Mặc dù prolamin có hàm lượng glutamin cao (khoảng 30–35%), chỉ có một số gốc glutamin này bị tấn công bởi TG2 của người. Tương quan mật thiết giữa tính đặc hiệu cơ chất của TG2, ái lực liên kết với DQ2, và khả năng kích thích tế bào T của prolamin được xử lý bởi TG2 chứng tỏ rằng sự khử amit của peptit là qua trung gian TG2 và đóng vai trò đáng kể trong việc xác định mức độ nghiêm trọng của bệnh. Ngoài ra, bệnh nhân

bị bệnh Celiac tạo ra đáp ứng tự kháng thể với phức chất TG2-gliadin. Các kháng thể kháng TG2 này được tìm thấy cả trong ruột non, nơi chúng được chứng minh là cùng vị trí với TG2 ngoại bào, lẫn trong máu, nơi chúng được dùng làm chất đánh dấu bệnh chẩn đoán.

Mặc dù thiếu mô hình động vật về bệnh Celiac, song các thí nghiệm *ex vivo* chỉ ra rằng việc ức chế TG2 có thể có lợi cho bệnh nhân bị bệnh spure. Việc nuôi cấy sinh thiết ruột non bệnh nhân celiac với chất tiêu hóa gluten được xử lý bằng TG2 (được khử amit) hoặc không được xử lý bằng TG2 (không được khử amit) đều dẫn đến tạo ra các dòng tế bào T của bệnh nhân mà chủ yếu nhận biết peptit gluten được khử amit hơn là peptit gluten không được khử amit. Tương tự, bằng cách phong bế hoạt tính của TG2 nội sinh trong sinh thiết bệnh celiac bằng xystamin, hơn một nửa dòng tế bào T thu được đã làm giảm các đáp ứng tăng sinh so với các đối chứng không được xử lý bằng xystamin. Các dòng tế bào không đáp ứng rõ rệt với các chất tiêu hóa không được khử amit. Các kết quả này chỉ ra rằng thực chất quần thể tế bào T đáp ứng với gluten trong sinh thiết ruột bệnh celiac chủ yếu nhận biết peptit gluten được khử amit đối lập với peptit không được khử amit, rằng hoạt tính TG2 nội sinh trong sinh thiết này có thể khử amit của peptit gluten *in situ* và rằng việc xử lý sinh thiết bệnh celiac bằng chất ức chế TG2 có thể làm giảm đáp ứng tăng sinh của tế bào T phản ứng với gluten.

Nghiên cứu khác chứng minh rằng chất ức chế liên TG (chất ức chế 2-[(2-oxopropyl)thio]imidazoli) có khả năng ngăn ngừa sự liên kết ngang *in situ* của peptit gluten với protein nội sinh trong các lát cắt mô mỏng thu được từ cả bệnh nhân Celiac spure lẫn đối chứng. Quan trọng hơn, các tác giả của nghiên cứu này còn chứng minh rằng việc ủ sinh thiết ruột non bệnh celiac nguyên vẹn với 2-[(2-oxopropyl)thio]imidazoli ngăn ngừa sự hoạt hóa tế bào T được cảm ứng bởi dạng không được khử amit của peptit gluten trội miễn dịch. Ngược lại, việc ức chế TG là không hữu hiệu kiểm soát sự hoạt hóa tế bào T khi sinh thiết được ủ với dạng được khử amit của peptit này. Các kết quả này chỉ ra rằng việc ức chế TG2 nội sinh trong sinh thiết của bệnh nhân celiac có thể ngăn ngừa sự khử amit của peptit gluten và, do đó, làm giảm sự hoạt hóa tế bào T.

Có một số quan sát ủng hộ giả thuyết TG2 có vai trò trong việc phát triển một số loại bệnh ung thư. Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng protein TG2 protein được tăng điều hòa trong mô ung thư so với mô khỏe mạnh ở các bệnh ung thư như u nguyên bào thần kinh đệm, u hắc sắc tố di ác tính, và cacxinom ống tuyến tụy. tương quan rõ ràng giữa tính kháng hóa liệu pháp và khả năng di căn của một số bệnh ung thư với mức biểu hiện TG2 đã được chứng minh, mặc dù trong các loại tế bào nhất định, TG2 được chứng minh là tạo ra tác dụng chống sự chết theo chương trình đối với tế bào trong khi việc giảm điều hòa siARN của mức biểu hiện protein TG2 hoặc xử lý bằng chất ức chế TG2 làm cho các tế bào này dễ chết theo chương trình. Mặt khác, cũng có các thông báo về việc làm giảm điều hòa sự biểu hiện TG2 trong các loại ung thư nhất định [18]. Mới đây, đã chứng minh được rằng TG2 là thành phần liên kết đối với GPR56, một protein được giảm điều hòa trong các tế bào ung thư di căn cao, chứng tỏ rằng TG2 có thể đóng vai trò protein ức chế khối u bằng cách tương tác với GPR56 [18].

Các chất ức chế transglutaminaza hiện nay được chia thành 3 lớp chính: 1) chất ức chế amin cạnh tranh (ví dụ, xystamin và spermin), chúng cạnh tranh với các cơ chất amin tự nhiên; 2) chất ức chế chuyển hoạt tính enzym thuận nghịch như GTP và lớp hợp chất mới được phát hiện với khung chính thieno[2,3-d]pyrimidin-4-on axylhydrazit; và 3) chất ức chế không thuận nghịch bao gồm các dẫn xuất 2-[(2-oxopropyl)thio]imidazoli (xystein ở vị trí hoạt động axetylat), 3-halo-4,5-dihydroisoxazol (tạo ra iminothioete ổn định trong vị trí hoạt động) và các chất tương tự carbobenzyloxy-L-glutaminy glyxin với nhiều nhóm phản ứng được cài vào.

Hầu hết các chất này đã được sử dụng trong các hệ thực nghiệm trên đây và cho kết quả có lợi. Tuy nhiên, không có chất ức chế nào trong số này có tính đặc hiệu với đồng dạng TG do chúng đều tấn công đích là bộ ba xúc tác bảo toàn bên trong lõi xúc tác của họ transglutaminaza. Kết quả là, chúng đều có nhược điểm là khi cùng ức chế Yếu tố XIIIa, TG1 và TG3, điều này cản trở việc ứng dụng chúng hữu hiệu trong bệnh của người do có khả năng gây ra tác dụng phụ.

WO 2006/100679 mô tả kháng thể kháng TG2 đặc hiệu sản xuất được bằng công nghệ tái tổ hợp từ các mẫu thu được từ ba bệnh nhân celiac trưởng thành có hiệu giá kháng thể kháng TG2 cao.

CUB7402 (ab2386) là kháng thể sẵn có trên thị trường từ Abcam.

Lai et al., 2007; FASEB 21(14):4131-4143 mô tả sự xác định hai dạng transglutaminaza mô được nối theo cách khác độc lập GTP trong bạch cầu, cơ trơn mạch, và tế bào nội mô người.

WO 2010/113025 mô tả sự chẩn đoán chọn lọc các bệnh tự miễn gây ra do gluten bằng thử nghiệm liên kết sử dụng epitop celiac chính có trên các protein thuộc họ transglutaminaza.

WO 02/068616 mô tả transglutaminaza 6 là chất chỉ thị chẩn đoán các bệnh tự miễn.

Di Niro et al., 2007; BMC Biotechnology 7(46): 1-10 mô tả cấu trúc của các kháng thể nhỏ (miniantibody) cho nghiên cứu in vivo các bệnh tự miễn ở người trong các mô hình động vật.

WO2010/116196 mô tả sự chẩn đoán chọn lọc các bệnh tự miễn gây ra do gluten bằng thử nghiệm liên kết sử dụng epitop celiac chính có trên các protein thuộc họ transglutaminaza. WO2010/116196 cũng mô tả việc điều trị các bệnh tự miễn gây ra do gluten bằng cách ức chế liên kết của các tự kháng thể celiac bằng các hợp chất điều trị.

Do TG2 liên quan đến nhiều tình trạng bệnh lý và số liệu thuyết phục từ các chất ức chế không đặc hiệu, cần có các chất ức chế TG2 chọn lọc cao và hiệu quả cao với các tác dụng trệch đích giảm thiểu.

Việc nêu hoặc bàn luận về tài liệu được công bố trước trong bản mô tả này hiển nhiên là không cần thiết do biết rằng tài liệu này là một phần của tình trạng kỹ thuật hoặc là hiểu biết chung phổ biến.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với epitop trong vùng lõi của transglutaminaza typ 2 (TG2) và ức chế

TG2 người liên kết chéo với lysin và glutamin bằng các liên kết $N\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine isopeptit, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự axit amin sau:

- (i) KASQDINSYLT (LCDR1);
LVNRLVD (LCDR2);
LQYDDFPYT (LCDR3);
THAMS (HCDR1);
TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); và
LISTY (HCDR3); hoặc
- (ii) KASQDINSYLT (LCDR1);
LTNRLMD (LCDR2);
LQYVDFPYT (LCDR3);
SSAMS (HCDR1);
TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); và
LISPY (HCDR3); hoặc
- (iii) KASQDINSYLT (LCDR1);
RTNRLFD (LCDR2);
LQYDDFPYT (LCDR3);
SSAMS (HCDR1);
TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2); và
LISLY (HCDR3).

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có:

- (i) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự
DITMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWVQKPKAPKILYLVN
RLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTK
VEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMS WVRQAPGKGLEWVA
TISSGGRSTYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLIS
TYWGQGTLVTVSS; hoặc

(ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTW FQQKPGKAPKTLIYLTN
RLMDGVPSRFSGSGSGQEFLLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQG TK
VEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSAMS WVRQAPGKGLEWVATI
SSGGRSTYYPD SVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISP
YWGQGTLVTVSS; hoặc

(iii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTW YQQKPGKAPKLLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTY YCLQYDDFPYTFGGG TKL
EIK, hoặc

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTW FQQKPGKAPKSLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYY CLQYDDFPYTFGQG TKV
EIK,

và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS WVRQAPGKGLEWVST
ISVGGGKTYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLIS
LYWGQGTLVTVSS.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với epitop trong vùng lõi của transglutaminaza typ 2 (TG2) và ức chế TG2 người liên kết chéo với lysin và glutamin bằng các liên kết $N\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysin}$ isopeptit, có:

(a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLQKPGQSPKFL
IYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPFTFG
GGTKLEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQGLEWI

GYINPYNDGAKYNE

KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTV
SS; hoặc

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKL
LIYKVSNNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVAEDLGVYYCLQVSHVPFTF
GSGTKLEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIG
FINPYNDGTTYNEKFKGKATLTSDKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFS
SGYWGQGTTLTVSS; hoặc

(c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKF
LIYKVSNNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISSEVAEDLGVYYCFQGSHVPFTF
GGGTKLEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIG
YINPYNDGARYNEKFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARL
SSDYWGQGTTLTVSS; hoặc

(d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYYWYQQKPGSSPRLIYDTS
NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQWNSSPLTFGAGT
KLELK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAH
IYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTT
APFAFWGQGTTLTVSA; hoặc

(e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYYWYQQKPGSSPRLIYDTS
NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATFYCQQWSSSPLTFGAGTK
LELK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAH
IYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTT
APFAYWGQGTTLTVSA; hoặc

(f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIEKPDHLFTGLIA
GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFG
GGTKVTVLG, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHWVKQNLGKSLEWI
GYINPKNGVIYYNQKFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCAT
ALTYWGQGTLVTVSA; hoặc

(g) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DVVMQTPLTSLVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLRFQRPQGSPRR
LIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCVQGTHFPYT
FGGGTKLEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMG
WINTSSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLSKSEDATYFCARPE
VAYWGQGTLVTVSA.

Theo một phương án, (a) kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa hoặc bao gồm kháng thể nguyên vẹn; (b) kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa hoặc bao gồm đoạn liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm: đoạn Fv, ví dụ đoạn Fv chuỗi đơn hoặc đoạn Fv được liên kết disulfua; đoạn Fab; và đoạn giống Fab, ví dụ đoạn Fab' hoặc đoạn F(ab)₂; (c) kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó là IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4; và/hoặc (d) kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó không ức chế hoạt tính TG1, TG3, TG13 và/hoặc TG7.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất hợp chất chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và một gốc nữa, ví dụ gốc có thể phát hiện dễ dàng, và/hoặc gốc gây độc tế bào trực tiếp hoặc gián tiếp.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm/chế phẩm dược chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế, trong hỗn hợp với tá dược, chất phụ gia, chất pha

loãng hoặc chất mang được dụng, tùy ý chứa thêm một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác nữa, ưu tiên là trong đó được phẩm/chế phẩm được này được bào chế để dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, hoặc dưới da cho người bệnh.

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit gồm các thành phần chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế; và một tác nhân khác.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế để sử dụng làm dược phẩm.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế để sử dụng trong điều trị và/hoặc chẩn đoán bệnh Celiac, sự lành vết thương bất thường, sự tạo sẹo, sẹo lồi, sẹo mất, bệnh viêm ruột, thoái hóa điểm vàng, bệnh vẩy nến, bệnh liên quan đến xơ hóa (ví dụ, xơ gan, xơ phổi như bệnh phổi kẽ và bệnh xơ hóa phổi, xơ tim, xơ da, xơ tủy, xơ thận như bệnh xơ cứng tiểu cầu và bệnh xơ kẽ ống), bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tái hẹp, bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thoái hóa thần kinh/bệnh thần kinh (ví dụ, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh polyglutamin, bệnh teo cơ tủy hành não, bệnh teo nhân răng nhân đỏ-cầu nhát thể Luy, chứng mất điều hòa tủy hành não 1, 2, 3, 6, 7 và 12, bệnh teo nhân đỏ-cầu nhát, chứng liệt nhân đỏ-cầu nhát), u nguyên bào thần kinh đệm như u nguyên bào thần kinh đệm trong hội chứng Li-Fraumeni và u nguyên bào thần kinh đệm rải rác, u hắc sắc tố ác tính, cacxinom ống tuyến tụy, bệnh bạch cầu dạng tủy, bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính, hội chứng loạn sản tủy, hội chứng tăng sinh tủy, bệnh ung thư phụ khoa, sacom Kaposi, bệnh Hansen, bệnh viêm kết tràng tạo collagen.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp *in vitro* để làm giảm hoặc ức chế hoạt tính enzym TG2, phương pháp này bao gồm dùng kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế, vào mẫu chứa TG2, ví dụ mẫu mô hoặc tế bào chứa TG2.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế, phương pháp này bao gồm biểu hiện polynucleotit theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Tạo protein tái tổ hợp TG2 của người

A: ADN bổ trợ của lõi xúc tác TG2 được tạo ra bằng PCR từ vector pClineo-hTG2 và cài vào plasmit pET 21a. Sau khi khuếch đại ở *E. coli*, plasmit này được cắt bằng *Nhe* I và *Hind* III để giải phóng ADN bổ trợ của lõi TG2 và chạy trên gel Agarosa 1% (lần 3). Các băng được xác định kích thước theo thang 100 bp (lần 1) và băng chuẩn trọng lượng phân tử ADN λ (lần 2).

B: Vector lõi TG2 pET21a được dùng để biến nạp chủng *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Việc biểu hiện được cảm ứng bằng cách sử dụng IPTG trong 4 giờ. Protein lõi TG2 tạo ra các thể không hòa tan thu hồi được từ dịch tan bào bằng cách ly tâm. Chúng được hòa tan lại, và lõi TG2 gắn đuôi His 37 kDa được tinh chế trên cột niken. Tách 10ng bằng SDS-PAGE, nhuộm protein và dò bằng kháng thể kháng TG2 CUB7402 (lần 2) theo băng chuẩn trọng lượng phân tử (lần 1).

Fig. 2: Đáp ứng miễn dịch ở chuột nhắt với protein lõi rhTG2

A: Lấy máu thử nghiệm từ 4 chuột nhắt đã được gây miễn dịch bằng lõi xúc tác ở ngày 45 sau khi gây miễn dịch lần đầu và 10 ngày sau khi gây miễn dịch nhắc lại thứ hai. Pha loãng huyết thanh theo bậc và kiểm tra khả năng phản ứng bằng ELISA kháng protein lõi TG2 cố định.

B Khả năng phản ứng còn được kiểm tra bằng cách sàng lọc kháng rh TG2 của người và vùng lõi xúc tác rh TG2. Phân đoạn 20, 40, 80ng protein bằng SDS PAGE và nhuộm protein trên màng PVDF. Protein này được dò miễn dịch bằng độ pha loãng huyết thanh 1:1000. Sự liên kết với kháng thể được phát hiện bằng cách sử dụng HRP đặc hiệu kháng chuỗi γ chuột nhắt. Xác định kích thước theo băng chuẩn trọng lượng phân tử.

Fig. 3: Khả năng phản ứng của tế bào lai với các thành viên thuộc họ TG

A: ELISA được thực hiện bằng cách sử dụng các đĩa có phủ TG tái tổ hợp (100ng/lỗ) để xác định tính đặc hiệu typ TG trong 109 dịch nổi tế bào lai mà có phản ứng tốt với TG2. Sự liên kết với kháng thể được phát hiện bằng cách sử dụng HRP đặc hiệu kháng chuỗi γ chuột nhất. việc chọn ngẫu nhiên các kháng thể sàng lọc được được thể hiện bao gồm EF4, CG9 & FD8, chúng có khả năng phản ứng chéo.

B: Chín tế bào lai chọn được được nhân dòng kép. IgG được tinh chế và thử khả năng phản ứng ở 0,1 μ g/ml kháng TG1, TG2, TG3, TG7 của người tái tổ hợp và Yếu tố XIIIa bằng cách sử dụng ELISA với các đĩa có phủ 100ng mỗi TG. Số liệu thể hiện trị số OD trung bình từ 3 ELISA riêng biệt $\pm$ SEM.

Yếu tố XIIIa được ký hiệu trên đồ thị là TG13.

Fig. 4: Nhận dạng tế bào lai có hoạt tính ức chế TG2

Các môi trường có điều kiện từ 32 lỗ tế bào lai có tính đặc hiệu với TG2 được sàng lọc về tác dụng của chúng đối với 100ng hoạt tính rhTG2 bằng cách sử dụng thử nghiệm hợp nhất 3 H putresxin. Chất ức chế liên TG2 hóa học 1,3-dimethyl-2-[(2-oxo-propyl)thio]imidazoli clorua được dùng làm đối chứng ức chế dương tính. RPMI (môi trường không có điều kiện) được dùng làm đối chứng âm tính. 500ng kháng thể ức chế TG2 do Quark biotechnology thử nghiệm được dùng để so sánh. Số liệu thể hiện CPM trung bình hợp nhất trong 30 phút từ ít nhất ba thí nghiệm thực hiện hai lần $\pm$ SEM. Các cột màu xám thể hiện mức ức chế TG2 đáng kể ($p < 0,05$).

Fig. 5: Lập bản đồ epitop của kháng thể ức chế.

Mỗi kháng thể đơn dòng ức chế được liên kết với đĩa ELISA và được sàng lọc dựa trên ngân hàng thể thực khuẩn TG2 của người. Thể thực khuẩn liên kết với kháng thể được chọn, khuếch đại và dùng cho 4 vòng sàng lọc tiếp theo. Tiếp theo, các đoạn ngân hàng TG2 trong thể thực khuẩn này được xác định trình tự và các trình tự chồng lắp được dùng để xác định epitop đối với mỗi kháng thể. Tiếp theo, các trình tự chung giữa các kháng thể được dùng để xác định trình tự liên ứng đối

với epitop ức chế cụ thể và các kháng thể được nhóm theo đó. Nhận dạng được 3 epitop ức chế.

Fig. 6: Vị trí cấu trúc của epitop ức chế với lõi xúc tác TG2

Trình tự axit amin của TG2 được đưa vào Pymol và thể hiện cấu trúc đồ họa 3D được tạo ra bằng lệnh mở, trạng thái được hoạt hóa bởi Ca^{2+} với các vị trí liên kết với canxi giả định (màu ngọc lam) và bộ ba xúc tác (màu xám) được thể hiện để so sánh (phần trái). Tiếp theo, các epitop ức chế liên ứng được thêm vào bằng màu xanh (Kháng thể nhóm 1 – vị trí AB1), màu đỏ (kháng thể nhóm 2 – vị trí DF4) và màu vàng (kháng thể nhóm 3, vị trí DD9).

Fig. 7: Trình tự VL của kháng thể ức chế

ARN từ mỗi tế bào lai ức chế được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng mỗi FR1 suy biến, mỗi MH1 và MH2 và 3 mỗi vùng ổn định để khuếch đại các gen VH. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện đối với AB1.

Fig. 8: Tác dụng ức chế hoạt tính TG2 của AB1 trong dịch tan bào

A: Làm tan tế bào Hep2G và trộn 45 ug protein với 750ng IgG từ AB1, DH2, DD9, BB7, DC1 và EH6 trong 20 phút. Hỗn hợp này được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt tính TG hợp nhất ^3H Putresxin với việc lấy mẫu trong 1 giờ. Tốc độ phản ứng được tính và thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm dịch tan bào ủ với kháng thể ngẫu nhiên (MAB002). Số liệu thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế trung bình $\pm$ SEM từ 2 thí nghiệm riêng biệt thực hiện hai lần. * $p < 0,05$

B: Cho tế bào HepG2 tiếp xúc với glucoza có nồng độ gia tăng trong 96 giờ để tăng điều hòa quá trình biểu hiện TG2. Thu hoạch tế bào, làm tan và phân đoạn 25 ug dịch tan bào bằng SDS-PAGE, thẩm tách protein và tiếp theo dò miễn dịch bằng dung dịch IgG AB1 1ng/ml bằng cách sử dụng điểm cuối phát quang hóa học.

Fig. 9: (Bảng 1): So sánh trị số IC50 đối với kháng thể ức chế TG2

Để xác định trị số IC₅₀ đối với mỗi kháng thể kháng người, chuột cống và chuột nhắt, thử nghiệm ³H Putresxin được sử dụng. 100ng của TG2 của người hoặc 25ng của chuột nhắt và TG2 của chuột cống được dùng để tạo ra phản ứng trong đó khoảng 3000 cpm Putresxin được hợp nhất/giờ trong 10ul hỗn hợp phản ứng. Tiếp theo, mỗi kháng thể pha loãng theo bậc được sử dụng bắt đầu từ việc thêm 500ng (nồng độ cuối 5ug/ml) vào hỗn hợp phản ứng và ủ với TG2 trong 20 phút trước khi hoạt hóa phản ứng. Tính trị số IC₅₀ bằng cách xác định nồng độ mà tại đó tốc độ phản ứng enzym giảm 50% bằng cách chỉnh đường cong thích hợp trong graphpad prism. Các trị số được thể hiện dưới dạng lượng IgG tính bằng mg/ml trong phản ứng mà có thể ức chế 1ng TG2.

Fig. 10: Hoạt tính TG ngoại bào ở tế bào HK2 đáp lại sự ức chế TG2

Cây tế bào HK2 lên fibronectin và ủ trong 2 giờ với sự có mặt của biotin cadaverin 0,1M với 4ng/μl kháng thể kháng TG2 của người (AB1) (phần A), 4ng/μl kháng thể kháng TG2 của người (DC1) (phần B) hoặc 400μM chất ức chế liên TG đặc hiệu với vị trí 1,3-dimetyl-2-[(2-oxo-propyl)thio]imidazoli clorua. Đo hoạt tính TG ngoại bào bằng cách hợp nhất biotin cadaverin vào fibronectin với việc hợp nhất được thực hiện bằng cách sử dụng extravidin-HRP và cơ chất TMB. Đo mức thay đổi mật độ quang học ở 450nm bằng bộ đọc đĩa 96 lỗ. Số liệu thể hiện OD trung bình ở 450nm đúng với 1mg protein tế bào. n = 6 lỗ/nhóm thí nghiệm.

Fig. 11: So sánh sự ức chế TG2 bởi kháng thể AB1 với đoạn fab của kháng thể ức chế TG2 của Quark bằng cách sử dụng thử nghiệm hợp nhất ³H putresxin

Thử nghiệm 100ng hTG2 về hoạt tính TG2 trên cơ sở hợp nhất ³H Putresxin vào dimethylcasein trong khoảng thời gian 60 phút có thêm 1μg đoạn fab của kháng thể được Quark mô tả trong WO2006/100679 và được tổng hợp tại Sheffield University hoặc 500ng AB1. Số liệu thể hiện hoạt tính TG trung bình dưới dạng hợp nhất ³H Putresxin (CPM) ± SEM từ 3 thí nghiệm độc lập thực hiện hai lần.

Fig. 12: So sánh tỷ lệ phần trăm ức chế TG2 bởi kháng thể AB1 với đoạn fab của kháng thể ức chế TG2 của Quark bằng cách sử dụng thử nghiệm hợp nhất ^3H putresxin

Số liệu từ Fig. 11 được thể hiện theo cách khác dưới dạng tỷ lệ phần trăm hoạt tính TG tại mỗi thời điểm để thể hiện sự giảm hoạt tính TG2 hầu như tương đương bởi việc sử dụng AB1 và đoạn fab của kháng thể Quark.

Fig. 13: So sánh sự ức chế TG2 bởi kháng thể AB1 với IgG chuột cống tái tổ hợp của kháng thể ức chế TG2 Quark bằng cách sử dụng thử nghiệm hợp nhất ^3H putresxin

Thử nghiệm 100ng hTG2 về hoạt tính TG2 trên cơ sở hợp nhất ^3H Putresxin vào dimethylcasein trong khoảng thời gian 60 phút có bổ sung 500ng dạng của chuột cống tái tổ hợp của kháng thể ức chế TG2 được Quark mô tả trong WO2006/100679 và tổng hợp tại Medical Research Council Technology hoặc 500ng AB1. Số liệu thể hiện hoạt tính TG trung bình dưới dạng hợp nhất ^3H Putresxin (CPM) $\pm$ SEM từ 3 thí nghiệm độc lập thực hiện hai lần.

Fig. 14: So sánh tỷ lệ phần trăm ức chế TG2 bởi kháng thể AB1 với IgG chuột cống tái tổ hợp của kháng thể ức chế TG2 của Quark bằng cách sử dụng thử nghiệm hợp nhất ^3H putresxin

Số liệu từ Fig. 13 được thể hiện theo cách khác dưới dạng tỷ lệ phần trăm hoạt tính TG tại mỗi thời điểm để thể hiện sự giảm hoạt tính TG2 hầu như tương đương bởi việc sử dụng AB1 và IgG chuột cống tái tổ hợp của Quark.

Fig. 15: Tác dụng của AB1 đối với mức ECM ở tế bào HK2

Mức collagen trưởng thành trong tế bào HK-2 được đo bằng cách hợp nhất ^3H prolin vào ECM trong khoảng thời gian 76 giờ có thêm hoặc không thêm kháng thể ức chế TG2 AB1. Số liệu thể hiện sự hợp nhất ^3H prolin/mg protein tế bào dưới dạng tỷ lệ phần trăm mức trung bình trong tế bào không được xử lý $\pm$ SEM. n=2.

Fig. 16: ELISA liên kết của các dạng kháng thể được làm cho giống như của người

Dịch nổi từ tế bào HEK293F đã được đồng chuyển nhiễm bằng các tổ hợp khác nhau của các vectơ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm cho giống như của người được thử nghiệm bằng ELISA kháng IgG người để xác định nồng độ và bằng ELISA kháng huTG2. Mỗi dịch nổi được thử nghiệm ba lần và IC₅₀ được xác định. Tổ hợp mạnh nhất được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo và dùng làm kháng thể được làm cho giống như của người tuyển chọn.

Fig. 17: Thử nghiệm MRC Quark CTD190 đối với Tg2 của người bằng ELISA

Cây hTG2 (1µg/ml) trong đệm cacbonat qua đêm trong đĩa 96 lỗ và phát hiện ELISA bằng cách sử dụng kháng thể sơ cấp 100ng/ml. Việc phát hiện được thực hiện bằng cách sử dụng IgG kháng chuột nhất (SIGMA 3673) đối với CUB và IgG kháng chuột cồng (SIGMA A5795) đối với Quark (cả hai kháng thể này đều có độ pha loãng 1:5000). Kháng thể Quark do MRC T sản xuất phản ứng với TG2 của người.

Fig. 18: ARN từ tế bào lai AB1 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MHV4 với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG1, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MKV4 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 19: ARN từ tế bào lai BB7 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MHV4 với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG1, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MKV4 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 20: ARN từ tế bào lai DC1 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MHV4 với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG1, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến

MKV4 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 21: ARN từ tế bào lai JE12 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng 5' RACE PCR với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG1, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu MKV1 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 22: ARN từ tế bào lai EH6 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng 5' RACE PCR với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG2B, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu MKV với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 23: ARN từ tế bào lai AG9 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MHV7 với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG1, hoặc sử dụng hỗn hợp chứa các mỗi trình tự tín hiệu suy biến MKV1 - 11 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 24: ARN từ tế bào lai AH3 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MHV7 với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG2B, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu MKV1 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 25: ARN từ tế bào lai DD9 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng 5' RACE PCR với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG2A, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MKV5 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 26: ARN từ tế bào lai DH2 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng 5' RACE PCR với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG2B, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MKV45 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 27: ARN từ tế bào lai DD6 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng 5' RACE PCR với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG2B, hoặc bằng cách sử dụng 5' RACE PCR vùng ổn định chuỗi nhẹ lambda MLC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 28: ARN từ tế bào lai IA12 được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến MHV9 với mỗi vùng ổn định chuỗi nặng MHCG1, hoặc bằng cách sử dụng mỗi trình tự tín hiệu suy biến CL14 với mỗi vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa MKC. Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện.

Fig. 29: Đường cong liều-đáp ứng và trị số IC₅₀ đối với sự ức chế enzym TG2 của người tái tổ hợp bởi kháng thể kháng TG2 dạng khảm, (a) cAB003, (b) cBB001, (c) cDC001, (d) cDD9001, (e) cDH001 và (f) kháng thể TG2 thương mại CUB7402. Trị số IC₅₀ là giá trị trung bình của 3 thí nghiệm độc lập.

Fig. 30: Đường cong liều-đáp ứng và trị số IC₅₀ đối với sự ức chế enzym TG2 của khi đầu chó tái tổ hợp bởi kháng thể kháng TG2 dạng khảm (a) cDC001 và (b) kháng thể TG2 thương mại CUB7402.

Fig. 31: Đường cong liều-đáp ứng và trị số IC₅₀ đối với sự ức chế enzym TG2 của người tái tổ hợp bởi kháng thể kháng TG2 được làm cho giống như của người, (a) hBB001AA, (b) hBB001BB, (c) hAB005 và (d) hAB004.

Fig. 32: Đường cong liều-đáp ứng và trị số IC₅₀ đối với sự ức chế enzym TG2 của khi đầu chó tái tổ hợp bởi kháng thể kháng TG2 được làm cho giống như của người (a) hBB01AA và (b) hAB004.

Fig. 33: Đường cong liều-đáp ứng và trị số IC₅₀ đối với sự ức chế enzym TG2 của người tái tổ hợp bởi kháng thể kháng TG2 đơn dòng của chuột, (a) mAB003, (b) mBB001, (c) mDC001, (d) mDD9001, (e) mDH001 và (f) mDD6001.

Fig 34: ELISA liên kết của các dạng kháng thể AB1 được làm cho giống như của người

Dịch nổi từ tế bào HEK293F đã được đồng chuyển nhiễm bằng các tổ hợp khác nhau của các vectơ chuỗi nhẹ của AB1 và chuỗi nặng của AB1 được làm cho giống như của người được thử nghiệm trong ELISA kháng IgG người để xác định nồng độ và trong ELISA kháng huTG2. Mỗi dịch nổi được thử nghiệm ba lần và IC₅₀ được xác định. Tổ hợp mạnh nhất được chọn cho nghiên cứu tiếp theo và dùng làm kháng thể được làm cho giống như của người tuyển chọn.

Fig. 35: Đường cong liên kết ELISA liều-đáp ứng và số liệu EC₅₀ đối với kháng thể liên kết với TG2 của người (a) các kháng thể dạng khảm cDD9001, cDH001, cDC001, kháng thể TG2 thương mại CUB7402 và đối chứng khớp isotyp, (b) kháng thể dạng khảm cBB001 và đối chứng khớp isotyp và (c) kháng thể dạng khảm cAB003 và đối chứng khớp isotyp.

Fig. 36: Đường cong liên kết ELISA liều-đáp ứng và số liệu EC₅₀ đối với kháng thể liên kết với TG2 của khi đầu chó (a) các kháng thể dạng khảm cDD9001, cDH001, cDC001, kháng thể TG2 thương mại CUB7402 và đối chứng khớp isotyp, (b) kháng thể dạng khảm cBB001 và đối chứng khớp isotyp và (c) kháng thể dạng khảm cAB003 và đối chứng khớp isotyp.

Fig. 37: Đường cong liên kết ELISA liều-đáp ứng và số liệu EC₅₀ đối với kháng thể liên kết với TG2 của người (a) các kháng thể được làm cho giống như của

người hBB001AA, HBB001BB, kháng thể TG2 thương mại CUB7402 và đối chứng khớp isotyp và (b) kháng thể được làm cho giống như của người hAB004.

Fig. 38. Đường cong liên kết ELISA liều-đáp ứng và số liệu EC50 đối với kháng thể liên kết với TG2 của khi đầu chó (a) các kháng thể được làm cho giống như của người hBB001AA, HBB001BB, kháng thể TG2 thương mại CUB7402 và đối chứng khớp isotyp và (b) kháng thể được làm cho giống như của người hAB004 và đối chứng khớp isotyp.

Fig. 39: Hoạt tính liên kết AB1 được làm cho giống như của người với TG2 ngoại bào

Sự ức chế hoạt tính TG2 ngoại bào do tế bào HK2 tạo ra được thử nghiệm bằng cách sử dụng ELISA đo mức độ hợp nhất biotin cadaverin vào fibronectin. Đường cong điển hình thể hiện sự ức chế hoạt tính TG2 bởi AB1 được làm cho giống như của người (hAB005) và IC thu được được thể hiện.

Fig. 40: Hoạt tính liên kết BB7 được làm cho giống như của người với TG2 ngoại bào

Sự ức chế hoạt tính TG2 ngoại bào do tế bào HK2 tạo ra được thử nghiệm bằng cách sử dụng ELISA đo mức độ hợp nhất biotin cadaverin vào fibronectin. Đường cong điển hình thể hiện sự ức chế hoạt tính TG2 bởi các dạng BB7 được làm cho giống như của người (hBB001AA và hBB001BB) và IC thu được được thể hiện.

Fig. 41: Các kết quả thử nghiệm trầy xước với đối chứng Cytochalasin D, R281 và ZDON và các kết quả thử nghiệm trầy xước với kháng thể thương mại CUB7402
Thử nghiệm về vết thương trầy xước được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào WI-38, sau khi cấy và sinh trưởng qua đêm, rửa tế bào bằng môi trường không có huyết thanh và tạo vết thương trầy xước bằng cách sử dụng Essen Wound Maker. Loại bỏ môi trường và thay bằng 95 ul/lỗ đối chứng chứa môi trường không có huyết thanh và kháng thể thử nghiệm. Đặt đĩa vào Essen Incycyte và phân tích sự khép vết thương bằng phần mềm Incucyte. Mật độ vết thương tương đối được vẽ

đồ thị theo thời gian đối với các đối chứng cytochalasin D, R281 và Z –Don (panen A) và kháng thể thương mại CUB7402 và cytochalasin (panen B).

Fig. 42: Các kết quả thử nghiệm trầy xước với BB7 được làm cho giống như của người

Thử nghiệm về vết thương trầy xước được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào WI-38, sau khi cấy và sinh trưởng qua đêm, rửa tế bào bằng môi trường không có huyết thanh và tạo vết thương trầy xước bằng cách sử dụng Essen Wound Maker. Loại bỏ môi trường và thay bằng 95 ul/lỗ đối chứng chứa môi trường không có huyết thanh và kháng thể thử nghiệm. Đặt đĩa vào Essen Incycyte và phân tích sự khép vết thương bằng phần mềm Incucyte. Mật độ vết thương tương đối được vẽ đồ thị theo thời gian đối với hBB001 AA được làm cho giống như của người và đối chứng cytochalasin D (panen A) và hBB001BB và đối chứng cytochalasin D (panen B).

Fig. 43: Các kết quả thử nghiệm trầy xước với AB1 được làm cho giống như của người

Thử nghiệm về vết thương trầy xước được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào WI-38, sau khi cấy và sinh trưởng qua đêm, rửa tế bào bằng môi trường không có huyết thanh và tạo vết thương trầy xước bằng cách sử dụng Essen Wound Maker. Loại bỏ môi trường và thay bằng 95 ul/lỗ đối chứng chứa môi trường không có huyết thanh và kháng thể thử nghiệm. Đặt đĩa vào Essen Incycyte và phân tích sự khép vết thương bằng phần mềm Incucyte. Mật độ vết thương tương đối được vẽ đồ thị theo thời gian đối với hAB005 được làm cho giống như của người và đối chứng cytochalasin D

Fig. 44: Các kết quả thử nghiệm trầy xước với DC1 dạng khảm

Thử nghiệm về vết thương trầy xước được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào WI-38, sau khi cấy và sinh trưởng qua đêm, rửa tế bào bằng môi trường không có huyết thanh và tạo vết thương trầy xước bằng cách sử dụng Essen Wound Maker. Loại bỏ môi trường và thay bằng 95 ul/lỗ đối chứng chứa môi trường không có

huyết thanh và kháng thể thử nghiệm. Đặt đĩa vào Essen Incycyte và phân tích sự khép vết thương bằng phần mềm Incucyte. Mật độ vết thương tương đối được vẽ đồ thị theo thời gian đối với kháng thể dạng khảm cDC001 và đối chứng cytochalasin D

Fig. 45: Sự liên kết TG2 của người với kháng thể cố định cAB003 phát hiện được bằng Biacore

Các pha tổ hợp tiêm TG2 của người lên cảm biến sinh học phủ cAB003 ở 25, 50, 100 và 200nM, bao gồm hai lần ở 50nM, được thể hiện ở bên trái. Từ thí nghiệm này, hai pha phân ly dài được thu gom, như được thể hiện ở bên phải. Đường khớp được thể hiện bằng các đường đen liền nét và kết quả được thể hiện trong Bảng 25.

Fig. 46: Sự liên kết TG2 của khí đầu chó với kháng thể cố định hAB004 phát hiện được bằng Biacore

Các pha tổ hợp tiêm TG2 của khí đầu chó lên cảm biến sinh học phủ hAB004 ở 25, 50, 100, 200 và 400nM, bao gồm hai lần ở 50nM, được thể hiện ở bên trái. Từ thí nghiệm này, hai pha phân ly dài được thu gom, như được thể hiện ở bên phải. Đường khớp được thể hiện bằng các đường đen liền nét và kết quả được thể hiện trong Bảng 26.

Fig. 47: Sự liên kết TG2 của người với kháng thể cố định cDH001 phát hiện được bằng Biacore khi không có canxi

Các pha tổ hợp tiêm TG2 của người lên cảm biến sinh học phủ cDH001 ở 25, 50, 100 và 200nM, bao gồm hai lần ở 50nM, được thể hiện ở bên trái. Từ thí nghiệm này, hai pha phân ly dài được thu gom, như được thể hiện ở bên phải. Đường khớp được thể hiện bằng các đường đen liền nét và kết quả được thể hiện trong Bảng 25.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với epitop trong vùng lõi của transglutaminaza typ 2 (TG2).

Được dự tính rằng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có thể liên kết chọn lọc với epitop trong vùng lõi của TG2 của người, TG2 của chuột cống, và/hoặc TG2 của chuột nhắt. TG2 có thể là TG2 của người.

Trình tự axit amin đầy đủ của TG2 của người, chuột cống và chuột nhắt có thể được tìm thấy trong ngân hàng gen với các số hiệu lưu giữ NM_004613, NM_019386.2 và NM_009373.3. Phân mã hóa của các trình tự này là như sau:

Trình tự nucleotit của TG2 của người:

```
atggccgaggagctggtcttagagaggtgtgatctggagctggagaccaatggccgagaccacca
cacggccgacctgtgccgggagaagctggtggtgcgacggggccagcccttctggctgacctgc
actttgagggccgcaactacgaggccagtgtagacagttcaccttcagtgtcgtgacgggcca
gcccctagccaggaggccgggaccaaggcccggttttccactaagagatgctgtggaggaggtga
ctggacagccaccgtggtggaccagcaagactgcacctctcgtgctgcagctcaccaccccgcca
acgcccccatcgccctgtatcgctcagcctggaggcctccactggctaccagggatccagcttt
gtgctggggccacttcattttgctcttcaacgcctggtgccagcggatgctgtgtacctggactc
ggaagaggagcggcaggagtagtgcctcaccagcagggcctttatctaccagggtcggccaagt
tcatcaagaacataccttggaattttgggcagtttgaagatgggatcctagacatctgcctgatc
cttctagatgtcaacccaagttcctgaagaacgcggccggtgactgctcccgccgcagcagccc
cgtctacgtggggccgggtggtgagtggtcatggtcaactgcaacgatgaccagggtgtgctgctgg
gacgctgggacaacaactacggggacggcgctcagccccatgtcctggatcggcagcgtggacatc
ctgcggcgctggaagaaccacggctgccagcgctcaagtatggccagtgtggttcttcgcccgc
cgtggcctgcacagtgtgaggtgcttgggcacccctaccgcgctcgtgaccaactacaactcgg
cccatgaccagaacagcaaccttctcatcgagtacttccgcaatgagtttggggagatccagggt
gacaagagcgagatgatctggaacttccactgctgggtggagtctggtgagtgaccaggccggacct
gcagccgggggtacgagggtgtggcaggccctggacccaacgccccaggagaagagcgaagggtgacgt
actgctgtggcccagttccagttcgtgccatcaaggaggcgacctgagcaccagtgatgctg
ccctttgtctttgcgagggtcaatgccgacgtggttagactggatccagcaggacgatgggtctgt
gcacaaatccatcaaccgttccctgatcgttgggtgaagatcagcactaagagcgtgggcccag
acgagcgggaggatatacccccacactacaaataccagaggggtcctcagaggagagggaggcc
ttcacaaggcggaaccacctgaacaaactggccgagaaggaggagacagggatggccatgcggat
ccgtgtgggcccagagcatgaacatgggcagtgactttgacgtctttgccacatcaccacaaca
ccgctgaggagtagctctgccgcctcctgctctgtgcccgcaccgtcagctacaatgggatcttg
gggcccagtggtggcaccaagtacctgctcaacctcaacctggagcctttctctgagaagagcgt
tctcttttgcatcctctatgagaaataccgtgactgccttacggagtccaacctcatcaagggtgc
gggcccctcctcgtggagccagttatcaacagctacctgctggctgagagggacctctacctggag
aatccagaaatcaagatccggatccttggggagcccaagcagaaacgcaagctggtggctgaggt
gtccctgcagaaccgctcctgtggccctggaaggctgcaccttactgtggagggggccggcc
tgactgaggagcagaagacgggtggagatccagaccccggtggaggcaggggaggaagttaagggtg
agaatggacctgctgccgtccacatgggcctccacaagctggtggtgaacttcgagagcgacaa
gctgaaggctgtgaagggttccggaatgtcatcattggccccgcctaa
```

Trình tự axit amin của TG2 của người:

```
MAEELVLERCDELETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWLTLHFEGRNYEASVDSLTF
VVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQQDCTLSLQLTTPANAPIGLYRLSLE
ASTGYQGSSFVLGHFILLFNAWCPADAVYLDSEERQEYVLTQQGFIYQGS AKFIKNI PW
NFGQFEDGILDICLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVSGMVNCDNDQGVLLGR
WDNNYGDGVSPMSWIGSVDILRRWKNHGCQVRKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN
```

YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPT
 PQEKSEGTCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQDDGSVHKSINRSL
 IVGLKISTKSVGRDEREDITHYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAMRIRVG
 QSMNMGSDFDVFAHITNNTAEYVCRLLLCARTVSYNGILGPECCTKYLLNLNLEPFSEK
 SVPLCILYKEYRDCLTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQK
 RKLVAEVSQNPLPVALEGCTFTVEGAGLTTEEQKTVEIPDPVEAGEEVKVRMDLLPLHMG
 LHKLVNPFESDKLKAVKGFNRNIIIGPA*

Trình tự nucleotit của TG2 của chuột cống:

Atggccgaggagctgaacctggagaggtgcatattggagatacaggccaatggccgtgatcacca
 cacggccgacctgtgccaaagagaaactgggtgctgcgccgaggccagcgcttccggctgacactgt
 acttcgagggccgtggctatgaggccagcggtggacagacttacatttgggtgcccgtgacgggcca
 gatcccagtgagaggcagggaccaaggcccgcttctcactgtctgacgatgtggaggagggatc
 ctggtcagcctctgtgctggaccaacaggacaatgtcctctcgctgcagctctgcacccagcca
 atgctcctgttggccagtaccgcctcagcctggagacttctactggctaccaaggctccagcttc
 atgctgggtcacttcatcctgctcttcaatgcctgggtgccagcggtgacgtgtacctagattc
 agaggcggagcgccgggaatacgtcctcacacagcagggcttcatctaccagggtctgtcaagt
 tcatcaagagtgtgccttggaaacttgggagcgttggaggatgggatcctggatgctgctgatg
 cttttggatgtgaacccaagttcctgaaggaccgtagccgggactgctcacgacgcagcagtc
 catctatgtgggcccgtgggtgagcggcatggtcaactgcaatgatgaccagggtgtgcttctgg
 gtcgctgggacaacaattatggggacggtatcagtcctatggcctggattggcagcgtggacatt
 ctgcgccgctggaaggaacacggctgtcagcaagtgaagtatggccagtgctgggtgtttgcggc
 ggtagcctgcacagtgtgctgcggtgccttggcatccctaccagagtgggtgaccaactacaactccg
 cccacgaccagaacagcaacctgctcatcgagtacttccgaaacgagtacggggagctggagagc
 aacaagagcgagatgatctggaatttccactgctgggtggagtccctggatgaccaggccagacct
 acagccaggctatgaggggtggcagggcattgacccccacaccgcaggagaagagcgaaggaaat
 actgttgtggcccagttctcagtgcgggccatcaaggagggtgacctgagcaccaagtatgatgcg
 tccttcgtgtttgccgaggtcaacgctgatgtggtggactggatccggcagtcagatgggtctgt
 gctcaaattccatcaacaattccctggctggtggggcagaagatcagcactaagagcgtgggcccgtg
 atgaccgggaggacatcacctatacctacaagtaccagaggggtccccagaggagaggggaagtc
 ttcaccagagccaaccacctgaacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggccatgcggat
 ccgagtgggggatggtatgagcttgggcaatgactttgacgtgtttgccacatcggcaacgaca
 cctcggagagccgtgagtgccgcctcctgctgtgcccgcactgtcagctacaacggcgtgctg
 gggcccagtggtggcactgaggacatcaacctgacctggatccctactctgagaacagcatccc
 ccttcgcacctctacgagaagtacagcgggtgctgacctgacagagtcacaaacctcatcaagggtgcggg
 gtctcctcgtcgagccagccgctaacagctacctgctggctgagagagatctctacctggagaat
 cctgaaatcaagatccggatcctgggggagcccaagcagaaccgcaaactggtggctgaggtgtc
 cctgaagaacccactttctgattccctgtatgactgtgtcttactgtggagggggctggcctga
 ccaaggaacagaagtctgtggaggtctcagaccctgtgcccagcaggagatgcgggtcaagggtgcgg
 gttgacctgttcccagctgatattggcctccacaagttgggtggtgaacttccagtggtgacaagct
 gaagtccgtcaagggttaccggaatatcatcatcgccccgcctaag

Trình tự axit amin của TG2 của chuột cống:

MAEELNLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRGQRFRLTYFEGRGYEASVDRLTFG
 AVTGPDPSSEEAGTKARFSLSDVEEGSWSASVLDQQDNVLSLQLCTPANAPVGQYRLSLE
 TSTGYQGSSFMLGHFILLFNAWCPADDVYLDSEAEERREYVLTQQGFYQGSVKFKISVPW
 NFGQFEDGILDACLMLLDVNPFLKDRSRDCSRSSPIYVGRVVSVMVNCNDDQGVLLGR
 WDNNGYDGI SPMAWIGSVDI LRRWKEHG CQVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN
 YNSAHDQNSNLLIEYFRNEYGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPT
 PQEKSEGTCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDASFVFAEVNADVVDWIRQSDGSVLKSINNSL
 VVGQKISTKSVGRDDREDITYTYKYPEGSPPEEREVFTRANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
 DGMSLGNDFDVFAHIGNDTSESRECRLLLCARTVSYNGVLGPECCTEDINLTLDPYSENS
 IPLRILYKEYSGCLTESNLIKVRGLLVEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQNR
 KLVAEVS LKNPLSDSLYDCVFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDAVKVRVDLFPTDIGL
 HKLVNPFQCDKLKSVKGYRNIIIGPA*X

Trình tự nucleotit của TG2 của chuột nhắt:

atggcagaggagctgctcctggagaggtgtgatttggagattcaggccaatggccgtgaccacca
cacggccgacctatgccaaagagaaactgggtgctgcgtcgtgggtcagcgcttcgggtgactctgt
acttcgagggccgtggctacgagggcagcgtggacagcctcacgttcgggtgctgtgaccggccca
gatcccagtgagagggcagggaccaaggcccgcttctcactgtctgacaatgtggaggagggatc
ttgggtcagcctcagtgctggaccaacaggacaatgtcctctcgctacagctctgcaccccagcca
atgctcctattggcctgtaccgtctcagcctagaggcttctactggctaccaggggtccagcttt
gtgctggggccacttcatcctgctctacaatgcctgggtgccagccgatgatgtgtacctagactc
agaggaggagcgacgggaatatgtccttacgcaacagggcttcatctaccaaggctctgtcaagt
tcatcaagagtgctgcttggaaactttgggcagttcgaggatggaatcctggatacctgcctgatg
ctcttgatatagaaccccaagttcctgaagaaccgtagtcgggactgctcacgcccagcagctcc
catctatgtgggcccgtgggtgagcgccatgggtcaactgcaatgatgaccaggggtgtgcttctgg
gccgctgggacaacaactatggggatgggtatcagtcctcctaccagagtggtgaccaactacaactccg
ctgcccgtggaaggaacacggctgtcagcaagtgaagtacgggcagtgctgggtgtttgcagc
gggtggcctgcacagtgctgcgggtgcctcggcatccctaccagagtggtgaccaactacaactccg
cccacgaccagaacagcaacctgctcatcgagtaacttccgaaatgagttcggggagctggagagc
aacaagagcgagatgatctggaacttccactgctgggtggagtcctggatgaccagggccagacct
acagccgggctatgaggggtggcaggccattgaccccacaccacaggagaagagcgaaggacat
actgttgtggccagctctcagtgcgagccatcaaggagggagacctgagtaccaagtatgatgca
cccttcgtgtttgccgaggtcaacgctgatgtggtggactggatccggcaggaagatgggtctgt
gctcaaatccatcaaccgttccttggctgctggggcagaagatcagcactaagagtggtggccgtg
atgaccgggaggacatcacccatacctacaagtacccagaggggtcacccgaggagaggggaagtc
ttaccaaggccaaccacctgaacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggccatgcgcat
ccgagtgggggacagtatgagcatgggcaacgacttcgacgtgtttgccacatcggcaacgaca
cctcggagactcgagagtgctcgtctcctgctctgtgcccgcactgtcagctacaacgggggtgctg
gggcccagagtggtggcactgaggacatcaacctgacctggatccctactctgagaacagcatccc
acttcgaatcctctacgagaagtacagcgggtgcctgacagagtcacacctcatcaaggtgcggg
gccttctcatcgaaccagctgccaacagctacctgctggctgagagagatctctacctggagaat
ccgaaatcaagatccgggtcctgggagaaccaagcaaaaccgcaaactggtggctgaggtgtc
cctgaagaaccactttccgatccctgtatgactgcattctactgtggagggggctggcctga
ccaaggagcagaagtctgtggaagtctcagacccgggtgccagcgggcgatttggtcaaggcacgg
gtcgacctgttcccgactgatattggcctccacaagctgggtggtgaacttccagtggtgacaagct
gaagtcggtgaaggggtaccggaatgttatcatcgccccggcctaa

Trình tự axit amin của TG2 của chuột nhắt:

MAEELLLERCDLLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRGQRFRLTLTFEGRGY
EASVDSLTFGAVTGPDPSEEAGTKARFSLSDNVEEGSWSASVLDQQDNVL
SLQLCTPANAPIGLYRLSLEASTGYQGSSFVLGHFILLYNWCPADDVYL
DSEEEERREYVLTQQGFYQGSVKFIKSVPNFQGFEDGILDTCMLLLDMN
PKFLKNRSRDCSRSSPIYVGRVVSAMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGIS
PMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYGQCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPG
YEGWQAIDPTPQEKSEGTGCCPVSVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNAD
VVDWIRQEDGSVLKSINRSLVVGQKISTKSVGRDDREDITHYKYPEGSP
EEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVGDSMSMGNDFDVFAHIGNDTS
ETRECRLLLCARTVSYNGVLGPECGTEDINLTDPYSENSIPLRIYKEY
SGCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRVLGEPKQNR
KLVAEVSLSKNPLSDPLYDCIFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDLVKAR
VDLFPTDIGLHKLNVNFQCDKLKSVKGYRNVIIIGPA

Các tác giả sáng chế đã tạo ra kháng thể kháng TG2 bằng cách gây miễn dịch cho chuột nhắt bằng protein tái tổ hợp chứa các axit amin 143 đến 473 của lõi

TG2 của người. Tế bào lai được sàng lọc về tính đặc hiệu với TG2 và ức chế bằng các đối tượng tuyển chọn thích hợp bất kỳ được nhân dòng đơn tính. IgG được tinh chế từ các dòng này để tính toán hiệu quả và epitop đích được lập bản đồ bằng cách sàng lọc ngân hàng TG2 của người bằng biểu hiện thể thực khuẩn.

Phương pháp theo sáng chế để sản xuất kháng thể kháng TG2 bằng cách sử dụng protein lõi TG2 tái tổ hợp là chưa được thử trước đó và ngạc nhiên là nó dẫn đến việc tách và xác định đặc điểm của kháng thể kháng TG2 có tính chọn lọc cao với TG2 và cho các đặc tính ức chế mạnh. Các nỗ lực trước đó để tạo ra kháng thể kháng TG2 đã dẫn đến việc tách các kháng thể hầu như không chọn lọc, chúng phản ứng chéo với các thành viên khác của họ transglutaminaza và do đó không thể đại diện cho các kháng thể triển vọng cho ứng dụng lâm sàng. Mặt khác, kháng thể theo sáng chế là các đối tượng tuyển chọn triển vọng cho các thử nghiệm lâm sàng đối với bệnh bị làm trầm trọng bởi hoặc qua trung gian hoạt tính TG2.

Ngạc nhiên là, phương pháp theo sáng chế dẫn đến việc sản xuất nhiều kháng thể hữu hiệu hơn so với các kháng thể được sản xuất trước đó. Trước đó không đảm bảo được rằng có thể tạo ra kháng thể là chất ức chế hữu hiệu TG2 bằng cách gây miễn dịch bằng vùng lõi. Như được chỉ ra trên đây, các kháng thể mà là các chất ức chế hữu hiệu không thể đủ đặc hiệu với TG2 được sử dụng hữu hiệu làm thuốc. Ngạc nhiên là, các kháng thể kháng các vùng khác nhau (cụ thể, các vùng của lõi mà khác nhau đôi chút giữa các thành viên TG2 khác nhau của họ transglutaminaza) là các chất ức chế TG2 hữu hiệu và chọn lọc.

Nói chung, các tác giả sáng chế cho rằng bằng cách tạo ra kháng thể kháng protein nhỏ hơn chỉ bao phủ lõi giữa, các tác giả sáng chế không những loại bỏ một số epitop miễn dịch đặc lợi có mặt trên protein có chiều dài đầy đủ mà còn thúc đẩy tấn công lõi. Điều này rõ ràng làm tăng nhiều loại kháng thể khả dụng cho việc chọn lọc và tạo ra mức độ bao phủ lõi rộng hơn.

Việc gây miễn dịch chỉ bằng lõi TG2 đã loại bỏ hầu như toàn bộ cấu trúc bậc ba của enzym (cụ thể là hai vùng thân beta ở đầu tận cùng carboxy). Có khả năng một số epitop ít khả dụng hơn hoặc ít gây miễn dịch hơn trong phân tử TG2 tự nhiên có chiều dài đầy đủ có thể là các epitop hấp dẫn hơn với lõi ở dạng được mô tả trong bản mô tả này. Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này nhận biết các epitop mạch thẳng (tức là liên kết với TG2 trên gel SDS PAGE khử), trong khi 80% kháng thể mà các tác giả sáng chế tách được trước đó bằng cách sử dụng TG2 có chiều dài đầy đủ làm chất gây miễn dịch là phụ thuộc vào cấu hình. Các tác giả sáng chế có thể chứng minh được rằng vùng lõi tái tổ hợp vẫn giữ được hoạt tính enzym, và do đó việc tách kháng thể ức chế tốt hơn là được trợ giúp nhờ việc bộc lộ các epitop ít thích hợp hơn trước đó được định vị trong hoặc gần vị trí hoạt động. Điều thú vị và ngạc nhiên là kháng thể ức chế kháng TG2 được tạo ra bằng cách gây miễn dịch bằng lõi với điều kiện protein lõi tái tổ hợp chưa chứng tỏ được các đặc tính gấp nếp giống như protein có chiều dài đầy đủ.

Lõi xúc tác của TG có tính bảo toàn cao giữa các thành viên của họ TG và giữa các loài. Điều này cho thấy rằng việc phát triển không chỉ các chất ức chế phân tử nhỏ đặc hiệu mà cả các chất ức chế trên cơ sở kháng thể có thể gặp thách thức về mặt kỹ thuật. Tuy nhiên, sáng chế đề xuất kháng thể có tính chọn lọc cao. Khả năng này phản ánh thực tế rằng có một số vùng trong vùng xúc tác của TG2 có tính không đồng nhất nhất định. Do đó, kháng thể theo sáng chế có thể khai thác các khác biệt nhỏ này. Tính chọn lọc đáng ngạc nhiên của kháng thể theo sáng chế có thể cho phép phát triển thuốc mà có thể gây nhiễu hữu hiệu hoạt tính TG2 và do đó đề xuất liệu pháp hữu hiệu đối với các tình trạng bệnh lý bị làm trầm trọng bởi hoặc gây ra do hoạt tính TG2 mà hiện nay chưa có lựa chọn điều trị thích hợp.

Lấy ví dụ so sánh, kháng thể được mô tả trong WO 2006/100679, được sản xuất bằng công nghệ tái tổ hợp từ các mẫu thu được từ ba bệnh nhân celiac trưởng thành có hiệu giá kháng thể kháng TG2 cao, được chứng minh là có hiệu quả thấp khi được các tác giả sáng chế thử nghiệm (Ví dụ 2). Kháng thể theo sáng chế là ưu việt hơn nhiều so với kháng thể của WO 2006/100679 về tính chọn lọc đối với

TG2 và về hoạt tính ức chế. Ví dụ, các tác giả sáng chế đã tạo ra đoạn Fab của kháng thể của WO 2006/100679, được sử dụng ở cùng nồng độ trong các thử nghiệm ức chế TG2 với kháng thể theo sáng chế trong thử nghiệm này. Lượng mol đoạn Fab cao gấp hai lần lượng kháng thể theo sáng chế, song vẫn không biểu hiện sự ức chế bất kỳ đối với hoạt tính TG2. Khi kháng thể có chiều dài đầy đủ của WO 2006/100679 được thử nghiệm ức chế trong thử nghiệm hợp nhất putresxin chuẩn, không phát hiện thấy sự ức chế hoạt tính TG2. Do đó, phương pháp theo sáng chế và kháng thể sản xuất được bằng phương pháp này là ưu việt so với phương pháp và kháng thể được mô tả trước đó.

Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm phân tử kháng thể hầu như nguyên vẹn, cũng như kháng thể dạng mảnh, kháng thể được làm cho giống như của người, kháng thể người (trong đó ít nhất một axit amin được đột biến so với kháng thể người có mặt tự nhiên), kháng thể chuỗi đơn, kháng thể hai đặc hiệu, chuỗi nặng kháng thể, chuỗi nhẹ kháng thể, dime cùng loại và dime khác loại của chuỗi nặng kháng thể và/hoặc chuỗi nhẹ kháng thể, và các đoạn liên kết với kháng nguyên và các dẫn xuất của chúng. Sáng chế còn bao gồm biến thể, thể dung hợp và dẫn xuất của kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó nằm trong nghĩa của các thuật ngữ “kháng thể” và “đoạn liên kết với kháng nguyên của nó”.

Thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm tất cả các lớp kháng thể, bao gồm IgG, IgA, IgM, IgD và IgE. Do đó, kháng thể có thể là phân tử IgG, như phân tử IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Tốt hơn, nếu kháng thể theo sáng chế là phân tử IgG, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, hoặc biến thể, thể dung hợp hoặc dẫn xuất của nó. Tốt hơn nữa, nếu kháng thể theo sáng chế là phân tử IgG2.

Kháng thể, dược phẩm, sử dụng và phương pháp theo sáng chế bao hàm biến thể, thể dung hợp và dẫn xuất của kháng thể đã được xác định và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, cũng như thể dung hợp của biến thể hoặc dẫn xuất nêu trên, với điều kiện biến thể, thể dung hợp và dẫn xuất này có tính đặc hiệu liên kết với TG2.

Kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều thành phần polypeptit, biến thể, thể dung hợp và dẫn xuất của kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên như được xác định trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp thao tác protein và gây đột biến định vị đã biết trong lĩnh vực này có sử dụng các polynucleotit tái tổ hợp (ví dụ, xem: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn).

Do đó, biến thể, thể dung hợp và dẫn xuất của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được xác định trong bản mô tả này, có thể được tạo ra trên cơ sở thành phần polypeptit của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó.

Thuật ngữ “dung hợp” bao gồm polypeptit dung hợp với polypeptit khác bất kỳ. Ví dụ, polypeptit này có thể được dung hợp với polypeptit như glutathion-S-transferaza (GST) hoặc protein A để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế polypeptit nêu trên. Ví dụ về các thể dung hợp như vậy được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ. Tương tự, polypeptit này có thể được dung hợp với đuôi oligo-histidin như His6 hoặc với epitop nhận biết được bởi kháng thể như epitop có đuôi Myc đã được biết rõ. Các thể dung hợp với biến thể hoặc dẫn xuất bất kỳ của polypeptit nêu trên cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Cần biết rằng thể dung hợp (hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của nó) mà vẫn giữ được các đặc tính mong muốn, như có tính đặc hiệu liên kết với TG2, là được ưu tiên.

Thể dung hợp có thể bao gồm hoặc gồm có phần khác tạo ra đặc tính mong muốn cho polypeptit nêu trên; ví dụ, phần này có thể hữu ích cho việc phát hiện hoặc tách polypeptit, hoặc thúc đẩy tế bào hấp thu polypeptit. Phần này có thể là, ví dụ, nhóm biotin, nhóm hoạt tính phóng xạ, nhóm phát huỳnh quang, ví dụ, nhóm huỳnh quang nhỏ hoặc nhóm huỳnh quang xanh (green fluorescent protein:

GFP), như được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ. Nhóm này có thể là đuôi gây miễn dịch, ví dụ, đuôi Myc, như được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ hoặc có thể là phân tử ưa lipid hoặc vùng polypeptit có khả năng thúc đẩy tế bào hấp thu polypeptit, như được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ.

Thuật ngữ “biến thể” của polypeptit nêu trên chỉ polypeptit trong đó ở một hoặc nhiều vị trí đã có các đoạn cải, mất và/hoặc thay thế axit amin, bảo toàn hoặc không bảo toàn, với điều kiện các thay đổi như vậy tạo ra protein mà các đặc tính cơ bản của nó, ví dụ, đặc tính liên kết, tính chịu nhiệt, hoạt tính ở giới hạn độ pH nhất định (tính chịu pH) không bị thay đổi một cách đáng kể. “Đáng kể” trong trường hợp này có nghĩa là chuyên gia trong lĩnh vực này có thể nói rằng các đặc tính của biến thể có thể vẫn khác biệt nhưng không rõ rệt so với các đặc tính của protein ban đầu. Do đó, sáng chế bao gồm các biến thể của polypeptit trong đó các thay đổi như vậy không làm biến đổi đáng kể hoạt tính của polypeptit nêu này. Cụ thể, sáng chế bao gồm các biến thể của polypeptit trong đó các thay đổi như vậy không làm biến đổi đáng kể tính đặc hiệu liên kết với TG2.

Thuật ngữ “các thay thế bảo toàn” là các tổ hợp dự tính như Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; và Phe, Tyr.

Các biến thể như vậy có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp thao tác protein và gây đột biến định vị.

Biến thể polypeptit có thể có trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất 75% với một hoặc nhiều trình tự axit amin nêu trong bản mô tả này, ví dụ, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với một hoặc nhiều trình tự axit amin nêu trong bản mô tả này.

Phần trăm tương đồng trình tự giữa hai polypeptit được tính bằng cách sử dụng các chương trình máy tính thích hợp, ví dụ, chương trình GAP của University of Wisconsin Genetic Computing Group và cần biết rằng phần trăm tương đồng

được tính là theo các polypeptit mà các trình tự của chúng đã được sắp hàng một cách tối ưu.

Theo cách khác, việc sắp hàng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình Clustal W (như được mô tả trong: Thompson *et al.*, 1994, *Nucl. Acid Res.* 22:4673-4680, được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn).

Các thông số được sử dụng có thể như sau:

- Các thông số sắp hàng từng cặp nhanh: kích thước bộ (tù) K; 1, kích thước cửa sổ; 5, điểm trừ khoảng trống; 3, số đường chéo nhiều nhất; 5. Phương pháp tính điểm: x phần trăm.
- Các thông số nhiều hàng: điểm trừ mở khoảng trống; 10, điểm trừ mở rộng khoảng trống; 0,05.
- Ma trận tính điểm: BLOSUM.

Theo cách khác, chương trình BESTFIT có thể được sử dụng để xác định các sự sắp hàng trình tự cục bộ.

Kháng thể, đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, thể dung hợp hoặc dẫn xuất dùng trong phương pháp hoặc ứng dụng theo sáng chế có thể chứa hoặc gồm có một hoặc nhiều axit amin đã được cải biến hoặc tạo dẫn xuất.

Các dẫn xuất hóa học của một hoặc nhiều axit amin có thể được tạo ra bằng cách cho phản ứng với nhóm chức bên. Các phân tử dẫn xuất này bao gồm, ví dụ, các phân tử dẫn xuất trong đó các nhóm amino tự do đã được tạo dẫn xuất để tạo ra amin hydroclorua, nhóm *p*-toluen sulphonyl, nhóm carboxybenzoxy, nhóm *t*-butyloxycarbonyl, nhóm cloaxetyl hoặc nhóm formyl. Các nhóm carboxyl tự do được tạo dẫn xuất để tạo ra muối, các metyl và etyl este hoặc các loại este và hydrazit khác. Các nhóm hydroxyl tự do có thể được tạo dẫn xuất để tạo ra các dẫn xuất O-axyl hoặc O-alkyl. Cũng được bao gồm dưới dạng dẫn xuất hóa học là các peptit chứa các dẫn xuất axit amin có mặt tự nhiên của 20 axit amin chuẩn. Ví dụ:

4-hydroxyprolin có thể được thay thế cho prolin; 5-hydroxylysin có thể được thay thế cho lysin; 3-methylhistidin có thể được thay thế cho histidin; homoserin có thể được thay thế cho serin và ornithin cho lysin. Dẫn xuất còn bao gồm peptit chứa một hoặc nhiều đoạn thêm hoặc mất miễn là hoạt tính cần có được duy trì. Các cải biến được bao gồm khác là amit hóa, axyl hóa đầu tận cùng amino (ví dụ, axetyl hóa hoặc amit hóa axit thioglycolic), carboxylamit hóa đầu tận cùng (ví dụ, bằng amoniac hoặc metylamin), và các cải biến đầu tận cùng tương tự.

Chuyên gia trong lĩnh vực này cũng biết rằng các hợp chất mô phỏng peptit cũng có thể là hữu ích. Do đó, thuật ngữ 'polypeptit' bao gồm các hợp chất mô phỏng peptit mà có khả năng liên kết với epitop trong vùng lõi của TG2. Thuật ngữ 'mô phỏng peptit' chỉ hợp chất mô phỏng cấu hình và các đặc tính mong muốn của peptit cụ thể làm tác nhân điều trị.

Ví dụ, polypeptit nêu trên bao gồm không chỉ các phân tử trong đó các gốc axit amin được nối với nhau bằng các liên kết peptit ($-\text{CO}-\text{NH}-$) mà cả các phân tử trong đó liên kết peptit là ngược. Các chất mô phỏng peptit đảo-ngược này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như các phương pháp được mô tả trong: Meziere *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237, được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Phương pháp này bao gồm việc tạo ra các chất giả peptit chứa các thay đổi liên quan đến khung chính, và không làm thay đổi hướng của mạch bên. Các peptit đảo-ngược, chứa liên kết $\text{NH}-\text{CO}$ thay vì liên kết peptit $\text{CO}-\text{NH}$, chịu được quá trình phân hủy protein cao hơn nhiều. Theo cách khác, polypeptit này có thể là hợp chất mô phỏng peptit trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được liên kết với nhau bằng liên kết $-\gamma(\text{CH}_2\text{NH})-$ thay cho liên kết amit thông thường.

Theo phương án khác, liên kết peptit có thể được phân phối một cách đầy đủ với điều kiện gốc liên kết thích hợp mà vẫn giữ được khoảng cách giữa các nguyên tử cacbon của các gốc axit amin được sử dụng, có lợi nếu gốc liên kết này

có phân bố điện tích hầu như tương tự và độ phẳng hầu như tương tự với liên kết peptit thông thường.

Cần biết rằng polypeptit nêu trên có thể được phong bế một cách thích hợp ở đầu tận cùng N hoặc C nhằm làm giảm khả năng bị cắt ở đầu protein.

Nhiều loại axit amin không được mã hóa hoặc được cải biến như D-axit amin và N-metyl axit amin đã được sử dụng để cải biến các peptit của động vật có vú. Ngoài ra, cấu hình có hoạt tính sinh học giả định có thể được làm ổn định nhờ cải biến cộng hóa trị, như vòng hóa hoặc đưa vào lactam hoặc các loại cầu nối khác, ví dụ, xem: Veber *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2636 and Thursell *et al.*, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111:166, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Chủ đề chung của nhiều chiến lược tổng hợp là đưa nhóm vòng nhất định vào khung trên cơ sở peptit. Nhóm vòng này giới hạn không gian cấu hình của cấu trúc peptit và điều này dẫn đến làm gia tăng tính đặc hiệu của peptit với thụ thể sinh học cụ thể. Một ưu điểm khác của chiến lược này là ở chỗ việc đưa nhóm vòng vào peptit có thể còn tạo ra peptit có độ nhạy với các peptidaza của tế bào giảm.

Do đó, các polypeptit được lấy làm ví dụ mà hữu ích trong phương pháp và ứng dụng theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có các đầu tận cùng xystein đầu tận cùng. Polypeptit như vậy có thể tồn tại dưới dạng vòng heterodetic nhờ sự tạo liên kết disulphua của các nhóm mercaptit trong các axit amin xystein đầu tận cùng hoặc dưới dạng homodetic nhờ sự tạo liên kết peptit amit giữa các axit amin đầu tận cùng. Như được chỉ ra trên đây, việc vòng hóa các peptit nhờ các liên kết disulphua hoặc amit giữa các xystein đầu tận cùng N và C có thể giải quyết được các vấn đề về tính đặc hiệu và thời gian bán hủy đôi khi quan sát được với các peptit mạch thẳng, bằng cách làm giảm quá trình phân hủy protein cũng như gia tăng độ bền của cấu trúc mà có thể thu được hợp chất có tính đặc hiệu cao hơn.

Polypeptit đóng vòng bằng các liên kết disulphua có đầu tận cùng carboxy và không có amino mà vẫn có thể dễ bị thoái hóa do thủy phân protein, trong khi các peptit đóng vòng bằng cách tạo thành liên kết amit giữa amin đầu tận cùng N và carboxyl đầu tận cùng C và do đó không chứa đầu tận cùng carboxy hoặc không có amino nữa. Do đó, các peptit có thể được liên kết bằng liên kết C-N hoặc liên kết disulphua.

Sáng chế không bị giới hạn theo cách bất kỳ bởi phương pháp vòng hóa peptit, song bao hàm các peptit có cấu trúc vòng có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp thích hợp bất kỳ. Do đó, các liên kết heterodetic có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc tạo ra nhờ các liên kết cầu disulphua, alkylen hoặc sulphua. Phương pháp tổng hợp peptit homodetic vòng và peptit heterodetic vòng, bao gồm các liên kết cầu disulphua, sulphua và alkylen, được bộc lộ trong US 5,643,872, được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Các ví dụ khác về phương pháp vòng hóa được bàn luận và bộc lộ trong US 6,008,058, được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Phương pháp khác để tổng hợp các hợp chất mô phỏng peptit vòng ổn định là chuyển vị đóng vòng (ring-closing metathesis: RCM). Phương pháp này bao gồm các bước tổng hợp tiền chất peptit và cho nó tiếp xúc với chất xúc tác RCM để tạo ra peptit có cấu hình giới hạn. Các tiền chất peptit thích hợp có thể chứa hai hoặc nhiều liên kết C-C không no. Phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptit pha rắn. Theo phương án này, tiền chất, được neo vào giá thể rắn, được tiếp xúc với chất xúc tác RCM và tiếp theo sản phẩm được cắt ra khỏi giá thể rắn để tạo ra peptit có cấu hình giới hạn.

Phương pháp khác, được bộc lộ bởi D. H. Rich in *Protease Inhibitors*, Barrett and Selveson, eds., Elsevier (1986), được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn, là thiết kế chất mô phỏng peptit nhờ ứng dụng khái niệm tương tự trạng thái chuyển vị trong thiết kế chất ức chế enzym. Ví dụ, biết rằng rượu bậc hai của

stalin mô phỏng trạng thái chuyển vị tứ diện của liên kết amit cắt được của cơ chất pepsin.

Nói tóm lại, các cải biến đầu tận cùng là hữu ích, như đã được biết rõ, để làm giảm khả năng nhạy với sự cắt bởi proteinaza và do đó kéo dài thời gian bán hủy của peptit trong dung dịch, đặc biệt là trong dịch sinh học nơi mà các proteaza có thể có mặt. Việc vòng hóa polypeptit cũng là cải biến hữu ích do các cấu trúc ổn định được tạo ra bởi việc vòng hóa và về hoạt tính sinh học quan sát thấy đối với các peptit vòng.

Do đó, theo một phương án, polypeptit nêu trên là dạng vòng. Tuy nhiên, theo phương án khác, polypeptit nêu trên là mạch thẳng.

Thuật ngữ “liên kết chọn lọc với epitop trong vùng lõi của TG2” nghĩa là kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có khả năng liên kết với epitop trong vùng lõi của TG2 một cách chọn lọc. Thuật ngữ “có khả năng liên kết chọn lọc” bao gồm các gốc liên kết được tạo ra từ kháng thể như vậy mà liên kết với lõi của TG2 mạnh gấp ít nhất 10 lần hoặc cao hơn so với các protein khác; ví dụ, ít nhất 50 lần hoặc cao hơn, hoặc ít nhất 100 lần hoặc cao hơn. Gốc liên kết này có khả năng liên kết chọn lọc với epitop trong lõi của TG2 trong điều kiện sinh lý, *ví dụ, in vivo*.

Tính đặc hiệu liên kết như vậy có thể xác định được bằng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này, như thử nghiệm chất hấp phụ gắn enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), hóa mô miễn dịch, kết tủa miễn dịch, thẩm tách protein và bào kế dòng chảy bằng cách sử dụng tế bào chuyển nhiễm biểu hiện TG2 hoặc lõi của TG2, hoặc đoạn của nó. Các phương pháp thích hợp để đo độ mạnh liên kết tương đối bao gồm thử nghiệm miễn dịch, ví dụ, trong đó gốc liên kết là kháng thể (xem Harlow & Lane, “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn). Theo cách khác, sự liên kết có thể được đánh giá bằng

cách sử dụng thử nghiệm cạnh tranh hoặc sử dụng phân tích Biacore® (Biacore International AB, Sweden).

Tốt hơn, nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế chỉ liên kết với TG2.

Chuyên gia trong lĩnh vực này biết rằng tính đặc hiệu liên kết của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được tạo ra bởi sự có mặt của các vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR) trong các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cấu trúc. Như được bàn luận dưới đây, theo phương án được đặc biệt ưu tiên về kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được xác định trong bản mô tả này, tính đặc hiệu liên kết với TG2 được tạo ra bởi sự có mặt của một hoặc nhiều CDR nhận dạng được. Ví dụ, các trình tự mà có thể bao gồm hoặc gồm có các trình tự CDR của AB-1 VL và VH bao gồm KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG và LISLY. Trong ví dụ khác, các trình tự mà có thể bao gồm hoặc gồm có các trình tự CDR của BB-7 VL và VH bao gồm KASQDINSYLT, LTNRLMD, LQYVDFPYT, SSAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG và LISPY. Các trình tự mà có thể bao gồm hoặc gồm có các trình tự CDR của DC-1 VL và VH bao gồm KASQDINSYLT, LVNRLVD, LQYDDFPYT, THAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG và LISTY. Tốt hơn, nếu kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được xác định trong bản mô tả này bao gồm hoặc gồm có các trình tự CDR, hoặc CDR và các trình tự liền kề hai bên, như được xác định trong Bảng 24A. Tốt nhất, nếu kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được xác định trong bản mô tả này bao gồm hoặc gồm có các trình tự CDR, hoặc CDR và các trình tự liền kề hai bên, của kháng thể được lấy làm ví dụ AB-1, hoặc BB-7, hoặc DC-1 (như được xác định, ví dụ, trong Bảng 24A).

Tốt hơn, nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó vẫn giữ được tính đặc hiệu liên kết với TG2 của kháng thể ban đầu. Thuật ngữ “vẫn giữ

được tính đặc hiệu liên kết” có nghĩa là kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có khả năng cạnh tranh liên kết với TG2 với các kháng thể được lấy làm ví dụ theo sáng chế, ví dụ, AB-1, AG-1, AG-9, AH-1, AH-3, BB-7, DC-1, EH-6, JE-12, IA-12, DF-4, DH-2, DD-6 và/hoặc DD-9 (xem phần ví dụ thực hiện sáng chế). Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể liên kết với cùng epitop trên TG2 là kháng thể chứa các trình tự sau: KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG, và LISLY.

Thuật ngữ “epitop” chỉ vị trí của phân tử mà kháng thể sẽ liên kết, tức là vùng phân tử của kháng nguyên. Epitop có thể là epitop mạch thẳng, được xác định bởi, ví dụ, trình tự axit amin, tức là cấu trúc bậc hai, hoặc epitop ba chiều, được xác định bởi cấu trúc bậc hai, ví dụ, sự gấp nếp của chuỗi peptit thành tấm beta hoặc chuỗi xoắn alpha, hoặc bởi cấu trúc bậc ba, ví dụ, cách chuỗi xoắn hoặc tấm gấp nếp hoặc sắp xếp để tạo ra cấu trúc bậc ba của kháng nguyên.

Các phương pháp xác định kháng thể thử nghiệm có khả năng cạnh tranh liên kết với kháng thể thứ cấp là đã được biết rõ trong lĩnh vực này (như, ví dụ, kỹ thuật ELISA-kẹp hoặc ELISA-kẹp đảo) và được mô tả, ví dụ, trong *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow & Lane (1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2), được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, với tính đặc hiệu liên kết với epitop trong vùng lõi của TG2 cũng có thể vẫn giữ được một hoặc nhiều đặc tính sinh học tương tự kháng thể ban đầu (như các kháng thể được lấy làm ví dụ nêu trong phần ví dụ thực hiện sáng chế).

Như được giải thích trên đây, TG2 là protein đa chức năng phụ thuộc vào canxi, nó xúc tác cho quá trình tạo các liên kết Nε-(γ -glutamyl)lysin isopeptit giữa các gốc lysin và glutamin. TG2 bao gồm vùng kẹp beta đầu tận cùng N chứa các vị trí liên kết (ví dụ, fibronectin) và các trình tự cần để xuất enzym. Vùng này liên kết với vùng lõi xúc tác. Trung tâm vùng này là bộ ba xúc tác gồm có Cys 277, Asp

358 và His 355, cộng với một số vị trí liên kết với canxi giả định. Vùng này liên kết với vùng thứ ba, thân beta 1 trong đó các gốc của vị trí liên kết với GTP vận chuyển enzym này nhờ hoạt tính GTPaza. Thân beta 1 còn chứa vị trí liên kết với integrin dùng trong quá trình dính bám tế bào. Thân beta 1 cùng với vùng TG2 thứ tự, thân beta 2, liên quan đến sự thay đổi cấu hình trong TG2 cần cho việc hoạt hóa của nó. Trong môi trường canxi cao, GTP thấp, thân beta 1 và 2 chuyển ra khỏi dạng bất hoạt đóng và gấp nếp để vận chuyển TG2 với cấu trúc mạch thẳng để lộ ra lõi xúc tác cho phép hoạt hóa (Pinkas *et al* (2007) *PLoS Biol.* Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. 5(12): e327).

Thuật ngữ “vùng lõi của transglutaminaza typ 2 (TG2)” bao gồm vùng TG2 chứa bộ ba xúc tác nêu trên, ngoại trừ vùng kẹp beta và các thân beta 1 và 2. Tốt hơn, nếu vùng lõi bao gồm hoặc gồm có các axit amin 143 đến 473 của TG2 của người, hoặc đoạn của nó.

Các axit amin 143 đến 473 của TG2 của người gồm có trình tự sau:

CPADAVYLDSEERQ EYVLTQQGFIYQGS AKFIKNIPWNFGQFEDGILDICLILLDVNPK
FLKNAGRDCSRSSPVYVGRVSGMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGVSPMSWIGSVDILR
RWKNHGCQRVKYQGCWVF AAVACTVLRCLGIPTRVVTNYNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGE
IQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGTYCCGPVPVRAIKEG
DLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDG SVHKSINRSLIVGLKISTKSVGRDEREDITH
TKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGM

Do đó, vùng lõi có thể gồm có các axit amin 143 đến 473 của TG2 của người. Do đó, epitop của kháng thể có thể là epitop bất kỳ trong vùng được xác định bởi các axit amin 143 đến 473 của TG2 của người. Do đó, epitop có thể là đoạn của trình tự này hoặc nó có thể được tạo ra bởi các gốc axit amin khác nhau trong đoạn này mà có thể không liên kế nhau trong cấu trúc axit amin bậc một song nằm cùng nhau trong cấu trúc bậc hai, bậc ba hoặc thậm chí bậc bốn của protein, như được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể liên kết chọn lọc với toàn bộ hoặc một phần vùng chứa các axit amin 304 đến 326 của TG2 của người. Vùng này (các axit amin 304 đến 326 của TG2 của người) chỉ Nhóm 1 trên Fig. 5 và bao gồm trình tự axit amin AHDQNSNLLIEYFRNEFGGEIQGD.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể liên kết chọn lọc với toàn bộ hoặc một phần vùng chứa các axit amin 351 đến 365 của TG2 của người. Vùng này (các axit amin 351 đến 365 của TG2 của người) chỉ Nhóm 2 trên Fig. 5 và bao gồm trình tự axit amin YEGWQALDPTPQEKs.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể liên kết chọn lọc với toàn bộ hoặc một phần vùng chứa các axit amin 450 đến 467 của TG2 của người. Vùng này (các axit amin 450 đến 467 của TG2 của người) chỉ Nhóm 3 trên Fig. 5 và bao gồm trình tự axit amin SEEREAFTTRANHLNKLAE.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó ức chế hoạt tính TG2 của người.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

KASQDINSYLT; và/hoặc

RTNRLFD; và/hoặc

LQYDDFPYT; và/hoặc

SSAMS; và/hoặc

TISVGGGKTYYPDSVKG; và/hoặc

LISLY.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

TCKASQDINSYLTWF; và/hoặc

TLIYRTNRLFDGVP hoặc TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF;
 và/hoặc
 YCLQYDDFPYTFG; và/hoặc
 FTLSSSAMS WVR hoặc CXAXXFTLSSSAMS WVR; và/hoặc
 WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR hoặc
 WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR XNXXXXXL; và/hoặc
 YCAKLISLYWG, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Các trình tự nêu ngay trên được xem xét để chứa các vùng quyết định tính
 hỗ trợ của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được lấy
 làm ví dụ AB-1 (xem Ví dụ 1) và các biến thể được làm cho giống như của người
 đặc hiệu nhất định của kháng thể AB-1. Kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm
 trình tự axit amin

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
 FXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT; hoặc
 KASQDINSYLTXX
 XF; hoặc RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; hoặc
 FXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm trình
 tự axit amin TCKASQDINSYLTWF hoặc TCKASQDINSYLTWY; và/hoặc
 LLIYRTNRLFDGVP hoặc SLIYRTNRLFDGVP hoặc
 LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF hoặc
 SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; và/hoặc
 YCLQYDDFPYTFG; và/hoặc
 FTFSSSAMS WVR hoặc CXAXXFTFSSSAMS WVR; và/hoặc
 WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR hoặc
 WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR XNXXXXXL; và/hoặc
 YCAKLISLYWG, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các trình tự sau: KASQDINSYLT; và RTNRLFD; và LQYDDFPYT và ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các trình tự sau: SSAMS; và TISVGGGKTYYPDSVKG; và LISLY.

Theo một phương án theo sáng chế kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
KLEIK hoặc

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
KLEIK. Các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ này tương ứng với các vùng được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ AB-1 (Fig. 7 và Fig. 18).

Theo cách khác, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin:

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
EIK (AB-1_VK) hoặc

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
KLEIK (AB-1_VK1).

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin:

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGT
KL

EIK (hAB-1_RKE); hoặc

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFAQKPGKAPKSLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGQTKV

EIK (hAB-1_RKJ). Các trình tự này là các biến thể được làm cho giống như của người của các trình tự chuỗi nhẹ của AB-1 nêu trên.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLIEWVAT
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLI
SLYWGQGTTTLTVSS hoặc

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLIEWVAT
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLI
SLYWGQGTTTLTVSS. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng này tương ứng với các vùng biến đổi được tìm thấy trong kháng thể lấy làm ví dụ AB-1 (Fig. 7 và 18).

Theo cách khác, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin:

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLIEWVAT
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLI
SLYWGQGTTTLTVSS (AB-1_VH).

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVST
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLIS
LYWGQGTLLTVSS (hAB-1_RHA). Trình tự này là biến thể được làm cho giống như của người của trình tự chuỗi nặng AB-1 nêu trên.

Do đó, dự tính rằng theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có:

i) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
KLEIK hoặc

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
KLEIK, hoặc

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKL
EIK (AB-1_VK), hoặc

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
KLEIK (AB-1_VK1), hoặc

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGTKL
EIK (hAB-1_RKE), hoặc

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKV
EIK (hAB-1_RKJ); và

ii) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS WVRQTPDRRLEWVAT
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRSED TAMYYCAKLI
SLYWGQGTTTLTVSS hoặc

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS WVRQTPDRRLEWVAT
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRSED TAMYYCAKLI
SLYWGQGTTTLTVSS, hoặc

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS WVRQTPDRRLEWVAT
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRSED TAMYYCAKLI
SLYWGQGTTTLTVSS (AB-1_VH), hoặc

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVST
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLIS
LYWGQGTLVTVSS (hAB-1_RHA).

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

KASQDINSYLT; và/hoặc

LTNRLMD; và/hoặc

LQYVDFPYT; và/hoặc

SSAMS; và/hoặc

TISSGGRSTYYPDSVKG; và/hoặc

LISPY.

Các trình tự nêu trên được xem xét để chứa các vùng quyết định tính hỗ trợ của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được lấy làm ví dụ BB-7 (xem Fig. 19). Kháng thể có thể bao gồm trình tự axit amin

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXLTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXXXF
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYVDFPYT; hoặc

KASQDINSYLTXXX
F; hoặc LTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; hoặc

FXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYVDFPYT, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các trình tự sau: KASQDINSYLT; và LTNRLMD; và LQYVDFPYT và ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các trình tự sau: SSAMS; và TISSGGRSTYYPDSVKG; và LISPY.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTN
RLMDGVPSRFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGK
LEIK. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ này tương ứng với vùng biến đổi của chuỗi
nhẹ được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ BB-7 (Fig. 19).

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng
nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự
axit amin

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIFSSSWVRQTPEKRLEWVATI
SSGGRSTYYPDVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSDDTAIYYCAKLISP
YWGQGTTLTVSS. Vùng biến đổi của chuỗi nặng này tương ứng với vùng biến
đổi của chuỗi nặng được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ BB-7 (Fig.
19).

Do đó, dự tính rằng theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn
liên kết với kháng nguyên của nó có thể có:

i) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin
AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTN
RLMDGVPSRFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGK
LEIK; và

ii) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin
AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIFSSSWVRQTPEKRLEWVATI
SSGGRSTYYPDVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSDDTAIYYCAKLISP
YWGQGTTLTVSS.

Cũng bao hàm rằng theo một phương án theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế,
kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có:

i) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLTN
RLMDGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGGGK
VEIK hoặc

DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFFQKPGKAPKTLIYLTN
RLMDGVPSRFSGSGSGQEFLLLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTK
VEIK; và/hoặc

ii) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVST
ISSGGRSTYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLIS
PYWGQGTLVTVSS hoặc
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVATI
SSGGRSTYYPD SVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISP
YWGQGTLVTVSS. Các trình tự này tương ứng với các biến thể được làm cho
giống như của người của kháng thể BB-7 (xem các Bảng 23, 24 và 24A).

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có
thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

KASQDINSYLT; và/hoặc

LVNRLVD; và/hoặc

LQYDDFPYT và/hoặc

THAMS; và/hoặc

TISSGGRSTYYPD SVKG; và/hoặc

LISTY.

Các trình tự nêu trên được xem xét để chứa các vùng quyết định tính hỗ trợ
của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được lấy làm ví
dụ DC-1 (xem Fig. 20). Kháng thể có thể bao gồm trình tự axit amin

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXX LVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX LQYDDFPYT hoặc

KASQDINSYLTXXX
XA; hoặc LVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXXXA; hoặc
AXXXXXXXXXXXXXXXXXX LQYDDFPYT, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các trình tự sau: KASQDINSYLT; và LVNRLVD; và LQYDDFPYT, và ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các trình tự sau: THAMS; và TISSGGRSTYYPDSVKG; và LISTY.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin

DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNR
LVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKL
EIK. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ này tương ứng với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ DC-1 (Fig. 20).

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWVRQTPEKRLEWVA
TISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNLTLQLSSLRSEDVAVYFCARLIS
TYWGQGTTLTVSS. Vùng biến đổi của chuỗi nặng này tương ứng với vùng biến đổi của chuỗi nặng được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ DC-1 (Fig. 20).

Do đó, dự tính rằng theo một phương của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có:

i) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin
DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNR
LVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKL
EIK; và

ii) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWVRQTPEKRLEWVA

TISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLSSLRSED TAVYFCARLIS
TYWGQGTTLTVS.

Cũng bao hàm rằng theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có:

i) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLV
NRLVDGVPSRFSGSGSGTDDFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGT
KVEIK hoặc

DITMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVN
RLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTK
VEIK; và/hoặc

ii) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMS WVRQAPGKGLEWVS
TISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI
STYWGQGTLVTVSS hoặc

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMS WVRQAPGKGLEWVA
TISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLIS
TYWGQGTLVTVSS. Các trình tự này tương ứng với các biến thể được làm cho giống như của người của DC-1 nêu trong các Bảng 23, 24 và 24A.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

KASQDINSYLT; và/hoặc

XXNRLXD; và/hoặc

LQYXDFPYT; và/hoặc

XXAMS; và/hoặc

TISXGGXXTYYPDSVKG; và/hoặc

LISXY, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

(K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); và/hoặc
 (R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); và/hoặc
 (L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; và/hoặc
 (S/T)(S/H/Y)AMS; và/hoặc
 (T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYY(P/A)DSVKG; và/hoặc
 (L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin
 QIVLTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTS
 NLASGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGT
 KLELK. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ này tương ứng với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ DD-9 (Fig. 25).

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin
 QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAH
 IYWDDDKRYNPSLKSRTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTT
 APFAFWGQGTLVTVSA. Vùng biến đổi của chuỗi nặng này tương ứng với vùng biến đổi của chuỗi nặng được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ DD-9 (Fig. 25).

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có:

i) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin
 QIVLTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTS
 NLASGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGT
 KLELK; và

ii) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAH
IYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTT
APFAFWGQGTLVTVSA.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin

QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTS
NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTK
LELK. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ này tương ứng với vùng biến đổi của chuỗi
nhẹ được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ DH-2 (Fig. 26).

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAH
IYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTT
APFAYWGQGTLVTVSA. Vùng biến đổi của chuỗi nặng này tương ứng với vùng
biến đổi của chuỗi nặng được tìm thấy trong kháng thể được lấy làm ví dụ DH-2
(Fig. 26).

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có:

i) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin

QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTS
NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTK
LELK; và

ii) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAH
IYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTT
APFAYWGQGTLVTVSA.

Do đó, dự tính rằng, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có:

i) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin tương ứng với trình tự VK bất kỳ nêu trong Fig bất kỳ từ Fig. 18 đến Fig. 28; và/hoặc

ii) ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin tương ứng với trình tự VH bất kỳ nêu trong Fig bất kỳ từ Fig. 18 đến Fig. 28 hoặc đoạn, biến thể hoặc dẫn xuất của nó.

Như được chỉ ra trên đây, dự tính rằng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo các phương án nêu trên có thể bao gồm trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất 75% với một hoặc nhiều trình tự axit amin nêu trên, ví dụ, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với một hoặc nhiều trình tự axit amin nêu trên. Cũng bao hàm rằng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên có thể bao gồm tới 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều hơn đoạn cài, mất, thay thế bảo toàn và/hoặc thay thế không bảo toàn.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

KASQDINSYLT; và/hoặc

XXNRLXD; và/hoặc

LQYXDFFPYT; và/hoặc

XXAMS; và/hoặc

TISXGGXXTYYPDSVKG; và/hoặc

LISXY, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

(K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); và/hoặc

(R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); và/hoặc

(L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; và/hoặc

(S/T)(S/H/Y)AMS; và/hoặc

(T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYYP(P/A)DSVKG; và/hoặc

(L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

KASQDINSYLT; và/hoặc

RTNRLFD; và/hoặc

LQYDDFPYT; và/hoặc

SSAMS; và/hoặc

TISVGGGKTYYPDSVKG; và/hoặc

LISLY.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit amin sau:

TCKASQDINSYLTWF; và/hoặc

TLIYRTNRLFDGVP hoặc TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF;

và/hoặc

YCLQYDDFPYTFG; và/hoặc

FTLSSSAMS WVR hoặc CXAXXFTLSSSAMS WVR; và/hoặc

WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR hoặc

WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRXNXXXXXL; và/hoặc

YCAKLISLYWG, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Các trình tự nêu trên được xem xét để chứa các vùng quyết định tính hỗ trợ của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được lấy làm ví dụ AB-1.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm trình tự axit amin

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXX

FXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT; hoặc
 KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
 XF; hoặc RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; hoặc
 FXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Theo phương án khác, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm trình tự axit amin TCKASQDINSYLTWF hoặc TCKASQDINSYLTWY; và/hoặc LLIYRTNRLFDGVP hoặc SLIYRTNRLFDGVP hoặc LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF hoặc SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; và/hoặc YCLQYDDFPYTFG; và/hoặc FTFSSSAMS WVR hoặc CXAXXFTFSSSAMS WVR; và/hoặc WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR hoặc WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRXNXXXXL; và/hoặc YCAKLISLYWG, trong đó X là axit amin bất kỳ.

Do đó, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các CDR sau: KASQDINSYLT; và RTNRLFD; và LQYDDFPYT và ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các CDR sau: SSAMS; và TISVGGGKTYYPDSVKG; và LISLY.

Theo phương án khác, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh thứ hai có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
 NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
 KLEIK hoặc
 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
 NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
 KLEIK, hoặc

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTN
 RLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKL
 EIK (AB-1_VK), hoặc

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRT
 NRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGT
 KLEIK (AB-1_VK1), hoặc

EIVLTQSPSSLASVGDRTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTN
 RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFGTYYYCLQYDDFPYTFGGGTKL
 EIK (hAB-1_RKE), hoặc

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTN
 RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKV
 EIK (hAB-1_RKJ).

Theo phương án khác nữa theo khía cạnh thứ hai, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS WVRQTPDRRLEWVAT
 ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRSED TAMYYCAKLI
 SLYWGQGTTLTVSS hoặc

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS WVRQTPDRRLEWVAT
 ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRSED TAMYYCAKLI
 SLYWGQGTTLTVSS, hoặc

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS WVRQTPDRRLEWVAT
 ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRSED TAMYYCAKLI
 SLYWGQGTTLTVSS (AB-1_VH), hoặc

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS WVRQAPGKGLEWVST
 ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLIS
 LYWGQGTTLTVSS (hAB-1_RHA).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ theo khía cạnh thứ hai và ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng theo khía cạnh thứ hai.

Để tránh nhầm lẫn, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể bao gồm trình tự axit amin bất kỳ nêu trong khía cạnh thứ nhất. Do đó, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm vùng VK và/hoặc VK bất kỳ như được lấy làm ví dụ theo Fig bất kỳ trong số các Fig. 18 đến Fig. 28 hoặc Bảng 14 đến Bảng 24 và 24A, hoặc biến thể, đoạn hoặc dẫn xuất bất kỳ của nó.

Ngoài ra, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể là hoặc bao gồm kháng thể được làm cho giống như của người hoặc dạng khảm được mô tả trong bản mô tả này, cụ thể, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm hoặc gồm có trình tự bất kỳ nêu trong các Bảng 14 đến 24 và 24A.

Dự tính rằng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên được mô tả ở đây có thể bao gồm trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất 75% với một hoặc nhiều trình tự axit amin nêu trên, ví dụ, tương đồng ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với một hoặc nhiều trình tự axit amin nêu trên. Cũng bao hàm rằng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên có thể bao gồm lên đến 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều hơn đoạn cài, mất, thay thế bảo toàn và/hoặc thay thế không bảo toàn.

Theo phương án được ưu tiên theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm hoặc gồm có kháng thể nguyên vẹn. Theo cách khác, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể hầu như gồm có kháng thể nguyên vẹn. Thuật ngữ “hầu như gồm có” có nghĩa là kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó gồm có một phần của kháng thể nguyên vẹn đủ để biểu hiện tính đặc hiệu liên kết với TG2.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế có thể là kháng thể không có mặt tự nhiên. Tất nhiên, khi kháng thể này là kháng thể có mặt tự nhiên, nó được tạo ra dưới dạng được phân lập (*tức là khác biệt so với dạng được tìm thấy trong tự nhiên*).

Theo một phương án theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm hoặc gồm có đoạn liên kết với kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm: đoạn Fv; đoạn Fab; và đoạn tương tự Fab. Theo phương án khác, đoạn Fv có thể là đoạn Fv chuỗi đơn hoặc đoạn Fv có liên kết disulphua. Theo phương án khác nữa, đoạn tương tự Fab có thể là đoạn Fab' hoặc đoạn F(ab)₂.

Các vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể tham gia vào việc nhận biết kháng nguyên, thực tế đầu tiên được xác nhận bằng các thí nghiệm cắt bằng proteaza sớm. Xác nhận tiếp theo được phát hiện bằng “việc làm cho giống như của người” đối với kháng thể loài gặm nhấm. Các vùng biến đổi có nguồn gốc từ loài gặm nhấm có thể được dung hợp với các vùng ổn định có nguồn gốc từ người sao cho kháng thể thu được vẫn giữ được tính đặc hiệu kháng nguyên của kháng thể có nguồn gốc từ loài gặm nhấm (Morrison *et al* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-6855).

Tính đặc hiệu kháng nguyên được tạo ra bởi các vùng biến đổi và độc lập với các vùng ổn định, như được biết từ các thí nghiệm bao gồm việc biểu hiện ở vi khuẩn các đoạn kháng thể, các đoạn đều chứa một hoặc nhiều vùng biến đổi. Các phân tử này bao gồm phân tử tương tự Fab (Better *et al* (1988) *Science* 240, 1041); phân tử Fv (Skerra *et al* (1988) *Science* 240, 1038); phân tử Fv chuỗi đơn (ScFv) trong đó các vùng thành phần V_H và V_L được liên kết với nhau bởi oligopeptit linh động (Bird *et al* (1988) *Science* 242, 423; Huston *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879) và kháng thể vùng đơn (dAb) bao gồm hoặc gồm có các vùng V được phân lập (Ward *et al* (1989) *Nature* 341, 544). Khái quát về các kỹ thuật

liên quan đến việc tổng hợp các đoạn kháng thể vẫn giữ được các vị trí liên kết đặc hiệu của chúng là được tìm thấy trong: Winter & Milstein (1991) *Nature* 349, 293-299.

Do đó, thuật ngữ “đoạn liên kết với kháng nguyên” bao gồm đoạn có chức năng của kháng thể có khả năng liên kết với TG2.

Các đoạn liên kết với kháng nguyên được lấy làm ví dụ có thể được chọn từ nhóm bao gồm đoạn Fv (ví dụ, Fv chuỗi đơn và Fv có liên kết disulphua), và đoạn tương tự Fab (ví dụ, đoạn Fab, đoạn Fab' và đoạn F(ab)₂).

Theo một phương án của sáng chế, đoạn liên kết với kháng nguyên là scFv.

Ưu điểm của việc sử dụng đoạn kháng thể, thay vì toàn bộ kháng thể, là cao gấp vài lần. Kích thước nhỏ của đoạn kháng thể dẫn đến cải thiện các đặc tính dược lý, như thâm vào mô rắn tốt hơn. Hơn nữa, đoạn liên kết với kháng nguyên như các đoạn kháng thể Fab, Fv, ScFv và dAb có thể được biểu hiện trong *E. coli* và được tiết ra từ đó, do đó cho phép dễ dàng sản xuất lượng lớn các đoạn này.

Cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế là dạng được cải biến của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, ví dụ, được cải biến bằng sự gắn cộng hóa trị của polyetylen glycol hoặc polyme thích hợp khác.

Được ưu tiên đặc biệt, nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó là phân tử tái tổ hợp.

Phương pháp tạo kháng thể và đoạn kháng thể là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, kháng thể có thể được tạo ra bằng một trong số các phương pháp có sử dụng sự cảm ứng quá trình sản sinh phân tử kháng thể *in vivo*, sàng lọc ngân hàng globulin miễn dịch (Orlandi. *et al*, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3833-3837; Winter *et al.*, 1991, *Nature* 349:293-299) hoặc tạo các phân tử

kháng thể đơn dòng bằng dòng tế bào nuôi cấy. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật tế bào lai, kỹ thuật lai tế bào B của người, kỹ thuật tế bào lai chứa virus Epstein-Barr (EBV) (Kohler *et al.*, 1975. *Nature* 256:495-497; Kozbor *et al.*, 1985. *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote *et al.*, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030; Cole *et al.*, 1984. *Mol. Cell. Biol.* 62:109-120).

Thích hợp, nếu sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó trong đó kháng thể này là kháng thể tái tổ hợp (*tức là* trong đó nó được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp).

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, kháng thể này có thể là kháng thể đơn dòng.

Các kháng thể đơn dòng thích hợp với kháng nguyên được chọn có thể bào chế được bằng các kỹ thuật đã biết, ví dụ, các kỹ thuật được bộc lộ trong “*Monoclonal Antibodies: A manual of techniques*”, H Zola (CRC Press, 1988) và trong “*Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*”, J G R Hurrell (CRC Press, 1982), được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các kháng thể đơn dòng được lấy làm ví dụ theo sáng chế và các phương pháp thích hợp để sản xuất chúng được nêu trong phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Các đoạn kháng thể cũng có thể được thu bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Harlow & Lane, 1988, “*Antibodies: A Laboratory Manual*”, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn). Ví dụ, đoạn kháng thể theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách thủy phân kháng thể hoặc biểu hiện ADN mã hóa đoạn này ở *E. coli* hoặc tế bào động vật có vú (*ví dụ*, nuôi cấy tế bào trứng chuột túi má Trung Quốc hoặc các hệ biểu hiện protein khác). Theo cách khác, đoạn kháng thể có thể được thu bằng cách cắt toàn kháng thể bằng pepsin hoặc papain bằng các phương pháp thông thường.

Theo một phương án theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể là kháng thể người hoặc kháng thể được làm cho giống như của người.

Chuyên gia trong lĩnh vực này biết rằng để điều trị hoặc chẩn đoán cho người, kháng thể được làm cho giống như của người có thể được sử dụng. Các dạng được làm cho giống như của người của kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) là kháng thể hoặc đoạn kháng thể dạng khảm được thao tác di truyền chứa các phần tối thiểu được tạo ra từ kháng thể không phải của người. Kháng thể được làm cho giống như của người bao gồm kháng thể trong đó các vùng quyết định tính hỗ trợ của kháng thể người (kháng thể nhận) được thay bằng các gốc từ vùng quyết định tính hỗ trợ của loài không phải người (kháng thể nhận) như chuột nhắt, chuột cống hoặc thỏ có nhóm chức mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc khung Fv của kháng thể người có thể được thay bằng các gốc không phải của người tương ứng. Kháng thể được làm cho giống như của người cũng có thể chứa các gốc không được tìm thấy trong kháng thể nhận cũng như trong vùng quyết định tính hỗ trợ nhập vào hoặc trình tự khung. Nói chung, kháng thể được làm cho giống như của người sẽ chứa hầu như tất cả ít nhất một, và thường là hai, vùng biến đổi, trong đó tất cả hoặc hầu như tất cả các vùng quyết định tính hỗ trợ này tương ứng với các vùng quyết định tính hỗ trợ của kháng thể không phải của người và tất cả, hoặc hầu như tất cả, các vùng khung này tương ứng với các vùng khung của trình tự liên ứng của người liên quan. Kháng thể được làm cho giống như của người còn tùy ý bao gồm ít nhất một phần vùng ổn định của kháng thể, như vùng Fc, thường được tạo ra từ kháng thể người (xem, ví dụ, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-329; Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các phương pháp làm cho kháng thể không phải của người trở thành giống như của người là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Nói chung, kháng thể được

làm cho giống như của người có một hoặc nhiều gốc axit amin đưa vào nó từ nguồn không phải người. Các gốc axit amin không phải của người này, thường chỉ các gốc nhập vào, thường thu được từ vùng biến đổi nhập vào. Việc làm cho giống như của người hầu như có thể thực hiện được như đã được mô tả (xem, ví dụ, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann *et al.*, 1988. *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536; US 4,816,567, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) bằng cách thay thế các vùng quyết định tính hỗ trợ của người bằng các vùng quyết định tính hỗ trợ tương ứng của loài gặm nhấm. Do đó, các kháng thể được làm cho giống như của người như vậy là các kháng thể dạng khảm, trong đó hầu như không đến một vùng biến đổi nguyên vẹn của người đã được thay bằng trình tự tương ứng từ loài không phải người. Thực tế, kháng thể được làm cho giống như của người thường là kháng thể người trong đó một số gốc của vùng quyết định tính hỗ trợ và có thể là một số gốc khung được thay bằng các gốc từ các vị trí tương tự trong kháng thể loài gặm nhấm.

Kháng thể người cũng có thể nhận dạng được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm ngân hàng biểu hiện thể thực khuẩn (xem, ví dụ, Hoogenboom & Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Cole *et al.*, 1985, In: *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner *et al.*, 1991. *J. Immunol.* 147:86-95, Soderlind *et al.*, 2000, *Nat Biotechnol* 18:852-6 and WO 98/32845 được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Thuật ngữ “axit amin” như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm hai mươi axit amin được mã hóa di truyền chuẩn và các chất đồng phân lập thể tương ứng của chúng ở dạng ‘D’ (so với dạng ‘L’ tự nhiên), các axit amin omega, các axit amin có mặt tự nhiên khác, các axit amin không thông thường (ví dụ, α,α -thể hai lần axit amin, N-alkyl axit amin, v.v.) và các axit amin được tạo dẫn xuất hóa học.

Khi axit amin được chỉ rõ, như “alanin” hoặc “Ala” hoặc “A”, thuật ngữ này chỉ cả L-alanin lẫn D-alanin trừ khi có quy định khác. Các axit amin không thông thường khác cũng có thể là các thành phần thích hợp cho các polypeptit theo sáng chế, miễn là polypeptit này vẫn giữ được đặc tính chức năng mong muốn. Đối với các peptit được thể hiện, mỗi gốc axit amin được mã hóa, khi thích hợp, được đại diện bằng ký tự chữ cái duy nhất, tương ứng với tên bộ ba của axit amin thông thường.

Theo một phương án, polypeptit như được xác định trong bản mô tả này bao gồm hoặc gồm có L-axit amin.

Một khi thu được kháng thể thích hợp, nó có thể được thử hoạt tính, như tính đặc hiệu liên kết hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể, ví dụ, bằng ELISA, hóa mô miễn dịch, bào kế dòng chảy, kết tủa miễn dịch, thẩm tách protein, v.v. Hoạt tính sinh học có thể được thử bằng các thử nghiệm khác nhau với kết quả đo cho đặc tính cụ thể đó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Sáng chế mô tả polynucleotit được phân lập bao gồm hoặc gồm có các trình tự nucleotit:

i)

GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAG
AGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATT
TAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCT
ATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGGGTCCCATCCAGGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAA
GATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCGTACACGT
TCGGAGGGGGGACCAAACCTGGAAATAAAA; và/hoặc

ii)

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGG
 GTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCCTCTG
 CCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTCG
 CAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGACAGTGTGA
 AGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTCTATCT
 GCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGC
 AAAACTAATCAGTCTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC
 TCA.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm hoặc gồm có trình tự axit nucleic bất kỳ được liệt kê trong Fig bất kỳ trong số các Fig. 18 đến Fig. 28.

Do đó, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm hoặc gồm có các trình tự nucleotit:

i)

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAG
 AGAGAGTCATCATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATT
 TAACCTGGTTCCAACAGAAACCAGGAAAGTCTCCTAAGACCCTGATCT
 ATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCA
 GTGGATCTGGGCAAGAATTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACATG
 AAGATATGGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTTCCGTACAC
 GTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA; và/hoặc

ii)

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGG
 TCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTTCAGTTCCTCTGC
 CATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGACTGGAGTGGGTCGC
 AACTATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAG
 GGTCGATTCACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCTATACCTG
 CAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCA

AAACTAATCAGTCCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCT
CA.

Sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm hoặc gồm có các trình tự nucleotit:

i)

GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAG
AGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATT
TAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGATCCTGATCT
ATCTTGTAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCA
GTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATG
AAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTTCCGTACAC
GTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA; và/hoặc

ii)

GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGG
TCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATG
CCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCG
CAACCATTAGTAGTGGTGGTTCGTTCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAA
GGGTCGATTCACTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATATCTG
CAACTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCA
AGACTAATCAGTACCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCT
CA.

Kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế ức chế hoạt tính TG2. Kháng thể theo sáng chế ức chế hoạt tính enzyme TG2 và do đó ngăn ngừa nó tạo liên kết ngang các gốc lysin và glutamin với các liên kết Nε-(γ-glutamyl)lysin isopeptit. Tốt hơn, nếu hoạt tính enzyme TG2 được loại bỏ hoàn toàn, song dự tính rằng sự ức chế này có thể là sự ức chế một phần trong trường hợp sự ức chế một phần này là đủ để tạo ra tác dụng điều trị hữu ích hoặc không có tác dụng điều trị. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể xác định được phạm vi ức chế hữu hiệu để đạt được tác dụng mong muốn.

Tốt hơn, nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó ức chế đặc hiệu TG2. Do đó, tốt hơn, nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó không ức chế hoạt tính TG1, TG3, TG13 và/hoặc TG7. Dự tính rằng kháng thể ức chế hữu hiệu hoạt tính TG2 song đủ chọn lọc để nó không ức chế đáng kể hoạt tính TG1, TG3, TG13 và/hoặc TG7 có thể là đặc biệt hữu ích làm thuốc. Do đó, tốt hơn, nếu kháng thể chỉ ức chế hoạt tính TG2.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó mà sự liên kết của nó với TG2 (ví dụ, TG2 của người) được ức chế hoặc làm giảm khi kháng thể theo khía cạnh bất kỳ nêu trên được liên kết với TG2 (ví dụ, TG2 của người).

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ liên kết chọn lọc với epitop trong vùng của TG2 sao cho nó có thể cạnh tranh với và làm xáo trộn sự liên kết của kháng thể bất kỳ theo các khía cạnh nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ nêu trên và gốc khác.

Gốc khác này có thể là gốc gây độc tế bào một cách trực tiếp hoặc gián tiếp.

Thuật ngữ “gây độc tế bào một cách trực tiếp” nghĩa là gốc này là gốc bản thân nó gây độc tế bào. Thuật ngữ “gây độc tế bào một cách gián tiếp” sáng chế nghĩa là gốc này là gốc, mặc dù bản thân nó không gây độc tế bào, song có thể cảm ứng tính gây độc tế bào, ví dụ, bằng cách tác động đến phân tử khác hoặc bằng tác động khác đến nó.

Gốc gây độc tế bào có thể được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm bao gồm chất hóa điều trị gây độc tế bào trực tiếp, polypeptit gây độc tế bào trực tiếp, gốc có khả năng chuyển tiền dược chất hầu như không độc thành dược chất

gây độc tế bào, chất nhạy với phóng xạ, axit nucleic gây độc tế bào trực tiếp, phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit gây độc tế bào trực tiếp hoặc gián tiếp, phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit điều trị, hoặc nguyên tử có hoạt tính phóng xạ. Dự tính rằng nguyên tử có hoạt tính phóng xạ là nguyên tử bất kỳ trong số các nguyên tử phospho-32, iot-125, iot-131, indi-111, rheni-186, rheni-188 hoặc ytri-90.

Chất hóa điều trị gây độc tế bào, như chất trị ung thư, bao gồm: chất alkyl hóa bao gồm nitơ mù tạc như mecloetamin (HN_2), xyclophosphamit, ifosfamid, melphalan (L-sarcolysin) và clorambuxil; etylenimin và metylmelamin như hexametylmelamin, thiotepa; alkyl sulphonat như busulfan; nitrosoure như carmustin (BCNU), lomustin (CCNU), semustin (metyl-CCNU) và streptozocin (streptozotixin); và triazen như decarbazin (DTIC; dimetyltriazenoimidazol-carboxamit); chất chống chuyển hóa bao gồm chất tương tự axit folic như metotrexat (ametopterin); chất tương tự pyrimidin như flouraxil (5-flouraxil; 5-FU), floxuridin (flodeoxyuridin; FUdR) và xytarabin (xytosin arabinosit); và chất tương tự purin và các chất ức chế liên quan như mercaptopurin (6-mercaptopurin; 6-MP), thioguanin (6-thioguanin; TG) và pentostatin (2'-deoxycoformyxin). Natural Products bao gồm vinca alkaloit như vinblastin (VLB) và vincristin; epipodophylotoxin như etoposit và teniposit; chất kháng sinh như dactinomycin (actinomycin D), daunorubixin (daunomycin; rubidomycin), doxorubixin, bleomycin, plicamycin (mithramycin) và mitomycin (mitomycin C); enzym như L-asparaginaza; và chất cải biến đáp ứng sinh học như interferon alphenom. Các chất khác bao gồm phức chất liên kết với platin như cisplatin (*cis*-DDP) và carboplatin; antracenedion như mitoxantron và antraxyclin; ure thể như hydroxyure; dẫn xuất metyl hydrazin như procarbazin (N-metylhydrazin, MIH); và chất ức chế vỏ thượng thận như mitotan (*o,p'*-DDD) và aminoglutethimit; taxol và chất tương tự/dẫn xuất; và chất chủ vận/đối kháng hormon như flutamit và tamoxifen.

Nhiều chất trong số này đã được gắn với kháng thể và các chất phân phối đích khác, và do đó các hợp chất theo sáng chế chứa các chất này có thể dễ dàng

được tạo ra bởi chuyên gia trong lĩnh vực này. Ví dụ, liên hợp carbodiimite (Bauminger & Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* **70**, 151-159; được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn) có thể được sử dụng để liên hợp các chất khác nhau, bao gồm doxorubicin, với kháng thể.

Các gốc peptit hoặc polypeptit gây độc tế bào bao gồm gốc bất kỳ dẫn đến sự chết tế bào. Các gốc peptit hoặc polypeptit gây độc tế bào là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, rixin, abrin, ngoại độc tố *Pseudomonas*, yếu tố mô và chất tương tự. Phương pháp liên kết chúng với gốc hướng đích như kháng thể cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Việc sử dụng rixin làm chất gây độc tế bào được bộc lộ trong: Burrows & Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8996-9000, được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn, và việc sử dụng yếu tố mô, dẫn đến sự đông máu và nhồi máu cục bộ của khối u, được mô tả bởi: Ran *et al* (1998) *Cancer Res.* **58**, 4646-4653 and Huang *et al* (1997) *Science* **275**, 547-550. Tsai *et al* (1995) *Dis. Colon Rectum* **38**, 1067-1074 mô tả chuỗi abrin A liên hợp với kháng thể đơn dòng và được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Các protein gây bất hoạt ribosom khác được mô tả dưới dạng chất gây độc tế bào trong WO 96/06641. Ngoại độc tố *Pseudomonas* cũng có thể được sử dụng làm gốc polypeptit gây độc tế bào (xem, ví dụ, Aiello *et al* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10457-10461; được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn).

Các cytokin nhất định, như TNF α và IL-2, cũng có thể là hữu ích làm chất gây độc tế bào.

Các nguyên tử có hoạt tính phóng xạ nhất định cũng có thể gây độc tế bào nếu được phân phối đủ liều. Do đó, gốc gây độc tế bào có thể bao gồm nguyên tử có hoạt tính phóng xạ mà, khi sử dụng, phân phối lượng đủ hoạt tính phóng xạ tới vị trí đích để gây độc tế bào. Các nguyên tử có hoạt tính phóng xạ thích hợp bao gồm phospho-32, iot-125, iot-131, indi-111, rheni-186, rheni-188 hoặc ytri-90, hoặc đồng vị khác bất kỳ phát đủ năng lượng để phá hủy tế bào xung quanh. Tốt hơn, nếu đồng vị và mật độ nguyên tử có hoạt tính phóng xạ trong hợp chất theo

sáng chế sao cho liều lớn hơn 4000 cGy (tốt hơn là ít nhất 6000, 8000 hoặc 10000 cGy) được phân phối tới vị trí đích và, tốt hơn, nếu tới các tế bào tại vị trí đích và các cơ quan tử của chúng, đặc biệt là nhân. Nguyên tử có hoạt tính phóng xạ có thể được gắn với kháng thể theo cách đã biết. Ví dụ, EDTA hoặc chất tạo chelat khác có thể được gắn với kháng thể và dùng để gắn ^{111}In hoặc ^{90}Y . Gốc tyrosin có thể được đánh dấu ^{125}I hoặc ^{131}I .

Gốc gây độc tế bào có thể là polypeptit gây độc tế bào một cách gián tiếp thích hợp. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, polypeptit gây độc tế bào một cách gián tiếp là polypeptit có hoạt tính enzym và có thể chuyển hóa tiền dược chất hầu như không độc thành dược chất gây độc tế bào. Khi gốc hướng đích là kháng thể, loại hệ này thường chỉ Liệu pháp tiền dược chất enzym hướng trực tiếp kháng thể-ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy). Hệ này cần gốc hướng đích định vị phần enzym tới vị trí mong muốn trong cơ thể bệnh nhân (tức là vị trí biểu hiện MR, như mô mạch mới liên quan đến ung thư) và sau thời gian cho phép enzym định vị tại vị trí này, sử dụng tiền dược chất là cơ chất đối với enzym, sản phẩm cuối của quá trình xúc tác là hợp chất gây độc tế bào. Mục đích của phương pháp này là tối đa hóa nồng độ của dược chất tại vị trí mong muốn và giảm thiểu nồng độ của dược chất ở mô bình thường (xem Senter, P.D. *et al* (1988) "Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4842-4846; Bagshawe (1987) *Br. J. Cancer* **56**, 531-2; and Bagshawe, K.D. *et al* (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" *Br. J. Cancer.* **58**, 700-703.)

Chất gây độc tế bào có thể là dược chất trị ung thư hiện có bất kỳ như chất alkyl hóa; chất xen vào ADN; chất ức chế enzym chia khóa bất kỳ như dihydrofolat reductaza, tymidin synthetaza, ribonucleotit reductaza, nucleosit kinaza hoặc topoisomeraza; hoặc chất tác động đến sự chết tế bào bằng cách tương tác với thành phần tế bào khác. Etoposit là ví dụ về chất ức chế topoisomeraza.

Các hệ tiền được chất đã được thông báo bao gồm: tiền được chất phenol mù tạc được hoạt hóa bởi *E. coli* β -glucuronidaza (Wang *et al*, 1992 and Roffler *et al*, 1991); tiền được chất doxorubixin được hoạt hóa bởi β -glucuronidaza của người (Bosslet *et al*, 1994); tiền được chất doxorubixin khác được hoạt hóa bởi α -galactosidaza của hạt cà phê (Azoulay *et al*, 1995); tiền được chất daunorubixin, được hoạt hóa bởi α -D-galactosidaza của hạt cà phê (Gesson *et al*, 1994); tiền được chất 5-flouridin được hoạt hóa bởi *E. coli* β -D-galactosidaza (Abraham *et al*, 1994); và tiền được chất metotrexat (ví dụ, metotrexat-alanin) được hoạt hóa bởi carboxypeptidaza A (Kuefner *et al*, 1990, Vitols *et al*, 1992 và Vitols *et al*, 1995). Các tiền được chất này và các chất khác được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1

Enzym	Tiền được chất
Carboxypeptidaza G2	Dẫn xuất của axit L-glutamic và axit benzoic mù tạc, anilin mù tạc, phenol mù tạc và phenylendiamin mù tạc; dẫn xuất flo của các chất này
Phosphataza kiềm	Etoposit phosphat
	Mitomycin phosphat
Beta-glucuronidaza	<i>p</i> -Hydroxyanilin mù tạc-glucuronit
	Epirubixin-glucuronit
Penicillin-V-amidaza	Adriamycin-N phenoxyaxetyl
Penicillin-G-amidaza	N-(4'-hydroxyphenyl axetyl) palytoxin
	Doxorubixin và melphalan
Beta-lactamaza	Nitơ mù tạc-cephalosporin <i>p</i> -phenylendiamin; dẫn xuất doxorubixin; dẫn xuất vinblastin-cephalosporin, cephalosporin mù tạc; dẫn xuất taxol
Beta-glucosidaza	Axit xyanophenylmetyl-beta-D-glucopyranosiduronic
Nitroreductaza	5-(Azaridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid
Cytosine deaminaza	5-Floxytosin
Carboxypeptidaza A	Metotrexat-alanin

(bảng này dựa trên Bagshawe (1995) *Drug Dev. Res.* **34**, 220-230, mà từ đó viện dẫn đầy đủ đối với các hệ khác nhau này có thể thu được; dẫn xuất taxol được mô tả trong: Rodrigues, M.L. *et al* (1995) *Chemistry & Biology* **2**, 223).

Các enzym thích hợp để tạo ra phần enzym theo sáng chế bao gồm: exopeptidaza, như carboxypeptidaza G, G1 và G2 (đối với tiền dược chất glutamyl mù tạc), carboxypeptidaza A và B (đối với tiền dược chất trên cơ sở MTX) và aminopeptidaza (đối với tiền dược chất 2- α -aminoxyl MTC); endopeptidaza, như trombolysin (đối với tiền dược chất trombin); hydrolaza, như phosphataza (ví dụ, phosphataza kiềm) hoặc sulphataza (ví dụ, aryl sulphataza) (đối với tiền dược chất phosphyl hoặc sulphat); amidaza, như penicillin amidaza và arylaxyl amidaza; lactamaza, như β -lactamaza; glycosidaza, như β -glucuronidaza (đối với β -glucuronomit antraxyclin), α -galactosidaza (đối với amygdalin) và β -galactosidaza (đối với β -galactosa antraxyclin); deaminaza, như xytosin deaminaza (đối với 5FC); kinaza, như urokinaza và tymidin kinaza (đối với ganxyclovir); reductaza, như nitroreductaza (đối với CB1954 và chất tương tự), azoreductaza (đối với azobenzen mù tạc) và DT-diaphoraza (đối với CB1954); oxidaza, như glucoza oxidaza (đối với glucoza), xantin oxidaza (đối với xantin) và lactoperoxidaza; DL-racemaza, kháng thể xúc tác và xyclodextrin.

Tiền dược chất là hầu như không độc so với dược chất gây độc tế bào. Thông thường, nó có độc tính nhỏ hơn 10%, tốt hơn là nhỏ hơn 1% khi đo bằng thử nghiệm gây độc tế bào *in vitro* thích hợp. Có lẽ gốc có khả năng chuyển tiền dược chất thành dược chất gây độc tế bào sẽ hoạt động khi tách ra khỏi phần còn lại của hợp chất nhưng nó chỉ cần hoạt động khi (a) nó kết hợp với phần còn lại của hợp chất và (b) hợp chất được liên kết với, liên kết hoặc nội hấp vào tế bào đích.

Khi mỗi gốc của hợp chất là polypeptit, hai phần có thể được liên kết với nhau theo cách bất kỳ để liên kết ngang các polypeptit, như các cách được mô tả chung trong: O'Sullivan *et al* (1979) *Anal. Biochem.* **100**, 100-108. Theo cách

khác, hợp chất có thể được tạo ra dưới dạng hợp chất dung hợp nhờ công nghệ ADN tái tổ hợp mà theo đó chiều dài ADN chứa các vùng tương ứng mã hóa hai gốc hợp chất theo sáng chế liên kế nhau hoặc cách nhau bởi vùng mã hóa peptit liên kết không phá hủy các đặc tính mong muốn của hợp chất. Tưởng tượng rằng hai phần của hợp chất có thể chồng lấp hoàn toàn hoặc một phần.

Gốc gây độc tế bào có thể là chất nhạy với phóng xạ. Chất nhạy với phóng xạ bao gồm flopyrimidin, chất tương tự tymidin, hydroxyure, gemxitabin, fludarabin, nicotinamit, halogen pyrimidin, 3-aminobenzamit, 3-aminobenzodiamit, etanixadol, pimonidazol và misonidazol (xem, ví dụ, McGinn *et al* (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1193-11203; Shewach & Lawrence (1996) *Invest. New Drugs* **14**, 257-263; Horsman (1995) *Acta Oncol.* **34**, 571-587; Shenoy & Singh (1992) *Clin. Invest.* **10**, 533-551; Mitchell *et al* (1989) *Int. J. Radiat. Biol.* **56**, 827-836; Iliakis & Kurtzman (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **16**, 1235-1241; Brown (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **16**, 987-993; Brown (1985) *Cancer* **55**, 2222-2228).

Tương tự, việc phân phối gen vào tế bào có thể làm cho chúng nhạy với phóng xạ, ví dụ, phân phối gen p53 hoặc cyclin D (Lang *et al* (1998) *J. Neurosurg.* **89**, 125-132; Coco Martin *et al* (1999) *Cancer Res.* **59**, 1134-1140).

Gốc khác có thể là gốc trở nên gây độc tế bào, hoặc giải phóng gốc gây độc tế bào, sau khi chiếu xạ. Ví dụ, đồng vị bo-10, khi được chiếu xạ thích hợp, giải phóng hạt α gây độc tế bào (xem ví dụ, US 4,348,376 cấp cho Goldenberg; Primus *et al* (1996) *Bioconjug. Chem.* **7**, 532-535).

Tương tự, gốc gây độc tế bào có thể là gốc hữu ích trong liệu pháp quang động lực như photofrin (xem, ví dụ, Dougherty *et al* (1998) *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889-905).

Gốc gây độc tế bào có thể là phân tử axit nucleic gây độc tế bào một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Ví dụ, phân tử axit nucleic này có thể là oligonucleotit đối nghĩa mà, khi định vị tại vị trí đích, có khả năng đi vào tế bào và dẫn đến sự chết tế bào. Do đó, oligonucleotit này có thể ngăn ngừa sự biểu hiện của gen thiết yếu hoặc dẫn đến làm thay đổi sự biểu hiện gen gây chết tế bào theo chương trình.

Ví dụ về oligonucleotit thích hợp bao gồm các oligonucleotit hướng đích tại bcl-2 (Ziegler *et al* (1997) *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1027-1036), và ADN polymeraza α và topoisomeraza II α (Lee *et al* (1996) *Anticancer Res.* **16**, 1805-1811).

Các axit nucleic peptit có thể là hữu ích thay cho các axit nucleic thông thường (xem Knudsen & Nielsen (1997) *Anticancer Drugs* **8**, 113-118).

Theo một phương án về hợp chất theo sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó và gốc gây độc tế bào có thể là các polypeptit được dung hợp. Do đó, sáng chế còn đề xuất polynucleotit mã hóa hợp chất này.

Theo phương án khác, gốc khác có thể là gốc dễ phát hiện. Dự tính rằng gốc dễ phát hiện có thể bao gồm lượng thích hợp của chất bất kỳ trong số iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, techniti-99m, gadolini, mangan hoặc sắt.

Thuật ngữ “gốc dễ phát hiện” nghĩa là gốc mà, khi định vị tại vị trí đích sau khi đưa hợp chất theo sáng chế vào bệnh nhân, có thể phát hiện được, thường là không xâm nhập từ ngoài vào cơ thể và vị trí đích được định vị. Do đó, hợp chất theo phương án này theo sáng chế là hữu ích để tạo ảnh và chẩn đoán.

Thông thường, gốc dễ phát hiện là hoặc chứa nguyên tử có hoạt tính phóng xạ mà hữu ích để tạo ảnh. Các nguyên tử có hoạt tính phóng xạ thích hợp bao gồm techneti-99m hoặc iot-123 đối với các nghiên cứu ảnh nhấp nháy. Các gốc dễ phát

hiện khác bao gồm, ví dụ, chất đánh dấu spin để tạo ảnh cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging: MRI) như iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt. Rõ ràng, hợp chất theo sáng chế phải có đủ đồng vị nguyên tử thích hợp để phân tử dễ được phát hiện.

Các chất đánh dấu phóng xạ hoặc các chất đánh dấu khác có thể được đưa vào hợp chất theo sáng chế theo các cách đã biết. Ví dụ, nếu kháng thể là polypeptit, nó có thể được sinh tổng hợp hoặc được tổng hợp bằng quá trình tổng hợp axit amin hóa học bằng cách sử dụng các tiền chất axit amin thích hợp bao gồm, ví dụ, flo-19 thay cho hydro. Các chất đánh dấu như ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{186}Rh , ^{188}Rh và ^{111}In có thể, ví dụ, được gắn nhờ các gốc xystein trong kháng thể. Ytri-90 có thể được gắn nhờ gốc lysin. Phương pháp IODOGEN (Fraker *et al* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **80**, 49-57) có thể được sử dụng để hợp nhất iot-123. Tài liệu tham khảo ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) mô tả chi tiết các phương pháp khác.

Sáng chế đề xuất vectơ chứa polynucleotit bất kỳ theo sáng chế.

Các vectơ plasmit thông thường của tế bào không có nhân điển hình là: pUC18, pUC19, pBR322 và pBR329 có thể thu mua từ Biorad Laboratories (Richmond, CA, USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 và pRIT5 có thể thu mua từ Pharmacia (Piscataway, NJ, USA); vectơ pBS, vectơ Phagescript, vectơ Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A có thể thu mua từ Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA).

Vectơ plasmit thông thường của tế bào động vật có vú là pSVL có thể thu mua từ Pharmacia (Piscataway, NJ, USA). Ví dụ về vectơ biểu hiện của động vật có vú cảm ứng được là pMSG, cũng có thể thu mua từ Pharmacia (Piscataway, NJ, USA).

Các vector plasmit hữu ích của nấm men là pRS403-406 và pRS413-416 và nói chung có thể thu mua từ Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA). Các plasmit pRS403, pRS404, pRS405 và pRS406 là các plasmit hợp chất nấm men (Yeast Integrating plasmid: YIp) và hợp nhất các gen đánh dấu chọn lọc của nấm men *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* và *URA3*. Các plasmit pRS413-416 là các plasmit trung đoạn của nấm men (Yeast Centromere plasmid: YCp).

Các phương pháp được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ có thể được sử dụng để tạo cấu trúc vector biểu hiện chứa trình tự mã hóa và, ví dụ, các yếu tố kiểm soát phiên mã và dịch mã thích hợp.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa polynucleotit hoặc vector bất kỳ theo sáng chế.

Nhiều hệ biểu hiện là đã biết, bao gồm các hệ sử dụng: vi khuẩn (ví dụ, *E. coli* và *Bacillus subtilis*) đã được chuyển nhiễm bằng, ví dụ, các vector biểu hiện ADN của thể thực khuẩn tái tổ hợp, plasmit hoặc cosmit; nấm men (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*) đã được chuyển nhiễm bằng, ví dụ, vector biểu hiện của nấm men; hệ tế bào côn trùng đã được chuyển nhiễm bằng, ví dụ, vector biểu hiện của virus (ví dụ, baculovirus); hệ tế bào thực vật đã được chuyển nhiễm bằng, ví dụ, vector biểu hiện của virus hoặc vi khuẩn; hệ tế bào động vật đã được chuyển nhiễm bằng, ví dụ, vector biểu hiện của adenovirus.

Vector có thể bao gồm đơn vị sao chép của tế bào không có nhân điển hình, như Col E1 *ori*, để nhân lên trong tế bào không có nhân điển hình, ngay cả khi vector này được sử dụng để biểu hiện trong các loại tế bào không có nhân điển hình khác. Vector cũng có thể bao gồm gen khởi đầu thích hợp như gen khởi đầu của tế bào không có nhân điển hình có khả năng định hướng biểu hiện (phiên mã và dịch mã) các gen ở tế bào chủ vi khuẩn, như *E. coli*, được chuyển nhiễm vector này.

Gen khởi đầu là yếu tố kiểm soát biểu hiện do trình tự ADN tạo ra cho phép xảy ra sự liên kết của ARN polymeraza và sự phiên mã. Các trình tự gen khởi đầu tương thích với các vật chủ vi khuẩn được lấy làm ví dụ thường được bố trí trong các vectơ plasmit chứa các vị trí giới hạn thích hợp để cài đoạn ADN theo sáng chế.

Polynucleotit trong tế bào chủ thích hợp có thể được biểu hiện để sản xuất kháng thể hoặc hợp chất theo sáng chế. Do đó, polynucleotit này có thể được sử dụng theo các kỹ thuật đã biết, được cải biến một cách thích hợp theo các hướng dẫn nêu trong bản mô tả này, để tạo cấu trúc vectơ biểu hiện, tiếp theo nó được biến nạp vào tế bào chủ thích hợp để biểu hiện và sản xuất kháng thể hoặc hợp chất theo sáng chế. Các kỹ thuật như vậy bao gồm các kỹ thuật được bộc lộ trong patent Mỹ các số. 4,440,859; 4,530,901; 4,582,800; 4,677,063; 4,678,751; 4,704,362; 4,710,463; 4,757,006; 4,766,075 và 4,810,648, tất cả đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Polynucleotit này có thể được nối với các trình tự ADN khác để đưa vào tế bào chủ thích hợp. ADN đi kèm sẽ phụ thuộc vào tính chất của vật chủ, cách đưa ADN vào vật chủ, và có cần duy trì hoặc hợp nhất episom hay không.

Nói chung, polynucleotit được cài vào vectơ biểu hiện, như plasmit, theo hướng chính xác và khung đọc đúng để biểu hiện. Nếu cần, ADN cài này có thể được liên kết với các trình tự nucleotit kiểm soát điều hòa sự phiên mã và dịch mã thích hợp nhận biết được bởi vật chủ mong muốn, mặc dù các trình tự kiểm soát này thường có thể sử dụng được trong vectơ biểu hiện. Do đó, ADN cài này có thể được liên kết hoạt động với gen khởi đầu thích hợp. Các gen khởi đầu của vi khuẩn bao gồm các gen khởi đầu *lacI* và *lacZ* của *E. coli*, các gen khởi đầu T3 và T7, gen khởi đầu *gpt*, các gen khởi đầu PR và PL của thể thực khuẩn λ , gen khởi đầu *phoA* và gen khởi đầu *trp*. Các gen khởi đầu của tế bào có nhân điển hình bao gồm gen khởi đầu tiền sớm của CMV, gen khởi đầu HSV tymidin kinaza, các gen khởi đầu SV40 sớm và muộn và các gen khởi đầu LTR của retrovirut. Các gen khởi đầu

thích hợp khác được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ. Các cấu trúc biểu hiện cũng cần có các vị trí để khởi đầu và kết thúc phiên mã, và trong vùng được dịch mã, vị trí liên kết với ribosom để dịch mã. (Hastings *et al*, International Patent No. WO 98/16643, published 23 April 1998)

Tiếp theo, vector được đưa vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Nói chung, không phải tất cả các tế bào chủ đều được biến nạp vector và do đó sẽ cần chọn các tế bào chủ được biến nạp. Một kỹ thuật chọn bao gồm bước đưa gen đánh dấu trình tự ADN vào vector biểu hiện, chứa các yếu tố kiểm soát cần thiết bất kỳ, mã hóa tính trạng chọn lọc trong tế bào được biến nạp. Các gen đánh dấu này bao gồm dihydrofolat reductaza, G418 hoặc tính kháng neomycin đối với giống tế bào có nhân điển hình, và các gen kháng tetracyclin, kanamycin hoặc ampicilin để nuôi cấy ở *E. coli* và vi khuẩn khác. Theo cách khác, gen mã hóa tính trạng chọn lọc như vậy có thể là trên vector khác, được dùng để đồng biến nạp tế bào chủ mong muốn.

Tiếp theo, tế bào chủ đã được biến nạp ADN tái tổ hợp theo sáng chế được nuôi cấy trong thời gian thích hợp trong các điều kiện thích hợp mà chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ theo hướng dẫn bộc lộ trong bản mô tả này để cho phép biểu hiện polypeptit, tiếp theo polypeptit này có thể được thu hồi.

Kháng thể hoặc hợp chất có thể được thu hồi và tinh chế từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp bằng các phương pháp đã biết bao gồm kết tủa amoni sulphat hoặc etanol, chiết axit, sắc ký trao đổi anion hoặc cation, sắc ký phosphoxenluloza, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký ái lực, sắc ký hydroxylapatit và sắc ký lectin. Tốt hơn nữa, nếu sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography: "HPLC") được sử dụng để tinh chế.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất dòng tế bào chủ sản xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ nêu trên hoặc hợp chất

theo sáng chế thu được từ việc đưa polynucleotit ngoại sinh hoặc vector theo sáng chế vào dòng tế bào này.

Tế bào chủ có thể là không có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình. Tế bào vi khuẩn là tế bào chủ không có nhân điển hình được ưu tiên và thường là chủng *Escherichia coli* như, ví dụ, chủng *E. coli* DH5 có thể thu mua từ Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA, và RR1 có thể thu mua từ American Type Culture Collection (ATCC) of Rockville, MD, USA (No ATCC 31343). Tế bào chủ có nhân điển hình được ưu tiên bao gồm tế bào nấm men và động vật có vú, tốt hơn là tế bào động vật có xương sống như từ dòng nguyên bào sợi của chuột nhắt, chuột cống, khỉ hoặc người. Tế bào chủ nấm men bao gồm YPH499, YPH500 và YPH501 mà thường có thể thu mua từ Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Tế bào chủ động vật có vú được ưu tiên bao gồm tế bào trứng chuột túi má Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO) có thể thu mua từ ATCC dưới dạng CCL61, tế bào phôi chuột Thụy Sĩ NIH/3T3 có thể thu mua từ ATCC dưới dạng CRL 1658, và tế bào COS-1 được tạo ra từ thận khỉ có thể thu mua từ ATCC dưới dạng CRL 1650.

Ngoài chính tế bào chủ được biến nạp, sáng chế còn bao hàm các giống tế bào, tốt hơn là giống đơn dòng (đồng nhất về dòng), hoặc giống được tạo ra từ giống đơn dòng, trong môi trường dinh dưỡng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế, kết hợp với tá dược, chất phụ trợ, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Thuật ngữ “dược dụng” nghĩa là chế phẩm vô trùng và không chứa pyrogen. Các chất mang dược dụng thích hợp là đã được biết rõ trong lĩnh vực dược. Chất mang phải là “chấp nhận được” theo nghĩa tương thích với hợp chất theo sáng chế và không gây hại cho cơ thể nhận nó. Thông thường, chất mang là nước hoặc nước

muối mà vô trùng và không chứa pyrogen; tuy nhiên, các chất mang chấp nhận được khác có thể được sử dụng.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa thành phần hoạt tính khác, tức là chất có hoạt tính điều trị không phải kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế. Dự tính rằng một hoặc nhiều chất có hoạt tính bổ sung có thể làm gia tăng tác dụng của dược phẩm trị bệnh đích, nếu cần. Theo một phương án, thành phần hoạt tính bổ sung có thể là chất điều trị được chọn từ chất tham gia vào việc làm giảm sự tạo mô sẹo, làm giảm đám rối sợi thần kinh, và/hoặc làm giảm tính kháng hóa liệu pháp.

Theo phương án được ưu tiên, dược phẩm có thể được bào chế để phân phối qua đường trong tĩnh mạch, trong bắp hoặc dưới da cho bệnh nhân.

Tốt hơn, nếu dược phẩm chứa lượng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế hữu hiệu điều trị các tình trạng bệnh lý được mô tả trên đây và cả dưới đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit gồm các phần chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế; và một hoặc nhiều chất khác. Dự tính rằng các chất khác này có thể là chất bất kỳ trong số các thành phần hoạt tính bổ sung được mô tả trên đây, hoặc chất thích hợp khác bất kỳ.

Sáng chế đề xuất lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất, dược phẩm, hoặc kit theo sáng chế, dùng làm thuốc.

TG2 rõ ràng là enzym đa chức năng và liên quan đến nhiều chức năng của tế bào bao gồm sự ổn định và vận chuyển nhân [28, 29], nhập bào [30, 31], truyền tín hiệu GTPaza [32-34], sự chết tế bào theo chương trình [35, 36], sự dính bám tế

bào [37-39], sự hợp nhất khung tế bào [28, 29] và sự ổn định ECM [9]. Nói chung, một chất ức chế có phân tử nhỏ có thể cản trở tất cả các chức năng này do nó tiếp xúc tự do với khoang ngoại bào và bên trong tế bào. Kháng thể không thể vào được tế bào và do đó vai trò nội bào của TG2 sẽ không bị ảnh hưởng bởi việc dùng *in vivo* kháng thể đặc hiệu với TG2.

Điều quan trọng nhất về vai trò gây bệnh của TG2 là nằm ở ngoại bào do vai trò của nó trong việc tạo mô sẹo và xơ hóa, bệnh Celiac và bệnh ung thư. Do đó, việc sử dụng kháng thể liên kết chọn lọc với TG2 làm thuốc có thể gia tăng mức độ chọn lọc nhằm ngăn ngừa các tác dụng nội bào không mong muốn mà có thể chuyển thành các tác dụng phụ điều trị không mong muốn.

Do đó, kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể mang lại các ưu điểm lâm sàng so với các dược chất hiện có, ví dụ, để phong bế TG2 trong các bệnh xơ hóa và tạo sẹo nơi mà TG2 liên kết ngang với protein ECM, trong bệnh Celiac nơi mà gliadin bị khử amit trong khoang ngoại bào và trong bệnh ung thư kháng hóa liệu pháp nơi mà sự dính bám tế bào là yếu tố phòng ngừa. Ngoài ra, các đoạn kháng thể nhỏ theo sáng chế, ví dụ, đoạn Fab có thể đi qua vách ngăn máu-não và ức chế TG2 trong não và có thể tạo ra liệu pháp hữu hiệu đối với các bệnh lý thần kinh liên quan đến TG2.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất, dược phẩm, hoặc kit theo sáng chế, dùng để làm giảm hoặc ức chế hoạt tính enzym TG2 ở cá thể cần điều trị.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất, dược phẩm, hoặc kit theo sáng chế, để sản xuất dược phẩm dùng để làm giảm hoặc ức chế hoạt tính enzym TG2 ở cá thể cần điều trị.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ức chế hoặc làm giảm hoạt tính enzym TG2 ở cá thể cần điều trị, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể sử dụng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, hoặc biến thể, thể dung hợp hoặc dẫn xuất của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất, dược phẩm, hoặc kit theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất, dược phẩm, hoặc kit theo sáng chế, dùng để điều trị và/hoặc chẩn đoán bệnh Celiac, sự lành vết thương bất thường, sự tạo sẹo, bệnh cứng bì, sẹo lồi và sẹo phì đại, sẹo mắt, bệnh viêm ruột, thoái hóa điểm vàng, bệnh mắt Grave, ngộ độc ecgotin do thuốc, bệnh vẩy nến, bệnh liên quan đến xơ hóa (ví dụ, xơ gan, xơ phổi như bệnh phổi kẽ và bệnh xơ hóa phổi, xơ tim, xơ da, xơ tủy, xơ thận như bệnh xơ cứng tiểu cầu và bệnh xơ kẽ ống), bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tái hẹp, bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thoái hóa thần kinh/bệnh thần kinh (ví dụ, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh polyglutamin, bệnh teo cơ tủy-hành não, bệnh teo nhân răng nhân đỏ-cầu nhát thể Luy, chứng mất điều hòa tủy-hành não 1, 2, 3, 6, 7 và 12, bệnh teo nhân đỏ-cầu nhát, chứng liệt nhân đỏ-cầu nhát), và/hoặc bệnh ung thư (ví dụ, u nguyên bào thần kinh đệm như u nguyên bào thần kinh đệm trong hội chứng Li-Fraumeni và u nguyên bào thần kinh đệm rải rác, u hắc sắc tố ác tính, cacxinom ống tuyến tụy, bệnh bạch cầu dạng tủy, bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính, hội chứng loạn sản tủy, hội chứng tăng sinh tủy, bệnh ung thư phụ khoa, sacom Kaposi, bệnh Hansen, bệnh viêm kết tràng tạo collagen).

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất, dược phẩm, hoặc kit theo sáng chế, để sản xuất dược phẩm để điều trị và/hoặc chẩn đoán bệnh Celiac, sự lành vết thương bất thường, sự tạo sẹo, bệnh cứng bì, sẹo lồi và sẹo phì đại, sẹo mắt, bệnh viêm ruột, thoái hóa điểm vàng, bệnh mắt Grave, ngộ độc ecgotin do

thuốc, bệnh vẩy nến, bệnh liên quan đến xơ hóa (ví dụ, xơ gan, xơ phổi như bệnh phổi kẽ và bệnh xơ hóa phổi, xơ tim, xơ da, xơ tủy, xơ thận như bệnh xơ cứng tiểu cầu và bệnh xơ kẽ ống), bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tái hẹp, bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thoái hóa thần kinh/bệnh thần kinh (ví dụ, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh polyglutamin, bệnh teo cơ tủy-hành não, bệnh teo nhân răng nhân đỏ-cầu nhát thể Luy, chứng mất điều hòa tủy-hành não 1, 2, 3, 6, 7 và 12, bệnh teo nhân đỏ-cầu nhát, chứng liệt nhân đỏ-cầu nhát), và/hoặc bệnh ung thư (ví dụ, u nguyên bào thần kinh đệm như u nguyên bào thần kinh đệm trong hội chứng Li-Fraumeni và u nguyên bào thần kinh đệm rải rác, u hắc sắc tố ác tính, cacxinom ống tuyến tụy, bệnh bạch cầu dạng tủy, bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính, hội chứng loạn sản tủy, hội chứng tăng sinh tủy, bệnh ung thư phụ khoa, sacom Kaposi, bệnh Hansen, bệnh viêm kết tràng tạo collagen).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị và/hoặc chẩn đoán bệnh Celiac, sự lành vết thương bất thường, sự tạo sẹo, bệnh cứng bì, sẹo lồi và sẹo phì đại, sẹo mắt, bệnh viêm ruột, thoái hóa điểm vàng, bệnh mắt Grave, ngộ độc ecgotin do thuốc, bệnh vẩy nến, bệnh liên quan đến xơ hóa (ví dụ, xơ gan, xơ phổi như bệnh phổi kẽ và bệnh xơ hóa phổi, xơ tim, xơ da, xơ tủy, xơ thận như bệnh xơ cứng tiểu cầu và bệnh xơ kẽ ống), bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tái hẹp, bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thoái hóa thần kinh/bệnh thần kinh (ví dụ, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh polyglutamin, bệnh teo cơ tủy-hành não, bệnh teo nhân răng nhân đỏ-cầu nhát thể Luy, chứng mất điều hòa tủy-hành não 1, 2, 3, 6, 7 và 12, bệnh teo nhân đỏ-cầu nhát, chứng liệt nhân đỏ-cầu nhát), và/hoặc bệnh ung thư (ví dụ, u nguyên bào thần kinh đệm như u nguyên bào thần kinh đệm trong hội chứng Li-Fraumeni và u nguyên bào thần kinh đệm rải rác, u hắc sắc tố ác tính, cacxinom ống tuyến tụy, bệnh bạch cầu dạng tủy, bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính, hội chứng loạn sản tủy, hội chứng tăng sinh tủy, bệnh ung thư phụ khoa, sacom Kaposi, bệnh Hansen, bệnh viêm kết tràng tạo collagen) ở bệnh nhân, phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế,

hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất, dược phẩm, hoặc kit theo sáng chế, cho bệnh nhân.

Thuật ngữ “điều trị” sáng chế bao gồm cả điều trị lẫn phòng bệnh cho đối tượng/bệnh nhân. Thuật ngữ “phòng bệnh” được dùng để bao hàm việc sử dụng kháng thể, thuốc, hợp chất, dược phẩm, hoặc kit được mô tả trong bản mô tả này mà ngăn ngừa hoặc làm giảm phương thức xuất hiện hoặc phát triển của tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn (như rối loạn liên quan đến xơ hóa) ở cá thể.

Tốt hơn, nếu bệnh nhân là người song bệnh nhân có thể là động vật có vú khác bất kỳ mà có thể có lợi từ việc điều trị này. Ví dụ, bệnh nhân có thể là chuột nhắt, chuột cống, chuột túi má, thỏ, mèo, chó, dê, cừu, khỉ hoặc vượn.

“Lượng hữu hiệu điều trị”, hoặc “lượng hữu hiệu”, hoặc “hữu hiệu điều trị”, như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ lượng tạo ra tác dụng điều trị đối với tình trạng bệnh lý và chế độ dùng nhất định. Đây là lượng tiên quyết của hoạt chất tính được để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất phụ gia và chất pha loãng yêu cầu, *tức là* chất mang hoặc chất dẫn. Ngoài ra, nó được dự tính có nghĩa là lượng đủ để làm giảm hoặc ngăn ngừa sự thiếu hụt đáng kể về mặt lâm sàng đối với hoạt tính, chức năng và đáp ứng của vật chủ. Theo cách khác, lượng hữu hiệu điều trị là đủ để cải thiện tình trạng đáng kể về mặt lâm sàng ở vật chủ, ví dụ, động vật có vú.

Tác nhân (*tức là* kháng thể, đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, thể dung hợp hoặc dẫn xuất của nó), thuốc, hợp chất, dược phẩm và kit theo sáng chế có thể được phân phối bằng cách sử dụng hệ phân phối dược chất giải phóng ổn định tiêm được. Các hệ này được thiết kế đặc hiệu để làm giảm số lần tiêm. Ví dụ về hệ như vậy là Nutropin Depot, nó bao hormon sinh trưởng của người tái tổ hợp (recombinant human growth hormone: rhGH) trong vi cầu phân hủy được bởi vi sinh vật, sau khi tiêm, giải phóng rhGH chậm trong khoảng thời gian dài. Tốt hơn,

nếu việc phân phối được thực hiện qua đường trong bắp (i.m.) và/hoặc qua đường dưới da (s.c.) và/hoặc qua đường trong tĩnh mạch (i.v.).

Tác nhân, thuốc, hợp chất, dược phẩm và kit theo sáng chế có thể được sử dụng nhờ thiết bị cấy phẫu thuật để giải phóng dược chất trực tiếp đến vị trí yêu cầu. Ví dụ, Vitrasert giải phóng ganciclovir trực tiếp vào mắt để điều trị bệnh viêm võng mạc do CMV. Việc dùng trực tiếp chất độc này tới vị trí bệnh đạt được tác dụng điều trị mà không có tác dụng phụ toàn thân đáng kể của dược chất.

Tốt hơn, nếu thuốc và/hoặc dược phẩm theo sáng chế là liều đơn vị chứa liều hoặc đơn vị hằng ngày, liều nhỏ hằng ngày hoặc phần thích hợp của nó, của thành phần hoạt tính.

Tác nhân, thuốc, hợp chất, dược phẩm và kit theo sáng chế thường được dùng theo đường ngoài đường tiêu hóa bất kỳ, ở dạng dược phẩm chứa (các) thành phần hoạt tính, tùy ý ở dạng muối cộng axit, hoặc cộng bazơ, hữu cơ hoặc vô cơ không độc, ở dạng liều dược dụng. Tùy theo chứng rối loạn và bệnh nhân cần điều trị cũng như đường dùng, dược phẩm có thể được dùng ở các liều khác nhau.

Để điều trị cho người, tác nhân, thuốc, hợp chất, dược phẩm và kit theo sáng chế có thể được dùng một mình, song thường được dùng kết hợp với tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang thích hợp được chọn theo đường dùng dự tính và thực hành dược chuẩn.

Tác nhân, thuốc, hợp chất, dược phẩm và kit theo sáng chế có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, qua đường trong tĩnh mạch, qua đường trong động mạch, qua đường trong màng bụng, qua đường trong tủy, qua đường trong bắp hoặc qua đường dưới da, hoặc chúng có thể được dùng nhờ kỹ thuật truyền dịch. Chúng được dùng tốt nhất ở dạng dung dịch nước vô trùng mà có thể chứa các chất khác, ví dụ, các muối vừa đủ hoặc glucoza để làm cho dung dịch trở nên đẳng trương với máu. Các dung dịch nước này có thể được đệm một cách thích

hợp (tốt hơn là đến độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 9), nếu cần. Việc bào chế được phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thích hợp trong điều kiện vô trùng là dễ dàng thực hiện được nhờ các kỹ thuật bào chế chuẩn được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ.

Thuốc và dược phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm các dung dịch tiêm vô trùng chứa nước và không chứa nước mà có thể chứa chất chống oxy hóa, chất đệm, chất ức chế vi khuẩn và chất tan để làm cho chế phẩm đẳng trương với máu của thể nhận dự tính; và các huyền phù vô trùng chứa nước và không chứa nước mà có thể chứa chất tạo huyền phù và chất làm đặc. Thuốc và dược phẩm có thể chứa trong vật đựng liều đơn vị hoặc nhiều liều, ví dụ, ampun và lọ nhỏ bịt kín, và có thể được bảo quản trong điều kiện làm khô ở nhiệt độ thấp (đông khô) mà chỉ cần thêm chất mang lỏng vô trùng, ví dụ, nước để tiêm, ngay trước khi dùng. Các dung dịch và huyền phù tiêm tùy ứng có thể bào chế được từ bột, hạt côm và viên nén vô trùng thuộc loại đã được mô tả.

Để dùng ngoài đường tiêu hóa cho người, mức liều hằng ngày của tác nhân, thuốc và dược phẩm theo sáng chế thường nằm trong khoảng từ 1µg đến 10mg/người trưởng thành/ngày dùng trong liều duy nhất hoặc các liều chia nhỏ. Bác sỹ trong trường hợp bất kỳ sẽ quyết định liều lượng thực tế thích hợp nhất cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ và nó thay đổi theo độ tuổi, thể trọng và đáp ứng của bệnh nhân cụ thể. Tất nhiên, có các trường hợp riêng trong đó giới hạn liều cao hay thấp sẽ được đánh giá và chúng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thông thường, thuốc, dược phẩm và kit theo sáng chế sẽ chứa tác nhân theo sáng chế ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2mg/ml đến 150mg/ml hoặc nằm trong khoảng từ 2mg/ml đến 200mg/ml. Theo phương án được ưu tiên, thuốc, dược phẩm và kit theo sáng chế sẽ chứa tác nhân theo sáng chế ở nồng độ 10mg/ml.

Nói chung, ở người, việc dùng ngoài đường tiêu hóa đối với tác nhân, thuốc, hợp chất, dược phẩm và kit theo sáng chế là đường được ưu tiên, là thích hợp nhất.

Để dùng trong thú y, tác nhân, thuốc, hợp chất, dược phẩm và kit theo sáng chế được dùng dưới dạng chế phẩm chấp nhận được thích hợp theo thực hành thú y bình thường và bác sỹ thú y sẽ quyết định chế độ liều và đường dùng thích hợp nhất cho động vật cụ thể.

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa các muối cộng axit hoặc bazơ được dùng của các gốc liên kết polypeptit theo sáng chế. Các axit dùng để điều chế muối cộng axit được dùng của các hợp chất bazơ nêu trên hữu ích theo sáng chế là các axit tạo ra các muối cộng axit không độc, tức là các muối chứa các anion được dùng, như các muối hydroclorua, hydrobromua, hydroiodua, nitrat, sulphat, bisulphat, phosphat, phosphat axit, axetat, lactat, xitrat, xitrat axit, tartrat, bitartrat, succinat, maleat, fumarat, gluconat, sacarat, benzoat, metansulphonat, etansulphonat, benzensulphonat, *p*-toluensulphonat và pamoat [*tức là* 1,1'-metylen-bis-(2-hydroxy-3 naphthoat)], và các muối khác.

Các muối cộng bazơ được dùng cũng có thể được sử dụng để tạo ra các dạng muối được dùng của các tác nhân (*tức là* kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó) theo sáng chế.

Các bazơ hóa học có thể được sử dụng làm chất phản ứng để điều chế các muối bazơ được dùng của các tác nhân theo sáng chế mà có bản chất axit là các bazơ tạo muối bazơ không độc với các hợp chất này. Các muối bazơ không độc như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các muối được tạo ra từ các cation được dùng như cation kim loại kiềm (*ví dụ*, kali và natri) và cation kim loại kiềm thổ (*ví dụ*, canxi và magie), amoni hoặc muối cộng amin hòa tan trong nước như N-metylglucamin-(meglumin), và alkanolamoni bậc thấp và các muối bazơ khác của các amin hữu cơ được dùng, và các chất tương tự.

Tác nhân và/hoặc gốc liên kết polypeptit theo sáng chế có thể được làm đông khô để bảo quản và được hoàn nguyên trong chất mang thích hợp trước khi dùng. Phương pháp làm đông khô thích hợp bất kỳ (ví dụ, sấy phun, sấy bánh) và/hoặc kỹ thuật hoàn nguyên có thể được sử dụng. Chuyên gia trong lĩnh vực này biết rằng việc làm đông khô và hoàn nguyên có thể dẫn đến thay đổi mức độ hao hụt hoạt tính kháng thể (ví dụ, với các globulin miễn dịch thông thường, kháng thể IgM có mức hao hụt hoạt tính lớn hơn so với kháng thể IgG) và mức sử dụng có thể được điều chỉnh để bù lại. Theo một phương án, gốc liên kết polypeptit đông khô (được làm khô ở nhiệt độ thấp) hao hụt hoạt tính của nó (trước khi đông khô) không quá 20%, hoặc không quá 25%, hoặc không quá 30%, hoặc không quá 35%, hoặc không quá 40%, hoặc không quá 45%, hoặc không quá 50% khi được hydrat hóa lại.

Tốt hơn, nếu sáng chế đề xuất kháng thể, hợp chất, dược phẩm, kit, sử dụng hoặc phương pháp trong đó lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó nằm trong khoảng từ 0,0001mg/kg đến 50mg/kg kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó.

Như được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ, lượng chính xác của hợp chất có thể thay đổi tùy theo hoạt tính đặc hiệu của nó. Liều lượng thích hợp có thể chứa lượng định trước của thành phần hoạt tính tính được để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn. trong phương pháp và sử dụng để sản xuất dược phẩm theo sáng chế, lượng hữu hiệu điều trị của thành phần hoạt tính được đề xuất. Lượng hữu hiệu điều trị có thể được xác định bởi nhân viên thú y hoặc y tế trên cơ sở các đặc điểm của bệnh nhân, như độ tuổi, thể trọng, giới tính, tình trạng bệnh lý, biến chứng, các bệnh khác, v.v., như đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp in vitro để làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của enzym TG2, phương pháp này bao gồm việc sử dụng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của

sáng chế, hoặc polynucleotit theo sáng chế, hoặc hợp chất hoặc kit theo sáng chế, cho mẫu chứa TG2.

“Mẫu” có thể là mẫu bất kỳ thu được từ nguồn thích hợp, ví dụ, động vật có vú. Ví dụ, mẫu có thể là mẫu mô hoặc mẫu tế bào chứa TG2. Mô được lấy làm ví dụ bao gồm mô thu được từ não bệnh nhân, đường dạ dày-ruột, phổi, tụy, gan, da, thận, mắt, tim, mạch máu, hạch bạch huyết, tủy sống, xương và cơ trơn.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm giảm hoặc ức chế hoạt tính enzym TG2 ở cá thể cần điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, cho cá thể này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, để sản xuất được phẩm dùng để làm giảm hoặc ức chế hoạt tính enzym TG2 ở cá thể cần điều trị.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp in vitro để làm giảm hoặc ức chế hoạt tính của enzym TG2, phương pháp này bao gồm việc sử dụng polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ của sáng chế, cho mẫu chứa TG2, ví dụ, mẫu mô hoặc mẫu tế bào chứa TG2.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, hoặc hợp chất theo sáng chế chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước biểu hiện polynucleotit theo sáng chế, hoặc nuôi cấy dòng tế bào chủ ổn định theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với protein transglutaminaza, phương pháp này

bao gồm bước chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với polypeptit chứa vùng lõi/vùng xúc tác của transglutaminaza nhưng không chứa phần thân hoặc vùng kẹp của transglutaminaza.

Sáng chế đề xuất phương pháp chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, hoặc hợp chất chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, phương pháp này bao gồm bước chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với trình tự polypeptit chứa trình tự axit amin gồm các axit amin 143 đến 473 của TG2 của người hoặc đoạn của nó.

Theo một phương án, phương pháp này có thể được thực hiện sử dụng biểu hiện thực khuẩn thể kháng thể. Tốt hơn, nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó là kháng thể ức chế mà ức chế hoạt tính xúc tác của protein transglutaminaza.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với protein transglutaminaza, phương pháp này bao gồm việc cho động vật không phải người sử dụng hợp chất chứa:

- i) polypeptit chứa vùng lõi/vùng xúc tác của transglutaminaza nhưng không chứa phần thân hoặc vùng kẹp của transglutaminaza, hoặc đoạn của nó; và, tùy ý,
- ii) tá dược.

Dự tính rằng polypeptit chứa vùng lõi/vùng xúc tác của transglutaminaza nhưng không chứa phần thân hoặc vùng kẹp của transglutaminaza sẽ chứa bộ ba xúc tác được mô tả trên đây, và tùy ý, cũng như vị trí liên kết với GTP của protein transglutaminaza.

Phương pháp này còn bao gồm bước chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó trên cơ sở sự liên kết chọn lọc của nó với protein transglutaminaza.

Sáng chế đề xuất phương pháp chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với protein transglutaminaza, phương pháp này bao gồm bước chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với trình tự polypeptit chứa trình tự axit amin gồm các axit amin 143 đến 473 của TG2 của người hoặc đoạn của nó.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên bao gồm dùng cho động vật không phải người hợp chất chứa:

- i) trình tự polypeptit chứa trình tự axit amin gồm các axit amin 143 đến 473 của TG2 của người hoặc đoạn của nó; và tùy ý,
- ii) tá dược.

Phương pháp này còn bao gồm bước chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó trên cơ sở sự liên kết chọn lọc của nó với TG2, ví dụ, TG2 của người.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó thu được bằng phương pháp bất kỳ nêu trên để sản xuất hoặc chọn kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó.

Thuật ngữ “chất phụ trợ” bao gồm tác nhân được lý hoặc miễn dịch mà tăng cường đáp ứng miễn dịch của thể nhận với polypeptit theo sáng chế. Các chất phụ trợ miễn dịch được thêm vào vacxin để kích thích đáp ứng của hệ miễn dịch với kháng nguyên đích, mà chính chúng không tạo ra tính miễn dịch. Ví dụ về chất phụ trợ bao gồm nhũ tương dầu, hợp chất vô cơ như muối nhôm, ví dụ, nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, hợp chất hữu cơ như Squalene, virosom, hoặc hợp chất thích hợp khác bất kỳ được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ.

Sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập chứa:

- i) trình tự polypeptit gồm các axit amin 143 đến 473 của TG2 của người;
- ii) trình tự polypeptit gồm các axit amin 304 đến 326 của TG2 của người;

iii) trình tự polypeptit gồm các axit amin 351 đến 365 của TG2 của người;
 iv) trình tự polypeptit gồm các axit amin 450 đến 467 của TG2 của người;
 hoặc
 đoạn, dẫn xuất hoặc polypeptit tương tự của nó.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit theo khía cạnh trên đây.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó dùng để điều trị tình trạng bệnh lý liên quan đến hoạt tính TG2 hầu như được mô tả trong bản mô tả này viện dẫn đến phần mô tả và hình vẽ.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó hầu như được mô tả trong bản mô tả này viện dẫn đến phần mô tả và hình vẽ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các dạng số ít chung chung bao gồm cả số nhiều, trừ khi có quy định khác. Do đó, ví dụ, "kháng thể" bao gồm nhiều kháng thể như vậy và "liều lượng" bao gồm một hoặc nhiều liều hoặc các đương lượng của nó được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ, v.v..

Tất cả các tài liệu được đưa vào bản mô tả này đều là theo cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phát triển kháng thể ức chế TG2 thích hợp để sử dụng điều trị ở người có nhận dạng 3 epitop ức chế đặc hiệu

Transglutaminaza typ 2 (TG2) xúc tác quá trình tạo liên kết ϵ -(γ -glutamyl)-lysine isopeptit giữa các peptit hoặc protein liên kết bao gồm các peptit hoặc protein chứa chất nền ngoại bào (extracellular matrix: ECM). TG2 ngoại bào gia tăng dẫn đến thúc đẩy sự lắng đọng ECM và làm giảm sự thanh thải dẫn đến sự tạo mô sẹo

và xơ hóa. Nó cũng liên quan đến bệnh Celiac, rối loạn thoái hóa thần kinh và một số bệnh ung thư. Mặc dù đã có nhiều hợp chất được phát triển để ức chế transglutaminaza, song chưa có hợp chất nào trong số đó đặc hiệu với TG2, ức chế tất cả các transglutaminaza ở mức độ nhất định. Mặc dù các hợp chất này cho phép các nghiên cứu chứng minh khái niệm về vai trò của TG2 trong các bệnh lý này, song sự thiếu tính đặc hiệu đồng dạng đã ngăn cản ứng dụng của chúng ở người. Để giải quyết vấn đề này, các tác giả sáng chế đã phát triển kháng thể đặc hiệu với TG2 ái lực cao mà có thể chỉ ức chế hoạt tính TG2.

Protein tái tổ hợp gồm các axit amin 143 đến 473 của lõi TG2 của người đã được sản xuất trong *Escherichia coli*, tái gấp nếp và tiêm 100µg vào 4 chuột nhắt với các lần nhắc lại ở 2, 5, 7 và 10 tuần. Thu hồi lách 4 ngày sau lần nhắc lại cuối cùng và cho tế bào lách dung hợp với tế bào u tủy Sp2/0-Ag-14. Bảy lần dịch nổi tế bào lai cho tính đặc hiệu với TG2. Các dịch nổi tế bào lai này được sàng lọc về khả năng chúng ức chế hoạt tính TG2 trong thử nghiệm hợp nhất Putresxin chứa 100µg TG2. Mười dịch nổi đặc hiệu với TG2 là có tính ức chế. Tiếp theo, chúng được nhân dòng kép. Bằng cách biểu hiện thể thực khuẩn để sàng lọc ngân hàng đoạn TG2, mỗi kháng thể được lập bản đồ đối với epitop chính xác trong vùng lõi TG2 và 3 epitop ức chế riêng biệt được xác định. Lượng kháng thể làm giảm hoạt tính từ 100ng TG2 xuống 50% được xác định.

Hai kháng thể hữu hiệu nhất, AB1 và DC1, liên kết với các axit amin 304 đến 327 và có IC_{50} $1,1 \times 10^{-5}$ mg/ml IgG/ng TG2 tái tổ hợp. Việc sử dụng AB1 & DC1 có khả năng ức chế thành công TG2 trong tế bào Hep2G của người và TG2 ngoại bào trong tế bào HK-2 của người khi được sử dụng trong môi trường nuôi cấy.

Do đó, việc gây miễn dịch cho chuột nhắt bằng vùng lõi TG2 cho phép tạo ra các kháng thể đơn dòng hướng đích là các epitop chưa được thông báo trước đó trong lõi xúc tác này một cách ngạc nhiên. Các kháng thể là đặc hiệu, ức chế hữu hiệu hoạt tính TG2 và là thích hợp để sử dụng *in vivo*.

Vật liệu và phương pháp

Sản xuất vùng lõi xúc tác của transglutaminaza 2

Vùng lõi xúc tác của TG2 của người (các gốc Cys143 – Met 473 của TG2) được biểu hiện, tái gấp nếp và tinh chế để cho phép gây miễn dịch ở chuột nhắt. Vùng lõi xúc tác (mỗi PCR có nghĩa GCG CGC GCT AGC TGC CCA GCG GAT GCT GTG TAC CTG GAC, đối nghĩa GCG CGC AAG CTT CAT CCC TGT CTC CTC CTT CTC GGC CAG) được nhân dòng trong vector biểu hiện pET21a(+) và được biểu hiện dưới dạng thể vùi không hòa tan ở chủng *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (Agilent Technologies). Nói vắn tắt, 50µl tế bào pLysS BL21 cạnh tranh (DE3) đã được chuyển nhiễm bằng 1µl plasmit biểu hiện (30ng/µl) và cấy lên đĩa thạch LB chứa các chất kháng sinh chọn lọc (100µg/ml ampicilin, 34µg/ml cloramphenicol) và 1% glucoza và ủ qua đêm ở 37°C. Thu khuẩn lạc đơn để cấy 10ml môi trường LB mới chứa 100µg/ml ampicilin, 34µg/ml cloramphenicol và 1% glucoza trong bình ủ lắc ở 37°C và ở 200 rpm. Sau khi để sinh trưởng qua đêm, chuyển giống vào 100ml môi trường 2xYT với 1% glucoza và cho sinh trưởng đến OD_{600nm} 0,8 và tiếp theo chuyển sang 1L môi trường 2xYT cho đến khi OD_{600nm} đạt tới 0,8. Sau 4 giờ cảm ứng bằng 1mM IPTG để kích thích biểu hiện, đóng viên và làm tan vi khuẩn bằng sóng âm trong dung dịch đệm A (10mM Tris; 1mM EDTA; 10mM DTT; 1mM PMSF; 0,5mg/ml viên nén ức chế proteaza của lysozym (Roche), pH 8,0). Thu hoạch thể vùi bằng cách ly tâm ở 40,000 x g và rửa 3 lần trong dung dịch đệm rửa B (50mM Tris; 1mM EDTA; 10mM DTT; 2% natri deoxycholat, pH 8,0) trước khi rửa lần cuối bằng nước đã khử ion.

Hòa thể vùi vào 3,5ml dung dịch đệm hòa tan (40mM Tris-HCl, 8M ure, và 10mM DTT pH 12) và tái gấp nếp trong khoảng thời gian 16 giờ trong dung dịch đệm tái gấp nếp (40mM Tris HCl; 150mM NaCl; 20% glyxerol; 5mM xystein; 0,5mM xystin pH 8) ở 4°C trong tối.

Nạp thể vùi hòa tan lên cột Nickel 1ml. Nói vắn tắt, cột này được cân bằng trước bằng dung dịch đệm liên kết (40mM Tris; 300mM NaCl; 10mM Imidazol) và phun thể vùi lên. Rửa toàn bộ cột (40mM Tris; 300mM NaCl; 30mM imidazol). Giải hấp protein tái tổ hợp bằng dung dịch đệm imidazol nồng độ cao (40mM Tris; 300mM NaCl; 300mM imidazol). Gom các phân đoạn chứa protein giải hấp được và thẩm tách theo dung dịch đệm thích hợp (40mM Tris; 300mM NaCl pH 8). Đánh giá protein bằng thử nghiệm protein Bradford.

Nuôi cấy tế bào HepG2 & dịch tan bào

Tế bào HepG2 được Richard Ross (University of Sheffield) cung cấp. Tế bào được sinh trưởng bình thường ở 37°C trong không khí có độ ẩm 95% và 5% CO₂ trong DMEM/4,5g/l glucoza có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (foetal calf serum: FCS), 100 IU penixilin và 100µg/ml streptomycin, 2mM l-glutamin (đều từ GIBCO). Cấy 2 triệu tế bào lên đĩa 10cm và để sinh trưởng trong 48 giờ. Làm tan tế bào trong 250µl dung dịch đệm STE (0,32M sucroza, 5mM Tris, 1mM EDTA) chứa các chất ức chế proteaza Phenylmetylsulphonyl florua (1mM), benzamidin (5mM), và leupeptin (10µg/ml) và tác động sóng âm trên băng để tạo ra dịch tan bào dùng được cho thử nghiệm về hoạt tính TG2.

Tế bào thận người (Human Kidney 2: HK2):

Tế bào HK-2 (biểu mô ống đầu gần của thận) được mua từ trung tâm lưu giữ giống tế bào châu Âu ở đời 3. Tế bào được sinh trưởng bình thường ở 37°C trong không khí có độ ẩm 95% và 5% CO₂ trong môi trường không có huyết thanh tế bào sừng (KSFM, Gibco 17005-042) với L-glutamin có bổ sung EGF tái tổ hợp (0,1-0,2ng/ml) và dịch chiết tuyến yên của bò (20-30ug/ml). Để cấy chuyển, loại bỏ môi trường và rửa một lần bằng 1 x PBS trước khi trypsin hóa bằng 1ml 0,25% trypsin/EDTA (bình T75) trong 1 phút ở 37°C. Tế bào được tạo huyền phù lại trong 10ml KSFM và ly tâm ở 400 xg trong 1 phút. Loại bỏ môi trường và cấy tế bào vào KSFM (tỷ lệ 1:3 đến 1:5 là bình thường). Tế bào được dùng để thực nghiệm ở các đời 5-14. Tế bào thường sinh trưởng tốt đến mức nhập dòng 95%.

Nhuộm Coomassie và thẩm tách protein

Kiểm tra độ tinh sạch của protein tái tổ hợp bằng cách chạy 5µg protein thu hồi được trên gel biến tính polyacrylamit 10% (w/v) và nhuộm bằng dung dịch thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue R (Sigma).

Việc xác nhận quá trình tổng hợp protein lõi của TG2 cũng như TG2 và mức phản ứng của lõi TG2 sau khi gây miễn dịch đều được đo bằng cách thẩm tách protein. Nạp protein tái tổ hợp (10 đến 80ng) lên gel polyacrylamit biến tính hoặc không biến tính 10% (w/v) và chuyển sang màng PVDF (Transblot SD, Biorad, UK) trong 1 giờ ở 100 V. Phong bế màng qua đêm ở 4°C bằng 3% (w/v) BSA trong TBS/0,1% (v/v) Tween 20. Tiếp theo, rửa màng và dò bằng kháng thể đơn dòng chuột nhất kháng transglutaminaza trong TBS/Tween chứa 1% BSA. Để chứng minh protein lõi của TG2 tái tổ hợp và dùng làm đối chứng dương tính về sàng lọc kháng thể, sử dụng kháng thể thương mại Cub7402 (neomarkers) ở độ pha loãng 1:1000. Phát hiện sự liên kết của kháng thể sơ cấp bằng kháng thể thứ cấp liên kết với HRP kháng chuỗi gama chuột nhất (Sigma, Poole, UK). Quan sát các băng bằng hệ phát hiện phát quang hóa học ECL (Amersham, UK).

Gây miễn dịch cho chuột nhất và dung hợp

Gây miễn dịch cho mỗi chuột nhất bằng hỗn hợp gồm 50µg kháng nguyên (pha đến thể tích 50µl bằng PBS vô trùng) và 50µl tá dược Freund đầy đủ. Bốn chuột nhất BALB/C (8-12 tuần tuổi) được tiêm. Hai lần gây miễn dịch nhắc lại được thực hiện (ngày 14 và ngày 35) bằng cách sử dụng quy trình tương tự ngoại trừ ở chỗ tá dược Freund không đầy đủ được sử dụng cho các lần tiêm này. Vào ngày 45, lấy máu thử nghiệm từ tất cả các chuột và đánh giá khả năng phản ứng với TG2 bằng ELISA.

Hai chuột có đáp ứng tốt nhất được tiếp tục nhắc lại bằng mũi tiêm 100µg protein lõi (trong PBS) trộn với tá dược Freund không đầy đủ ở 10 tuần, và 4 ngày sau đó, mổ chuột để thu tế bào lách và dung hợp với tế bào u tủy Sp2/0-Ag-14. Từ

tế bào dung hợp này, khoảng 1000 lỗ đã được sàng lọc về khả năng phản ứng với protein TG2 bằng ELISA.

Sàng lọc tính đặc hiệu với TG2

Môi trường được tạo điều kiện hoặc IgG tinh chế được được thử nghiệm về khả năng phản ứng với các thành viên thuộc họ transglutaminaza. Khả năng mỗi kháng thể liên kết với mỗi transglutaminaza (TG1, TG2, TG3, TG5, TG7 và Yếu tố XIIIa; đều từ Zedira) được xác định bằng thử nghiệm liên kết với đĩa. Bao đĩa vi chuẩn độ (Costar, Cambridge, UK) bằng TG tái tổ hợp (Zedira, Darmstadt, Germany) trong 50µl dung dịch đệm bicarbonat/cacbonat 0,1M (pH 9,6) qua đêm ở 4°C. Phong bế đĩa trong 2 giờ ở 37°C bằng 200µl PBS chứa 3% w/v BSA. Rửa đĩa ba lần bằng PBS chứa 0,05% Tween 20 (dung dịch đệm rửa) và thêm 100µl môi trường được tạo điều kiện pha loãng (độ pha loãng 1:5 đến 1:20) mAb kháng lõi xúc tác TG2. Ủ đĩa trong 1 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng. Lặp lại bước rửa và thêm peroxidaza cải ngựa kháng chuỗi gama chuột nhắt (1:5000) trong PBS chứa 0,05% Tween 20 (v:v) và 1% BSA (w:v) (Sigma, Poole UK) trong 1 giờ. Sau 8 lần rửa, sự liên kết được thực hiện với 50µl cơ chất 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin. Dập tắt phản ứng bằng cách thêm 25µl H₂SO₄ 0,1M và xác định độ hấp thụ ở 450nm.

Sàng lọc về sự ức chế TG2

Hoạt tính TG được đo bằng cách hợp nhất ³H-Putresxin phụ thuộc vào Ca²⁺ vào N',N'-dimethylcasein. Ủ sơ bộ TG2 của người tái tổ hợp (100ng) trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng với mẫu thử nghiệm (môi trường được tạo điều kiện hoặc IgG tinh chế được) trước khi bắt đầu phản ứng. Thêm 25µl hỗn hợp phản ứng (5µl CaCl₂ 25mM, 5µl dithiothreitol 40mM, 5µl hỗn hợp ³H-Putresxin, và 10µl N',N'-dimethylcasein 25mg/ml (thay CaCl₂ 25mM bằng EDTA 100mM đối với đối chứng không phải enzym) vào để bắt đầu phản ứng và ủ mẫu ở 37°C trong 1 giờ. Chấm các phần mẫu 10µl lên mảnh giấy lọc 3mM Whatman và nhúng ngay vào axit tricloaxetic (TCA) 10% lạnh để làm kết tủa các protein liên kết ngang thường ở thời điểm 0, 10, 30 và 60 phút trong phản ứng. Sau 3 lần rửa toàn bộ trong TCA 5% lạnh, tiếp theo 3 lần rửa trong etanol 95% lạnh, Đếm giấy lọc làm khô bằng

không khí trong 2ml chất lỏng nhấp nháy (Ultima Gold Packard, Perkin Elmer). Tính tốc độ phản ứng. 1 đơn vị TG tương đương với 1nmol Putresxin được hợp nhất/giờ ở 37°C.

Sử dụng quy trình tương tự để đánh giá mức độ ức chế TG trong dịch tan bào bằng cách thay 25µl protein tái tổ hợp bằng 25µl dịch tan bào.

Nhân dòng tế bào lai & tinh chế kháng thể từ môi trường được tạo điều kiện

Việc phân lập kháng thể đơn dòng được thực hiện từ các tế bào lai ức chế đã được nhân dòng. Các lỗ tế bào lai nhận dạng được ban đầu được nhân dòng kép nhờ quy trình pha loãng giới hạn (để đảm bảo độ ổn định và độ đơn dòng) (Loirat MJ et al, 1992) với các tiểu dòng được thử nghiệm như được mô tả bằng ELISA và sàng lọc hoạt tính. Các dòng sản xuất kháng thể được chọn được sinh sản trong các bình 25 và 75 cm² và nuôi bằng môi trường không có huyết thanh (Hyclone, Fisher Scientific, Loughborough, UK). Khi tế bào đã được sinh sản, thu gom môi trường được tạo điều kiện để tinh chế IgG bằng sắc ký ái lực trên cột protein G (Amersham Life Sciences). Pha loãng môi trường được tạo điều kiện trong thể tích tương đương của natri phosphat 10mM, pH 7,25, và nạp lên cột protein G ở lưu tốc 1,0 đến 2,0ml/phút. Rửa toàn bộ cột bằng 10 thể tích cột cùng dung dịch đệm. Giải hấp kháng thể được liên kết bằng dung dịch glyxin (0,1M; pH 2,7) và trung hòa bằng 0,15% thể tích 1M Tris / HCl pH 9. Thẩm tách mẫu theo 1000 thể tích dung dịch nước muối đệm phosphat trong 24 giờ với 2 lần thay dung dịch đệm.

Biểu hiện thể thực khuẩn và lập bản đồ epitop kháng thể

Trình tự mã hóa có chiều dài đầy đủ của TG2 của người được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các môi sau; TG2-FL-1 5'

ATGGCCGAGGAGCTGGTCTTAGAGA 3' và TG2-FL-2 5'

GGCGGGGCCAATGATGACATTCCGGA 3'. Sản phẩm khuếch đại dài khoảng 2 kb được tinh chế bằng Quiagen PCR cleanup kit (Quiagen) và cắt thành các đoạn ngẫu nhiên nhờ RQ DNase I (Promega). Hỗn hợp phản ứng RQ DNase được xử lý bằng đoạn Klenow ADN polymeraza I và ADN polymeraza của T4 để tạo ra các

đoạn đầu bằng. Tinh chế các đoạn này bằng điện di gel, và các đoạn trong giới hạn 50–150 bp được chiết bằng Qiagen gel recovery kit (Qiagen, Crawley UK).

Vector biểu hiện thể thực khuẩn được cắt bằng EcoRV, xử lý bằng phosphatase kiềm và tinh chế bằng điện di gel và Qiagen gel recovery kit. Gắn 100ng vector tinh chế được với 15ng đoạn đầu bằng điều chế được của ADN hỗ trợ TG2 của người. Sản phẩm gắn được biến nạp điện vào tế bào điện cạnh tranh XL1-Blue (Agilent Technologies) và ngân hàng đoạn này liên kết với thể thực khuẩn giúp VCSM13 (Agilent). Kết tủa hạt thể thực khuẩn bằng glucoza 2% và PEG 6000 4% và tạo huyền phù lại trong PBS 0,1% Tween 20 (v:v) 1% BSA (w:v).

Việc lập bản đồ epitop được thực hiện bằng quy trình sau. Phủ lỗ ELISA qua đêm ở 4°C bằng 30µg kháng thể đơn dòng trong 100µl dung dịch đệm phủ. Rửa lỗ được phủ bằng PBS/Tween và phong bế bằng 400µl BSA 3% trong PBS (w:v) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Thêm khoảng 10^{10} hạt thể thực khuẩn (100µl) vào lỗ đã phong bế và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Rửa lỗ 8 lần bằng 400µl PBS/0,5% Tween (v:v) và giải hấp thể thực khuẩn dính bám bằng glyxin 0,2M pH 2,2. Dùng thể thực khuẩn đã giải hấp để gây nhiễm 1ml tế bào chủ XL1-Blue và cấy mẫu lên đĩa thạch LB (60µg/ml ampicilin, 15µg/ml tetracyclin), thêm phần trên cơ sở còn lại vào 100ml môi trường LB (60µg/ml ampicilin, 15µg/ml tetracyclin) và để sinh trưởng qua đêm ở 37°C trong bình ủ lắc ở 200 rpm để tạo ra ngân hàng đoạn đã chọn được làm giàu. Lập lại quy trình làm giàu này 5 lần và chọn các khuẩn lạc ngẫu nhiên từ vòng cuối để xác định trình tự.

Xác định trình tự vùng VL của kháng thể

Môi

Môi có nghĩa cho chuỗi nặng – Cặp môi FR1 suy biến cao, MH1 và MH2 (Wang et al 2000), được tổ hợp với 3 môi vùng ổn định để khuếch đại các gen VH.

MH1 5' CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGTC 3'

MH2 5'CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3'

Mouse-G1 5' AGGCGCAGTACTACAATCCCTGGGCACAATTTTCTTGTCCACC 3'

Mouse-G2a 5' AGGCGCAGTACTACAGGGCTTGATTGTGGGCCCTCTGGG 3'
 Mouse-G2b 5' AGGCGCAGTACTACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGGCCCG 3'

Mỗi Kappa

VK1 5' CGCTGCGAGCTCGATATTGTGATGACBCAGDC 3'
 VK2 5' CGCTGCGAGCTCGAGRTTKTGATGACCCARAC 3'
 VK3 5' CGCTGCGAGCTCGAAAATGTGCTCACCCAGTC 3'
 VK4 5' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAGTC 3'
 VK5 5' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACACAGAC 3'
 VK6 5' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGCTSACYCARTC 3'
 VK7 5' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACYCARTC 3'
 VK8 5' CGCTGCGAGCTCCAAATTGTTCTCACCCAGTC 3'
 K-CONST 5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA 3'

Chiết ARN tổng số từ tế bào lai đơn dòng ($\sim 10^5$ tế bào) bằng Trizol (GIBCO) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và định lượng bằng A_{260nm} . Tổng hợp ADN bổ trợ bằng ImProm II transcriptaza ngược (Promega) và mỗi hexame ngẫu nhiên. Hỗn hợp phản ứng là như sau; 1 μ g ARN tổng số, 0,1 μ g oligo (dN)₆, 12 μ l dung dịch đệm ImProm II, 1 μ l dNTP 10mM (Promega), 8 μ l MgCl₂ 25mM, 4 μ l ImProm II transcriptaza ngược (Promega), H₂O đã xử lý DEPC đến tổng thể tích phản ứng 60 μ l. Gia nhiệt hỗn hợp ARN và mỗi ngẫu nhiên đến 70°C trong 10 phút và tiếp theo đặt lên băng. Thêm các thành phần phản ứng còn lại vào và tiếp theo ủ ở 20°C trong 10 phút, tiếp theo ở 40°C trong 40 phút nữa.

Việc khuếch đại các gen VH và VK được thực hiện nhờ GoTaq polymeraza (Promega). Mỗi 50 μ l hỗn hợp phản ứng chứa: ADN bổ trợ 2 μ l, 20 pmol mỗi có nghĩa và mỗi đối nghĩa, 10 μ l dung dịch đệm phản ứng GoTaq, 1 μ l dNTP 10mM, 5 μ l MgCl₂ 25mM, 2,5 u GoTaq polymeraza, H₂O đến thể tích cuối 50 μ l. Các phản ứng được lập chu kỳ 35 lần bằng cách sử dụng các điều kiện sau: biến tính ban đầu 95°C 2 phút; biến tính 94°C 1 phút, ủ 56°C 1 phút, kéo dài 72°C 1 phút. Phân tích sản phẩm PCR bằng điện di gel và nhân dòng bằng kit tách dòng đơn tính TOPO TA (Invitrogen). Các đoạn ngẫu nhiên của sản phẩm PCR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn để xác định trình tự.

Đo hoạt tính TG ngoại bào

Hoạt tính TG ngoại bào được đo bằng ELISA tế bào được cải biến. Thu hoạch tế bào biểu mô HK-2 bằng cách sử dụng EDTA 0,1M hoặc 0,25% trypsin/EDTA và cấy ở mật độ 8×10^4 tế bào/lỗ trong môi trường không có huyết thanh trên đĩa 96 lỗ đã phủ qua đêm 100 μ l/lỗ fibronectin (5 μ g/ml trong Tris-HCl 50mM pH 7,4) (Sigma, Poole UK). Để các tế bào gắn kết với nhau trong 2,5 giờ ở 37°C với sự có mặt của biotin cadaverin 0,1mM [axit N-(5 amino pentyl biotinamit) trifloaxetic] (Molecular Probes, Eugene OR, USA). Rửa đĩa hai lần bằng 3mM EDTA/PBS và loại bỏ tế bào bằng 0,1% (w/v) deoxycholat trong 5mM EDTA/PBS. Thu gom dịch nổi và dùng để xác định protein. Rửa đĩa bằng 50mM Tris-HCl và hợp nhất biotin cadaverin bằng cách sử dụng 1:5000 extravidin HRP (Sigma, Poole, UK) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng tiếp theo là cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin). Dập tắt phản ứng bằng 50 μ l H₂SO₄ 2,5M và đo độ hấp thụ ở 450nm.

Đo mức collagen bằng cách đánh dấu phóng xạ

Cấy tế bào ở mật độ $3,75 \times 10^6/10 \text{ cm}^2$ trên đĩa Petri hoặc 1×10^6 /lỗ của đĩa 6 lỗ. Đánh giá collagen ECM bằng cách đánh dấu 20 μ Ci ^3H prolin (1,0 mCi/ml, ICN). Thực hiện đánh dấu trong 72 giờ trong điều kiện nuôi cấy tế bào chuẩn. Sau khi đánh dấu, loại bỏ môi trường, rửa tế bào bằng PBS và loại bỏ bằng 2ml amoni hydroxit 0,25M trong 50mM Tris pH 7,4 ở 37°C trong 10 phút. Thu gom các phân đoạn hòa tan và xác định nồng độ protein bằng thử nghiệm axit bixinconic (bicinchoninic acid: BCA). Rửa toàn bộ đĩa bằng PBS có thể tích gia tăng trước khi hòa tan ECM với 2ml SDS 2,5% (w/v) trong 50mM Tris pH 6,8. Nạo vét đĩa để đảm bảo loại bỏ hết ECM và đo 200 μ l về hoạt tính phóng xạ bằng máy đếm nhấp nháy beta. Số nhấp nháy được hiệu chỉnh cho mỗi mg protein tế bào hòa tan và được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm của trị số đối chứng trung bình.

Tạo IgG Quark đã được phê chuẩn tái tổ hợp

Nhằm mục đích thực nghiệm, kháng thể dạng khảm của người-của chuột công từ trình tự Fv chuỗi đơn kháng thể của người kháng transglutaminaza typ II đã được tạo ra. Kháng thể này được ký hiệu là QPCDTGII (viết tắt là QCT), và trình tự của vùng biến đổi là có thể sử dụng trong WO 2006/100679A2.

Lớp phụ $\gamma 2a$ của chuột công được chọn cho các vùng ổn định của chuỗi nặng, loại bỏ vị trí glycosyl hóa để làm giảm khả năng phản ứng ADCC ở chuột công thử nghiệm. vùng ổn định của chuột công được chọn đối với chuỗi nặng là 013593 (Bruggemann, M. Gene **74**: 473-482 (1988); Bruggemann, M., Free, J., Diamond, A., Howard, J., Cobbold, S. and Waldmann, H. Proc. Natl. Acad. Sci USA **83**: 6075-6079 (1986)) from the Kabat database (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH National Technical Information Service, 1991)). Chuỗi nhẹ kappa là 013718 (Sheppard, H. W. and Gutman, G. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**: 7064-7068 (1981)) từ Kabat.

Nói vắn tắt, các trình tự mã hóa chuỗi nặng và chuỗi kappa được tạo ra bằng cách tổng hợp ADN (bộ codon được điều chỉnh cho hợp với chuyển dịch codon của động vật có vú).

Sản phẩm của quá trình tổng hợp gen chuỗi nặng được khuếch đại nhờ PCR bằng cách sử dụng các môi QCT_HindIII và QCT_H_rev. Cắt sản phẩm PCR này bằng HindIII và NgoMIV và gắn vào vector biểu hiện MRCT. Dòng vi khuẩn DH5 α cạnh tranh đã được biến nạp hóa học sản phẩm gắn được sàng lọc nhờ PCR bằng cách sử dụng các môi HCMVi và rat_gamma1. Ba dòng tạo ra sản phẩm PCR có kích thước dự đoán được xác định trình tự.

Sản phẩm của quá trình tổng hợp gen chuỗi kappa được khuếch đại nhờ PCR bằng cách sử dụng các môi QCT_HindIII và QCT_L_rev. Cắt sản phẩm PCR này bằng HindIII và PpuMI và gắn vào vector biểu hiện pKN100. Dòng vi khuẩn DH5 α cạnh tranh đã được biến nạp hóa học sản phẩm gắn được sàng lọc nhờ PCR

bằng cách sử dụng các môi HCMVi và rat_kappa. Ba dòng tạo ra sản phẩm PCR có kích thước dự đoán được xác định trình tự.

Vectơ biểu hiện kép cài vào mã hóa cả chuỗi nặng lẫn chuỗi kappa đã được tạo ra và được chuyển nhiễm vào tế bào HEK293T. Thu gom dịch nổi nuôi cấy tế bào từ hai lần chuyển nhiễm HEK293T quy mô lớn và tinh chế ái lực trên cột Protein L-agarose 1ml bằng hệ sắc ký ÄKTA Explorer, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đỉnh OD 280nm duy nhất giải hấp bằng IgG Elution Buffer, và được thẩm tách bằng hai lần thay PBS. Sản phẩm này được thử nghiệm cả bằng độ hấp thụ UV ở 280nm, lẫn bằng ELISA IgG_{2a} chuột cống. Tổng hiệu suất là khoảng 700µg (bằng OD_{280nm}); 303,5µg (bằng ELISA).

Làm cho kháng thể AB1 trở thành giống như của người

Cơ sở dữ liệu ADN bổ trợ của VH và VK của người

Các trình tự protein của các globulin miễn dịch của người và chuột nhất từ International Immunogenetics Database 2009¹⁰¹ và Kabat Database Release 5 of Sequences of Proteins of Immunological Interest (cập nhật mới nhất vào ngày 17-11-1999)¹⁰² được dùng để soạn thảo cơ sở dữ liệu về trình tự globulin miễn dịch của người trong việc sắp hàng Kabat. Cơ sở dữ liệu này chứa 10606 trình tự VH và 2910 trình tự VK.

Mô hình phân tử AB1

Mô hình tương đồng của các vùng biến đổi của kháng thể chuột nhất AB1 được tính bằng cách sử dụng chương trình Modeller¹⁰³ chạy tự động. Các tọa độ nguyên tử gồm 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb và 1MQK.pdb là các khuôn mẫu trình tự có mức tương đồng cao nhất lần lượt đối với Interface, VL và VH như xác định được bằng phân tích Blast đối với cơ sở dữ liệu cấu trúc pdb của kháng thể Accelrys. Các khuôn mẫu này được dùng để tạo ra 20 mô hình ban đầu, trong đó mô hình tốt nhất được lọc bằng cách lập mô hình mỗi vòng CDR với 3 khuôn mẫu vòng tốt nhất của nó.

Chọn khung (FW) hAB1

Chương trình phân tích trình tự, gibsSR, được dùng để chất vấn các cơ sở dữ liệu VH và VK với các trình tự protein VHc, VKc và VKc₁ của AB1 bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn chọn lọc khác nhau. Các gốc FW trong vòng 5Å của gốc CDR (định nghĩa Kabat) trong mô hình tương đồng của kháng thể chuột nhất AB1, được nhận dạng và gọi là các gốc “Đầu gần 5Å”.

AF062220 được chọn làm FW cho cấu trúc VHc của AB1 được làm cho giống như của người ban đầu. Bảng 1 thể hiện việc sắp hàng và mức tương đồng gốc của AF062220 với Ab1 của chuột. Bảng 2 thể hiện vỏ đầu gần 5Å của các trình tự. AF062260 chỉ có 1 đột biến soma cách xa gen VH dòng mầm của nó Z12347 (Bảng 3).

AY247656 được chọn làm FW cho cấu trúc VKc của AB1 được làm cho giống như của người ban đầu. Việc sắp hàng và mức tương đồng gốc với AB1 của chuột được thể hiện trong Bảng 4; Bảng 5 thể hiện vỏ đầu gần 5Å của các trình tự. Trình tự này có 5 đột biến soma cách xa gen VK dòng mầm của nó X93620 (Bảng 6).

AF193851 được chọn làm FW cho cấu trúc VKc₁ của AB1 ban đầu. Việc sắp hàng và mức tương đồng gốc với AB1 của chuột được thể hiện trong Bảng 7. Bảng 8 thể hiện vỏ đầu gần 5Å của các trình tự. Trình tự này không có đột biến soma cách xa gen VK dòng mầm của nó J00248 (Bảng 9).

ELISA liên kết

Tế bào HEK 293F đã được đồng chuyển nhiễm bằng tổ hợp của các vectơ chuỗi nhẹ được làm cho giống như của người khác nhau kết hợp với các vectơ chuỗi nặng được làm cho giống như của người khác nhau. TG2 của người tái tổ hợp được dùng để đo mức liên kết của kháng thể bằng ELISA. Kết quả chỉ ra rằng dạng chuỗi nặng RHA (Bảng 10), kết hợp với một trong hai dạng chuỗi nhẹ RKE

và RKJ (Bảng 11) (đại diện cho các dạng chuỗi nhẹ khác nhau được làm cho giống như của người) cho mức liên kết tối ưu (Fig. 16).

Dạng chuỗi nặng RHA là dạng ghép không được cải biến của các vùng CDR chuột nhất của kháng thể AB1 trên trình tự cho của người. Tuy nhiên, cả hai dạng chuỗi nhẹ RKE và RKJ, đều có cùng hồi biến gốc đầu gần 5Å duy nhất, F72 (đánh số Kabat– thể hiện bằng màu xanh). Hồi biến này nằm ngoài các gốc Vernier¹⁰⁴, Canonical¹⁰⁵ hoặc Interface¹⁰⁶ (xem Bảng 11).

Bảng 7

Số Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vernier ⁴	-	*	*		ABCDEF							ABCDEF
Canonicai ⁵	-	*	*									
Interface ⁶	-	1			1111	1			2	22		3
Đầu gắn 5A												
AB VKc	-	DIQMTQS	SSMYASLGERVTITCKASQ			DINSYLTWFOOK	GKS	KTLLYRTNRLFDGV	SRFSGSGSGQDFFLTITSSLEVEDMGIYYCLOYDDFP			YTFGGGKLEI-K
AF193851	-	LS	V.D	R		G.RN	A	ASN	OS			FAT

Bảng 8

	Gốc đầu gắn 5A
AB VKc	DIQMTQTCWFTLLYGVFFSGSGSGQDFFYCFG
AF193851	S.....T..T....

Bảng 9

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J00248.seq	DIQMTQSPSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFOQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOYNSYP									
AF193851.seq	R.....N.....H.T..W									0

Bảng 10

Số Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	
- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
Vernier ⁴	-*												
Canonical ⁵	-												
Interface ⁶	-												
Đầu gắn 5A													
AB VHc													
AB RHA													

Bảng 11

Số Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	
Vernier ⁴	- * . *												
Canonical ⁵	- 1 .												
Interface ⁶	- .												
Đầu gắn 5A	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
AB VKc	-EIVLTQSPSSMYASLGERTVITCKAQ	-----	-DINSYLTWFQKPKGKSPKTLIYRTNRLFDGVP	SRFSGSGSGQDFFLATIS	SSLEYEDMGIYYC	IQYDDFP	-----	-YTFGGGT	KLEI	-K			
AB RKE	-EIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCKAQ	-----	-DINSYLTWFQKPKGKAPKLLIYRTNRLFDGVP	SRFSGSGSGTDF	FTISSLOPEDFGTY	ICIQYDDFP	-----	-YTFGGGT	KLEI	-K			
AB RKJ	-DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKAQ	-----	-DINSYLTWFQKPKGKAPKSLIYRTNRLFDGVP	SRFSGSGSGTDF	FTISSLOPEDFATY	ICIQYDDFP	-----	-YTFGGGT	KVEI	-K			

Kết quả

Tạo protein lõi rh TG2

Để tạo ra kháng thể có thể hướng đích các epitop quan trọng đối với hoạt tính TG2, thay vì các vị trí thuận lợi trên phân tử TG2, các tác giả sáng chế đã gây miễn dịch cho chuột nhắt bằng lõi xúc tác của TG2 thay vì phân tử TG2 có chiều dài đầy đủ. Để tạo ra vùng TG2 tái tổ hợp, cấu trúc PCR đã được tạo ra gồm các bazơ 329 đến 1419 và cài vào vector Pet21+(a) (Fig. 1A). Việc cài và biểu hiện vector này ở vi khuẩn BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL tạo ra protein không hòa tan gồm các axit amin 143 đến 473 bao hàm toàn bộ lõi xúc tác. Hòa tan và tái gấp nếp protein này trong Tris HCl 40mM; NaCl 150mM; glyxerol 20%; xystein 5mM; xystin 0,5mM pH 8. Chạy 10ng dung dịch này trên gel polyacrylamit không khử, thẩm tách protein và dò miễn dịch bằng CUB7402. Có thể nhìn thấy một băng rõ rệt ở vị trí 37 kDa mà phù hợp với kích thước dự đoán của lõi TG2 (Fig. 1B). Các băng lớn hơn cũng có thể phản ứng miễn dịch với CUB7402 hầu như là các kết tụ của protein lõi do chúng không có mặt khi chạy gel khử (số liệu không được thể hiện).

Gây miễn dịch và dung hợp

Gây miễn dịch cho 4 chuột nhắt bằng 50µg lõi rhTG2. Sau khi gây miễn dịch khoảng 5 và 9 tuần, lấy mẫu huyết thanh từ mỗi chuột và thử phản ứng với rh TG2 bằng ELISA bằng cách pha loãng huyết thanh theo bậc. Tất cả các chuột đều phản ứng miễn dịch mạnh với lõi rhTG2, ngay cả ở độ pha loãng cao nhất (1: 51000) (Fig. 2A). Để xác nhận kháng thể có thể còn nhận biết cả TG2 có chiều dài đầy đủ, chạy rhTG2 và protein lõi rhTG2 trên gel không biến tính, thẩm tách protein và dò miễn dịch bằng huyết thanh chuột có độ pha loãng 1:1000 (Fig. 2B). Chuột có mức phản ứng mạnh nhất (chuột C) với cả hai protein này được dùng

liều nhắc lại và thu hồi tế bào lách để dung hợp nhờ dịch vụ University of Sheffield's Hybridoma, Bioserv.

Chọn tế bào lai dương tính và nhân dòng

Trong số 400 lỗ tế bào lai chọn được bằng Bioserv dưới dạng dương tính cao nhất, các dịch nổi 109 cho mức phản ứng bền với TG2, tuy nhiên chỉ có 34 không phản ứng với các thành viên chính khác thuộc họ TG khi thử bằng ELISA (các ví dụ đại diện được thể hiện trên Fig. 3A). Các lỗ đặc hiệu với TG2 có dịch nổi được sàng lọc bằng thử nghiệm hợp nhất ^3H -Putresxin về khả năng ức chế hoạt tính TG2 thu được từ 100ng TG2 (Fig. 4). Sàng lọc ban đầu này chỉ ra rằng 10 dịch nổi tế bào lai có khả năng ức chế hoạt tính TG2 (AB1; DC1; BB7; EH6; DH2; DD9; JE12; AG9; AH3; DF4). Chín trong số mười dịch nổi này đã được nhân dòng thành công nhờ phương pháp pha loãng giới hạn. Đối với dòng DF4, mặc dù các dòng được phân lập sau nhân dòng, chúng không ức chế. Sau nhân dòng, IgG được tinh chế từ mỗi tế bào lai nhân dòng được và thử lại khả năng phản ứng chọn lọc với TG2 (Fig. 3B).

Khả năng ức chế TG2

Mỗi tế bào lai nhân dòng được thử hoạt tính ức chế TG2 đối với IgG của nó kháng TG2 của người, chuột cống và chuột nhắt và tính IC_{50} trên cơ sở lượng IgG cần để ức chế 1ng TG2. Có giới hạn khoảng 12 lần về trị số IC_{50} kháng TG2 của người dao động từ AB-1 hữu hiệu cao nhất ở $1,1 \times 10^{-5} \text{mg/ml}$ IgG đến JE12 hữu hiệu thấp nhất ở $12,3 \times 1,1 \times 10^{-5} \text{mg/ml}$ IgG (Fig. 9; Bảng 1). Đáng ngạc nhiên là các tác giả sáng chế chỉ có thể xác định IC_{50} đối với 4 kháng thể (DH2, DD9, EH6 và BB7) kháng TG2 chuột cống, với kháng thể tốt nhất DH2 có IC_{50} $2,23 \times 10^{-4} \text{mg/ml}$ IgG là thấp hơn 6 lần kháng thể kháng TG2 của người và thấp hơn 38 lần chất ức chế AB-1 tốt nhất kháng TG2 (Fig. 9; Bảng 1). Không có kháng thể ức chế nào trong số này có khả năng ức chế TG2 của chuột nhắt, có thể là do sự dung nạp miễn dịch.

Lập bản đồ epitop của các kháng thể ức chế

Để xác minh các epitop trong TG2 là độc nhất về mặt miễn dịch với TG2 trong khi ức chế, cũng như xác minh 10 kháng thể này là hướng đích các vị trí giống nhau hoặc khác nhau, mỗi kháng thể được lập bản đồ bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Tạo cấu trúc ngân hàng thể thực khuẩn TG2 và sàng lọc đối với mỗi mAb. Tiếp theo, xác định epitop bằng cách xác định trình tự liên ứng của các thể thực khuẩn liên kết.

AB1, AG1, AH1, BB7, DC1, EH6 và JE12 đều liên kết hoàn toàn hoặc một phần với epitop duy nhất (Fig. 5) bao hàm các axit amin 304 đến 326 và nằm trước vị trí hoạt động bên trong túi liên kết với cơ chất (Fig. 6). Vùng này được các tác giả sáng chế gọi là vị trí AB-1 và các kháng thể hướng đích vị trí này là các kháng thể nhóm 1.

DF4 chỉ hướng đích trình tự gồm axit amin 351 đến axit amin 365 (Fig. 5) trình tự này chạy từ trước ra sau lõi bao hàm Asp 358 trong bộ ba xúc tác (Fig. 6). Kháng thể này được gọi là nhóm 2.

DH2 và DD9 liên kết với trình tự gồm các axit amin 450 đến 467 (Fig. 5). Các kháng thể nhóm 3 liên kết với vùng sau lõi gần vùng nối với thân β -1, vùng này được các tác giả sáng chế gọi là vị trí DH2. Epitop này bao hàm vị trí liên kết với canxi giả định (Fig. 6).

Xác định trình tự kháng thể

Để xác minh trình tự chuỗi nhẹ biến đổi đối với mỗi kháng thể, ARN từ mỗi tế bào lai ức chế được chiết, phiên mã ngược và khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng cặp mồi FR1 suy biến cao, các mồi MH1 và MH2 được kết hợp với 3 mồi vùng ổn định để khuếch đại các gen VH.

Các trình tự VH và VK thu được được thể hiện trên Fig. 7 đối với AB1.

Khả năng AB1 ức chế hoạt tính TG2 trong hỗn hợp protein *in vitro*.

Kháng thể ức chế mạnh nhất kháng TG2 tái tổ hợp là AB1. Để có giá trị điều trị, nó phải có khả năng không những ức chế hoạt tính TG2 trong dung dịch thuần mà còn trong dung dịch protein phức hợp và không tổ hợp theo cách bất kỳ với các protein khác. Để thử nghiệm khả năng này, dịch đồng nhất của dòng tế bào gan người HepG2 được điều chế. Việc dùng 0,5 μ g AB1 có khả năng ức chế 70% hoạt tính TG2 (Fig. 8A). Tuy nhiên, BB7 cho mức ức chế tốt hơn đáng kể với việc làm giảm 90% hoạt tính TG2. Việc dò miễn dịch 25 μ g dịch tan bào này bằng AB1 cho thấy không có tổ hợp ngoài đích với bằng phản ứng miễn dịch duy nhất ở kích thước tương ứng với TG2 (Fig. 8B).

Khả năng AB1 và DC1 ức chế hoạt tính TG2 ngoại bào

Để đánh giá các kháng thể này có thể ức chế hoạt tính TG2 trong hệ tế bào hay không, AB1 (Fig. 10a) và DC1 (Fig. 10b) được dùng cho tế bào biểu mô ống thận người 2 (HK-2) trong môi trường nuôi cấy và thử hoạt tính TG ngoại bào bằng thử nghiệm biotin cadaverin. AB1 có khả năng ức chế 60% hoạt tính và DC1 có khả năng ức chế 55% hoạt tính khi dùng ở 4ng/ul trong môi trường nuôi cấy, mức này tương đương với chất ức chế liên TG là 1,3-dimetyl-2-[(2-oxo-propyl)thio]imidazoli clorua dùng ở 400uM.

So sánh kháng thể AB1 với các kháng thể ức chế đã biết khác

Để thử tác dụng của AB1 so với các kháng thể ức chế TG2 đã biết khác, cả đoạn fab (Fig. 11,12) lẫn IgG đầy đủ (Fig. 13, 14) của kháng thể đã được mô tả bởi Quark Biotechnology trong đơn patent số WO2006/100679 được thử ức chế hoạt tính TG2 bằng thử nghiệm hợp nhất ^3H Putresxin. Hoạt tính từ 100ng của TG2 của người có thể bị ức chế 60 đến 80% bởi 500ng AB1. So với đoạn fab hoặc

IgG đầy đủ củ kháng thể Quark có thể ức chế TG2 một cách đáng kể trong thử nghiệm này.

Bàn luận

Rõ ràng cần phê chuẩn TG2 làm đích điều trị ở người đối với các bệnh mà các nghiên cứu thực nghiệm chỉ ra là có liên quan. Các bệnh này bao gồm sự tạo mô sẹo, bệnh Celiac, bệnh thoái hóa thần kinh và kháng hóa liệu pháp ở các bệnh ung thư nhất định. Điều làm hạn chế nhu cầu này là thiếu các hợp chất đặc hiệu với TG2 thật sự mà có thể ức chế chọn lọc hoạt tính TG2 ở người.

Trong nghiên cứu này, các tác giả sáng chế lần đầu tiên gây miễn dịch cho chuột nhắt bằng đoạn TG2 nhằm phân lập nhiều kháng thể kháng TG2 kháng lõi xúc tác của enzym này để tìm kiếm epitop ức chế. Epitop này tạo ra đáp ứng miễn dịch tốt với các kháng thể nhận biết cả lõi rhTG2 lẫn TG2 tự nhiên mà không nhận biết TG khác.

10 kháng thể phân lập được có hoạt tính ức chế. Tiếp theo, các kháng thể này được lập bản đồ với 3 epitop đặc hiệu với TG2 nhưng ức chế. Các kháng thể này được nhân dòng, xác định trình tự, và IgG phân lập được được tính trị số IC₅₀. Ba kháng thể (AB1, DC1 và BB7) hướng đích túi cơ chất được chứng minh là các chất ức chế đặc biệt hữu hiệu. Điều quan trọng nhất là các kháng thể này cũng hoạt động tốt cả trong dịch tan bào lẫn trong môi trường nuôi cấy tế bào, chứng tỏ rằng các kháng thể này có khả năng hoạt động trong môi trường giàu protein vốn quan trọng để sử dụng *in vivo*.

Các tác giả sáng chế tin rằng yếu tố chính để tạo ra các kháng thể ức chế này một cách thành công là quyết định gây miễn dịch chỉ bằng protein lõi. Theo hiểu biết của các tác giả sáng chế, không có kháng thể TG2 thương mại nào có khả năng ức chế đáng kể bất kỳ. Nỗ lực riêng của các tác giả sáng chế để dùng TG2 có

chiều dài đầy đủ tạo ra lượng lớn kháng thể, một vài kháng thể này là đặc hiệu với TG2 và không có kháng thể nào trong số này có tính ức chế. Điều này có thể là do sự ưu tiên gây miễn dịch rõ rệt đối với các vòng protein bên trong TG2 có chiều dài đầy đủ, nhiều vòng protein trong số này nằm sau lõi xúc tác ở các vị trí tương tự kháng thể kháng TG2 được sử dụng rộng rãi nhất, CUB7402 (aa447 aa478).

Ngạc nhiên là, phương pháp theo sáng chế sản xuất các kháng thể hữu hiệu hơn nhiều. nói chung, bằng cách đơn giản tạo ra kháng thể kháng protein nhỏ hơn chỉ bao phủ lõi trung tâm, các tác giả sáng chế không chỉ loại bỏ một số epitop miễn dịch thích hợp mà còn hướng đích lõi. Riêng việc này làm gia tăng nhiều kháng thể có thể dùng để chọn lọc và do đó bao phủ lõi rộng hơn. Tuy nhiên, việc gây miễn dịch chỉ bằng lõi có nghĩa là nhiều nếp gấp của lõi bị mất và do đó một số epitop mà có lẽ ít dùng được bên trong phân tử TG2 nguyên vẹn có thể là các epitop hấp dẫn hơn với lõi ở dạng này. Giả thiết rằng cả 10 kháng thể này đều nhận biết các epitop mạch thẳng (tức là liên kết với TG2 trên gel khử), mặc dù 80% kháng thể mà các tác giả sáng chế phân lập được trước đó bằng cách sử dụng TH2 có chiều dài đầy đủ làm chất gây miễn dịch là phụ thuộc vào cấu hình, chứng tỏ đây là yếu tố chính.

Các nghiên cứu khác trước đó đưa ra khái niệm kháng thể ức chế TG2 để dùng cho người. Esposito và cộng sự đã phát hiện các kháng thể tái tổ hợp từ bệnh nhân celiac trong đó nêu rằng kháng thể TG2 có thể có vai trò ức chế [19]. Một trong số các kháng thể này đã được phát triển để sử dụng thương mại bởi Quark Biotechnology và đơn patent đã nộp (WO2006/100679). Kháng thể này chứng tỏ khả năng ngăn ngừa chứng xơ hóa thận trong mô hình UUO chuột cống. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã tạo ra dạng tái tổ hợp của kháng thể này và mặc dù nó phản ứng với TG2 trong ELISA (Fig. 17) và thẩm tách protein, các tác giả sáng chế đạt được mức ức chế nhỏ tới 500ng IgG /ng TG2 đối với kháng thể này trong đó tất cả các kháng thể được phát triển trong nghiên cứu này đều phong bế hầu

như toàn bộ hoạt tính TG2. Hơn thế nữa, WO2006/100679 mô tả việc tạo ra dạng kháng thể chuột nhất đối với kháng thể người này, và như vậy, việc dùng kéo dài trong mô hình bệnh thận ở chuột cống đã biết có thể gặp khó khăn.

Một lưu ý trong nghiên cứu này là việc lập bản đồ 3 epitop ức chế bên trong lõi TG2. Cho đến nay, epitop AB1 là hướng đích mạnh nhất, điều gây ngạc nhiên có lẽ là vị trí của epitop này. Việc kiểm tra vị trí của nó bên trong cấu trúc hoạt động của TG2 dự đoán [20] cho thấy nó liên kết trong cửa vào với bộ ba xúc tác mà trong đó có thể là túi cơ chất. Giả sử các cơ chất mà các tác giả sáng chế dùng trong thử nghiệm sàng lọc theo sáng chế là tương đối nhỏ (Putresxin và dimethyl casein), điều gây ngạc nhiên có lẽ là vị trí này quá hữu hiệu. Tuy nhiên, epitop phải ở vị trí sao cho IgG lớn (150 kDa) gắn chặt vào vị trí xúc tác. Từ số liệu epitop, có thể dự đoán được rằng vị trí DD9 có thể là hữu hiệu hơn do nó tổ hợp với vị trí liên kết với canxi giả định [21]. Tuy nhiên, việc kiểm tra tài liệu chuyên ngành cho thấy 5 vị trí liên kết với Ca^{2+} giả định hoặc nhiều hơn [21] và mặc dù rõ ràng nó có tác dụng đáng kể, là không quan trọng đối với toàn bộ hoạt tính TG2.

Về giả thuyết, vị trí DF4 có thể là epitop hữu hiệu nhất do kháng thể này liên kết với một trong số các axit amin thiết yếu trong bộ ba xúc tác. Tuy nhiên, đã không thể nhân dòng thành công DF4 để sản xuất kháng thể ức chế này và do đó việc sản xuất đủ IgG để thực hiện đầy đủ các thử nghiệm IC_{50} là không thể. Trên thực tế, có thể rất khó nhân dòng các kháng thể có tác dụng rất cao do Gunzler và các đồng tác giả (1982) *FEBS Lett.* **150(2)**: 390-6 chỉ ra rằng tế bào lympho cần hoạt tính TG2 để tăng sinh và do đó các kháng thể có khả năng ức chế tốt hơn chỉ có được nhờ sử dụng các phương pháp tái tổ hợp hoặc hệ thống chiết IgG liên tục.

Một trong những vấn đề gây nản lòng nhất để thực hiện công việc này rõ ràng là không thể phát triển tất cả các kháng thể phong bế một cách hữu hiệu hoạt

tính TG2 không phải của người, điều này là quan trọng trong thử nghiệm tiền lâm sàng. Tất cả các kháng thể đều phản ứng với TG2 của chuột cống và chuột nhắt trong cả thẩm tách protein lẫn ELISA, trong một số trường hợp có khác biệt nhỏ về cường độ. Tuy nhiên, trong số 9 kháng thể mà các tác giả sáng chế tạo ra IgG, chỉ có thể xác định được IC₅₀ đối với 4 kháng thể ở chuột cống và không có kháng thể nào ở chuột nhắt. 4 kháng thể tính được IC₅₀ kháng TG2 của chuột cống có IC₅₀ kháng TG2 của chuột cống gấp 30 lần hoặc thấp hơn so với AB1 kháng TG2 của người, nghĩa là liều *in vivo* bất kỳ đều có thể là lớn không chấp nhận được. Ngoài ra, không có kháng thể nào ức chế trong dịch tan bào của chuột cống. Giả sử khả năng phản ứng trong ELISA và thẩm tách protein, cộng với việc chỉ có 5 trường hợp ghép cặp không hợp đôi giữa các loài đối với AB1 và 3 trường hợp ghép cặp không hợp đôi đối với DD9, tính đặc hiệu loài đáng kể đối với sự ức chế là đáng ngạc nhiên và chứng tỏ tầm quan trọng của ái lực đối với sự ức chế hữu hiệu. Do đó, khi đã nhận dạng được các epitop ức chế này đối với TG2 của người thì điều quan trọng lúc này là các kháng thể tương tự sẽ được phát triển đối với các vị trí này trong TG2 của chuột cống nếu xác minh được giá trị của chúng trong các mô hình bệnh tiền lâm sàng *in vivo*.

Nhiều chất ức chế TG có thể sử dụng. Đáng chú ý là các hợp chất trên cơ sở thiomidazol ban đầu được phát triển bởi Merke Sharpe Dome [22], chất tương tự CBZ-glutamyl được phát triển bởi Griffin và cộng sự [23] mà các tác giả sáng chế đã sử dụng rất thành công để điều trị sự tạo sẹo thận thực nghiệm [16] và các chất ức chế kiểu dihydroisoxazol được phát triển bởi Khosla và cộng sự [24-27] được sử dụng thành công trong các mô hình bệnh ung thư khác nhau. Đã có hy vọng rằng việc sàng lọc liên tục các hợp chất này có thể thu được chất ức chế TG2 của người hữu hiệu, song khả năng phản ứng chéo họ TG hoặc độc tính tiềm tàng của các hợp chất này dường như đã ngăn cản điều đó. Mới đây hơn, Axyliidenoxoindol đã được mô tả là lớp chất ức chế TG2 thuận nghịch mới [24], song thiếu số liệu về khả năng phản ứng chéo của chúng với các thành viên khác

thuộc họ TG. Tại hội thảo Gordon 2010 về TG2 đối với bệnh ở người, Pasternack và cộng sự từ Zedira đã trình bày chi tiết phạm vi các hợp chất sử dụng chất nhận Michael mạch bên làm chất ức chế TG2 với tuyên bố về sự phù hợp để sử dụng *in vivo* và tính chọn lọc TG2, tuy nhiên cho đến nay, công bố đầy đủ về chúng vẫn chưa được cụ thể hóa. Trước đó cũng tại cuộc họp này, Macdonald và các đồng tác giả đã chứng minh một số phát triển thú vị trong việc thiết kế chất ức chế TG2 để điều trị bệnh tả Huntington, song công bố đầy đủ thì vẫn còn phải đợi. Rõ ràng rằng rất cần có chất ức chế TG2 phân tử nhỏ. Việc thâm nhập mô, khả năng vượt qua vách ngăn máu-não, việc sản xuất, chi phí và dễ định liều chỉ là một số lợi ích. Tuy nhiên, kháng thể ức chế như được phát triển theo sáng chế theo cách nhất định có thể còn tốt hơn.

Rõ ràng rằng TG2 là enzym đa chức năng và liên quan đến nhiều chức năng của tế bào bao gồm ổn định nhân và vận chuyển [28, 29], nhập bào [30, 31], truyền tín hiệu GTPaza [32-34], chết tế bào theo chương trình [35, 36], dính bám tế bào [37-39], toàn vẹn khung tế bào [28, 29] và ổn định ECM [9]. Rõ ràng rằng chất ức chế phân tử nhỏ có thể ngăn cản tất cả các chức năng này do nói chung chúng tiếp cận tự do với khoang ngoại bào và phần nội bào. Kháng thể không thể đi vào tế bào và do đó các vai trò nội bào của TG2 không thể bị ảnh hưởng. Điều quan trọng là hầu hết vai trò gây bệnh của TG2 đều xuất phát từ ngoại bào như vai trò của nó trong việc tạo mô sẹo và xơ hóa, bệnh Celiac và bệnh ung thư. Việc sử dụng kháng thể như vậy có thể gia tăng mức độ chọn lọc trong việc ngăn ngừa các tác dụng nội bào không mong muốn. Do đó, kháng thể có thể có ưu điểm trong việc phong bế TG2 ở các bệnh xơ hóa và tạo sẹo trong đó TG2 liên kết ngang với các protein ECM, ở bệnh Celiac trong đó gliadin bị khử amit trong khoang ngoại bào và ở sự kháng hóa liệu pháp ở bệnh ung thư trong đó sự dính bám tế bào là yếu tố bảo vệ. Tuy nhiên, trừ khi đoạn Fab nhỏ có thể được thiết kế để có thể vượt qua vách ngăn máu-não, nếu không kháng thể ức chế TG2 có thể sẽ ít được dùng để điều trị các bệnh lý thần kinh.

Tóm lại, lần đầu tiên các tác giả sáng chế đã có thể phát triển các kháng thể ức chế TG2 mà hướng đích chọn lọc TG2. các tác giả sáng chế cũng đã nhận dạng được 3 epitop mới trong vùng lõi của TG2. Việc làm cho kháng thể AB1 trở thành giống như của người sẽ mở ra khả năng lần đầu tiên của liệu pháp hướng đích TG2 ở người.

Ví dụ 2: Xác định trình tự của kháng thể ức chế TG2 mới theo sáng chế

Xác định trình tự của kháng thể

Để xác minh trình tự của các vùng biến đổi của mỗi kháng thể theo sáng chế, viên tế bào lai được xử lý bằng Qiagen RNeasy Mini Kit để chiết ARN theo quy trình của nhà sản xuất. Phiên mã ngược ARN chiết được để tạo ra ADN bổ trợ bằng cách sử dụng 1st Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare), có sử dụng mỗi NotI-dT₁₈, theo quy trình của nhà sản xuất. Làm sạch chế phẩm ADN bổ trợ bằng Qiagen PCR Purification Kit, theo quy trình của nhà sản xuất.

Để xác định trình tự chuỗi nặng, khuếch đại ADN bổ trợ của chuột nhất bằng PCR bằng cách sử dụng bộ môi suy biến (MHV1-12) với mỗi vùng ổn định (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3, hoặc hỗn hợp của bốn môi này) như được thể hiện trong Bảng 12. Tương tự, để xác định trình tự chuỗi nhẹ, khuếch đại ADN bổ trợ của chuột nhất bằng cách sử dụng bộ môi suy biến (MVK1-11) với mỗi vùng ổn định MKC như được thể hiện trong Bảng 13.

Nếu không quan sát thấy sản phẩm khuếch đại bằng cách sử dụng bộ ban đầu Heavy Chain PCR thì thực hiện 5' RACE PCR (Invitrogen), bằng cách sử dụng mỗi NotI-dT₁₈ để tạo ra ADN bổ trợ; và các môi vùng ổn định (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3, hoặc hỗn hợp của bốn môi này) và 5' RACE

Anchor Primer, GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG (trong đó I là bazơ đối với deoxyinosin) cho PCR.

Gắn các băng khuếch đại thu được vào vector pCR2.1®-TOPO® bằng kit TOPO-TA Cloning® (Invitrogen) theo quy trình của nhà sản xuất và gửi tới GATC Biotech AG để xác định trình tự.

Bảng 12: Môi PCR để nhân dòng các vùng biến đổi của chuỗi nặng của chuột nhắt

Tên	Trình tự
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATCTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRACCTTTGGGYTCAGCTTGRTTT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTCCT
MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCC
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2A	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

Các mã không rõ ràng: R = A hoặc G; Y = C hoặc T; M = A hoặc C; K = G hoặc T; S = G hoặc C; W = A hoặc T.

MHV chỉ các môi lai với các trình tự dẫn của các gen vùng biến đổi của chuỗi nặng của chuột nhắt, MHCG chỉ các môi lai với các gen vùng ổn định của chuột nhắt.

Bảng 13: Môi PCR để nhân dòng các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Kappa của chuột nhắt

Tên	Kích thước	Trình tự
MKV1	30 đơn vị	ATGAAGTTGVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	29 đơn vị	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	30 đơn vị	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGSGTTG
MKV4	33 đơn vị	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	30 đơn vị	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	27 đơn vị	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	31 đơn vị	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	31 đơn vị	ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTCAATTG
MKV9	25 đơn vị	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	27 đơn vị	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
MKV11	28 đơn vị	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
CL12A		ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT
CL12B		ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT
CL13		ATGGATTACAGGCCCAGGTCTTAT
CL14		ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT
CL15		ATGAATTTGCCTGTTCTCTCTTGGTGCT
CL16		ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT
CL17A		ATGAGGTGCCTARCTSAGTTCCTGRG
CL17B		ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG
CL17C		ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG
MKC	20 đơn vị	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

Các mã không rõ ràng: R = A hoặc G; Y = C hoặc T; M = A hoặc C; K = G hoặc T; S = G hoặc C; W = A hoặc T.

MKV chỉ các môi lai với các trình tự dẫn của các gen vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kappa của chuột nhắt, MKC chỉ các môi lai với gen vùng ổn định kappa của chuột nhắt.

Số liệu trình tự

Kháng thể AB1 được xác định trình tự ngoài các kháng thể BB7, DC1, JE12, EH6, AG9, AH3, DD9, DH2, DD6 và IA12. Các trình tự này được nêu trên Fig. 18 đến Fig. 28.

Ví dụ 3: Tạo cấu trúc và xác định đặc điểm của các kháng thể kháng TG2 mới dạng khảm và được làm cho giống như của người theo sáng chế.

Để tiếp tục xác định đặc điểm của các kháng thể theo sáng chế và để phân hạng và ưu tiên các kháng thể dùng để làm cho giống như của người, một panen kháng thể TG2 dạng khảm đã được tạo cấu trúc (các vùng biến đổi của chuột và IgG1 của người và kappa của người). Phương pháp dùng để tạo ra các kháng thể dạng khảm này được nêu dưới đây.

Phương pháp

Cơ sở dữ liệu ADN bổ trợ của VH và VK của người

Các trình tự protein của các globulin miễn dịch của người và của chuột nhất từ International Immunogenetics Database 2009¹ và Kabat Database Release 5 of Sequences of Proteins of Immunological Interest (cập nhật mới nhất vào ngày 17-11-1999)² được dùng để soạn thảo cơ sở dữ liệu về trình tự globulin miễn dịch của người trong việc sắp hàng Kabat. Cơ sở dữ liệu này chứa 10606 trình tự VH và 2910 trình tự VK.

Mô hình phân tử AB1

Là đại diện của kháng thể nhóm 1 (tức là các kháng thể liên kết với epitop gồm các axit amin 304 đến 326 của TG2 của người), mô hình tương đồng của các vùng biến đổi của kháng thể chuột nhất AB1 được tính bằng cách sử dụng chương trình Modeller³ chạy tự động. Các tọa độ nguyên tử gồm 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb và 1MQK.pdb là các khuôn mẫu trình tự có mức tương đồng cao nhất lần lượt đối với Interface, VL và VH như xác định được bằng phân tích Blast đối với cơ sở dữ

liệu cấu trúc pdb của kháng thể Accelrys. Các khuôn mẫu này được dùng để tạo ra 20 mô hình ban đầu, trong đó mô hình tốt nhất được lọc bằng cách lập mô hình mỗi vòng CDR với 3 khuôn mẫu vòng tốt nhất của nó.

Chọn khung hAB1

Chương trình phân tích trình tự, gibsSR, được dùng để chất vấn các cơ sở dữ liệu VH và VK của người với các trình tự protein VHc, VKc và VKc₁ của AB1, VHc và VKc của BB7 và VHc và VKc của DC1 bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn chọn khác nhau. Các gốc FW trong vòng 5Å của gốc CDR (định nghĩa Kabat) trong mô hình tương đồng của kháng thể chuột nhất AB1, được nhận dạng và gọi là các gốc “đầu gần 5Å”.

AF06220 được chọn làm FW cho các dạng chuỗi nặng được làm cho giống như của người ban đầu. Bảng 14 thể hiện việc sắp hàng và mức tương đồng gốc của AF06220 với các kháng thể chuột nhất. Bảng 15 thể hiện vỏ đầu gần 5Å của các trình tự. AF062260 chỉ có 1 đột biến soma cách xa gen VH dòng mầm của nó Z12347 (Bảng 16).

AY247656 được chọn làm FW cho chuỗi nhẹ kappa được làm cho giống như của người của AB1 ban đầu. Việc sắp hàng và mức tương đồng gốc với chuỗi nhẹ kappa của kháng thể AB1 của chuột được thể hiện trong Bảng 17; Bảng 18 thể hiện vỏ đầu gần 5Å của các trình tự. Trình tự này có 5 đột biến soma cách xa gen VK dòng mầm của nó X93620 (Bảng 19).

AF193851 được chọn làm FW cho các cấu trúc chuỗi nhẹ kappa được làm cho giống như của người khác. Việc sắp hàng và mức tương đồng gốc với các kháng thể chuột được thể hiện trong Bảng 20. Bảng 21 thể hiện vỏ đầu gần 5Å của các trình tự. Trình tự này không có đột biến soma so với gen VK dòng mầm của nó J00248 (Bảng 22).

Tạo vector biểu hiện

Việc tạo cấu trúc vector biểu hiện dạng khảm bao gồm việc thêm trình tự dẫn thích hợp vào VH và VL, đứng trước là vị trí giới hạn Hind III và trình tự Kozak. Trình tự Kozak đảm bảo sự dịch mã đầy đủ của trình tự vùng biến đổi. Nó xác định codon AUG đúng mà từ đó ribosom có thể khởi đầu dịch mã, và bazơ quan trọng nhất là adenin ở vị trí 3, ngược dòng codon khởi đầu AUG.

Đối với chuỗi nặng, việc tạo cấu trúc vector biểu hiện dạng khảm bao gồm việc đưa đoạn 5' của vùng ổn định $\gamma 1$ của người tới vị trí giới hạn ApaI tự nhiên, liền kề đầu 3' của vùng J của vùng biến đổi. CH này được mã hóa trong vector biểu hiện xuôi dòng trình tự VH cài vào song thiếu intron V-C.

Đối với chuỗi nhẹ, vị trí cho ghép tự nhiên và vị trí BamHI được thêm vào xuôi dòng vùng V. Trình tự cho ghép này tạo điều kiện thuận lợi cho việc ghép intron V:C của kappa cần để gắn VL vào khung đọc với vùng ổn định.

Trình tự ADN của các vùng biến đổi được tối ưu hóa và được tổng hợp bằng GeneArt®. Trình tự dẫn được chọn là trình tự cho mức biểu hiện kháng thể tốt trong tế bào động vật có vú nuôi cấy.

Các cấu trúc vùng biến đổi của chuỗi nặng được cắt ra khỏi vector nhân dòng bằng HindIII + ApaI, tinh chế và gắn vào vector biểu hiện chuỗi nặng MRCT đã được cắt theo cách tương tự và xử lý phosphatase, và dùng để biến nạp vi khuẩn TOP10.

Các cấu trúc vùng biến đổi của chuỗi kappa được cắt bằng HindIII + BamHI, tinh chế và gắn vào vector biểu hiện chuỗi nhẹ kappa MRCT đã được cắt theo cách tương tự và xử lý phosphatase, và dùng để biến nạp vi khuẩn TOP10.

Biểu hiện kháng thể

Vecto biểu hiện cài kép mã hóa cả chuỗi nặng lẫn chuỗi kappa đã được tạo ra và biến nạp vào tế bào HEK293T. Dịch nổi nuôi cấy tế bào được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên Protein G-agarose theo quy trình của nhà sản xuất.

ELISA liên kết

Tế bào HEK 293F đã được đồng chuyển nhiễm bằng tổ hợp gồm các vecto chuỗi nhẹ được làm cho giống như của người khác nhau kết hợp với các vecto chuỗi nặng được làm cho giống như của người khác nhau. TG2 của người tái tổ hợp được dùng để đo mức liên kết kháng thể bằng ELISA. Kết quả chỉ ra rằng dạng chuỗi nặng RHA (Bảng 23), tổ hợp với một trong hai dạng chuỗi nhẹ RKE và RKJ (Bảng 24) (đại diện cho các dạng chuỗi nhẹ khác nhau được làm cho giống như của người) cho mức liên kết tối ưu (Fig. 34), và do đó, được chọn để tiếp tục xác định đặc điểm. Phương pháp tương tự được dùng để nhận dạng các cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tối ưu của BB7 được làm cho giống như của người, và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của DC1 được làm cho giống như của người.

Dạng chuỗi nặng RHA là dạng ghép không được cải biến của các vùng CDR của kháng thể AB1 trên trình tự cho của người. Tuy nhiên, cả hai dạng chuỗi nhẹ, RKE và RKJ, đều có cùng hồi biến gốc đầu gần 5Å duy nhất, F72 (Bảng 24). Hồi biến này nằm ngoài các gốc Vernier⁴, Canonical⁵ hoặc Interface⁶.

Bảng A sau tóm tắt kháng thể dạng khảm và kháng thể được làm cho giống như của người sản xuất được có viện dẫn chéo đến các định danh được sử dụng trên hình vẽ.

Kháng thể chuột	Kháng thể dạng khảm	Kháng thể được làm cho giống như của người
AB1	cAB001 cAB003	hAB004 (hAB001AE) hAB005 (hAB001AJ)

BB7	cBB001	hBB001AA hBB001BB
DC1	cDC001	hDC001AA hDC001BB
DD6	cDD6001	
DD9	cDD9001	
DH2	cDH001	

Các bảng

Bảng 14

Số Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110						
	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----																	
Vernier ⁴	-*																	
Canonical ³	-																	
Interface ⁶	-																	
Đầu gần 5'Á	****	*	*	****	****	****	****	****	*	*	****	****	****					
CDR																		
AB_VHc (mAB001VH)	-EVQLV	ESGGGLVK	PGGSLK	LSCA	ASGFTL	SSAMS--	WVRQTP	DRRL	EWVATISV--	GGGKTY	YPDSVK	GRFTISR	DNAKNTLYLQ	MNSLRSEDTAM	YCAKLI-----	SLYWGQ	GTTLTVSS	
BB7_VHc (mBB7001VH)	-AVQLV	ESGGGLVK	PGGSLK	LSCA	ASGFI	FSSAMS--	WVRQTP	PEKRL	EWVATISS--	GGRSTY	YPDSVK	GRFTISR	DSA	KNTLYLQ	MDSLRSEDTAI	YCAKLI-----	SPYWGQ	GTTLTVSS
DC1_VHc (mDC001VH)	-EVQLV	ESGGGLVK	PGGSLK	LSCA	ASGFTL	STHAMS--	WVRQTP	PEKRL	EWVATISS--	GGRSTY	YPDSVK	GRFTISR	DNVKN	TLYLQ	LSSLRSEDTAV	YFCARLI-----	STYWGQ	GTTLTVSS
AF062260	C....	L.....	Q.....	R.....		F.Y....	---A.GKG....	SA..G--	S..S..A.....	V.....	DG-----	GV.....	LV.....					

Bảng 14 thể hiện việc sắp hàng và tương đồng gốc của AF062260 với kháng thể chuột. Tương đồng gốc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.). Khác biệt gốc được thể hiện khi có thể. Khoảng trống (-) được sử dụng để duy trì đánh số Kabat, và thể hiện đoạn cài hoặc mất gốc khi có thể.

Bảng 15

	Gốc đầu gần 5'Á
AB_VHc (mAB001VH)	EVQLCAFTLSWVRWVVARFTISRNLCAKKG
BB7_VHc (mBB7001VH)	AVQLCAIIFSWVRWVVARFTVSRSLCAKKG
DC1_VHc (mDC001VH)	EVQLCAFTLSWVRWVVARFTISRNLFCARWG
AF062260	F.....S.....

Bảng 15 thể hiện các gốc khung chuỗi nặng của kháng thể nằm trong vỏ 5'Á của CDR. Tương đồng gốc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.). Khác biệt gốc được thể hiện khi có thể.

Bảng 16

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----
Z12347.seq	EVQLLESGG	GLVQPG	SLRLSCA	ASGFTF	SSYAMS	WVRQAP	CKGLEW	SAISG	SGSTYY	ADSVKGRFTISR
AF062260.seq										R
										1

Bảng 16 thể hiện AF062260 có 1 đột biến soma cách xác gen VH dòng mã Z12347. Tương đồng gốc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.).Khác biệt gốc được thể hiện khi có thể..

Bảng 17

Số Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Vernier ⁴	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-
Canonical ⁵	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-----ABCDEF----- -----*
Interface ⁶	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-----3-----3-----3-----
Đầu gần 5A	*****	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-----I-----I-----II-----
CDR												
AB_VKc (mAB001VK)	-	EIVLTQSP	SSMYAS	ISGERVT	ITCKASQ	-----	DINSYLT	FWQOKP	GKSPKTL	IYRTNRL	FDGVPS	RFSGSGSGQDFFLTIS
AY247656	-	LS	.V.D.....Q			SN	.N.Y.....	A.L.....	DASN	.ET.....	T.TF.....	QP..F.T...Q..NTY.-----L.....

Bảng 17 thể hiện việc sắp hàng và tương đồng gốc của AY247656 với kháng thể AB1 của chuột. Tương đồng gốc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.). Khác biệt gốc được thể hiện khi có thể.. Khoảng trống (-) được sử dụng để duy trì đánh số Kabat, và thể hiện đoạn cài hoặc mất gốc khi có thể.

Bảng 18

	Gốc đầu gần 5A
AB_VKc (mAB001VK)	EIVLTQTCWF ¹ LIYGVPFSGSGGQDFFYCFG
AY247656	YL.....T..T....

Bảng 18 thể hiện các góc khung chuỗi nhẹ kappa của kháng thể AB1 nằm trong vỏ 5Á của CDR. Tương đồng góc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.)
Khác biệt góc được thể hiện khi có thể..

Bảng 19

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
X93620.seq	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYINWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE	TGVPSRFS	SGSGTDF	FTT	ISSLP	EDIATYYC	QQYD	NLPP		
AY247656.seq E.VL									NTY.L	5
	<----->				<----->					

Bảng 19 thể hiện AY247656 có 5 đột biến soma cách xa gen VK dòng mầm X93620. Tương đồng góc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.)
Khác biệt góc được thể hiện khi có thể.

Bảng 20

Số Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Vernier ⁴	-	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Canonical ⁵	-	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Interface ⁶	-	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Đầu gần 5A	-	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
CDR	-	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
AB_VKc1 (mAB002VK)	-	DIQMTQSPSSMYASISGERVTITCKASQ	-----	DINSYLTWFOQKPGKPKTLIYRTNRLFDGVPSRFS	SGSGQDFFLT	ISSLEYEDMG	IYYCLQYDDFP	-----	YTFGGG	TKLEI	-K	
AB1_VKc2 (mAB003VK)	-	DIQMTQSPSSMYASISGERVTITCKASQ	-----	DINSYLTWFOQKPGKPKTLIYRTNRLFDGVPSRFS	SGSGQDFFLT	ISSLEYEDMG	IYYCLQYDDFP	-----	YTFGGG	TKLEI	-K	
BB7_VKc (mBB001VK)	-	AIKMTQSPSSMYASISGERVTITCKASQ	-----	DINSYLTWFOQKPGKPKTLIYRTNRLMDGVPSRFS	SGSGQDFFLT	ISGLEHEDMG	IYYCLQYDDFP	-----	YTFGGG	TKLEI	-K	
DC1_VKc (mDC001VK)	-	DITMTQSPSSIYASISGERVTITCKASQ	-----	DINSYLTWFOQKPGKPKTLIYLVNRLVDGVPSRFS	SGSGQDALT	ISSLEYEDMG	IYYCLQYDDFP	-----	YTFGGG	TKLEI	-K	
AFI93851	-	...M.....LS..V.D.....R.....	-----	G.RN.A.....A..S.....AASN.QS.....T..T.....QP.....FAT.....Q.....V.....	-----	W.....	-----	W.....	-----	Q.....	-----	

Bảng 20 thể hiện việc sắp hàng và tương đồng góc của AF193851 với kháng thể chuột. Tương đồng góc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.)
Khác biệt góc được thể hiện khi có thể. Khoảng trống (-) được sử dụng để duy trì đánh số Kabat, và thể hiện đoạn cài hoặc mất gốc khi có thể.

Bảng 21

	Gốc đầu gần 5A
AB VKc1 (mAB002VK)	DIQMTQTCWFLLIYGVPFSGSGSGQDFFFCFG
AB1_VKc2 (mAB003VK)	DIQKTQTCWFLLIYGVPFSGSGSGQDFFFCFG
BB7 VKc (mBB001VK)	AIKMTQTCWFLLIYGVPFSGSGSGQEFFLYCFG
DC1 VKc (mDC001VK)	DITMTQTCWFLLIYGVPFSGSGSGQDIAYCFG
AF193851	...M.....S.....T..T....

Bảng 21 thể hiện các gốc khung chuỗi nhẹ kappa của kháng thể nằm trong vỏ 5A của CDR. Tương đồng gốc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.). Khác biệt gốc được thể hiện khi có thể.

Bảng 22

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
J00248.seq	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVITTCRASQGIN	YLAWFQQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS	SGSGTDTLT	TISSLPEDFATYYCQYNSYPP				
AF193851.seq		R.....	N.....		H.T..W	0			
	<----->		<----->		<----->				

Bảng 22 thể hiện AF193851 không có đột biến soma cách xa gen VK dòng mầm J00248. Tương đồng gốc được thể hiện bằng ký tự dấu chấm (.). Khác biệt gốc được thể hiện khi có thể.

Bảng 23

Số Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	
Vernier ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canonical ⁵	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Interface ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Đầu gắn 5'Á	****	*	*	****	***	***	****	****	****	*	****	**	
CDR													
AB_RHA (hAB001HA)	-	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--	WVRQAPGKGLEWVSTISV--	GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI	----	----	----	----	----	----	----	SLYWGQGTLLTVSS
BB7_RHA (hBB001HA)	-	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--	WVRQAPGKGLEWVSTISS--	GGRTYYPD	SVKGRFTISRDNKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI	----	----	----	----	----	----	SPYWGQGTLLTVSS
BB7_RHB (hBB001HB)	-	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFFSSAMS--	WVRQAPGKGLEWVATISS--	GGRTYYPD	SVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI	----	----	----	----	----	----	SPYWGQGTLLTVSS
DC1_RHA (hDC001HA)	-	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMS--	WVRQAPGKGLEWVSTISS--	GGRTYYPD	SVKGRFTISRDNKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKLI	----	----	----	----	----	----	STYWGQGTLLTVSS
DC1_RHB (hDC001HB)	-	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMS--	WVRQAPGKGLEWVATISS--	GGRTYYPD	SVKGRFTISRDNKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYFCARLI	----	----	----	----	----	----	STYWGQGTLLTVSS

Bảng 23 thể hiện việc sắp hàng trình tự của các dạng được làm cho giống như của người cuối cùng của các chuỗi nặng của AB1, BB7 và DC1. Khoảng trống (-) được sử dụng để duy trì đánh số Kabat, và thể hiện đoạn cài hoặc mất gốc khi có thể.

Bảng 24

Số Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Vernier ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canonical ⁵	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Interface ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Đầu gắn 5'Á	*****	**	**	****	****	*****	****	*****	****	****	****	
CDR												
AB_RKE (hAB001KE)	-	EIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ----	DINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVP	SRFSGSGSGTDFFFTIS	SLQPEDFGTY	YCYQVDDFP----	----	----	----	----	----	YTFGGGTKLEI-K
AB_RKJ (hAB001KJ)	-	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ----	DINSYLTWFOQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVP	SRFSGSGSGTDFFLT	ISLQPEDFATY	CYQVDDFP----	----	----	----	----	----	YTFGGTKVEI-K
BB7_RKA (hBB001KA)	-	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ----	DINSYLTWFOQKPGKAPKSLIYLTNRLMDGVP	SRFSGSGSGTDFFLT	ISLQPEDFATY	CYQVDDFP----	----	----	----	----	----	YTFGGTKVEI-K
BB7_RKB (hBB001KB)	-	DIKMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ----	DINSYLTWFOQKPGKAPKSLIYLTNRLMDGVP	SRFSGSGSGGGEFLT	ISLQPEDFATY	CYQVDDFP----	----	----	----	----	----	YTFGGTKVEI-K
DC1_RKA (hDC001KA)	-	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ----	DINSYLTWFOQKPGKAPKSLIYLVNRLVDGVP	SRFSGSGSGTDFFLT	ISLQPEDFATY	CYQVDDFP----	----	----	----	----	----	YTFGGTKVEI-K
DC1_RKB (hDC001KB)	-	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ----	DINSYLTWFOQKPGKAPKSLIYLVNRLVDGVP	SRFSGSGSGGQDYALT	ISLQPEDFATY	CYQVDDFP----	----	----	----	----	----	YTFGGTKVEI-K

Bảng 24 thể hiện việc sắp hàng trình tự của các dạng được làm cho giống như của người cuối cùng của các chuỗi nhẹ kappa của AB1, BB7 và DC1. Khoảng trống (-) được sử dụng để duy trì đánh số Kabat, và thể hiện đoạn cài hoặc mất gốc khi có thể.

Bảng 24A

Bảng 24a tóm tắt thông tin trình tự nêu trong các bảng 23 và 24, cụ thể là thể hiện trình tự của các CDR, và các CDR với các vùng kề hai bên, trong các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể AB, BB-7 và DC-1.

Chuỗi nặng - CDR1 AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB	CAASGFTFSSAMSWVR hoặc FTFSSAMSWVR hoặc SSAMS. CAASGFTFSSAMSWVR hoặc FTFSSAMSWVR hoặc SSAMS. CAASGIIFSSAMSWVR hoặc IIFSSAMSWVR hoặc SSAMS. CAASGFTFSTHAMSWVR hoặc FTFSTHAMSWVR hoặc THAMS. CAASGFTLSTHAMSWVR hoặc FTLSTHAMSWVR hoặc THAMS.
Chuỗi nặng - CDR2 AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB	WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTL hoặc WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR hoặc TISVGGGKTYYPDSVKG. WVSTISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTL hoặc WVSTISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN WVSTISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISR hoặc TISSGGGRSTYYPDSVKG. WVATISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTL hoặc WVATISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN WVATISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISR hoặc TISSGGGRSTYYPDSVKG. WVSTISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTL hoặc WVSTISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN WVSTISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISR hoặc TISSGGGRSTYYPDSVKG. WVATISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTL hoặc WVATISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN WVATISSGGGRSTYYPDSVKGRFTISR hoặc TISSGGGRSTYYPDSVKG.
Chuỗi nặng - CDR3 AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB	YCAKLISLYWG hoặc LISLY. YCAKLISPYWG hoặc LISPY. YCAKLISPYWG hoặc LISPY. YCAKLISLYWG hoặc LISTY. FCARLISTYWG hoặc LISTY.

<u>Chuỗi nhẹ - CDR1</u> AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB	TCKASQDINSYLTWY TCKASQDINSYLTWF TCKASQDINSYLTWF TCKASQDINSYLTWF TCKASQDINSYLTWF TCKASQDINSYLTWF	hoặc KASQDINSYLT. hoặc KASQDINSYLT. hoặc KASQDINSYLT. hoặc KASQDINSYLT. hoặc KASQDINSYLT. hoặc KASQDINSYLT.
<u>Chuỗi nhẹ – CDR2</u> AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB	LLIYRTNRLFDGVP SLIYRTNRLFDGVP SLIYLTNRLMDGVP SLIYLTNRLMDGVP SLIYLVNRLVDGVP ILIYLVNRLVDGVP	hoặc LLIYRTNRLFDGVP hoặc SLIYRTNRLFDGVP hoặc SLIYLTNRLMDGVP hoặc SLIYLTNRLMDGVP hoặc SLIYLVNRLVDGVP hoặc ILIYLVNRLVDGVP hoặc RTNRLFD hoặc RTNRLFD hoặc LTNRLMD hoặc LTNRLMD hoặc LVNRLVD hoặc LVNRLVD
<u>Chuỗi nhẹ – CDR3</u> AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB	YCLQYDDFPYTFG YCLQYDDFPYTFG YCLQYVDFPYTFG YCLQYVDFPYTFG YCLQYDDFPYTFG YCLQYDDFPYTFG	hoặc LQYDDFPYT. hoặc LQYDDFPYT. hoặc LQYVDFPYT. hoặc LQYVDFPYT. hoặc LQYDDFPYT. hoặc LQYDDFPYT.

Xác định đặc điểm của kháng thể dạng khảm và kháng thể được làm cho giống như của người

Các Ab dạng khảm và được làm cho giống như của người được thử nghiệm về sự liên kết với TG2 của người và của khỉ đầu chó và về sự ức chế các enzym này theo phương pháp được mô tả dưới đây.

Phương pháp

Thử nghiệm ELISA về việc liên kết với TG2

Sự liên kết của kháng thể với TG2 của người và của khỉ đầu chó đã được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Đĩa polystyren trong 96 lỗ “Maxisorp” (Nunc) được bao 50ng TG2 của người và của khỉ đầu chó đã tinh chế trong 50µl dung dịch đệm cacbonat-bicacbonat 0,05M có pH 9,6 ở 4°C qua đêm. Bao lỗ đối chứng bằng 50µl albumin huyết thanh bò (BSA) 100µg/ml. Rửa đĩa ba lần bằng 300µl nước muối đệm phosphat có pH 7,4 (PBS) chứa 0,1% Tween 20 (PBST) và phong bế bằng 300µl sữa nguyên kem Marvel 3% w/v trong PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa 3 lần bằng PBST, 50µl kháng thể kháng TG2 dạng khảm hoặc được làm cho giống như của người đã tinh chế bằng protein-A hoặc kháng thể đối chứng isotyp kappa của IgG1 của người CUB7402 (Abcam) được pha loãng theo bậc 4 từ nồng độ cao nhất 50nM trong PBS, và thêm vào đĩa hai lần. Sau 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, rửa đĩa 3 lần bằng PBST và ủ với 50µl kháng IgG người của dê liên hợp với peroxidaza (Fc) (Serotec) đã pha loãng 1/5000 sữa nguyên kem Marvel 3% w/v trong PBS hoặc đối với các lỗ chứa CUB7402 là kháng IgG người của dê liên hợp với peroxidaza 1/5000 (Fc) (Sigma) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 lần rửa bằng PBST, phát triển đĩa bằng 50µl cơ chất TMB (Sigma) trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng trước khi dập tắt phản ứng bằng 25µl H₂SO₄ 05M và đo độ hấp thụ ở 450nm trong bộ đọc đĩa vi chuẩn độ (BioTek EL808). Phân tích đường cong liều-đáp ứng và xác định trí số EC50 và các thông

số thống kê khác bằng cách khớp logic 4 thông số đối với số liệu (GraphPad Prism).

Thử nghiệm transglutaminaza trên cơ sở huỳnh quang về sự ức chế TG2 bởi kháng thể theo sáng chế.

Hoạt tính transglutaminaza của enzym TG2 của người đã tinh chế (Zedira) hoặc enzym TG2 của khỉ đầu chó đã tinh chế (Trenzyme) được đo bằng cách hợp nhất dansyl lysin KxD (Zedira) vào *N,N*-dimetyl casein (DMC, Sigma). TG2 của người hoặc khỉ đầu chó được pha loãng trong dung dịch đệm chuyển amit (HEPES 25mM pH 7,4 chứa NaCl 250mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 5mM, DTT 0,2mM và Pluronic F-127 0,05% v/v) lần lượt thành 1nM và 10nM và trộn với kháng thể kháng TG2 của chuột, dạng khảm hoặc được làm cho giống như của người đã tinh chế bằng protein-A ở các nồng độ khác nhau trong 180 phút ở nhiệt độ trong phòng trong đĩa vi chuẩn độ màu đen 384 lỗ (Corning). Bắt đầu phản ứng bằng cách thêm DMC và KxD lần lượt đến nồng độ cuối 10uM và 20uM và thể tích phản ứng cuối 30ul, và để ở nhiệt độ trong phòng trong 180 phút và theo dõi sự gia tăng phát huỳnh quang (RFU) (kích thích ở 280nm, bức xạ ở 550nm) bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa Tecan Safire². Tiêu chuẩn hóa số liệu theo tỷ lệ phần trăm hoạt tính trong đó % hoạt tính = (RFU kháng thể thử nghiệm – RFU đối chứng thấp) / (RFU đối chứng cao – RFU đối chứng thấp) x 100, trong đó đối chứng thấp chứa tất cả các thành phần ngoại trừ enzym còn đối chứng cao chứa tất cả các thành phần ngoại trừ kháng thể.

Vẽ đường cong liều kháng thể-đáp ứng bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad prism và khớp bằng mô hình logic 4 thông số để đưa về IC₅₀ và các thông số thống kê khác. Kết quả được mô tả trên Fig. 29 đến Fig. 33.

Kết quả và bàn luận về sự ức chế enzym và thí nghiệm ELISA liên kết bởi các kháng thể kháng TG2 của chuột và được làm cho giống như của người

Khả năng các kháng thể kháng TG2 dạng khảm và được làm cho giống như của người ức chế sự chuyển amit bởi TG2 của người được xác định bằng sự ức chế phụ thuộc liều đối với sự hợp nhất phụ thuộc TG2 của dansyl lysin vào *N,N*-dimethyl casein (được minh họa trên Fig. 29 đến Fig. 31). Cả kháng thể dạng khảm lẫn kháng thể được làm cho giống như của người từ nhóm 1 (ví dụ, cAB003, cBB001, cDC001, hBB001AA, hAB001BB, hAB005 và hAB004) đều ức chế mạnh hoạt tính TG2 trong giới hạn nanomol thấp, phù hợp với số liệu ELISA thể hiện sự liên kết với TG2 của người được cố định trong cùng giới hạn (Fig. 35 và Fig. 37). Ngược lại, kháng thể thương mại CUB7402 không ức chế hoạt tính enzym TG2 của người hoặc khỉ đầu chó (Fig. 29F và 30B), mặc dù mức liên kết tương đương với các kháng thể nhóm 1 trong các thử nghiệm ELISA (Fig. 35A, 36A, 37A và 38A) phù hợp với sự nhận biết CUB7402 của epitop không cản trở chức năng chuyển amit của enzym này. Do đó, các kháng thể nhóm 1 có thể được phân biệt bằng khả năng của chúng ức chế chức năng enzym từ các kháng thể khác như CUB7402, chúng liên kết song không có tác dụng đối với hoạt tính enzym. Tương tự, các kháng thể của chuột và dạng khảm đại diện cho nhóm 3 (ví dụ, mDD9001, mDH001, cDD9001 và cDH001) luôn ức chế sự chuyển amit của TG2, song với độ mạnh thấp hơn so với kháng thể nhóm 1 (Fig. 29 và Fig. 33). Sự ức chế của TG2 của người bởi các kháng thể đơn dòng chuột gốc được lấy ví dụ từ nhóm 1 và nhóm 3 (Fig. 33) cho độ mạnh tương đương với các dạng khảm và được làm cho giống như của người của chúng, chỉ ra rằng độ mạnh chức năng của kháng thể chuột đã được giữ lại trong các dạng được làm cho giống như của người. Tương tự, số liệu ELISA liên kết TG2 của người đối với các kháng thể được lấy ví dụ hBB001AA, hBB001BB và hAB004 (Fig. 37) cho trị số EC50 tương đương với các trị số thu được đối với các dạng khảm cBB001 và cAB003, chỉ ra rằng ái lực liên kết cũng được duy trì ở các dạng được làm cho giống như của người. Các kháng thể dạng khảm và được làm cho giống như của người cũng chứng tỏ ức chế mạnh TG2 của khỉ đầu chó (Fig. 30 và Fig. 32) và trị số EC50 ELISA tương đương (Fig. 36 và Fig. 38) giữa các loài, phù hợp với sự bảo tồn epitop cùng họ ở TG2 của khỉ đầu chó, cho mức tương đồng trình tự chung 99%. Ngược lại,

CUB7402 có mức liên kết với TG2 của cả hai loài tương đương kháng thể nhóm 1, song không ức chế hoạt tính của các enzym này (Fig. 35-38 và Fig. 29-30).

Thử nghiệm trên cơ sở tế bào

Sự liên kết của kháng thể theo sáng chế với TG2 ngoại bào từ tế bào biểu mô HK-2 được thử nghiệm bằng quy trình sau.

Đo hoạt tính TG ngoại bào

Hoạt tính TG ngoại bào được đo bằng ELISA tế bào được cải biến. Thu hoạch tế bào biểu mô HK-2 bằng Accutase và cấy ở mật độ 2×10^4 tế bào/lỗ trong môi trường không có huyết thanh trên đĩa 96 lỗ đã phủ qua đêm 100 μ l/lỗ fibronectin (5 μ g/ml trong Tris-HCl 50mM pH 7,4) (Sigma, Poole UK). Để các tế bào gắn O/N ở 37°C. Thay môi trường bằng DMEM (Life Technologies) và thêm hợp chất, kháng thể hoặc đối chứng vào và để liên kết ở 37°C. Thêm biotin cadaverin [axit N-(5 amino pentyl biotinamit) trifloaxetic] 0,1mM (Zedira) vào các lỗ và cho đĩa về 37 °C trong 2 giờ. Rửa đĩa 2 lần bằng EDTA 3mM/PBS và loại bỏ tế bào bằng 0,1% (w/v) deoxycholat trong EDTA 5mM/PBS. Thu gom dịch nổi và dùng để xác định protein. Rửa đĩa bằng PBS/Tween và hợp nhất biotin cadaverin bằng 1:5000 extravidin HRP (Sigma, Poole, UK) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng tiếp theo là cơ chất K Blue (SkyBio). Dập tắt phản ứng bằng Red Stop (SkyBio) và đo độ hấp thụ ở 4650 nm. Mỗi kháng thể được thử nghiệm ít nhất ba lần riêng biệt.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 39 và Fig. 40 và thể hiện đường cong ví dụ và bảng trị số IC₅₀ thu được đối với các kháng thể thử nghiệm. Fig. 39 thể hiện kết quả với AB1 được làm cho giống như của người và Fig. 40 thể hiện kết quả với BB7 được làm cho giống như của người.

hAB005 ức chế TG2 ngoại bào của tế bào HK2 với IC₅₀ là 71,85nM và mức ức chế cực đại bằng khoảng 30% hoạt tính đối chứng. hBB001AA ức chế hoạt tính với IC₅₀ là 19,8nM và mức ức chế cực đại bằng 40% hoạt tính đối

chứng. hBB001BB có IC50 tốt hơn là 4,9nM song mức ức chế cực đại bằng 55% đối chứng.

Thử nghiệm vết thương trầy xước

Thử nghiệm vết thương trầy xước cũng được thực hiện để đánh giá hoạt tính liên kết của các kháng thể kháng TG2 được làm cho giống như của người và dạng khảm theo sáng chế.

TG2 đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong chứng xơ hóa phổi và chuột nhắt khuyết TG2 biểu hiện sự tạo sẹo và xơ hóa giảm trong mô hình bleomycin (Keith C. Olsen, Ramil E. Sapinoro, R. M. Kottmann, Ajit A. Kulkarni, Siiri E. Iismaa, Gail V. W. Johnson, Thomas H. Thatcher, Richard P. Phipps, and Patricia J. Sime. (2011) Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis. Am.J of Respiratory & Critical Care Med. **184** 0699-707). Sự di cư của các tế bào từ chuột nhắt khuyết TG2 trong quá trình tạo vết thương là giảm so với kiểu dại. Thử nghiệm vết thương trầy xước được thực hiện để đánh giá tác dụng của các kháng thể kháng TG2 được làm cho giống như của người và/hoặc dạng khảm theo sáng chế đối với tỷ lệ khép vết thương trong lớp nguyên bào sợi phổi bình thường (tế bào WI-38).

Quy trình thử nghiệm vết thương trầy xước:

Cấy tế bào WI-38 (nguyên bào sợi phổi người bình thường ATCC cat#CCL-75) vào đĩa Image Lock 96 lỗ (Essen cat#4379) ở 2×10^4 /lỗ trong môi trường α MEM (Life Technologies cat#32561) chứa 10% FBS và sinh trưởng O/N đến mức nhập dòng >97%. Rửa tế bào 2 lần bằng môi trường α MEM mà không có huyết thanh và tạo vết thương trầy xước bằng cách sử dụng Essen Wound Maker và quy trình của nhà sản xuất. Loại bỏ môi trường và thay bằng 95 μ l/lỗ môi trường không có huyết thanh. Thêm đối chứng và kháng thể thử nghiệm vào các lỗ. Đặt đĩa vào Essen Incucyte và phân tích sự khép vết thương bằng cách sử dụng quy trình tạo vết thương trầy xước.

Cytochalasin D được dùng làm đối chứng thử nghiệm ở 0,1 μ M. R281, một chất ức chế transglutaminaza không đặc hiệu, phân tử nhỏ, được thử nghiệm ở 100 μ M. Z DON, một chất ức chế transglutaminaza không thuận nghịch, dạng peptit, được thử nghiệm ở 10 μ M và 100 μ M. Kháng thể kháng TG2 có bán trên thị trường Cub7402 (ABcam cat#ab2386) được thử nghiệm ở 5 μ g/ml. Kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm ít nhất 3 lần ở các nồng độ khác nhau như được chỉ ra. Trong tất cả các thí nghiệm, Cytochalasin D đều ở 0,1 μ M còn ZDON ở hai nồng độ để thể hiện tác dụng phụ thuộc vào liều.

Các kết quả được lấy ví dụ của thử nghiệm trải xước được thể hiện trên Fig. 41 đến Fig. 44. Như có thể thấy trên Fig. 41, Cytochalasin D, R281 và ZDON đều ức chế sự khép vết thương (ZDON được chứng minh là ức chế theo cách phụ thuộc vào liều) song kháng thể Cub7402 không ức chế sự khép vết thương. BB7 được làm cho giống như của người, AB1 được làm cho giống như của người và DC1 dạng khảm đều ức chế sự khép vết thương.

Ái lực của các Ab kháng TG2 dạng khảm và được làm cho giống như của người

Ái lực liên kết (K_d và tốc độ phân ly) đối với nhóm Ab dạng khảm và được làm cho giống như của người theo sáng chế kháng TG2 của người và TG2 của khỉ đầu chó được đánh giá bằng kỹ thuật Biacore. Quy trình và kết quả được mô tả dưới đây và được thể hiện trên Fig. 45 đến Fig. 47.

Phương pháp Biacore

TG2 của người tái tổ hợp được thu mua từ Zedira GmbH (cat. no.: T002). TG2 của khỉ đầu chó tái tổ hợp được thu mua từ Trenzyme. Cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface plasmon resonance: SPR) được đo bằng thiết bị Biacore T200 (GE Healthcare). Chíp CM5 (GE Healthcare cat. no.: BR-1006-68) được bao kháng thể đơn dòng của chuột nhắt kháng IgG1 của người (Fc) (kháng thể MAH) (GE Healthcare cat. no.: BR-1008-39) bằng cách liên hợp amin như được mô tả trong hướng dẫn của nhà sản xuất. Dung dịch đệm HBS-EP+ (HEPES 0,01M, NaCl

0,15M, EDTA 3mM, Surfactant P20 0,05% v/v) và dung dịch đệm HBS-P+ (HEPES 0,01M, NaCl 0,15M, Surfactant P20 0,05%) được mua từ GE Healthcare dưới dạng dung dịch gốc 10x (cat. nos.: BR-1006-69 và BR-1006-71). Dung dịch canxi clorua được thu mua từ Sigma Aldrich (cat. no.:21115).

Phương pháp dùng để xác định ái lực của kháng thể kháng TG2 bao gồm bước tẩy kháng thể dạng khảm hoặc được làm cho giống như của người trên chip CM5 đã bao MAH, tiếp theo tiêm loạt mẫu TG2 trong dung dịch đệm chạy. Dung dịch đệm chạy là 1x HBS-P+ chứa CaCl_2 1mM, hoặc 1x HBS-EP+ đối với các thí nghiệm không có canxi. Bước tẩy kháng thể được thực hiện trong khoảng thời gian tiếp xúc 120 giây ở lưu tốc $10\mu\text{l/phút}$ dẫn đến tẩy được khoảng 40-80 RU. Tiêm TG2 lên kháng thể đã cố định ở nồng độ nằm trong khoảng từ 25nM đến 400nM với thời gian tiếp xúc lên đến 600 giây ở lưu tốc $30\mu\text{l/phút}$. Sự phân ly của TG2 thường được đo trong khoảng thời gian lên đến 5400 giây (1,5 giờ). Tiếp theo, tái sinh chip bằng cách sử dụng MgCl_2 3M, trong thời gian tiếp xúc 60 giây ở lưu tốc $30\mu\text{l/ml}$, tiếp theo khoảng thời gian ổn định 300 giây trước khi thực hiện mẫu tiếp theo. Đối với mỗi TG2 của người và của khỉ đầu chó, thực hiện ít nhất 5 mũi tiêm ở các nồng độ khác nhau trong ít nhất hai thí nghiệm riêng biệt.

Trích xuất số liệu động học từ Biacore T200 Evaluation Software và phân tích bằng GraphPad Prism, trong đó các pha tổ hợp và các pha phân ly được phân tích riêng biệt lần lượt bằng mô hình tổ hợp một pha và mô hình phân kỳ theo hàm mũ một pha. Tính các trị số tốc độ tổ hợp (k_{on}) đối với mỗi đường cong, và tốc độ phân ly (k_{off}) từ số liệu pha phân ly dài thu thập được. Trong đó, trị số k_{off} được tính là $< 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, cài đặt các trị số ở 1×10^{-5} để phân tích, do các tốc độ chậm hơn trị số này không thể ước tính được một cách chính xác. Các trị số k_{on} và k_{off} nêu trong các bảng dưới đây được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình của các trị số tính được riêng rẽ đối với mỗi kháng thể đối với mỗi loại TG2 từ nhiều nồng độ ± 1 độ lệch chuẩn. Trị số K_D được tính dưới dạng k_{off} trung bình/ k_{on} trung bình.

Kết quả của thí nghiệm Biacore

Bảng 25

Kháng thể		TG2 của người				
		k_{off} (s^{-1})	st.dev	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	st.dev	K_D (M)
cAB003	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,7 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$< 6 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$8,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^{-10}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$2,1 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$< 7 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$2,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-10}$
hAB005 (hAB001AJ)		$< 10^{-5}$	-	$1,9 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$2,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$< 10^{-5}$	-	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$3,2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	$1,8 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$6,4 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$4,9 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^{-8}$
cDD9001	+ Ca^{2+}	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$7,1 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^{-9}$

Bảng 25 thể hiện số liệu động học thu được đối với TG2 của người. Trong đó, tốc độ k_{off} được tính là nhỏ hơn 10^{-5} s^{-1} , các trị số được đặt đến 10^{-5} s^{-1} để phân tích, do các tốc độ chậm hơn trị số này không thể ước tính được một cách chính xác.

Bảng 26

Kháng thể		TG2 của khí đầu chó				
		k_{off} (s^{-1})	st.dev	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	st.dev	K_D (M)
cAB003	+ Ca^{2+}	$1,2 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$9,3 \times 10^{-11}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$2,9 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$1,8 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^{-11}$
hAB005 (hAB001AJ)		$3,4 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-10}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$3,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$< 3 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$3,7 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-10}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$4,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$	$< 7 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$6,3 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-9}$
cDD9001	+ Ca^{2+}	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$4,1 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$8,9 \times 10^{-10}$

Bảng 26 thể hiện số liệu động học thu được đối với TG2 của khí đầu chó. Trong đó, tốc độ k_{off} được tính là nhỏ hơn 10^{-5} s^{-1} , các trị số được đặt đến 10^{-5} s^{-1} để

phân tích, do các tốc độ chậm hơn trị số này không thể ước tính được một cách chính xác.

Fig. 45 đến Fig. 47 cung cấp bộ số liệu Biacore được lấy ví dụ. Như có thể thấy, các kháng thể được làm cho giống như của người và dạng khảm cAB003, cBB001, hAB004, hAB005, hBB001AA, hBB001BB, cDC001 đối với TG2 có ái lực rất cao với TG2 của người và của khỉ đầu chó, với trị số K_D là 120pM hoặc cao hơn. Các kháng thể dạng khảm cDH001 và cDD9001 có tốc độ tổ hợp chậm hơn với TG2 của người và của khỉ đầu chó và ái lực chung yếu hơn. Việc kiểm tra tính chọn lọc của kháng thể khi không có mặt canxi cho thấy rằng ít hoặc không có tác dụng, ngoại trừ trong trường hợp của cDH001 và cDD9001, ở đó sự liên kết là yếu do tốc độ phân ly (k_{off}) nhanh hơn.

Tài liệu tham khảo

101. Lefranc, M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). *Nucleic Acids Res.* **31**, 307-310 (2003).
102. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).
103. Eswar, N. *et al.* Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* **Chapter 5:Unit 5.6.**, Unit (2006).
104. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol. Biol.* **224**, 487-499.
105. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Antibody modeling: implications for engineering and design. *Methods* **20**, 267-279.
106. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol. Biol.* **186**, 651-663.

Tài liệu tham khảo

1. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. Verderio, E.A., T. Johnson, and M. Griffin, *Amino Acids*, 2004. 26(4): p. 387-404.
2. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. Grenard, P., S. Bresson-Hadni, S. El Alaoui, M. Chevallier, D.A. Vuitton, and S. Ricard-Blum, *J Hepatol*, 2001. 35(3): p. 367-75.
3. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. Griffin, M., L.L. Smith, and J. Wynne, *Br J Exp Pathol*, 1979. 60(6): p. 653-61.
4. Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation. Small, K., J.F. Feng, J. Lorenz, E.T. Donnelly, A. Yu, M.J. Im, G.W. Dorn, 2nd, and S.B. Liggett, *J Biol Chem*, 1999. 274(30): p. 21291-6.
5. Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. Johnson, T.S., A.F. El-Koraie, N.J. Skill, N.M. Baddour, A.M. El Nahas, M. Njloma, A.G. Adam, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(8): p. 2052-62.
6. Thrombin upregulates tissue transglutaminase in endothelial cells: a potential role for tissue transglutaminase in stability of atherosclerotic plaque. Auld, G.C., H. Ritchie, L.A. Robbie, and N.A. Booth, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(10): p. 1689-94.
7. Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. Mosher, D.F., *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p. 63-8.
8. Transglutaminases. Lorand, L. and S.M. Conrad, *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p. 9-35.
9. Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels: a potential mechanism of tissue scarring. Fisher, M., R.A. Jones, L. Huang, J.L. Haylor, M. El Nahas, M. Griffin, and T.S. Johnson, *Matrix Biol*, 2009. 28(1): p. 20-31.
10. Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. Johnson, T.S., N.J. Skill, A.M. El Nahas, S.D. Oldroyd, G.L.

Thomas, J.A. Douthwaite, J.L. Haylor, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(10): p. 2146-57.

11. Do changes in transglutaminase activity alter latent transforming growth factor beta activation in experimental diabetic nephropathy? Huang, L., J.L. Haylor, M. Fisher, Z. Hau, A.M. El Nahas, M. Griffin, and T.S. Johnson, *Nephrol Dial Transplant*, 2010. 25(12): p. 3897-910.

12. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. Suto, N., K. Ikura, and R. Sasaki, *J Biol Chem*, 1993. 268(10): p. 7469-73.

13. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. Kuncio, G.S., M. Tsyganskaya, J. Zhu, S.L. Liu, L. Nagy, V. Thomazy, P.J. Davies, and M.A. Zern, *Am J Physiol*, 1998. 274(2 Pt 1): p. G240-5.

14. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. Skill, N.J., T.S. Johnson, I.G. Coutts, R.E. Saint, M. Fisher, L. Huang, A.M. El Nahas, R.J. Collighan, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2004. 279(46): p. 47754-62.

15. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. Johnson, T.S., M. Fisher, J.L. Haylor, Z. Hau, N.J. Skill, R. Jones, R. Saint, I. Coutts, M.E. Vickers, A.M. El Nahas, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(12): p. 3078-88.

16. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. Huang, L., J.L. Haylor, Z. Hau, R.A. Jones, M.E. Vickers, B. Wagner, M. Griffin, R.E. Saint, I.G. Coutts, A.M. El Nahas, and T.S. Johnson, *Kidney Int*, 2009. 76(4): p. 383-94.

17. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. Shweke, N., N. Boulos, C. Jouanneau, S. Vandermeersch, G. Melino, J.C. Dussaule, C. Chatziantoniou, P. Ronco, and J.J. Boffa, *Am J Pathol*, 2008. 173(3): p. 631-42.

18. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. Xu,

- L., S. Begum, J.D. Hearn, and R.O. Hynes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(24): p. 9023-8.
19. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. Esposito, C., F. Paparo, I. Caputo, M. Rossi, M. Maglio, D. Sblattero, T. Not, R. Porta, S. Auricchio, R. Marzari, and R. Troncone, *Gut*, 2002. 51(2): p. 177-81.
 20. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. Pinkas, D.M., P. Strop, A.T. Brunger, and C. Khosla, *PLoS Biol*, 2007. 5(12): p. e327.
 21. Functional significance of five noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. Kiraly, R., E. Csosz, T. Kurtan, S. Antus, K. Szigeti, Z. Simon-Vecsei, I.R. Korponay-Szabo, Z. Keresztessy, and L. Fesus, *Febs J*, 2009. 276(23): p. 7083-96.
 22. 3,5 substituted 4,5-dihydroisoxazoles as transglutaminase inhibitors. Syntex, US Patent 4, 912, 120, 1990. March.
 23. Griffin M, Coutts I G, and S. R, *Novel Compounds and Methods of Using The Same.*, in *International Publication Number WO 2004/113363.*, 2004: GB patent PCT/GB2004/002569.
 24. Acylideneoxindoles: a new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. Klock, C., X. Jin, K. Choi, C. Khosla, P.B. Madrid, A. Spencer, B.C. Raimundo, P. Boardman, G. Lanza, and J.H. Griffin, *Bioorg Med Chem Lett*. 21(9): p. 2692-6.
 25. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. Siegel, M. and C. Khosla, *Pharmacol Ther*, 2007. 115(2): p. 232-45.
 26. Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. Siegel, M., J. Xia, and C. Khosla, *Bioorg Med Chem*, 2007. 15(18): p. 6253-61.
 27. Novel therapies for celiac disease. Sollid, L.M. and C. Khosla, *J Intern Med*. 269(6): p. 604-13.
 28. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Fesus, L. and M. Piacentini, *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(10): p. 534-9.

29. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Lorand, L. and R.M. Graham, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(2): p. 140-56.
30. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. Toth, B., E. Garabuczi, Z. Sarang, G. Vereb, G. Vamosi, D. Aeschlimann, B. Blasko, B. Becsi, F. Erdodi, A. Lacy-Hulbert, A. Zhang, L. Falasca, R.B. Birge, Z. Balajthy, G. Melino, L. Fesus, and Z. Szondy, *J Immunol*, 2009. 182(4): p. 2084-92.
31. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. Davies, P.J., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, and I.H. Pastan, *Nature*, 1980. 283(5743): p. 162-7.
32. GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique GTP-binding pocket. Iismaa, S.E., M.J. Wu, N. Nanda, W.B. Church, and R.M. Graham, *J Biol Chem*, 2000. 275(24): p. 18259-65.
33. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP. Iismaa, S.E., L. Chung, M.J. Wu, D.C. Teller, V.C. Yee, and R.M. Graham, *Biochemistry*, 1997. 36(39): p. 11655-64.
34. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. Nakaoka, H., D.M. Perez, K.J. Baek, T. Das, A. Husain, K. Misono, M.J. Im, and R.M. Graham, *Science*, 1994. 264(5165): p. 1593-6.
35. Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. Fesus, L. and V. Thomazy, *Adv Exp Med Biol*, 1988. 231: p. 119-34.
36. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. Fesus, L., V. Thomazy, and A. Falus, *FEBS Lett*, 1987. 224(1): p. 104-8.
37. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and beta1 integrin co-signaling. Telci, D., Z. Wang, X. Li, E.A. Verderio, M.J. Humphries, M. Baccarini, H. Basaga, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2008. 283(30): p. 20937-47.

38. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. Verderio, E., B. Nicholas, S. Gross, and M. Griffin, *Exp Cell Res*, 1998. 239(1): p. 119-38.
39. A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. Verderio, E.A., D. Telci, A. Okoye, G. Melino, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2003. 278(43): p. 42604-14.

Tài liệu tham khảo

1. Lefranc, M.P. IMGT, the international ImmunoGeneTics database(R). *Nucleic Acids Res.* 31, 307-310 (2003).
2. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).
3. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. Chapter 5: Unit 5.6., Unit (2006).
4. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol. Biol.* 224, 487-499.
5. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Antibody modeling: implications for engineering and design. *Methods* 20, 267-279.
6. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol. Biol.* 186, 651-663.

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với epitop trong vùng lõi của transglutaminaza typ 2 (TG2) và ức chế TG2 người liên kết chéo với lysin và glutamin bằng các liên kết $N\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ isopeptit, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự axit amin sau:

- (i) KASQDINSYLT (LCDR1);
LVNRLVD (LCDR2);
LQYDDFPYT (LCDR3);
THAMS (HCDR1);
TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); và
LISTY (HCDR3); hoặc
- (ii) KASQDINSYLT (LCDR1);
LTNRLMD (LCDR2);
LQYVDFPYT (LCDR3);
SSAMS (HCDR1);
TISSGGRSTYYPDSVKG (HCDR2); và
LISPY (HCDR3); hoặc
- (iii) KASQDINSYLT (LCDR1);
RTNRLFD (LCDR2);
LQYDDFPYT (LCDR3);
SSAMS (HCDR1);
TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2); và
LISLY (HCDR3).

2. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có:

- (i) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DITMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVN
RLVDGVPSRFSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTK
VEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMS WVRQAPGKGLEWVA
TISSGGRSTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLIS
TYWGQGTLVTVSS; hoặc

(ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTN
RLMDGVPSRFSGSGSGQEFLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTK
VEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMS WVRQAPGKGLEWVATI
SSGGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISP
YWQGQTLVTVSS; hoặc

(iii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFFTISSLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGTKL
EIK, hoặc
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTN
RLFDGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKV
EIK,

và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMS WVRQAPGKGLEWVST
ISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLIS
LYWGQGTLLVTVSS.

3. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết chọn lọc với epitop trong vùng lõi của transglutaminaza typ 2 (TG2) và ức chế TG2 người liên kết chéo với lysin và glutamin bằng các liên kết $N\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ isopeptit, có:

(a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLQKPGQSPKFL
IYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPFTFG

GGTKLEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQGLEWIGYINPYNDGA
KYNE KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS;

hoặc

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKL
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVAEDLGVIYYCLQVSHVPFTF

SGGTKLEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIG
FINPYNDGTKYNEKFKGKATLTSDKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFS
SGYWGQGTTLTVSS; hoặc

(c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKF
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISSEVAEDLGVIYYCFQGSHPFTF

GGGTKLEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIG
YINPYNDGARYNEKFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARL
SSDYWGQGTTLTVSS; hoặc

(d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYYWYQKPGSSPRLLIYDTS
NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGT

KLELK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAH
IYWDGDKRYNPSLKSRTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTT
APFAFWGQGTTLTVSA; hoặc

(e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYYWYQKPGSSPRLLIYDTS
NLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEGAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTK

LELK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAH

IYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTT
APFAYWGQGLVTVSA; hoặc

(f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIQEKPDHLFTGLIA
GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFG
GGTKVTVLG, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHWVKQNLGKSLEWI
GYINPKNGVIYYNQKFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCAT
ALTYWGQGLVTVSA; hoặc

(g) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự

DVVMQTQPLTLSVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLFQRPQGSPRR
LIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCVQGTHFPYT
FGGGTKLEIK, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMG
WINTSSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLSKSEDATYFCARPE
VAYWGQGLVTVSA.

4. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

(a) kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa hoặc bao gồm kháng thể nguyên vẹn;

(b) kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa hoặc bao gồm đoạn liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm: đoạn Fv, ví dụ đoạn Fv chuỗi đơn hoặc đoạn Fv được liên kết disulfua; đoạn Fab; và đoạn giống Fab, ví dụ đoạn Fab' hoặc đoạn F(ab)₂;

(c) kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó là IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

5. Polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

6. Hợp chất chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và một gốc nữa, ví dụ gốc có thể phát hiện dễ dàng, và/hoặc gốc gây độc tế bào trực tiếp hoặc gián tiếp.
7. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, hoặc polynucleotit theo điểm 5, hoặc hợp chất theo điểm 6, trong hỗn hợp với tá dược, chất phụ gia, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng, tùy ý chứa thêm một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác nữa, ưu tiên là trong đó dược phẩm/chế phẩm dược này được bào chế để dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, hoặc dưới da cho người bệnh.
8. Bộ kit gồm các thành phần chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, hoặc polynucleotit theo điểm 5, hoặc hợp chất theo điểm 6; và một tác nhân khác.
9. Phương pháp *in vitro* để làm giảm hoặc ức chế hoạt tính enzym TG2, phương pháp này bao gồm bước dùng kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, hoặc polynucleotit theo điểm 5, hoặc hợp chất theo điểm 6, vào mẫu chứa TG2, ví dụ mẫu mô hoặc tế bào chứa TG2.
10. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, hoặc hợp chất theo điểm 6, phương pháp này bao gồm biểu hiện polynucleotit theo điểm 5.

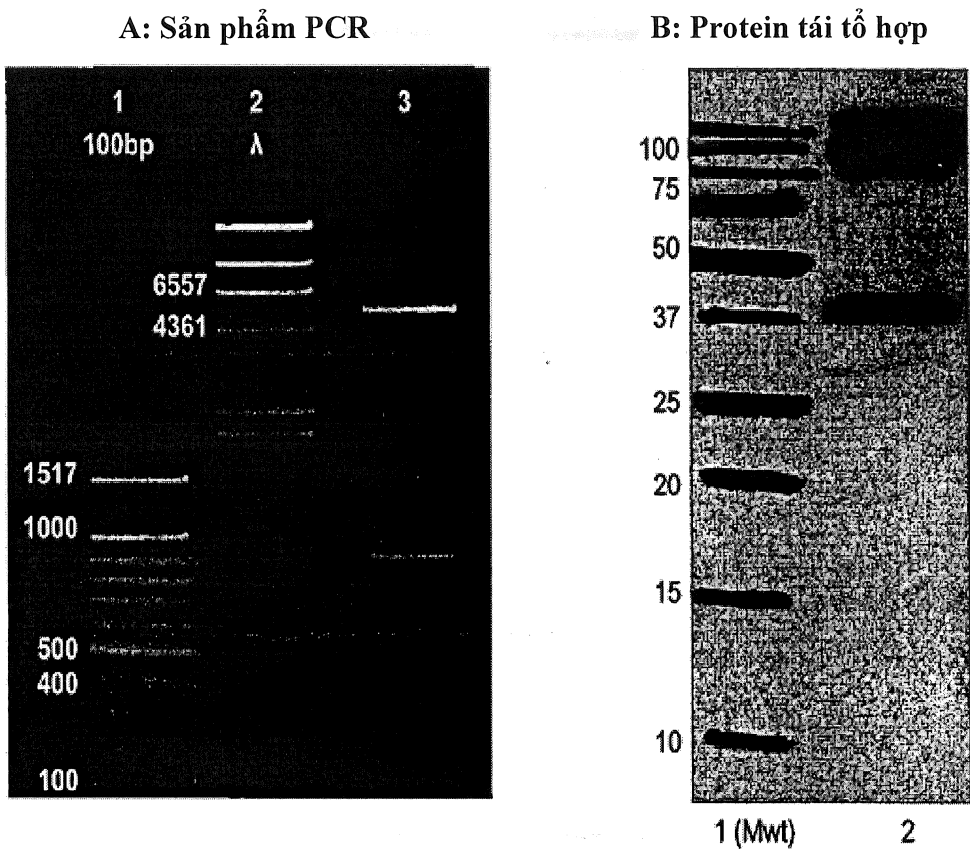
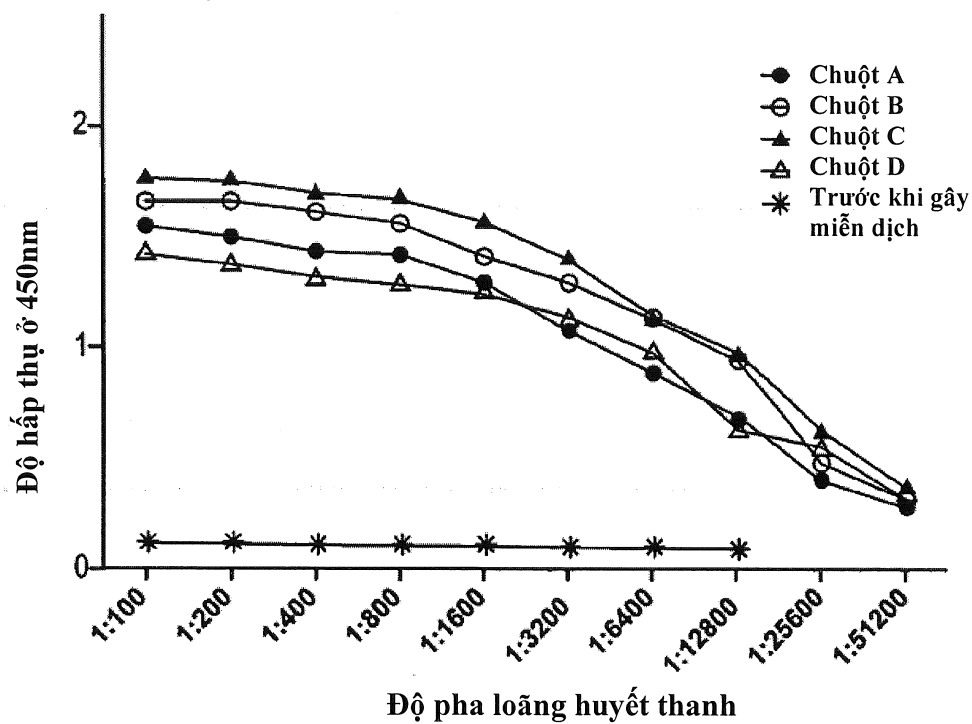


FIG. 1

A: ELISA huyết thanh



B: Thẩm tách protein huyết thanh

Chuột C

Chuột 1

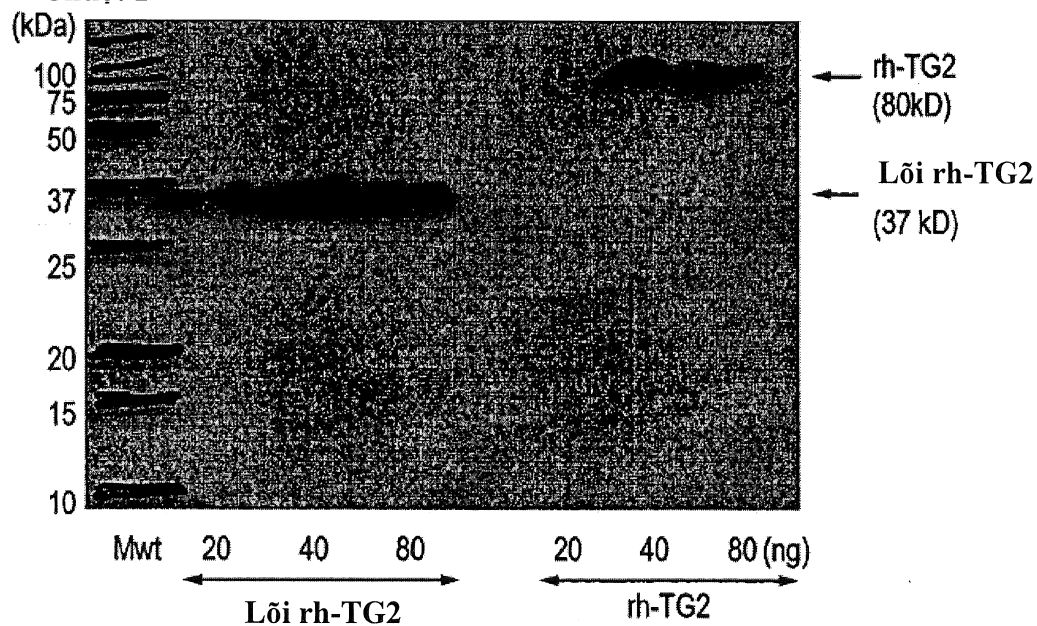
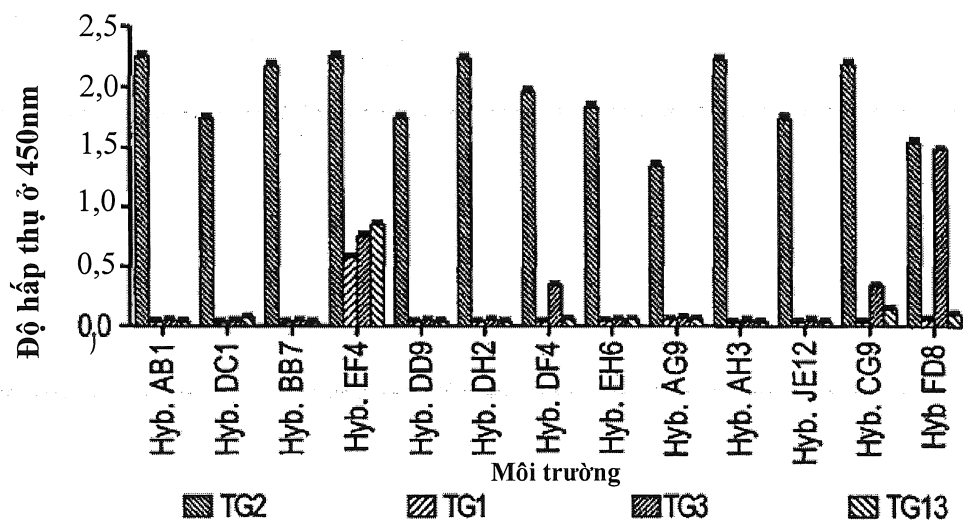


FIG. 2

A: Sàng lọc ban đầu môi trường có điều kiện



B: Khả năng phản ứng của mAb tinh chế được

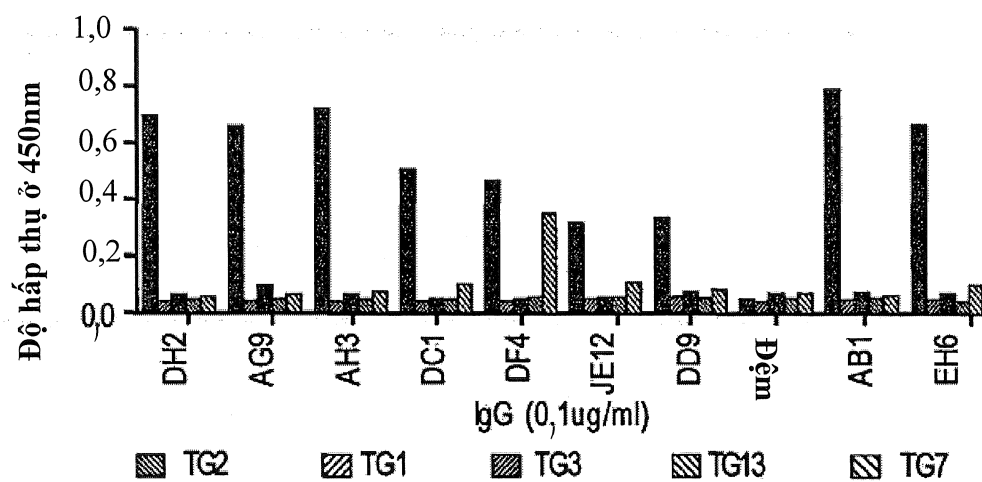


FIG. 3

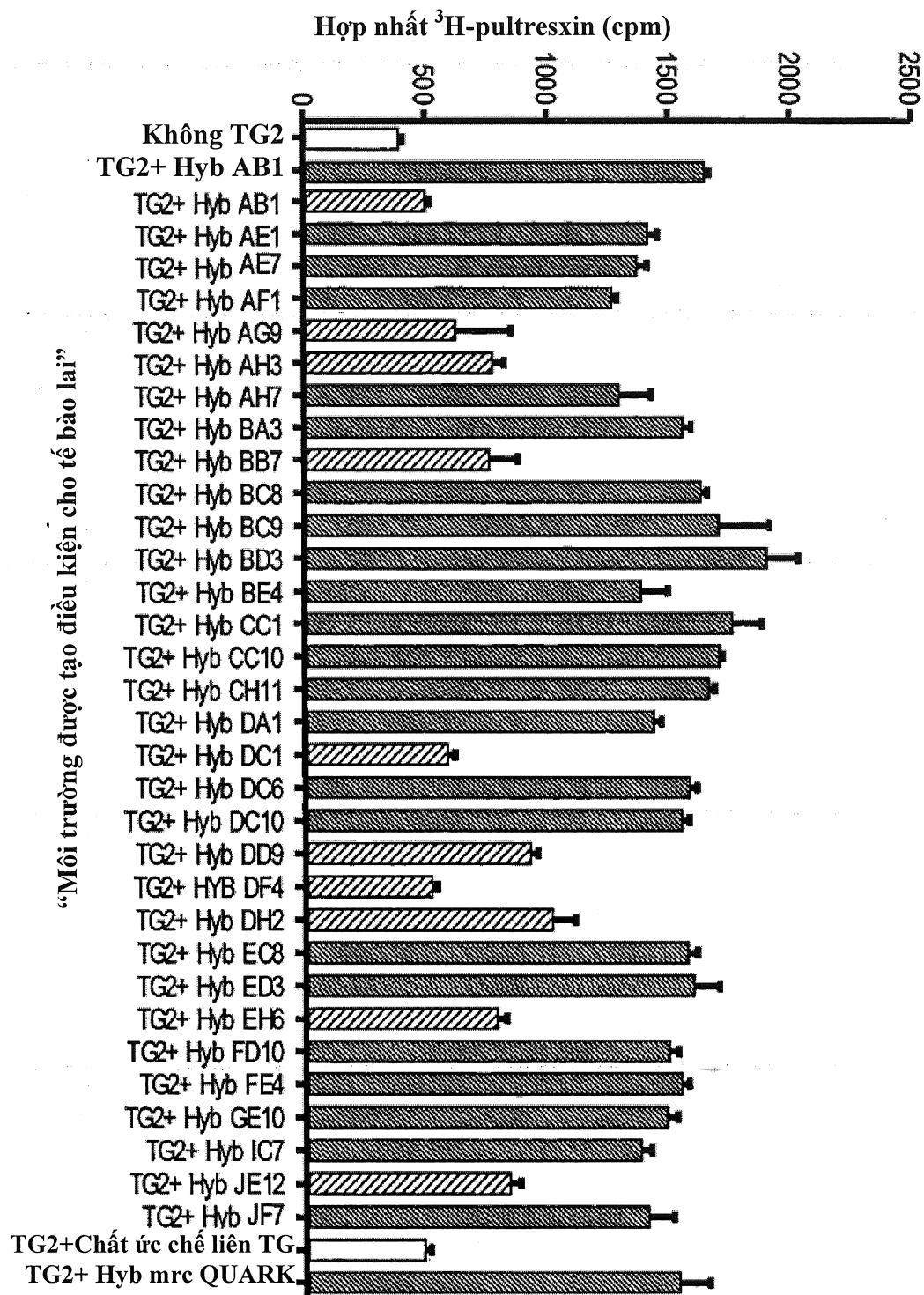


FIG. 4

Nhóm 1: Vị trí – trước vị trí hoạt động – túi liên kết với cơ chất

AB-1, AG-1, AH-1, BB-7, DC-1, EH-6, JE-12
 TG2 chuột nhất YNSAHDQNSKLLIEYFRNEFELESNKSEMI
 Chuột cống YNSAHDQNSKLLIEYFRNEFELESNKSEMI
 Người YNSAHDQNSKLLIEYFRNEFEIEIQDCKSEMI
 *****;***:::*****

Nhóm 2: Vị trí – ở phía sau lõi sau vị trí hoạt động

DF-4
 TG2 chuột nhất SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPTPQEKSEGTYCCGPVS
 Chuột cống SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPTPQEKSEGTYCCGPVS
 Người SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPTPQEKSEGTYCCGPVP
 *****;*****

Nhóm 3: Vị trí – sau lõi nối với thân beta-1

Bao hàm vị trí liên kết với canxi

DD-9 và DH-2

TG2 chuột nhất TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
 Chuột cống TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
 Người TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
 *****;****;***:*****;*****

FIG. 5

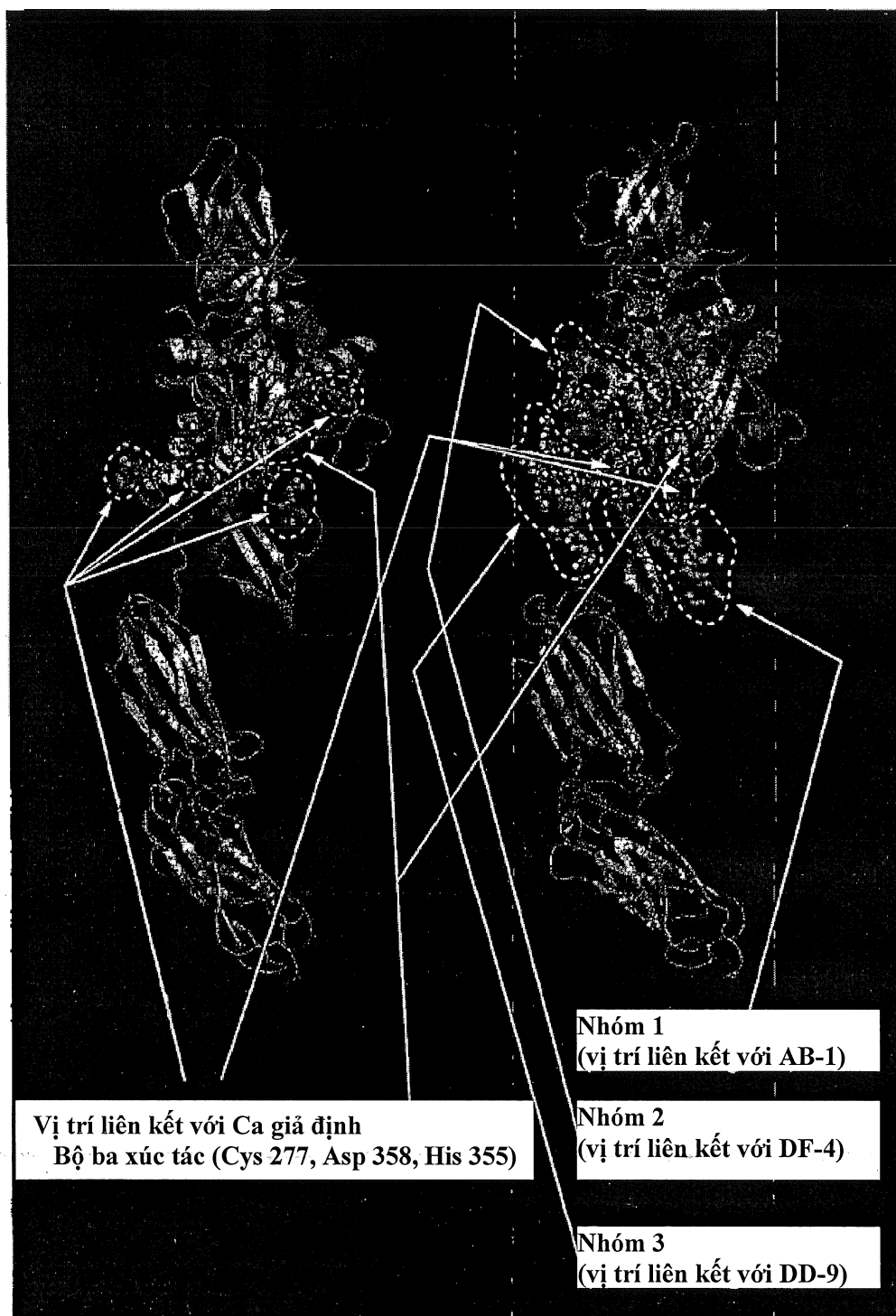


FIG. 6

Kháng thể AB-1**AB1 VH**

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGC
 CAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAA
 ACCCACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
 AACACCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTAC
 TGTGCAAACTAATCAGTCTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AB1 VH

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSQVRQTPDRRLEWVATISVGGGK
 THYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTTLTVSS

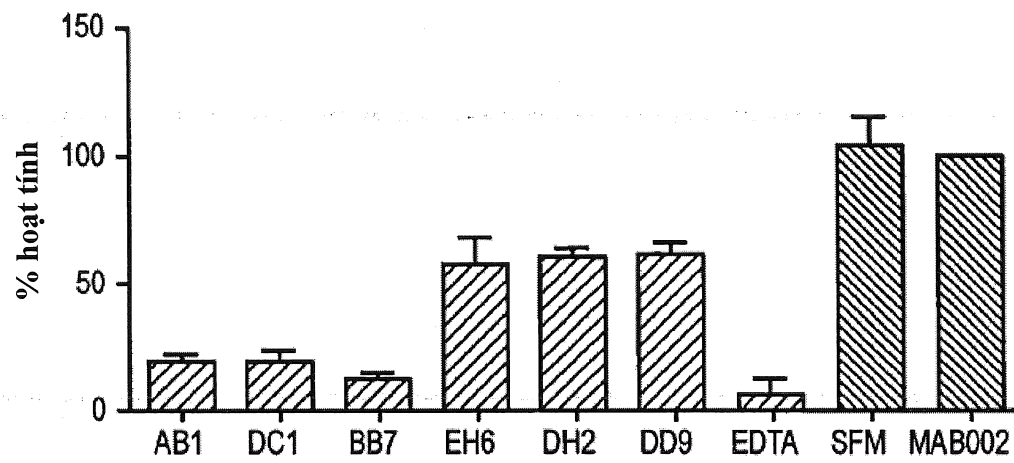
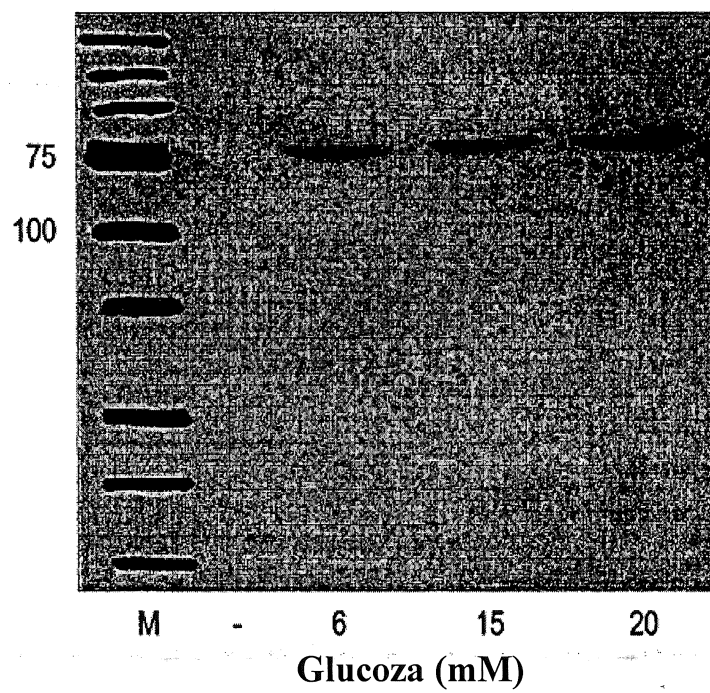
AB1 VK

GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTC
 ACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAG
 AAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGG
 GTCCCATCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGC
 AGCCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCG
 TACACGTTCCGAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAAA

AB1 VK

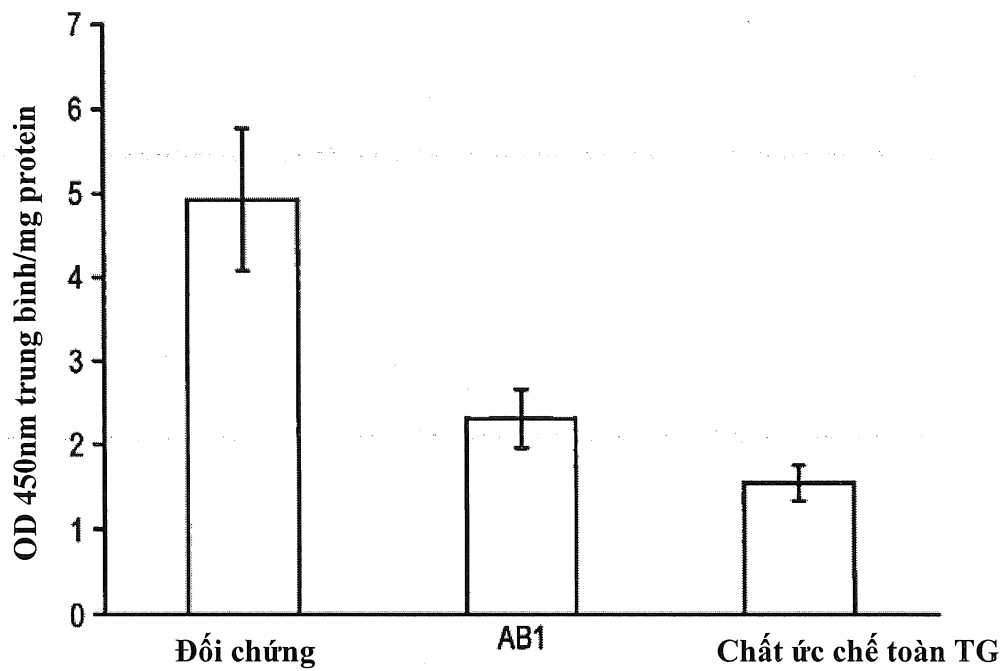
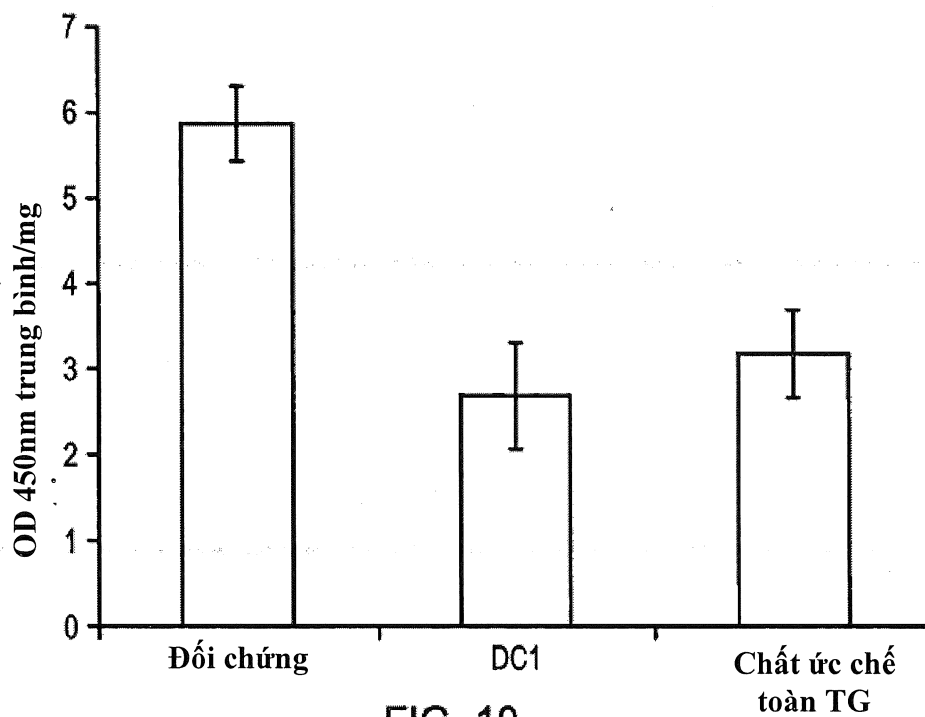
DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
 VPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 7

A: Ức chế TG**B: Thẩm tách protein****FIG. 8**

	IC50 hTG2 (mg/ml IgG/ng TG2)	IC50 rTG2 (mg/ml IgG/ng TG2)	IC50 mTG2 (mg/ml IgG/ng TG2)	Tỷ lệ Người/chuột cống	Tỷ lệ hTG2 IC50 với chất ức chế của người tốt nhất	Tỷ lệ rTG2 IC50 với chất ức chế của người tốt nhất
AB1	$1,09 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	1	-
DC1	$1,23 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	1,1	-
BB7	$1,59 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-4}$	NI	20	1,47	29,4
AG9	$4,87 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	4,47	-
DD9	$5,24 \times 10^{-5}$	$3,03 \times 10^{-4}$	NI	6	4,87	29,22
DH2	$6,7 \times 10^{-5}$	$2,23 \times 10^{-4}$	NI	-	6,2	38,13
EH6	$6,9 \times 10^{-5}$	$4,03 \times 10^{-4}$	NI	5,8	6,33	36,714
AH3	$7,8 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	7,1	-
JE12	$12,3 \times 10^{-6}$	NI	NI	-	11,3	-

FIG. 9

A: Ức chế bằng kháng thể AB1**B: Ức chế bằng kháng thể DC1****FIG. 10**

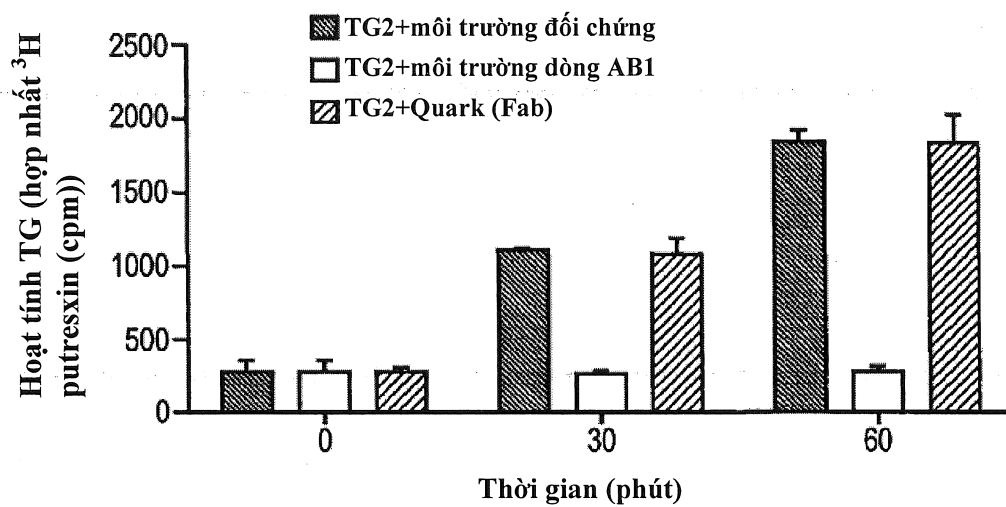


FIG. 11

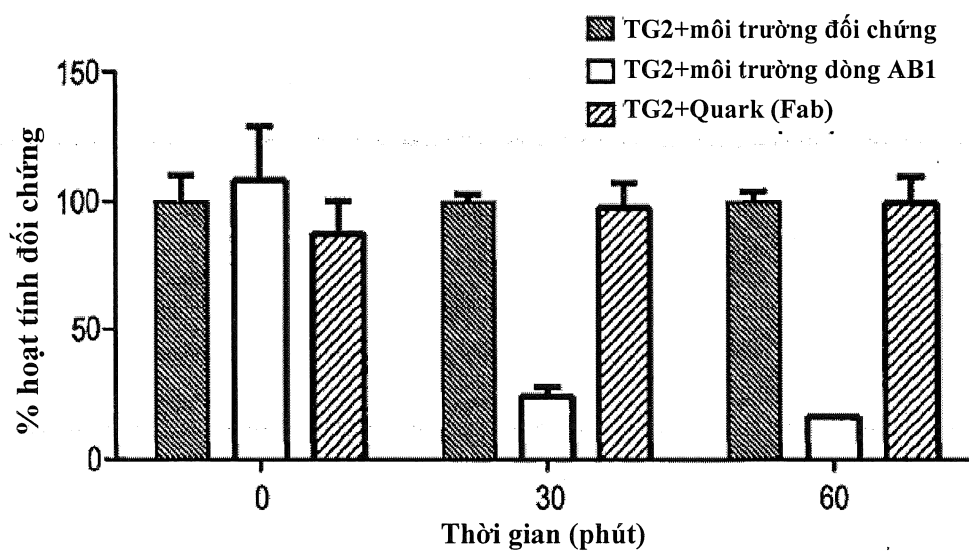


FIG. 12

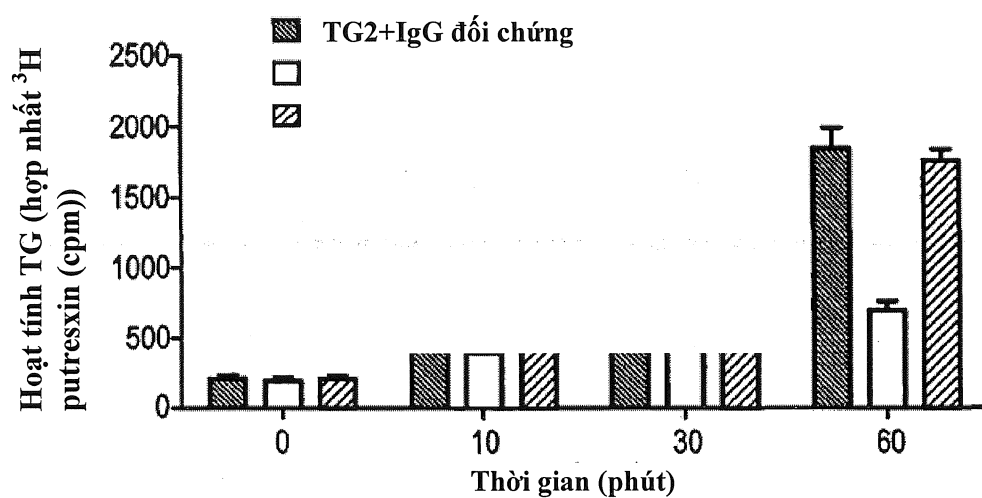


FIG. 13

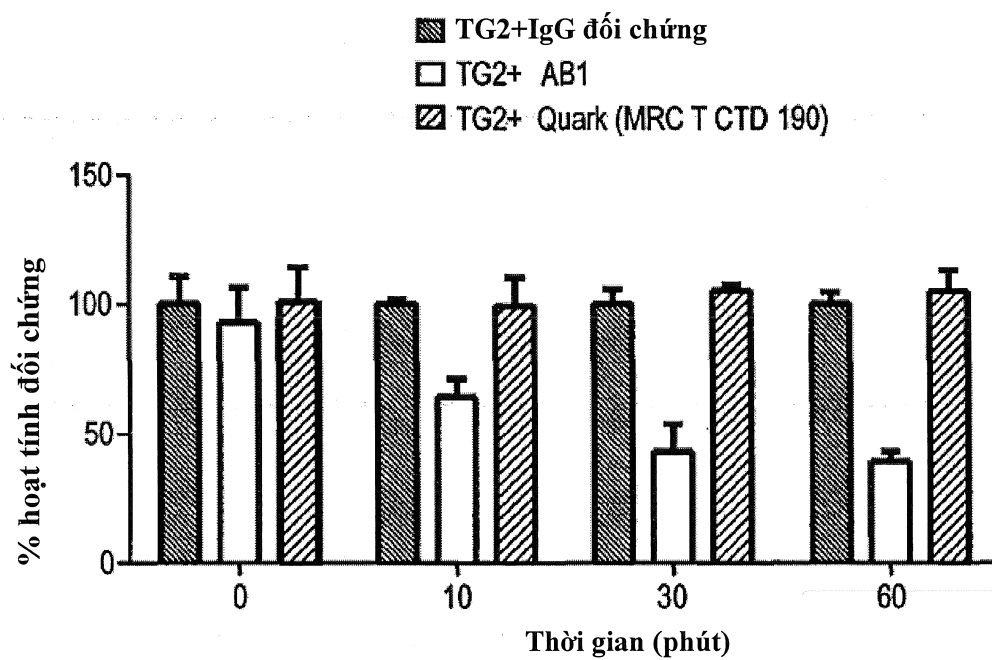


FIG. 14

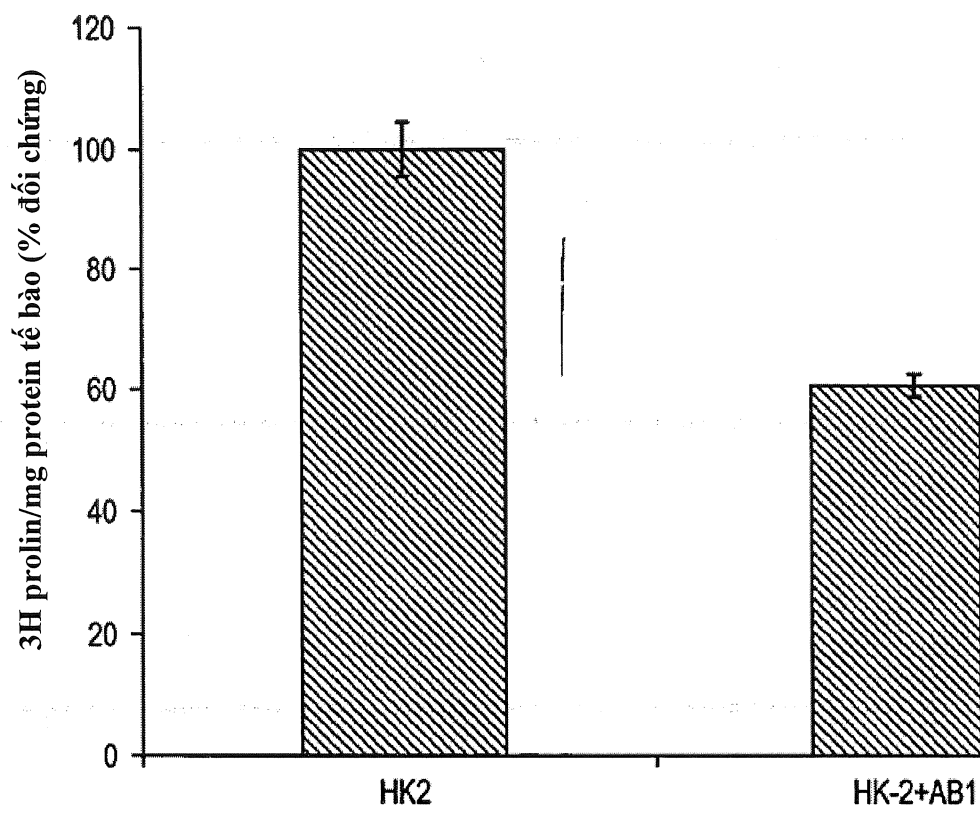
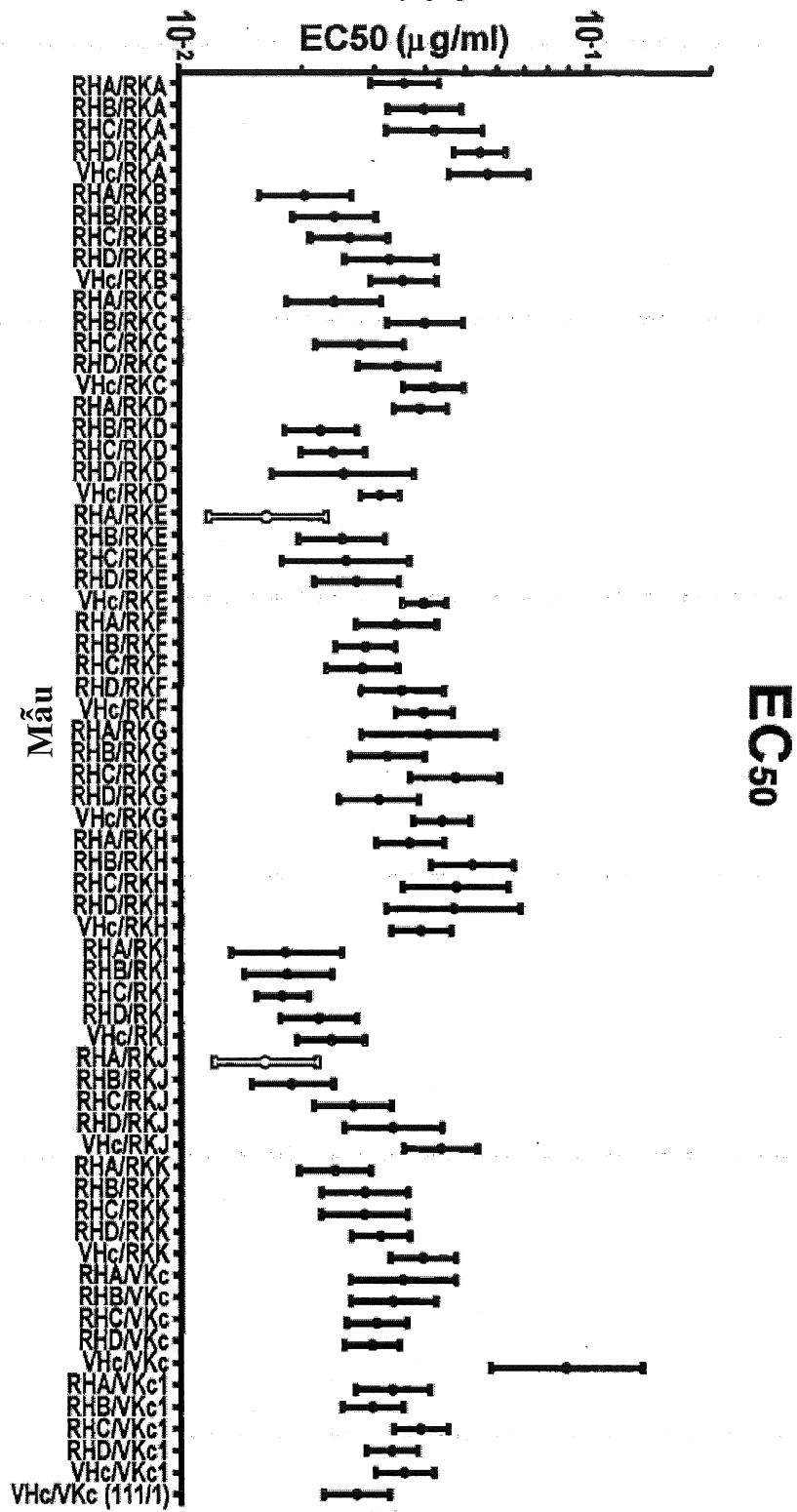


FIG. 15



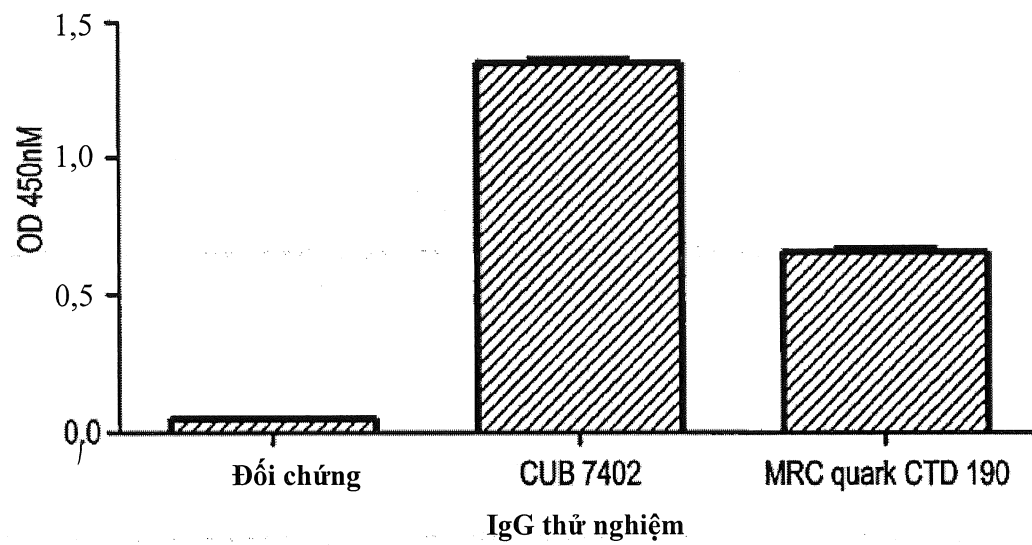


FIG. 17

Kháng thể AB1**AB1_VH**

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTGGGTTCCGCCAGACTCCGG
 ACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGAC
 AGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTCTATCTGCAAAT
 GAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCTCTACT
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AB1_VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSQVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPD
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

AB1_VK

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT
 CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGA
 AATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGGGTCCCATCCAGGTC
 AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAGATAT
 GGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAAC
 TGGAATAAAA

AB1_VK

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRF
 SGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 18

Kháng thể BB-7**BB7 VH**

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
 CTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG
 AAAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACTATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGAC
 AGTGTGAAGGGTCGATTCACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCTATACCTGCAAAT
 GGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCCCTACT
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

BB7 VH

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIIFSSSAMSWMVQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD
 SVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTTLTVSS

BB7 VK

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCATCAT
 CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTTCCAACAGAAACCAGGAA
 AGTCTCCTAAGACCCTGATCTATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTT
 AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAATTTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACATGAAGATAT
 GGGCATTATTTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGC
 TGGAAATAAAA

BB7 VK

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRF
 SGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 19

Kháng thể DC-1**DC1_VH**

GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGG
 AGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGAC
 AGTGTGAAGGGTCGATTCACTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACCCCTATATCTGCAACT
 GAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCTACT
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

DC1_VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSVMRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD
 SVKGRFTISRDNVKNLTLYLQLSSLRSEDVAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS

DC1_VK

GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACTAT
 CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGA
 AATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGTAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTT
 AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAGATAT
 GGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGC
 TGGAAATAAAA

DC1_VK

DITMTQSPSSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFOQKPGKSPKILIYLVNRLVDGVPSRF
 SGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 20

Kháng thể JE-12**JE12 VH**

GAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
 CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCAGTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAACAGAAGTCTG
 GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAAGTACAATGAG
 AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT
 CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTATT
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

JE12 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQGLEWIGYINPYNDGAKYNE
 KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTTLTVSS

JE12 VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
 CTCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTGAACATATTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC
 TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
 GTCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGT
 GGAGGCTGAAGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTTACGTTTCG
 GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

JE12 VK

DVLMTQNPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVS NRFSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK

FIG. 21

Kháng thể EH-6**EH6 VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
 CTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTAGTTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
 GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATTTATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAG
 AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACCTCAGACAAAGCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCT
 CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTCTCCTCTGGGTACT
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

EH6 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGFINPYNDGTYNE
 KFKGKATLTSDKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFSSGYWGQGTTLTVSS

EH6 VK

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
 CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC
 TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAATCGATTTTCTGGG
 GTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGT
 GGGGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCCTTCAAGTTTCACATGTTTCCTTTCACGTTCTG
 GCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

EH6 VK

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGS
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVAEDLGVYYCLQVSHVPFTFGSGTKLEIK

FIG. 22

Kháng thể AG-9**AG9 VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
 CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACCTACCTATGTTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
 GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG
 AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAAC
 CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTTTCTAGTGACTACT
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AG9 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE
 KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTTLTVSS

AG9 VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGCGATCAGGCCTCCAT
 CTCTTGAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC
 TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
 GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGTGT
 GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTTCCGTTACGTTTCG
 GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

AG9 VK

DVLMTQNPLSLPVSIGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
 VPDFSGSGSGTDFTLRISSEVAEDLGVIYCFQGSHPFTFGGGTKLEIK

FIG. 23

Kháng thể AH-3**AH3 VH**

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
 CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACTACCTATGTTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
 GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG
 AAGTTCAAAGGCAAGGCCCACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAAC
 CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTACT
 GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AH3 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE
 KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

AH3 VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCAT
 CTCTTGCAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC
 TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
 GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGTGT
 GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTTACGTTTCG
 GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

AH3 VK

DVLMTONPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
 VPDREFSGSGSDTFTLRISSEAEADLGVIYCFQGSHPFTFGGGTKLEIK

FIG. 24

Kháng thể DD-9**DD9_VH**

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGAC
 TTGTTCTTTTTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCGGGTATGGGTGTGAGTTGGATTTCGTCAGT
 CCTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC
 CCATCCCTGAAGAGCCGGATCACAATCTCCAAGGATTCCTCAAGCAACCAGGTATTCCTCAA
 GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTACTGTGCTCGAAGTTGGACTACGG
 CCCGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DD9_VH

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYN
 PSLKSRITISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGLVTVSA

DD9_VK

CAAATTGTTCTACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
 GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAGATTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
 CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGT
 GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGGGGCTGAAGATGCTGC
 CACTTATTACTGCCAACAGTGGAATAGTTCCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
 AGCTGAAA

DD9_VK

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVDMYQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRF
 GSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK

FIG. 25

Kháng thể DH-2**DH2_VH**

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGAC
 TTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCAGTGAAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTTCGTCAGC
 CTTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC
 CCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGCAACCAGGTATTCCTCAA
 GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGTGGGACTACGG
 CCCCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DH2_VH

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYN
 PSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVTSA

DH2_VK

CAAATTGTTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
 GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
 CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGT
 GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGC
 CACTTTTTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTCCCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
 AGCTGAAA

DH2_VK

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPVRFSS
 GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQWSSSPLTFGAGTKLELK

FIG. 26

Kháng thể DD-6**DD6 VH**

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGCCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
 CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCACTGACTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGAACCTTG
 GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAACCCTAAAAATGGTGTTATTTACTACAACCAG
 AAGTTC AAGGGCAAGGCCACATTGACAGTGAACAGGTCTCCAACACAGCCTACATGGAGAT
 CCGCAGCCTGACATCGGAAGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAGCTCTGACTTACTGGG
 GACAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DD6 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHVVKQNLGKSLEWIGYINPKNGVIYYNQ
 KFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCATALTYWGQGLVTVSA

DD6 VL

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCAC
 TTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTGCAGCTAATAACTATGCCAACTGGATCCAAGAAAAAC
 CAGATCATTATTTACTGGTCTGATAGCTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTGTTCTGCC
 AGATTCTCAGGCTCCCTGATAGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGA
 GGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACTATTGGGTGTTCCGGTGGAGGAA
 CCAAAGTGA CTGTCCTAGGC

DD6 VL

QAVVTQESALTTSPGETVTILTCRSSTGAVAANNYANWIEKPDHLFTGLIAGTNKRAPGVPA
 RFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKVTVLG

FIG. 27

Kháng thể IA-12**IA12_VH**

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
 CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACCTATGGAATGACCTGGGTGAAACAGGCTCCAG
 GAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTCCTCTGGAGTGCCAACATATGCTGAT
 GACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGAT
 CAACAACCTCAAAAGTGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGACCGGAAGTTGCTTACT
 GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

IA12_VH

QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMGWINTSSGVPTYAD
 DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLSKSEDTATYFCARPEVAYWGQGLVTVSA

IA12_VK

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGGTACCTTTGGACAACCAGCCTCTAT
 CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATGATAATGGAAAGACTTATTTGCATTGGTTAT
 TTCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGA
 GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT
 GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCTG
 GAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAAA

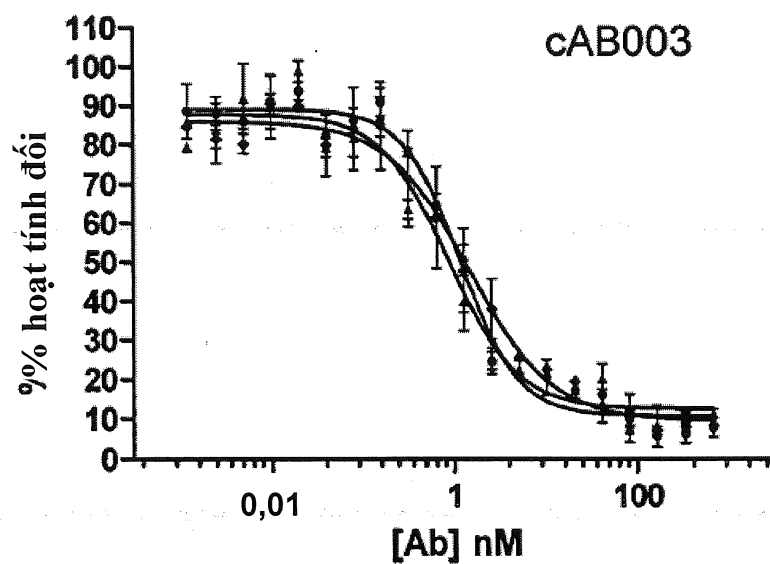
IA12_VK

DVVMTQTPLTSLVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLFQRPQGSPRRLIYLVSKLD SG
 VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCVQGT HFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 28

A

	IC50 nM (SD)
cAB003	1,172 (0,297)



B

	IC50 nM (SD)
cBB001	0,925 (0,228)

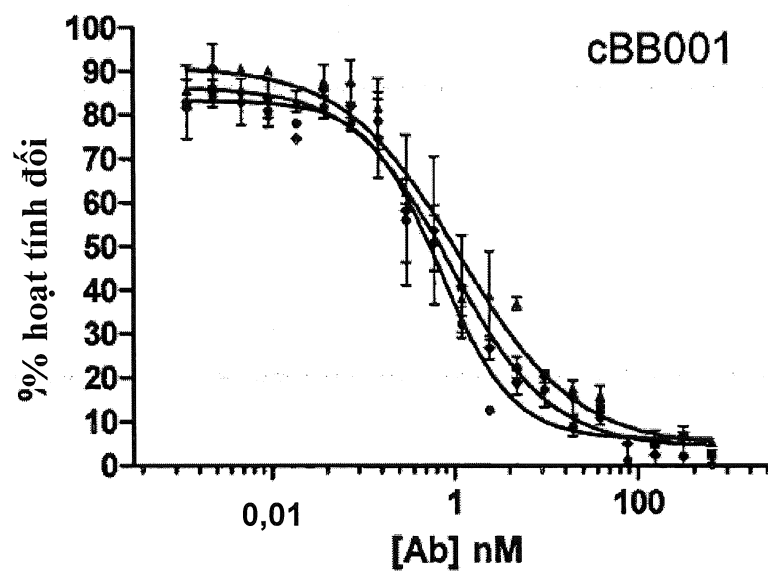
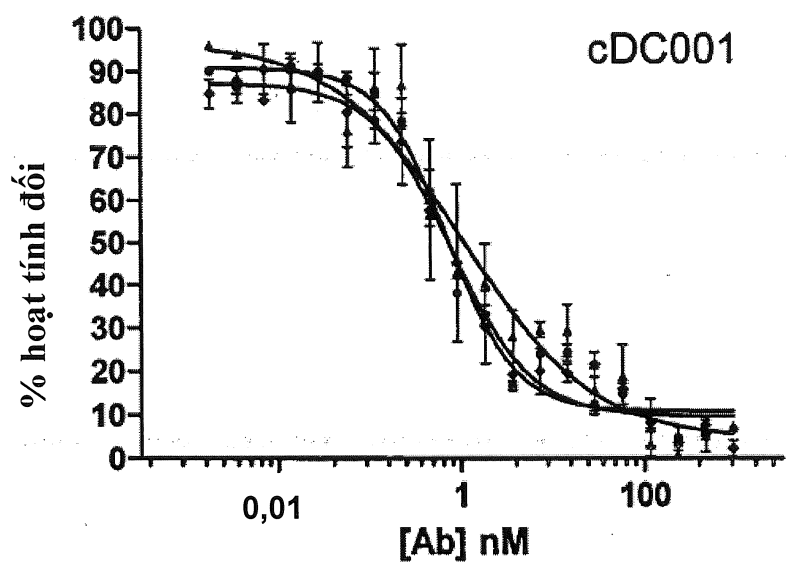


FIG. 29

C

	IC50 nM (SD)
cDC001	0,851 (0,177)



D

	IC50 nM (SD)
cDD9001	172,033 (23,353)

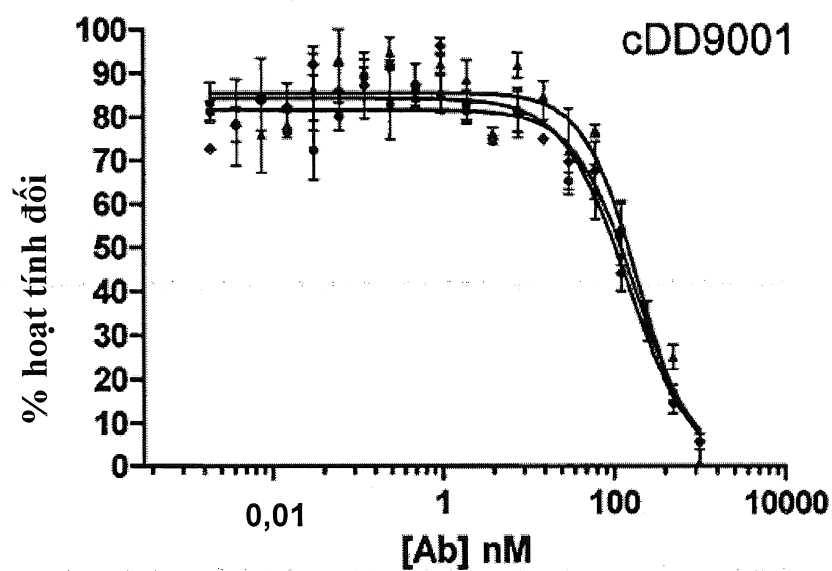
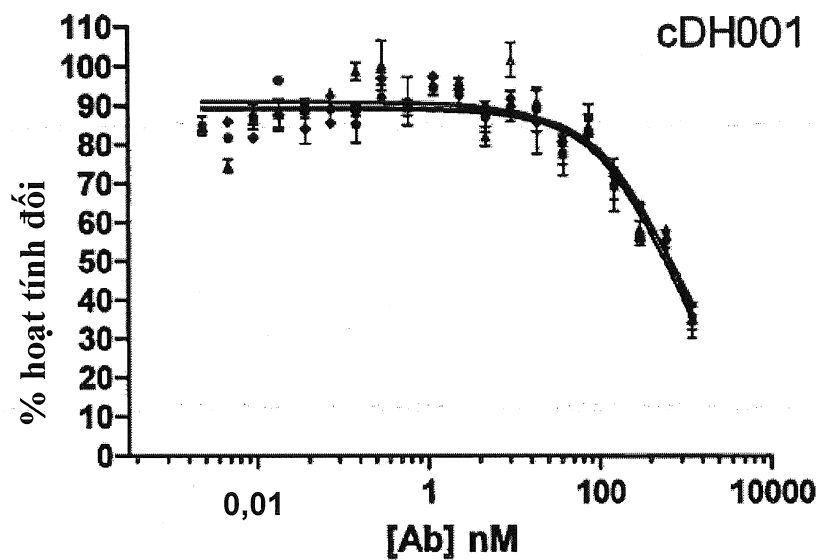


FIG. 29(tiếp tục)

E

	IC50 nM (SD)
cDH001	829,233 (59,923)



F

	IC50 nM
CUB7402	>100

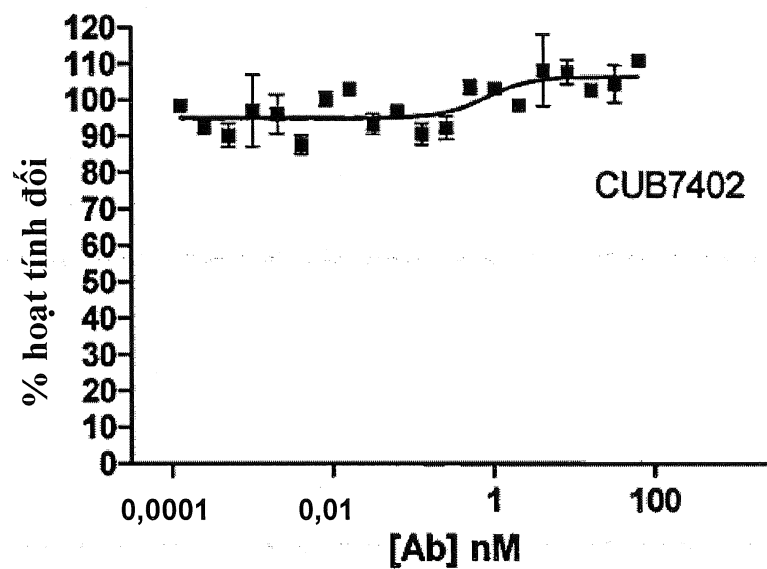
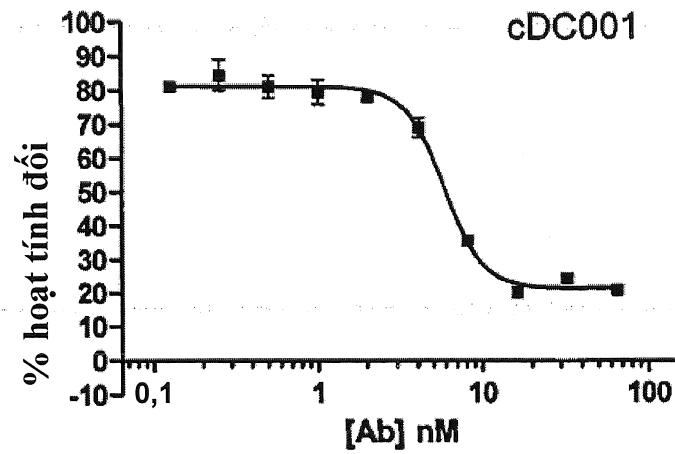


FIG. 29 (tiếp tục)

A

	IC50 nM
cDC001	5,862



B

	IC50 nM
CUB7402	>100

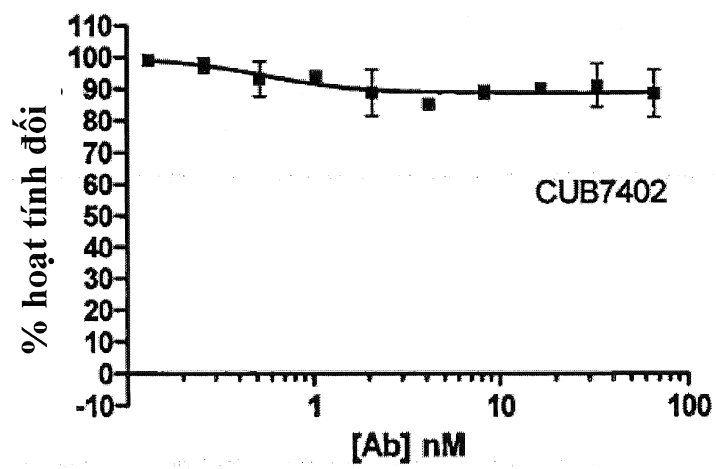
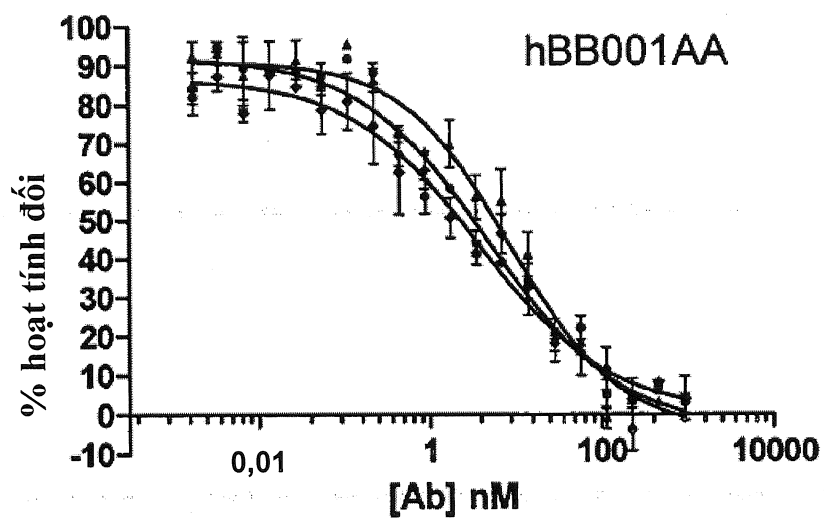


FIG. 30

A

	IC ₅₀ (SD)	nM
hBB001AA	5,987 (2,643)	



B

	IC ₅₀ nM (SD)
hBB001BB	0,985 (0,140)

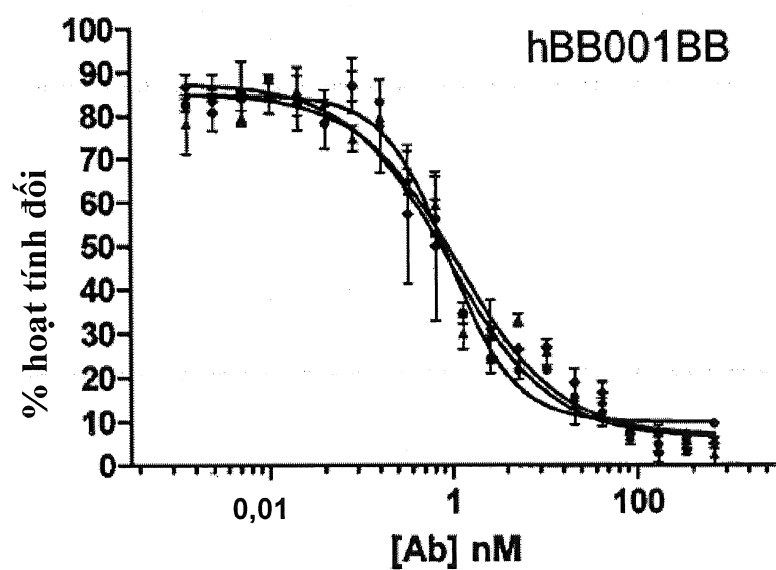


FIG. 31

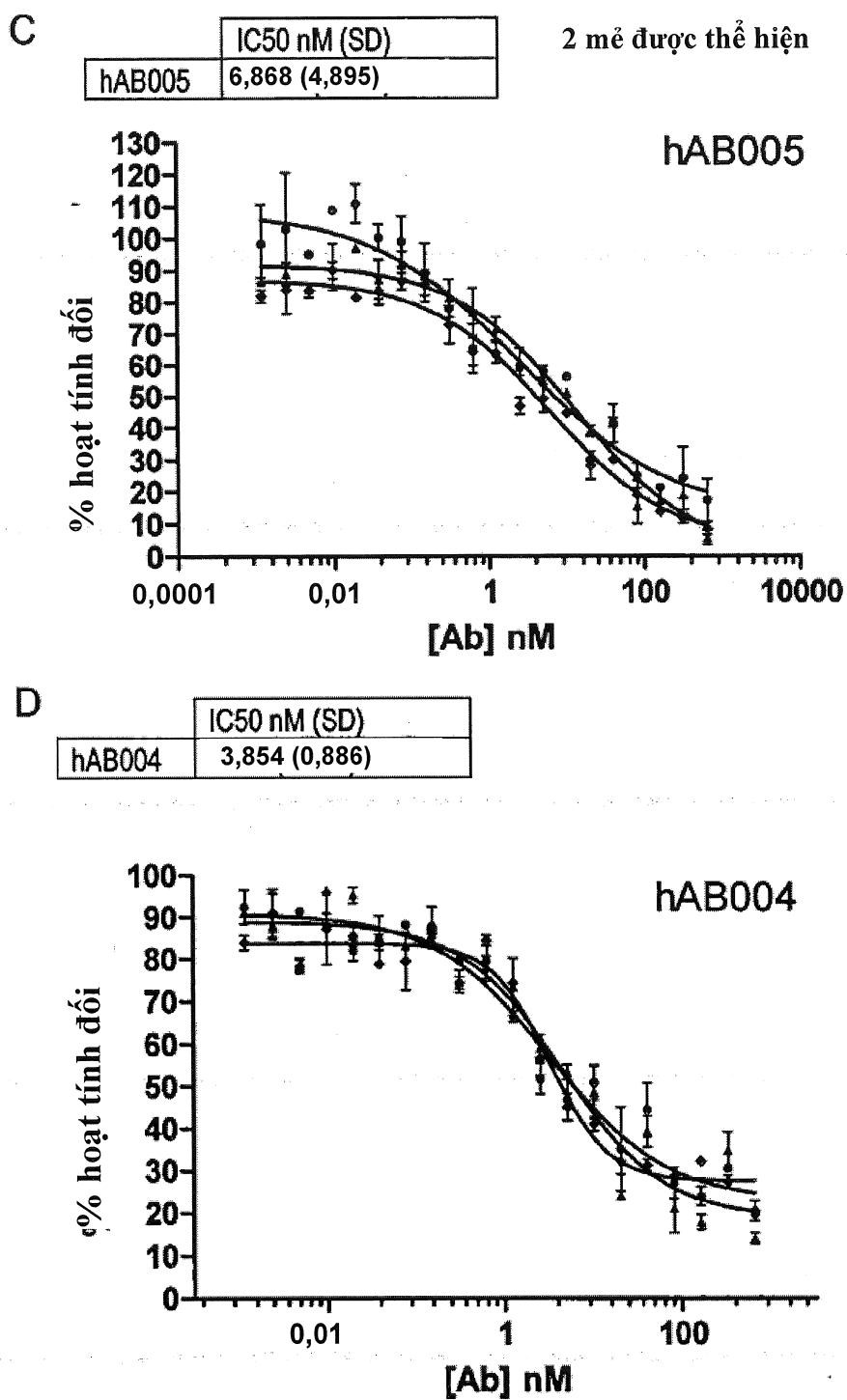


FIG. 31 (tiếp tục)

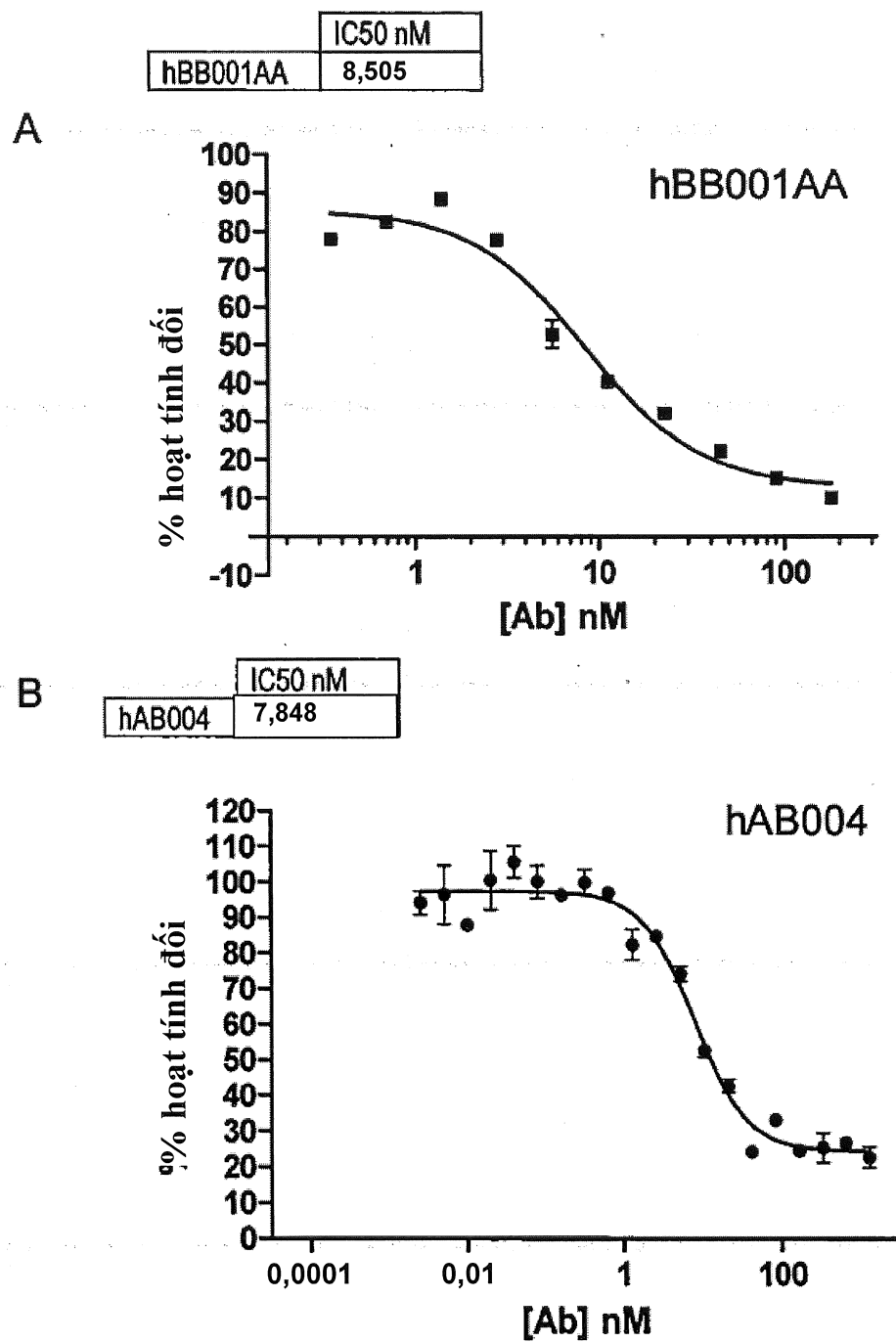
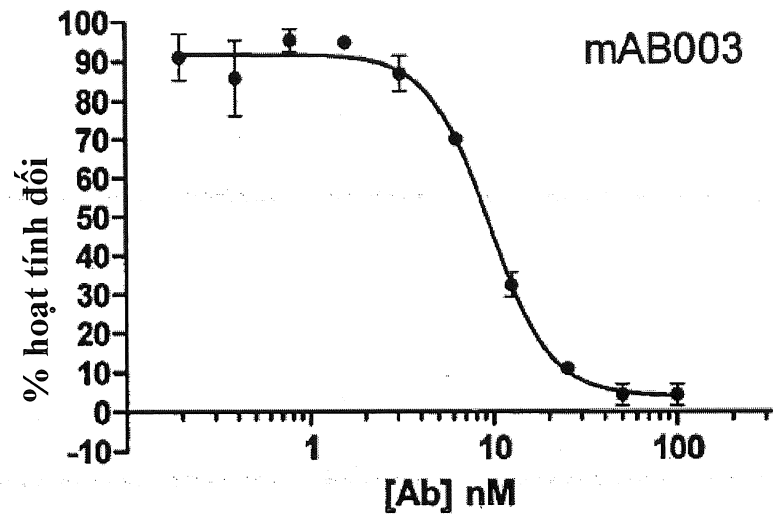


FIG. 32

A

	EC50 nM
mAB003	9,501



B

	EC50 nM
mBB001	0,752

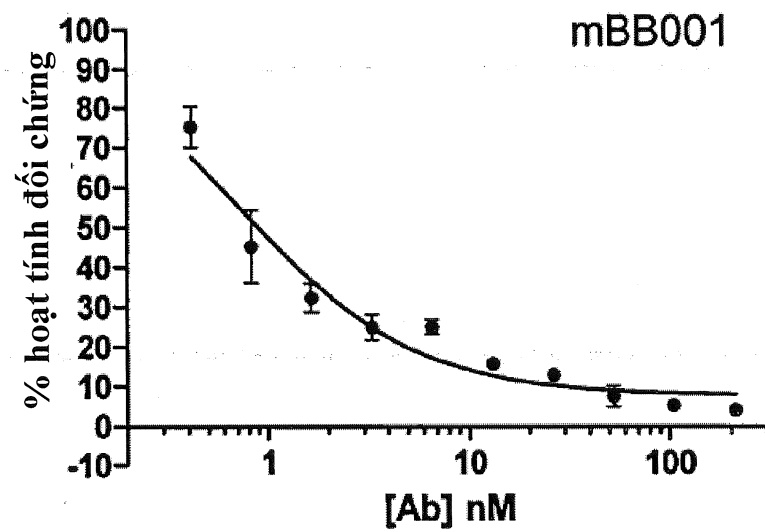


FIG. 33

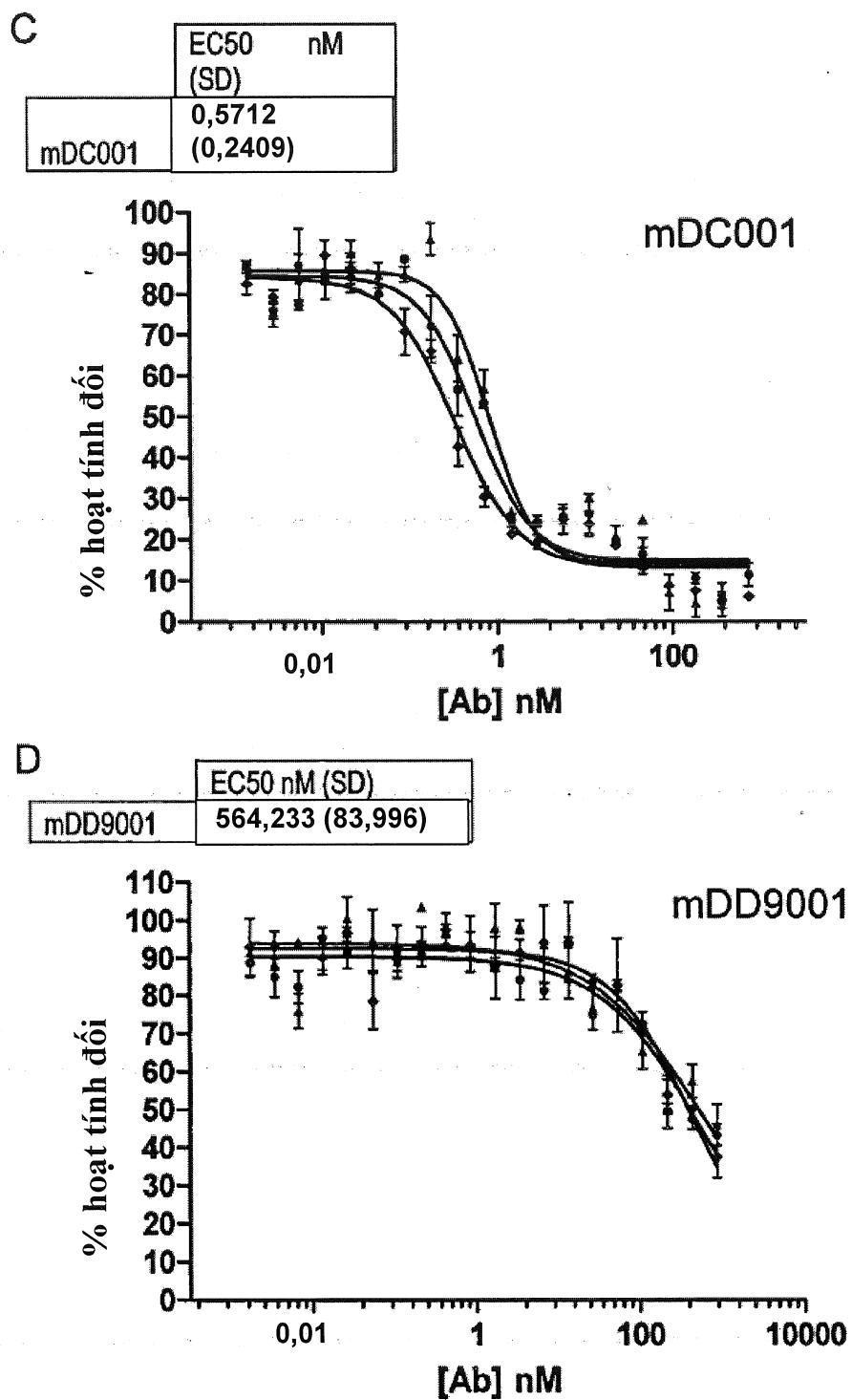
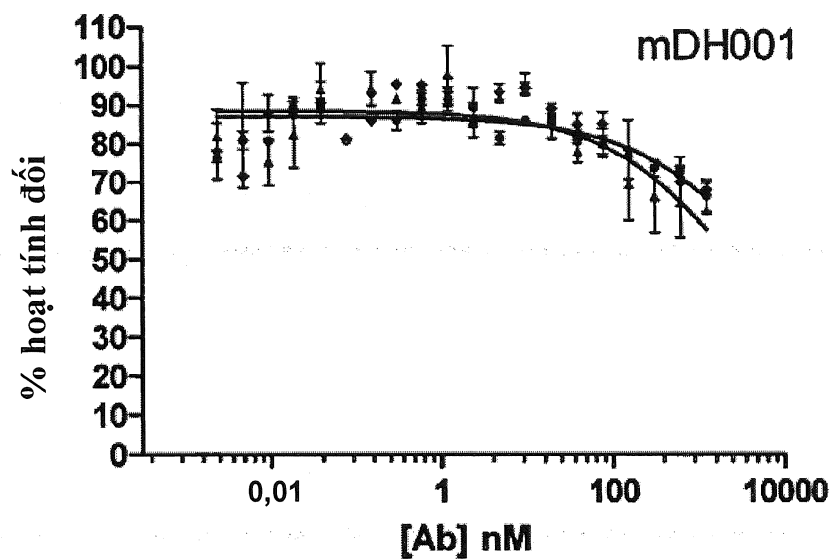


FIG. 33 (tiếp tục)

E

	EC50 nM (SD)
mDH001	~7000



F

	EC50 nM (SD)
mDD6001	43,196 (10,948)

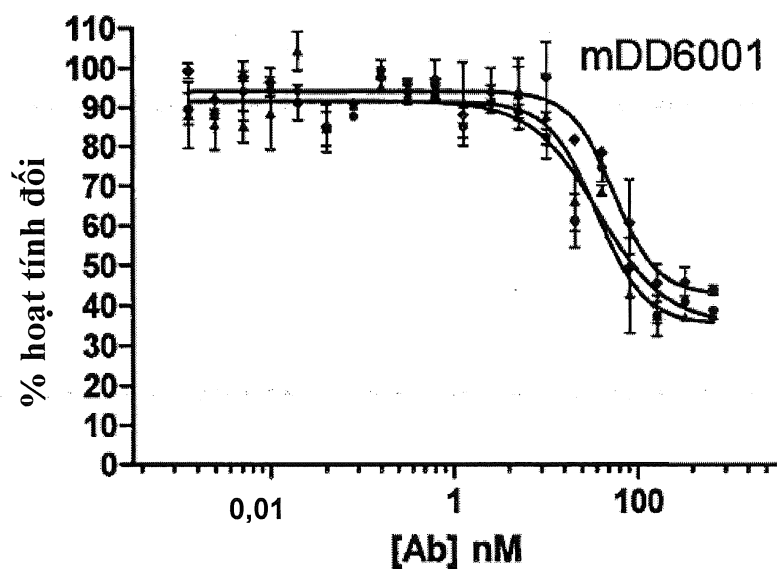
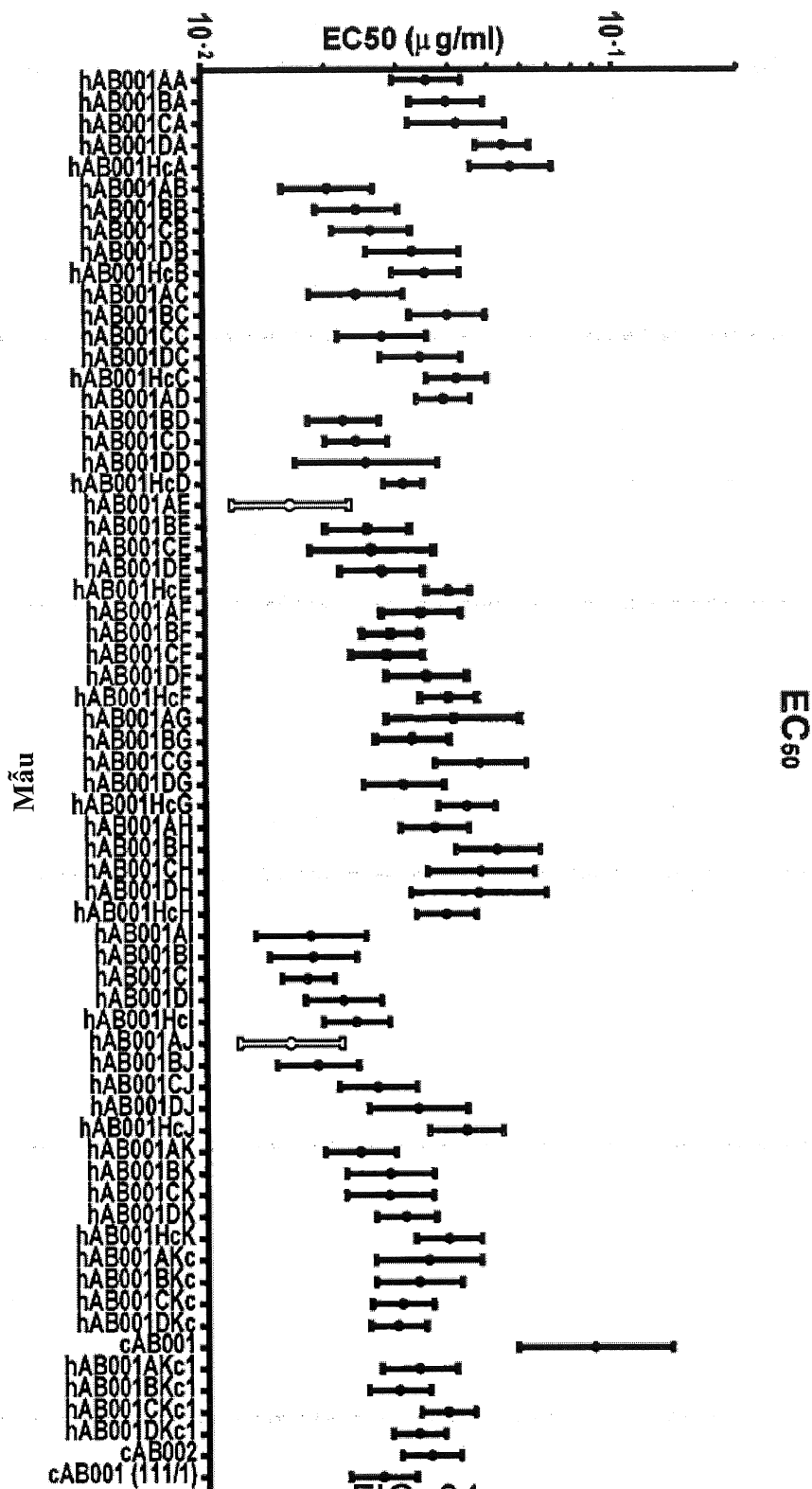


FIG. 33 (tiếp tục)



A

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0,3804	0,2099	0,3401	0,4418
r2	0,9991	0,998	0,9968	0,9985
IE50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,3291 đến 0,4396	0,1860 đến 0,2368	0,2890 đến 0,4002	0,3927 đến 0,4971

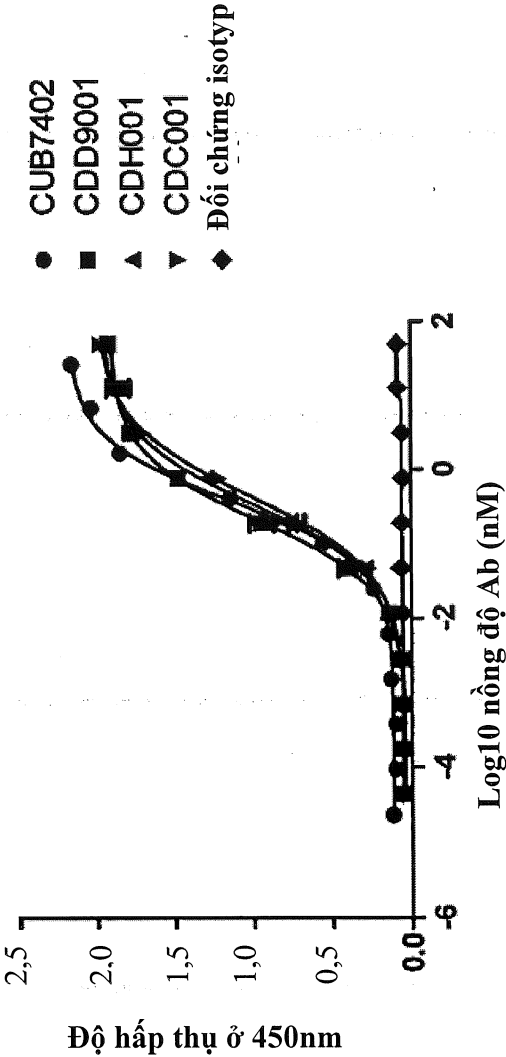
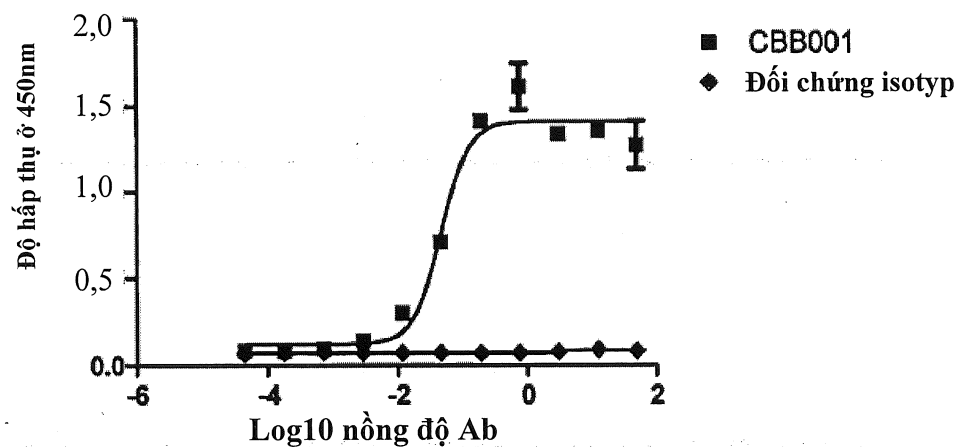


FIG. 35

B

	CBB001
EC50 (nM)	0,04811
r ²	0,9682
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,03611 đến 0,06410



C

	CAB003
EC50 (nM)	0,06141
r ²	0,9568
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,03066 đến 0,1230

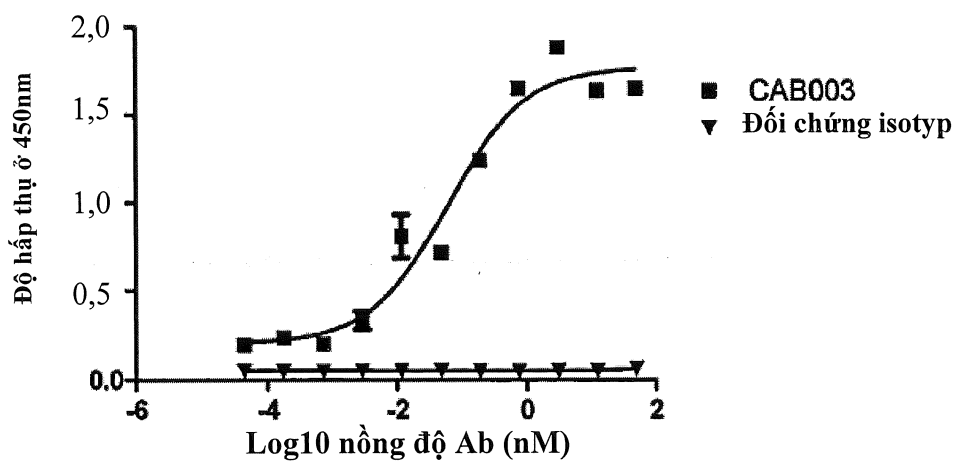
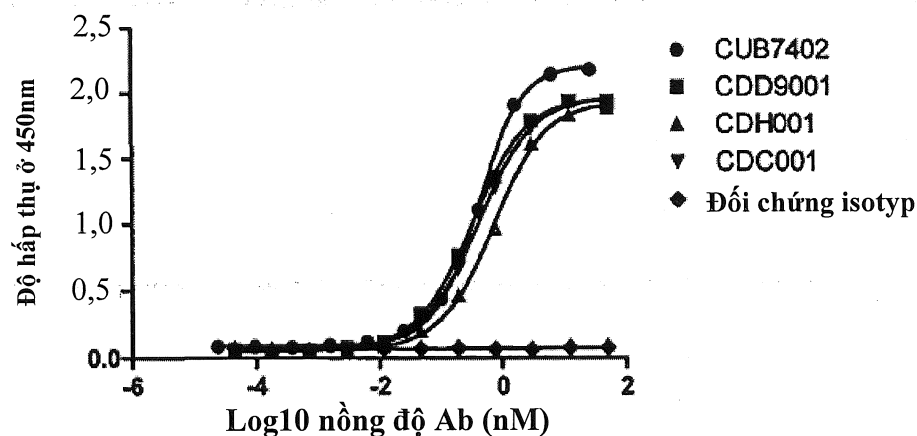


FIG. 35 (tiếp tục)

A

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0,4161	0,3279	0,7385	0,4177
r ²	0,9994	0,9992	0,9986	0,9993
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,3672 đến 0,4603	0,3040 đến 0,3536	0,6682 đến 0,8162	0,3887 đến 0,4489



B

	CBB001
EC50 (nM)	0,05166
r ²	0,9383
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,03303 đến 0,08079

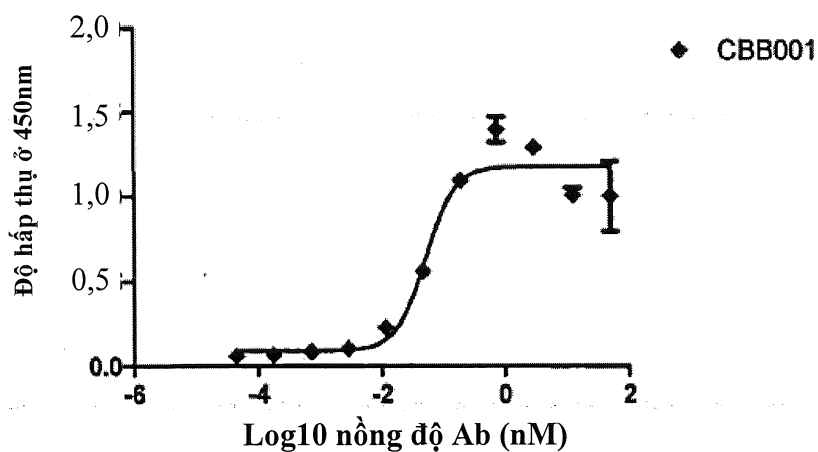


FIG. 36

C

	CAB003
EC50 (nM)	0,05682
r ²	0,9837
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,04054 đến 0,07966

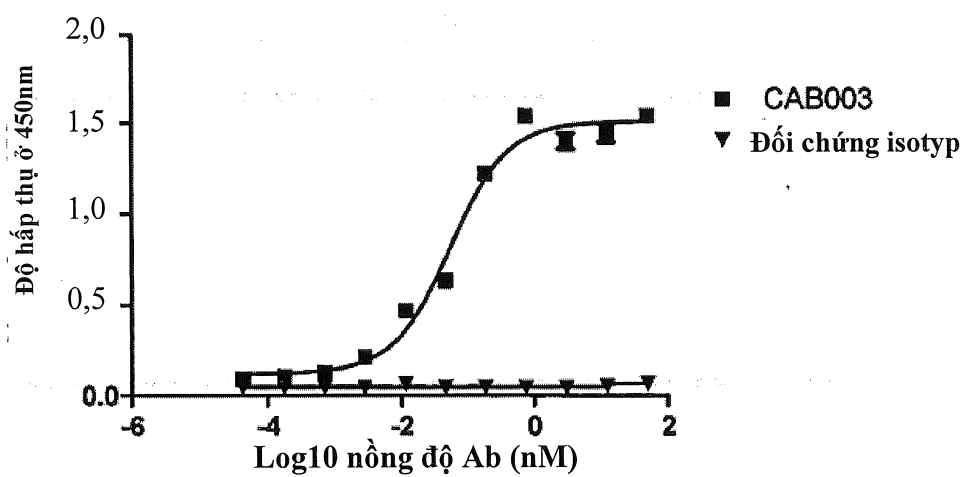
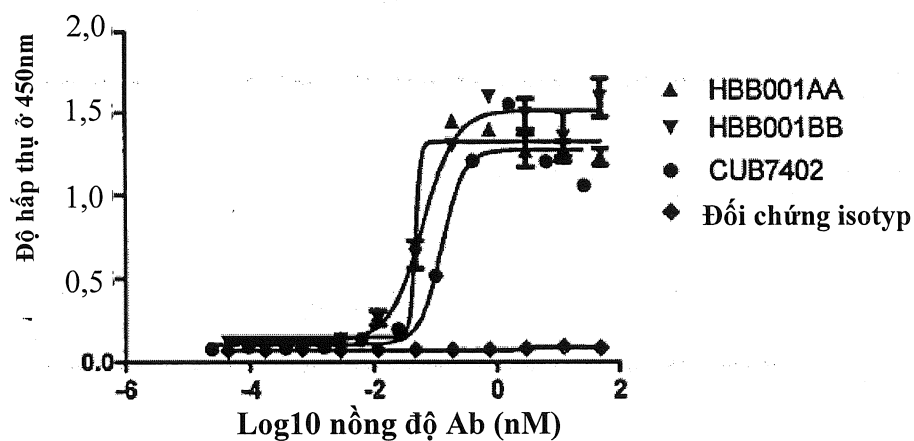


FIG. 36 (tiếp tục)

A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (nM)	0,1277	~0,04739	0,06274
r2	0,9588	0,9792	0,9771
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,06801 đến 0,2396	ND	0,04636 đến 0,08491



B

	HAB004
EC50 (nM)	0,02001
r2	0,9794
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,01199 đến 0,03342

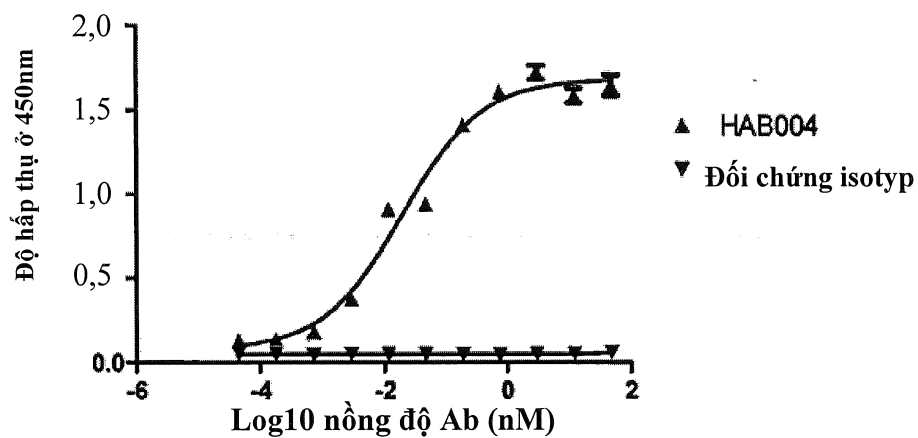
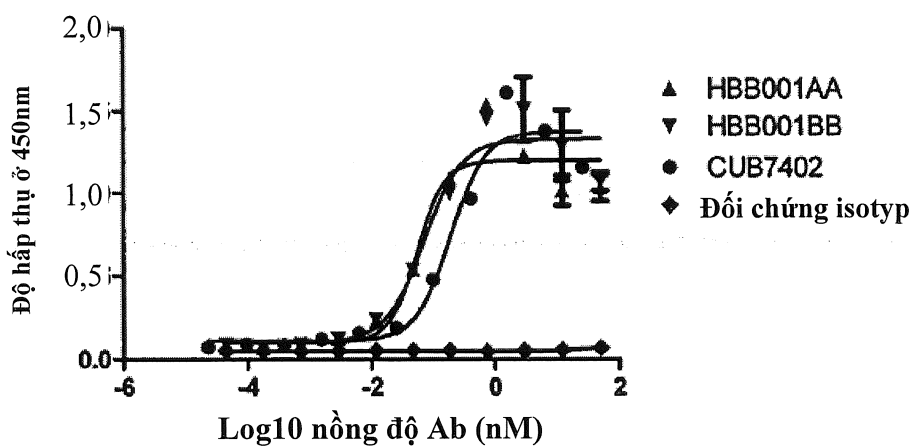


FIG. 37

A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (nM)	0,1982	0,0561	0,07377
r2	0,0561	0,9329	0,9361
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,09303 đến 0,4223	0,03522 đến 0,08934	0,04198 đến 0,1296



B

	HAB004
EC50 (nM)	0,06117
r2	0,9766
E50 (giới hạn tin cậy 95%)	0,04047 đến 0,09246

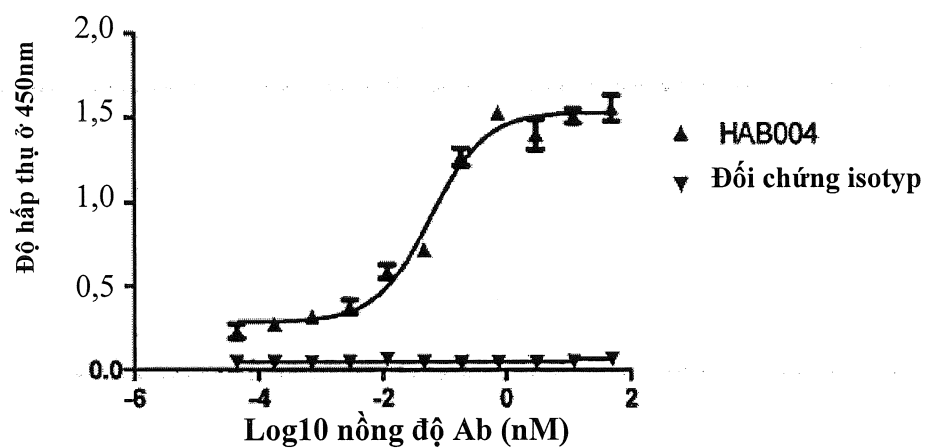
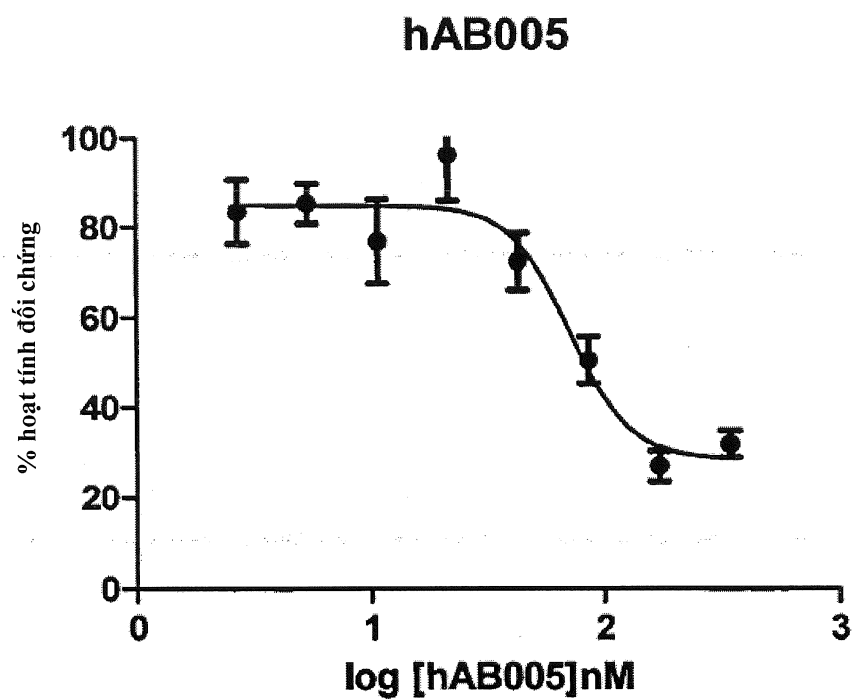


FIG. 38



IC₅₀ = 71,85nM

FIG. 39

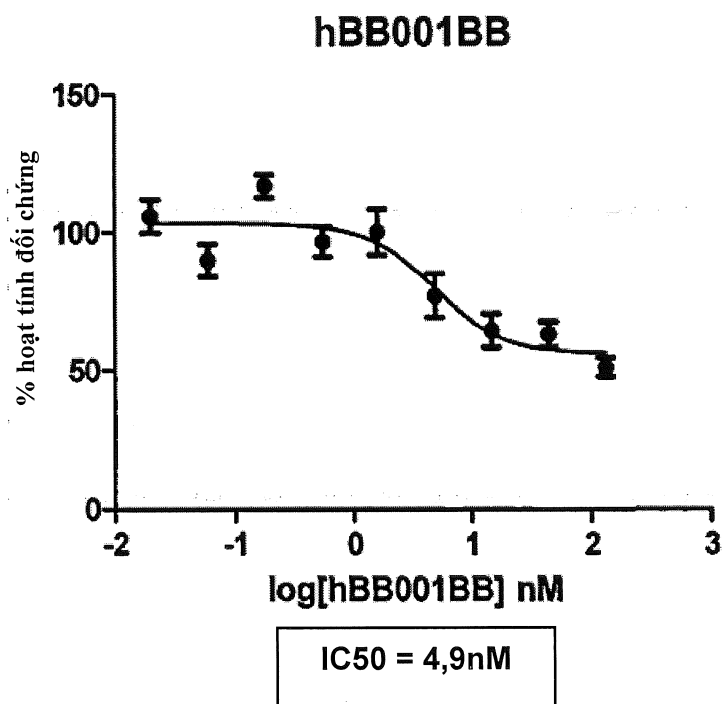
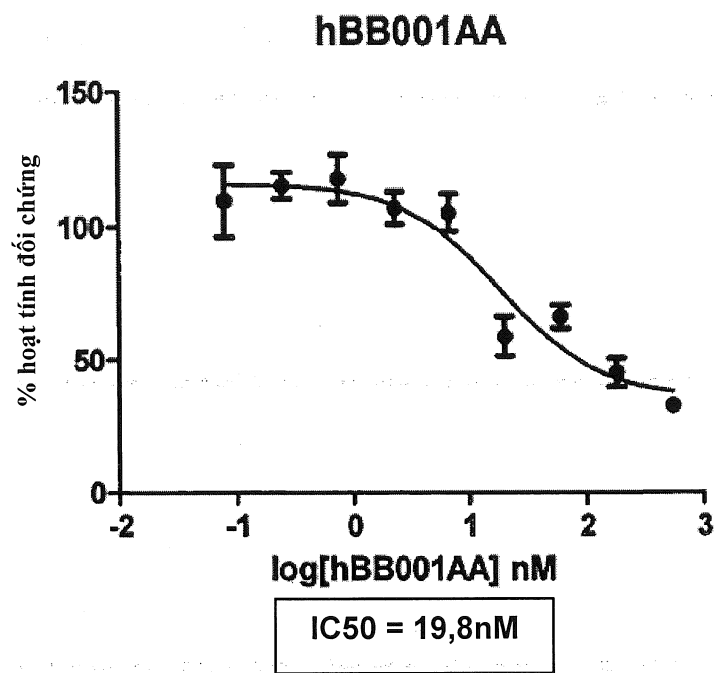


FIG. 40

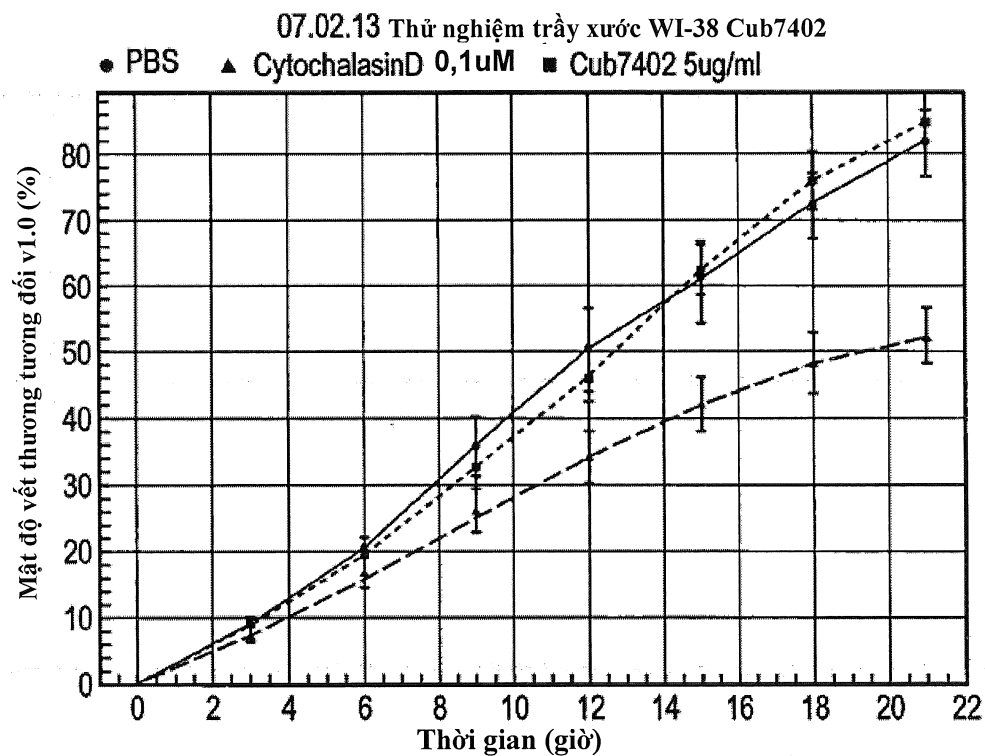
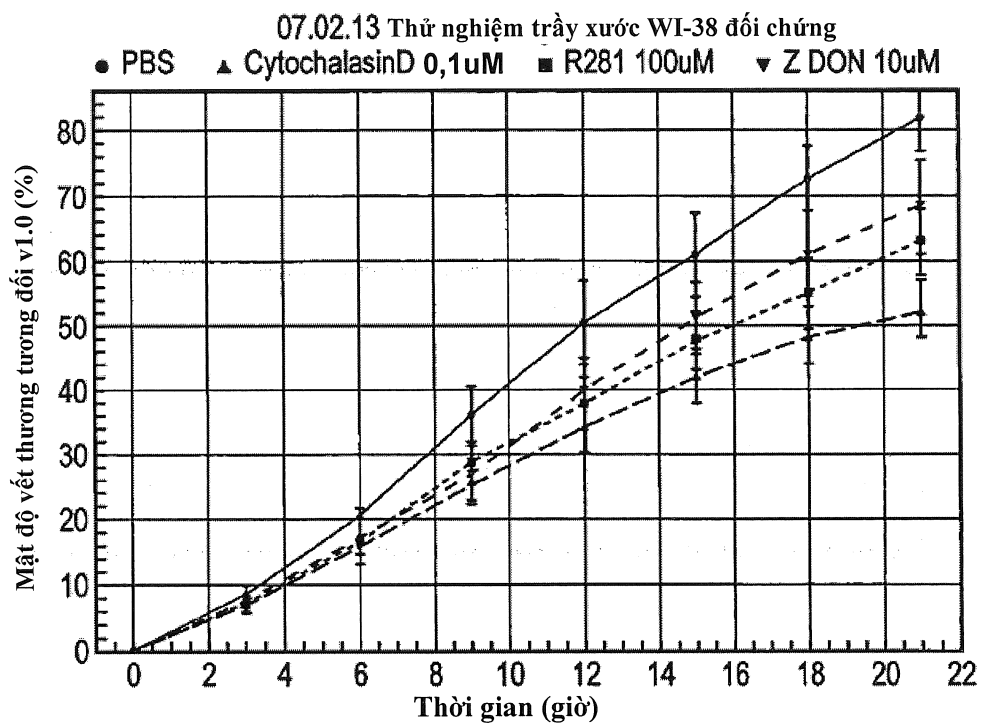


FIG. 41

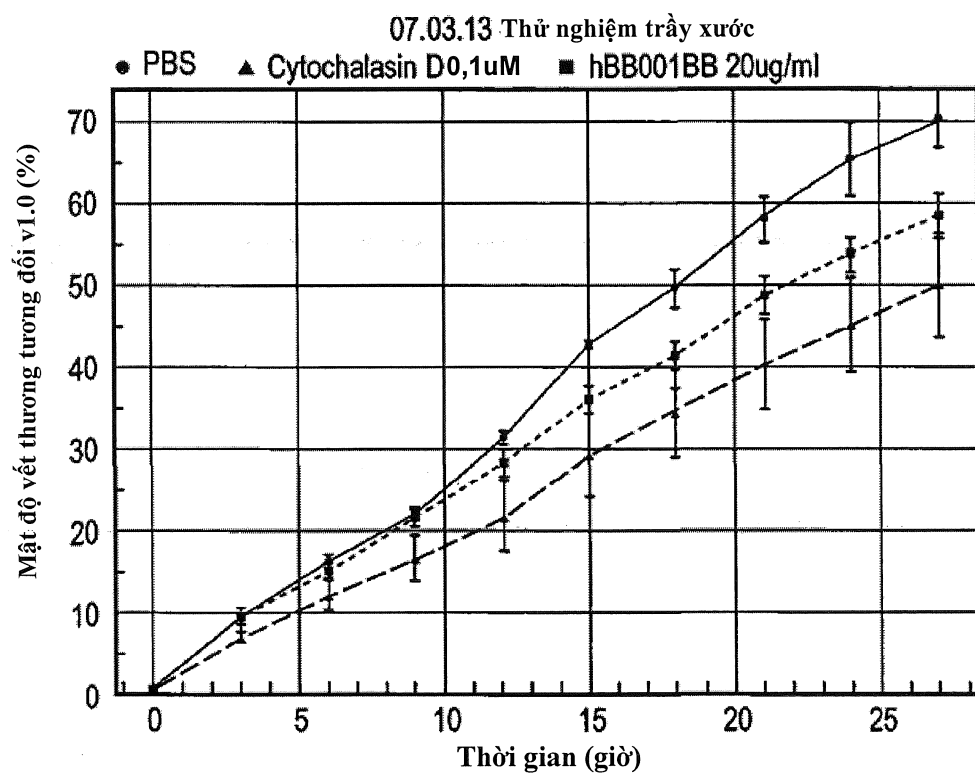
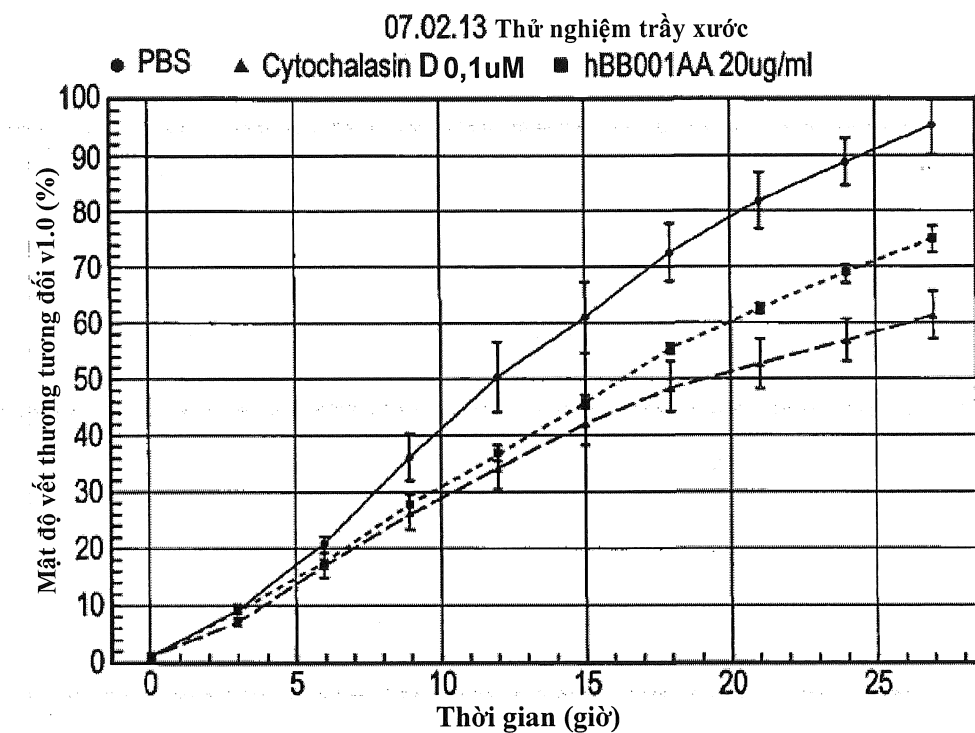


FIG. 42

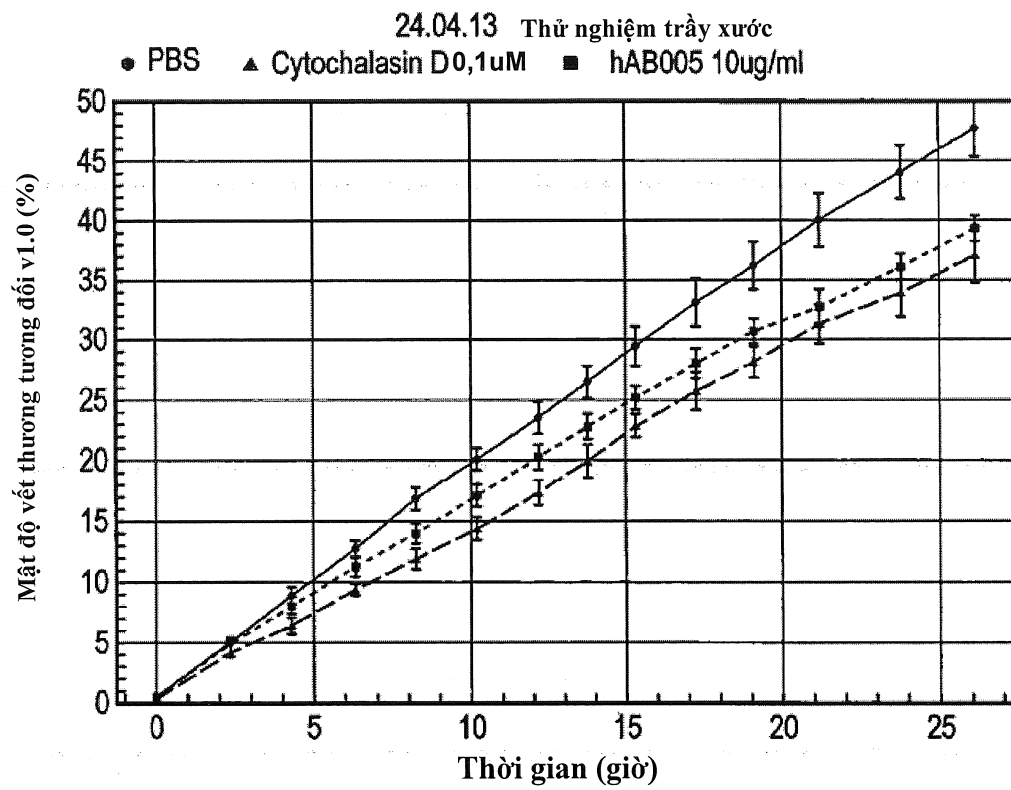


FIG. 43

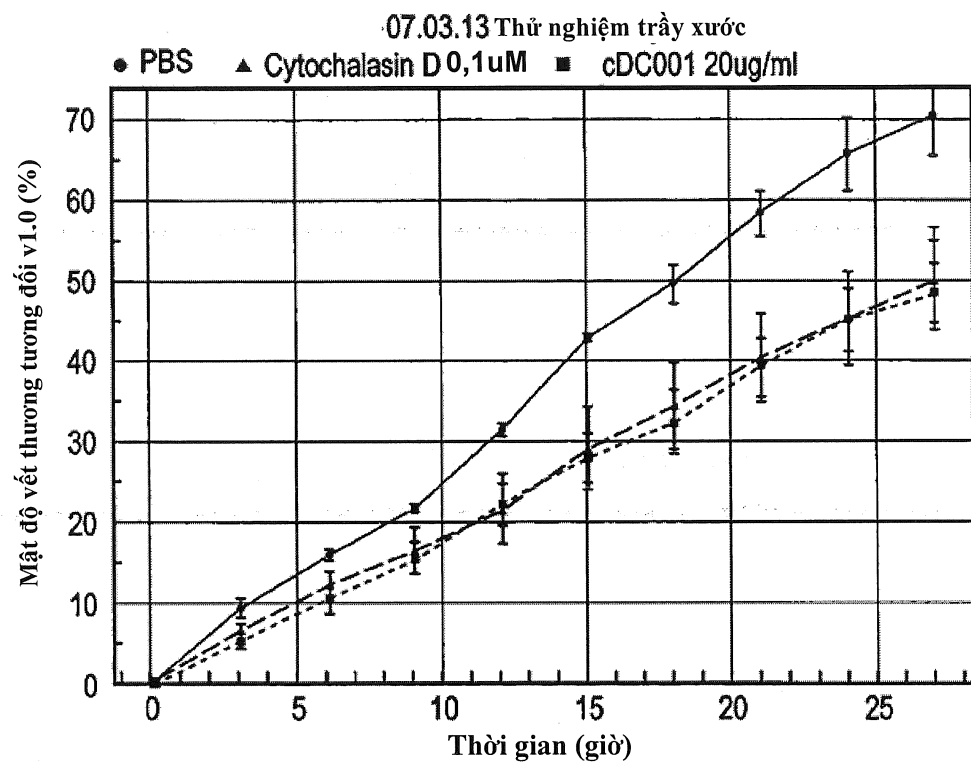


FIG. 44

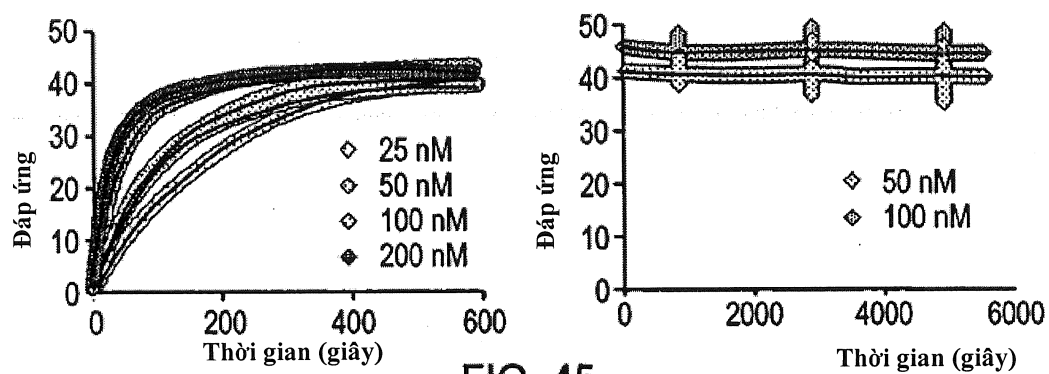


FIG. 45

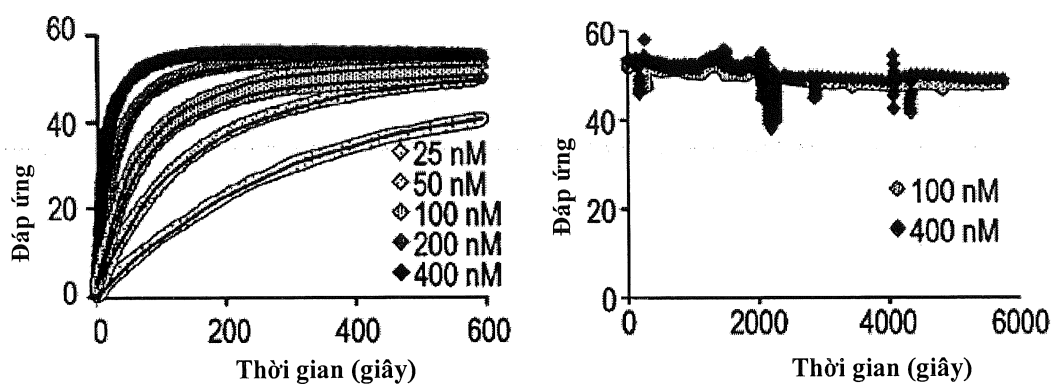


FIG. 46

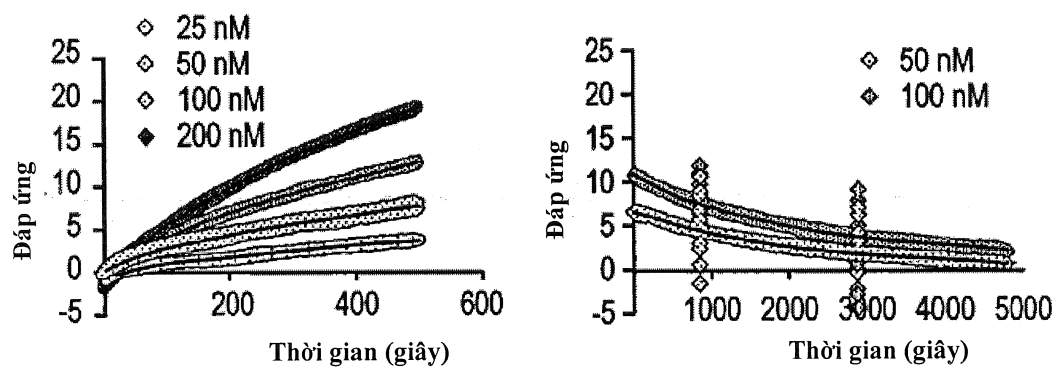


FIG. 47