



(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)



1-0032525

(51)⁸ C12N 15/09; A61K 39/395; A61P 35/00; (13) B
C07K 16/30; C12N 5/10; C12N 1/15;
C12N 1/19; C12N 1/21; A61K 35/17;
C07K 19/00

(21) 1-2018-01003

(22) 02/08/2016

(86) PCT/JP2016/072688 02/08/2016

(87) WO 2017/026331 16/02/2017

(30) 2015-159240 11/08/2015 JP

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/06/2018 363A

(73) OSAKA UNIVERSITY (JP)

1-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan

(72) HOSEN, Naoki (JP); SUGIYAMA, Haruo (JP); KUMANOGOH, Atsushi (JP);
TAKAGI, Junichi (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG INTEGRIN β_7 CỦA NGƯỜI, THỤ THỂ CỦA KHÁNG
NGUYÊN THỂ KHẢM, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA THỤ THỂ, TẾ BÀO CHỨA
POLYNUCLEOTIT VÀ DƯỢC PHẨM ĐỂ ĐIỀU TRỊ ĐA U TỬY CHỨA KHÁNG
THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập thành phần hoạt tính của dược phẩm để điều trị bệnh u tủy. Cụ thể là,
sáng chế đề cập kháng thể mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin từ 20
đến 109 của integrin β_7 của người. Sáng chế cũng đề cập đến thụ thể của kháng nguyên thể
khảm, polynucleotit mã hóa thụ thể và tế bào chứa polynucleotit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể mới, việc sử dụng kháng thể này và tương tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh đa u tủy, là một ví dụ điển hình về bệnh do sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương, chiếm khoảng 1% trong số tất cả các bệnh ung thư, và chiếm nhiều hơn 10% một chút trong số tất cả các khối u máu ác tính. Bệnh đa u tủy là bệnh mà trong đó tế bào huyết tương có mặt trong tủy xương trở thành ung thư (kết quả là trở thành tế bào huyết tương bất thường) và trải qua quá trình sinh trưởng đơn dòng.

Trong bệnh đa u tủy, tế bào huyết tương bất thường (tế bào u tủy) lan đến tủy xương khắp cơ thể và sinh trưởng ở mọi phần của tủy xương trong toàn bộ cơ thể. Khi tế bào huyết tương bất thường sinh trưởng, có nhiều triệu chứng khác nhau bao gồm xuất hiện gãy xương. Tế bào u tủy sản sinh protein M, là globulin miễn dịch bất thường, làm tăng nồng độ protein M trong máu, và do đó máu trở nên nhớt.

Protein M không có chức năng làm kháng thể nguyên bản, mà nhận diện chất ngoại lai, như mầm bệnh đi vào cơ thể. Do đó, khả năng miễn dịch giảm. Hiện tượng này gây ảnh hưởng đến nhiều cơ quan, và do đó xảy ra các triệu chứng khác nhau. Các triệu chứng điển hình là đau và hư tổn xương, tăng canxi huyết, bệnh thận và suy thận, thiếu máu, và triệu chứng tương tự.

Hiện nay, khi điều trị bệnh đa u tủy, các chất ức chế proteasom, các iMID, như thalidomide và dẫn xuất của chúng, cụ thể là lenalidomide, và liệu pháp hóa trị sử dụng, ví dụ, melphalan kết hợp với prednison, và cấy tế bào gốc tạo máu được sử dụng chủ yếu.

Tuy nhiên, cuối cùng tế bào u tủy đạt được sự kháng các tác nhân điều trị này trong hầu hết các trường hợp. Do đó, thực tại của các phương pháp điều trị hiện nay là

bệnh nhân u tủy có tiên lượng không có triển vọng với thời gian sống trung bình sau khi khởi phát bệnh từ khoảng 3 năm đến khoảng 5 năm. Ngoài ra, các tác nhân điều trị này không tác động đặc hiệu lên chỉ các tế bào u dùng làm đích, và do đó có vấn đề là thể hiện tính độc lên cả các tế bào bình thường, hậu quả là gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng.

Đã có những nỗ lực để phát triển phương pháp điều trị cho bệnh đa u tủy bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng. Ví dụ, kháng thể kháng CS1, và kháng thể kháng CD38, và kháng thể tương tự được xem là có triển vọng (tài liệu phi sáng chế 1 và 2). Ngoài ra, trong tài liệu sáng chế 1, bộc lộ tác nhân điều trị bệnh đa u tủy hoặc tương tự, mà sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CD48 của người làm thành phần hoạt tính.

Integrin chủ yếu tạo ra dime khác loại gồm chuỗi α và chuỗi β đáp ứng chức năng làm thụ thể trên bề mặt tế bào Trong cơ thể sống. Có nhiều tổ hợp gồm chuỗi α và chuỗi β của các integrin như vậy.

Ngoài ra, trong tài liệu phi sáng chế 4 đến 6, thụ thể của kháng nguyên thể khảm tế bào T (CAR-Tế bào T) chứa vị trí nhận diện kháng nguyên có ái lực đối với một kháng nguyên nhất định.

Danh sách tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế

PTL 1: WO 2010/117059 A1

Tài liệu phi sáng chế

NPL 1: Journal of Clinical Oncology, 2012 Jun 1; 30(16): 1953-9.

NPL 2: Journal of immunology, 2011 Feb 1; 186(3): 1840-8.

NPL 3: J Biol Chem. 2012 May 4; 287(19): 15749-59.

NPL 4: J Immunol. 2009 Nov 1; 183(9): 5563-74.

NPL 5: N Engl J Med. 2014 Oct 16; 371(16): 1507-17.

NPL 6: Nat Biotechnol. 2002 Jan; 20(1): 70-5.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Kháng thể kháng CS1 có tính đặc hiệu tương đối cao với tế bào u tủy. Tuy nhiên, chỉ riêng kháng thể này không thể được hứa hẹn là có hiệu quả chống u tủy cao, và tính hiệu quả của nó dưới dạng một tác nhân đơn lẻ vẫn chưa được chứng minh trong thử nghiệm lâm sàng. Đã phát hiện ra rằng hiệu quả chống u của kháng thể kháng CS1 tăng lên bằng việc sử dụng kết với lenalidomide, và được cho là đang tìm kiếm sự chấp thuận đối với việc sử dụng kết hợp này. Trong khi đó, CD38 cũng được biểu hiện ở nhiều tế bào máu bình thường bao gồm tế bào gốc tạo máu dương tính với CD34, và do đó kháng nguyên có tính đặc hiệu thấp là đích điều trị bệnh đa u tủy. Trong các trường hợp này, mục tiêu của sáng chế là đề xuất các phương pháp có hiệu quả hơn để điều trị, ví dụ, bệnh liên quan đến sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương, như bệnh đa u tủy.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu rộng để đạt được mục đích này, và kết quả là, đã thu được kháng thể MMG49 bằng cách tiến hành sàng lọc thông qua việc sử dụng liên kết đặc hiệu với tế bào u tủy và tế bào gốc của chúng làm chất chỉ thị. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã xác định rằng kháng thể này liên kết với vùng nhất định của integrin β_7 của người và phát hiện ra rằng CAR-tế bào T được tạo ra bằng cách sử dụng vị trí nhận diện kháng nguyên của kháng thể này là cực kỳ hữu dụng để điều trị bệnh u tủy. Ngoài ra, các tác giả sáng chế còn giải thích rằng epitop của kháng thể MMG49 có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin từ 20 đến 109 của integrin β_7 của người.

Sáng chế được hoàn thành dựa trên các phát hiện này, và bao hàm các phát minh về các khía cạnh ở phạm vi rộng được mô tả dưới đây.

(I) Kháng thể

Kháng thể (I) bao gồm các kháng thể được mô tả trong các mục (I-1) đến (I-25) dưới đây.

(I-1)

Kháng thể kháng integrin β_7 của người, mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin từ 20 đến 109 của integrin β_7 của người.

(1-1A)

Kháng thể theo mục (I-1), mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin từ 33 đến 109 của integrin β_7 của người.

(1-1B)

Kháng thể theo mục (I-1), mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin từ 20 đến 90 của integrin β của người.

(1-1C)

Kháng thể theo mục (I-1), mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin từ 33 đến 90 của integrin β_7 của người.

(I-2)

Kháng thể theo mục (I-1), mà ái lực của nó đối với epitop gia tăng khi có mặt ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin từ 379 đến 721 của integrin β_7 của người.

(I-3)

Kháng thể theo mục (I-2), mà ái lực của nó đối với epitop gia tăng khi có mặt ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin từ 417 đến 721 của integrin β_7 của người.

(I-4)

Kháng thể theo mục (I-2), mà ái lực của nó đối với epitop gia tăng khi có mặt ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin từ 564 đến 721 của integrin β_7 của người.

(I-5)

Kháng thể theo mục (I-2), mà ái lực của nó đối với epitop gia tăng khi có mặt ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin từ 379 đến 563 của integrin β_7 của người.

(I-6)

Kháng thể theo mục (I-2), mà ái lực của nó đối với epitop gia tăng khi có mặt ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin từ 417 đến 563 của integrin β_7 của người.

(I-7)

Kháng thể theo mục (I-2), mà ái lực của nó đối với epitop gia tăng khi có mặt ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin từ 379 đến 416 của integrin β_7 của người.

(I-8)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-7), mà ái lực của nó đối với epitop gia tăng nhờ sự hoạt hóa integrin β_7 của người.

(I-9)

Kháng thể kháng integrin β_7 của người, mà ái lực của nó đối với integrin β_7 của người được biểu hiện trên tế bào u tủy cao hơn đối với integrin β_7 của người được biểu hiện trên tế bào bình thường.

(I-10)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-9), mà epitop của nó giống hệt với epitop của kháng thể MMG49.

(I-11)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-10), kháng thể này gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm:

CDR1 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1

CDR2 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

và/hoặc

CDR3 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3;

và/hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm:

CDR1 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6

CDR2 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7; và/hoặc

CDR3 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

(I-12)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-10), kháng thể này gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và/hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

(I-13)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-12), kháng thể này là Fv, scFv, kháng thể đôi, kháng thể ba, kháng thể tứ, hoặc hỗn hợp của chúng.

(I-14)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-11), kháng thể này gồm vùng hằng định.

(I-15)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-12) và (I-14), kháng thể này là kháng thể khảm.

(I-16)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-12) và (I-14), kháng thể này là kháng thể người hóa.

(I-17)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-12) và (I-14), kháng thể này là kháng thể của người.

(I-18)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-12) và (I-14) đến (I-17), kháng thể này là globulin miễn dịch, Fab, F(ab')₂, tiểu kháng thể, scFv-Fc, hoặc hỗn hợp của chúng.

(I-19)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-12) và (I-14) đến (I-18), kháng thể này là IgA, IgD, IgE, IgG, hoặc IgM.

(I-20)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-12) và (I-14) đến (I-19), kháng thể này gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 và/hoặc chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

(I-21)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-20), kháng thể này có hoạt tính gây độc tế bào.

(I-22)

Kháng thể theo mục (I-21), trong đó hoạt tính gây độc tế bào là hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC.

(I-23)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-22), kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu.

(I-24)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-23), kháng thể này có độc tố tế bào đi kèm với nó.

(I-25)

Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (I-1) đến (I-24), kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

(II) polynucleotit

Polynucleotit (II) bao gồm polynucleotit được mô tả trong mục (II-1) sau.

(II-1)

Polynucleotit, có trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin của kháng thể (I).

(III) Tế bào chủ

Tế bào chủ (III) bao gồm tế bào chủ được mô tả trong mục (III-1) hoặc (III-2) sau.

(III-1)

Tế bào chủ, chứa polynucleotit (II).

(III-2)

Tế bào chủ theo mục (III-1), tế bào này là tế bào nhân thật.

(IV) Thụ thể của kháng nguyên thể khảm

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) bao gồm thụ thể của kháng nguyên thể khảm được mô tả trong mục (IV-1) đến (IV-5) sau.

(IV-1)

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm, mà epitop của nó giống hệt với epitop của kháng thể (I).

(IV-2)

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm theo mục (IV-1), thụ thể của kháng nguyên thể khảm này có vị trí nhận diện kháng nguyên của kháng thể (I).

(IV-3)

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm theo mục (IV-1) hoặc (IV-2), vị trí nhận diện kháng nguyên gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm:

CDR1 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1

CDR2 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

và/hoặc

CDR3 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3;

và/hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm:

CDR1 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6

CDR2 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7; và/hoặc

CDR3 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

(IV-4)

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm theo mục bất kỳ trong số các mục (IV-1) đến (IV-3), trong đó vị trí nhận diện kháng nguyên gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và/hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

(IV-5)

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm theo mục bất kỳ trong số các mục (IV-1) đến (IV-4), thụ thể của kháng nguyên thể khảm này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21.

(V) polynucleotit

Polynucleotit (V) bao gồm polynucleotit được mô tả trong mục (V-1) hoặc (V-2) sau không giống polynucleotit (II).

(V-1)

Polynucleotit, mà mã hóa trình tự axit amin của thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV).

(V-2)

Polynucleotit theo mục (V-1), polynucleotit này có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 22.

(VI) Tế bào

Tế bào (VI) bao gồm tế bào được mô tả trong mục bất kỳ trong số các mục (VI-1) đến (VI-4) sau không giống tế bào chủ (III).

(VI-1)

Tế bào, chứa polynucleotit (V).

(VI-2)

Tế bào theo mục (VI-1), tế bào này là tế bào nhân thật.

(VI-3)

Tế bào theo mục (VI-1) hoặc (VI-2), tế bào này là tế bào T hoặc tế bào NK.

(VI-4)

Tế bào theo mục bất kỳ trong số các mục (VI-1) đến (VI-3), tế bào này là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm hoặc tế bào NK thụ thể của kháng nguyên thể khảm.

(VII) Dược phẩm

Dược phẩm (VII) bao gồm các dược phẩm được mô tả trong mục (VII-1) đến (VII-5) sau.

(VII-1)

Dược phẩm, gồm kháng thể (I) hoặc tế bào (VI).

(VII-2)

Dược phẩm theo mục (VII-1), trong đó tế bào là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (VI-4).

(VII-3)

Dược phẩm theo mục (VII-1) hoặc (VII-2), dược phẩm này để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư.

(VII-4)

Dược phẩm theo mục (VII-3), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư máu.

(VII-5)

Dược phẩm theo mục (VII-4), trong đó bệnh ung thư máu là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương.

(VIII) Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa (VIII) bệnh bao gồm các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh được mô tả trong mục (VIII-1) đến (VIII-6) sau.

(VIII-1)

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh, gồm việc sử dụng một lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể (I) hoặc tế bào (VI) cho đối tượng.

(VIII-2)

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa theo mục (VIII-1), trong đó tế bào là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (VI-4).

(VIII-3)

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa theo mục (VIII-1) hoặc (VIII-2), trong đó bệnh là bệnh ung thư, và trong đó đối tượng là người bệnh đã phát triển bệnh ung thư hoặc động vật có nguy cơ phát triển bệnh ung thư.

(VIII-4) Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa theo mục (VIII-3), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư máu.

(VIII-5)

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa theo mục (VIII-4), trong đó bệnh ung thư máu là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương.

(VIII-6)

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đa u tủy, hướng đến integrin β_7 của người dạng có hoạt tính.

(IX) Sử dụng

Sử dụng (IX) bao gồm các sử dụng được mô tả trong mục (IX-1) đến (IX-5) sau.

(IX-1)

Sử dụng kháng thể (I) hoặc tế bào (VI), để sản xuất dược phẩm.

(IX-2)

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa theo mục (IX-1), trong đó tế bào là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (VI-4).

(IX-3)

Sử dụng theo mục (IX-1) hoặc (IX-2), sử dụng này để điều trị bệnh ung thư.

(IX-4)

Sử dụng theo mục (IX-3), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư máu.

(IX-5)

Sử dụng theo mục (IX-4), trong đó bệnh ung thư máu là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương.

(X) Phương pháp sàng lọc

Phương pháp sàng lọc (X) bao gồm các phương pháp sàng lọc được mô tả trong mục (X-1) đến (X-5) sau.

(X-1)

Phương pháp sàng lọc thành phần hoạt tính của dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm, tạo ra thư viện hợp chất, hợp chất thử nghiệm mà liên kết đặc hiệu với integrin β_7 của người và liên kết với vùng ở vị trí gốc axit amin từ 20 đến 109 của integrin β_7 của người.

(X-2)

Phương pháp sàng lọc theo mục (X-1), phương pháp này còn bao gồm việc chọn lọc hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào.

(X-3)

Phương pháp sàng lọc theo mục (X-1) hoặc (X-2), trong đó hợp chất được chọn là kháng thể đơn dòng.

(X-4)

Phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục (X-1) đến (X-3), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư máu.

(X-5)

Phương pháp sàng lọc theo mục (X-4), trong đó bệnh ung thư máu là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương.

(XI) Phương pháp chẩn đoán

Phương pháp chẩn đoán (XI) bao gồm các phương pháp chẩn đoán được mô tả trong mục (XI-1) đến (XI-5) sau.

(XI-1)

Phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư, gồm cho mẫu thu được từ đối tượng tiếp xúc với kháng thể (I).

(XI-2)

Phương pháp chẩn đoán theo mục (XI-1), trong đó mẫu thu được từ đối tượng là máu hoặc dịch tủy xương.

(XI-3)

Phương pháp chẩn đoán theo mục (XI-1) hoặc (XI-2), phương pháp này gồm việc xét đoán xem đối tượng đã phát triển hoặc có nguy cơ phát triển bệnh ung thư khi phát hiện có tế bào liên kết với kháng thể (I).

(XI-4)

Phương pháp chẩn đoán theo mục (XI-3), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư máu.

(XI-5)

Phương pháp chẩn đoán theo mục (XI-4), trong đó tế bào này là tế bào huyết tương, và trong đó bệnh ung thư là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương.

(XII) Kit

Kit (XII) bao gồm các kit được mô tả trong mục (XII-1) đến (XII-3) sau.

(XII-1)

Kit để chẩn đoán bệnh ung thư, gồm kháng thể (I).

(XII-2)

Phương pháp chẩn đoán theo mục (XII-1), trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư máu.

(XII-3)

Kit theo mục (XII-2), trong đó bệnh ung thư là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Kháng thể theo sáng chế không nhận diện tế bào bình thường, và do đó hữu dụng làm thành phần hoạt tính của dược phẩm. Cụ thể là, kháng thể theo sáng chế hữu dụng làm thành phần hoạt tính của tác nhân điều trị bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư máu).

Kháng thể theo sáng chế hữu ích bởi vì tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm được tạo ra bằng cách gắn vị trí nhận diện kháng nguyên với thụ thể của kháng nguyên thể khảm có thể được dùng làm thành phần hoạt tính của dược phẩm này như được mô tả nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là các kết quả thu được trong Ví dụ 2 bằng cách phân tích liên kết của kháng thể MMG49 với tế bào Tủy xương có nguồn gốc từ bệnh nhân u tủy bằng cách sử dụng FACS. (Trái) Sơ đồ minh họa phương pháp xác định phân đoạn tế bào nguyên bản u tủy (Tế bào nguyên bản u tủy), phân đoạn tế bào huyết tương u tủy (tế bào huyết tương u tủy), và bạch cầu CD45⁺ (bạch cầu CD45⁺). (Phải) Các biểu đồ thể hiện liên kết của kháng thể MMG49 với mỗi phân đoạn này.

FIG. 2 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 2 bằng cách phân tích, bằng FACS, liên kết của kháng thể MMG49 với phân đoạn tế bào nguyên bản u tủy, phân đoạn tế bào huyết tương u tủy, và bạch cầu CD45⁺ của các tế bào Tủy xương có nguồn gốc từ bệnh nhân u tủy (UPN1 đến UPN5).

FIG. 3 minh họa quá trình xác định protein kháng nguyên được nhận diện bởi kháng thể MMG49 bằng phương pháp tách dòng biểu hiện trong ví dụ 3. Minh họa quá trình cô đặc tế bào BaF3 mà liên kết với kháng thể MMG49, từ nồng độ ban đầu là 0,1% hoặc nhỏ hơn, bằng phương pháp phân loại FACS.

FIG. 4 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 4 bằng cách nhuộm tế bào U266 khuyết ITGB7 được tạo ra bằng cách sử dụng hệ thống Crisp-cas9 với kháng thể MMG49 hoặc kháng thể FIB27 (kháng thể kháng integrin β_7 có sẵn trên thị trường), sau đó tiến hành phân tích FACS.

FIG. 5 là ảnh thể hiện các kết quả thu được trong Ví dụ 4 bằng cách đưa sản phẩm được kết tủa miễn dịch từ dịch ly giải tế bào có nguồn gốc từ tế bào u tủy MM1s với kháng thể MMG49 hoặc kháng thể đối chứng cùng typ, vào phân tích trên SDS-PAGE, và sau đó tiến hành thâm tách miễn dịch western với kháng thể kháng integrin β_7 có sẵn trên thị trường (Abcam plc).

FIG. 6 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 5 bằng cách phân tích liên kết của mỗi kháng thể trong số các kháng thể MMG49, kháng thể FIB27, và kháng thể FIB504 với mỗi phân đoạn tế bào của tế bào máu ngoại vi ở người khỏe mạnh (trên các hình vẽ, tế bào B, tế bào T, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tế bào hồng cầu, và tiểu cầu được thể hiện theo thứ tự đã định từ bên tay trái) bằng cách sử dụng phân tích FACS.

FIG. 7 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 5 bằng cách phân tích, bằng FACS, liên kết của kháng thể MMG49 với từng phân đoạn tế bào của tế bào Tủy xương có nguồn gốc từ bệnh nhân u tủy. Ở phía bên tay trái, phương pháp xác định mỗi phân đoạn tế bào được minh họa, và ở phải bên tay phải, các biểu đồ thể hiện liên kết của MMG49 với mỗi phân đoạn được thể hiện. Trên FIG. 7A, thể hiện so sánh giữa tế bào gốc tạo máu và phân đoạn tế bào nguyên bản, và tế bào u tủy, và trên FIG. 7B, thể hiện so sánh giữa các phân đoạn bạch cầu B/T, và tế bào nguyên bản u tủy và phân đoạn tế bào huyết tương u tủy.

FIG. 8 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 6 bằng cách phân tích liên kết của mỗi kháng thể trong số các kháng thể MMG49 và kháng thể FIB27 với mỗi tế bào Trong số các dòng tế bào u tủy khác nhau, và tế bào T và tế

bào B có nguồn gốc từ máu ngoại vi bằng cách sử dụng FACS. Còn có các kết quả được thể hiện xác nhận sự biểu hiện của ITGA4 (liên kết của kháng thể kháng integrin α_4) và sự biểu hiện ITGAE (liên kết của kháng thể kháng integrin α_E) trong tế bào nêu trên bằng phân tích FACS.

FIG. 9 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 6 bằng cách phân tích, bằng FACS, liên kết của kháng thể MMG49 và kháng thể FIB27 với tế bào U266 và tế bào U266 thiếu hụt ITGA4 (integrin α_4). Còn có các kết quả được thể hiện thu được bằng cách phân tích, bằng FACS, sự biểu hiện của ITGA4 (liên kết của kháng thể kháng integrin α_4) trong tế bào nêu trên.

Các FIG. 10 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 7 bằng cách cho phép tế bào K562 biểu hiện mạnh integrin $\alpha_4\beta_7$ và tế bào T có nguồn gốc từ máu ngoại vi của người bình thường được xử lý khi có mặt $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ hoặc Mn^{2+} ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút phản ứng với kháng thể MMG49 hoặc kháng thể isotyp, sau đó nhuộm tế bào bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG của chuột làm kháng thể thứ cấp, và đưa tế bào được nhuộm vào phân tích FACS.

FIG. 11 là biểu đồ minh họa cấu trúc của protein thể khảm người/chuột integrin β_7 và sự có mặt hoặc không có mặt liên kết của kháng thể MMG49 với tế bào 293T được tạo ra để biểu hiện tạm thời protein trong Ví dụ 8.

FIG. 12 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 8 bằng cách phân tích, bằng FACS, liên kết của kháng thể MMG49 với tế bào 293T được tạo ra để biểu hiện tạm thời protein thể khảm người/chuột integrin β_7 .

FIG. 13 là biểu đồ tổng kết các kết quả được thể hiện trên FIG. 12. Trên biểu đồ trên FIG. 13, trục tung thể hiện tỷ lệ phần trăm tế bào được liên kết với kháng thể, và trục hoành thể hiện các protein thể khảm người/chuột integrin β_7 khác nhau.

FIG. 14 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách nhuộm tế bào MM1s và tế bào KMS12BM với kháng thể MMG49 được khảm hóa được tạo ra bằng cách liên kết các vùng biến đổi của kháng thể MMG49 với vùng hằng định của kháng thể IgG4 của người.

FIG. 15 là sơ đồ minh họa phương pháp tạo ra cấu trúc CAR nhờ sử dụng các vùng biến đổi của kháng thể MMG49.

FIG. 16 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách nhuộm tế bào T được tạo ra để biểu hiện cấu trúc CAR bằng cách sử dụng các vùng biến đổi của kháng thể MMG49 với kháng thể PE kháng $F(ab')_2$ của người.

FIG. 17 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 11 bằng cách xác định định lượng, bằng ELISA, các lượng IFN- γ và IL2 được tạo ra nhờ nuôi cấy đồng thời tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T có GFP (đối chứng) được đưa vào với tế bào K562 không biểu hiện integrin β_7 hoặc tế bào K562 gây ra sự biểu hiện mạnh integrin $\alpha_4\beta_7$. *P: <0,05

FIG. 18 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 11 bằng cách xác định định lượng, bằng ELISA, lượng IFN- γ được tạo ra nhờ nuôi cấy đồng thời tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T có GFP (đối chứng) được đưa vào với tế bào biểu hiện hoặc tế bào không biểu hiện kháng nguyên MMG49.

FIG. 19 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 11 bằng cách xác định định lượng, bằng ELISA, lượng IL2 được tạo ra nhờ nuôi cấy đồng thời tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T có GFP (đối chứng) được đưa vào với tế bào biểu hiện hoặc tế bào không biểu hiện kháng nguyên MMG49.

FIG. 20 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 11 bằng cách đo, bằng thử nghiệm tiêu diệt ^{51}Cr , mức độ hủy hoại tế bào gây ra bởi tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T có GFP (đối chứng) được đưa vào so với tế bào K562 không biểu hiện integrin β_7 hoặc tế bào K562 được tạo ra để biểu hiện mạnh integrin $\alpha_4\beta_7$. Trục y của mỗi đồ thị trên FIG. 20 biểu thị tỷ lệ phần trăm hủy hoại tế bào (%).

FIG. 21 là các biểu đồ thể hiện kết quả thu được trong Ví dụ 11 bằng cách đo, bằng thử nghiệm tiêu diệt ^{51}Cr , mức độ hủy hoại tế bào gây ra bởi tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T có GFP (đối chứng) được

đưa vào so với tế bào biểu hiện hoặc tế bào không biểu hiện kháng nguyên MMG49.

FIG. 22 là biểu đồ và các đồ thị minh họa và thể hiện thiết kế thử nghiệm điều trị cho dòng tế bào u tủy MM1s được ghép trong tủy xương của chuột NOG và kết quả của thử nghiệm này trong Ví dụ 12. Tế bào tủy xương sau 1 tuần chuyển tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T có GFP (đối chứng) được đưa vào được thu gom và phân tích bằng FACS. Tế bào MM1s có thể được nhận dạng là tế bào CD138⁺ của người. Trong nhóm sử dụng tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49, tế bào MM1s trong tủy xương gần như biến mất hoàn toàn.

FIG. 23 là sơ đồ, ảnh, và đồ thị minh họa và thể hiện thiết kế thử nghiệm điều trị cho dòng tế bào u tủy MM1s được ghép toàn thân vào chuột NOG và kết quả của thử nghiệm này trong Ví dụ 12. Lượng tế bào u tủy trước và sau khi chuyển tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T có GFP (đối chứng) được đưa vào được đánh giá bằng phép đo cường độ phát huỳnh quang dựa trên chụp ảnh IVIS. Trong nhóm sử dụng tế bào T có CAR có nguồn gốc từ kháng thể MMG49, tế bào MM1s trong tủy xương gần như biến mất hoàn toàn.

FIG. 24 là tổng quan minh họa việc so sánh giữa trình tự axit amin của integrin β_7 có nguồn gốc từ người và trình tự axit amin of integrin β_7 có nguồn gốc từ chuột.

FIG. 25 là biểu đồ và đồ thị minh họa và thể hiện việc tạo cấu trúc protein thể khảm người/chuột integrin β_7 và sự có mặt hoặc không có mặt liên kết của kháng thể MMG49 với tế bào 293T được tạo ra để biểu hiện tạm thời protein trong Ví dụ 13.

FIG. 26 là biểu đồ thể hiện kết quả của thử nghiệm nghiên cứu epitop của kháng thể MMG49 trong Ví dụ 14. MFI trên trục hoành biểu thị cường độ của liên kết với kháng thể MMG49, và giá trị số càng cao biểu thị ái lực càng cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Ở đây, "bao gồm" và "có" là ngôn ngữ mở, nhưng mỗi khái niệm bao gồm ngôn ngữ đóng "gồm có", và theo một phương án, có thể được thay thế bằng "gồm có".

"Tế bào nguyên bản u tủy" là tế bào nguyên bản ở giai đoạn trước khi biệt hóa thành tế bào huyết tương u tủy, và được đặc trưng bởi biểu hiện CD38 ở mức cao, nhưng không biểu hiện CD138, dùng làm chất đánh dấu đặc hiệu cho tế bào huyết tương trưởng thành. Do đó, tế bào nguyên bản u tủy đôi khi được gọi là "tế bào CD38⁺⁺CD138⁻" hoặc "tế bào CD19⁻CD38⁺⁺CD138⁻".

"Tế bào huyết tương u tủy" thường được gọi là tế bào u tủy, và là tế bào sản sinh protein M, là globulin miễn dịch bất thường. Tế bào huyết tương u tủy biểu hiện CD138 ngoài biểu hiện CD38 ở mức cao. Do đó, tế bào huyết tương u tủy đôi khi được gọi là "tế bào CD38⁺⁺CD138⁺" hoặc "tế bào CD19⁻CD38⁺⁺CD138⁺".

Tế bào nguyên bản u tủy và tế bào huyết tương u tủy còn chỉ tế bào nguyên bản khối u và tế bào huyết tương ung thư, tương ứng ở bệnh gây ra sự phát triển ung thư của tế bào huyết tương ngoài bệnh đa u tủy.

"Tế bào nguyên bản tạo máu" là tế bào có thể biệt hóa thành các tế bào tạo máu khác nhau. Tế bào nguyên bản tạo máu đặc trưng ở chỗ biểu hiện CD34. Do đó, ở đây, tế bào nguyên bản tạo máu đôi khi được gọi là "tế bào CD34⁺".

(I) Kháng thể

Kháng thể (I) ưu tiên là kháng thể kháng integrin β_7 của người mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người.

Ví dụ ưu tiên hơn về kháng thể (I) có thể bao gồm: kháng thể mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 33 đến 109 của integrin β_7 của người; và kháng thể mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 90 của integrin β_7 của người. Ví dụ ưu tiên nhất có thể là kháng thể mà epitop của nó có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 33 đến 90 của integrin β_7 của người.

Integrin β_7 của người không bị giới hạn cụ thể, và có thể là protein xuyên màng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31, protein có thể tạo ra

heterodime với integrin α . Ví dụ cụ thể về integrin α có thể bao gồm integrin α_4 và integrin α_E .

Ví dụ cụ thể về trình tự axit amin của integrin β_7 của người có thể bao gồm, ngoài trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31, trình tự axit amin mô tả trong, ví dụ: ĐĂNG KÝ: EAW96675, PHIÊN BẢN: EAW96675.1, GI: 119617081; ĐĂNG KÝ: NM000889, PHIÊN BẢN: NM000889.2, GI: 540344585; ĐĂNG KÝ: XM005268851, PHIÊN BẢN: XM005268851.2, GI: 767974096; ĐĂNG KÝ: XM006719376, PHIÊN BẢN: XM006719376.2, GI: 767974098; và ĐĂNG KÝ: XM005268852, PHIÊN BẢN: XM005268852.3, GI: 767974097, liệt kê trong cơ sở dữ liệu NCBI.

Phần mô tả sau đây liên quan đến integrin β_7 của người được tạo ra dựa trên trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31. Tuy nhiên, đối với trình tự axit amin khác bất kỳ của integrin β_7 của người, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng xác định vùng hoặc vị trí nào của trình tự axit amin khác của integrin β_7 của người tương ứng với vùng và/hoặc vị trí của integrin β_7 của người được mô tả dưới đây bằng cách xác định mức độ tương đồng của trình tự axit amin khác so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31 trên máy tính.

Vùng ở vị trí gốc axit amin 1 đến 19 của integrin β_7 của người là đoạn peptit dùng làm peptit tín hiệu và không có mặt nếu integrin β_7 của người hoạt động chức năng làm protein màng trong cơ thể sống. Do đó, nếu integrin β_7 của người thể hiện chức năng là protein màng, đầu tận cùng N của nó là gốc axit amin ở vị trí 20 của trình tự axit amin nêu trên.

Vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người gồm vùng PSI. Vùng PSI của integrin β_7 của người và vùng PSI của integrin β_7 của chuột được biết là có mức độ tương đồng cao khoảng 80% hoặc cao hơn. Tuy nhiên, như minh họa trên FIG. 24, khi được so sánh với nhau, gốc axit amin của vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 gồm vùng PSI của integrin β_7 của người và integrin β_7 của chuột khác nhau tổng số 15 gốc axit amin, cụ thể là gốc axit amin ở vị trí 23, vị trí 26, vị trí 28, vị trí 30, vị trí 32, vị trí 35, vị trí 36, vị trí 38, vị trí 41, vị trí 42, vị trí 48, vị trí 93, vị trí 94, vị trí 102, và vị trí 109 của integrin β_7 của người.

Do đó, ưu tiên là epitop của kháng thể (I) đi kèm với một hoặc nhiều axit amin bất kỳ, tốt hơn là hai hoặc nhiều, tốt hơn nữa là ba hoặc nhiều trong số 15 gốc axit amin này. Cụ thể là, epitop của kháng thể (I) ưu tiên là có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 23 đến 109 của integrin β_7 của người, ưu tiên hơn là có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 23 đến 48 hoặc vùng ở vị trí gốc axit amin 93 đến 109.

Epitop của kháng thể (I) theo một phương án khác được ưu tiên hơn có thể trong: vùng ở vị trí gốc axit amin 23 đến 48; vùng ở vị trí gốc axit amin 93 đến 109; hoặc vùng ba chiều là tổ hợp của vùng ở vị trí gốc axit amin 23 đến 48 và vùng ở vị trí gốc axit amin 93 đến vị trí 109.

Epitop của kháng thể (I) có thể là epitop thẳng, hoặc có thể là epitop hình thù (còn được gọi là epitop không thẳng). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết rằng epitop thẳng là trường hợp trong đó các gốc axit amin liên tiếp nhau dùng làm epitop và epitop hình thù là epitop được tạo ra bởi các gốc axit amin không liên tiếp nhau.

Ví dụ, trường hợp trong đó vùng ba chiều nêu trên là tổ hợp của vùng ở vị trí gốc axit amin 23 đến 48 và vùng ở vị trí gốc axit amin 93 đến 109 dùng làm epitop có thể được đưa ra làm ví dụ tương ứng với epitop hình thù, và trường hợp trong đó vùng gồm các gốc axit amin không liên tiếp được bao gồm trong vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 dùng làm epitop cũng được bao gồm trong epitop hình thù.

Trong số các epitop nêu trên, ưu tiên là gốc axit amin ở vị trí 48 có liên quan mạnh với epitop của kháng thể (I) hoặc được bao gồm trong epitop của kháng thể (I).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể hiểu về epitop thẳng đặc hiệu và epitop hình thù, tham chiếu đến, ví dụ, JP 2011-527572 A, JP 2009-534401 A, hoặc "Dissecting antibodies with regards to linear và conformational epitopes." Forsstrom B, Axnas BB, Rockberg J, Danielsson H, Bohlin A, Uhlen M. PLoS One. 2015 Mar 27; 10(3): e0121673. doi: 10.1371/journal.pone.0121673. eCollection 2015.

Nói cách khác, nhưng điều nêu trên có nghĩa là kháng thể (I) là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người, và cụ thể là, ưu tiên là liên kết đặc hiệu với vùng ở vị trí từ 23 đến 109, ưu tiên hơn là liên kết đặc hiệu với vùng ở vị trí từ 23 đến 48 và/hoặc vị trí từ 93 đến 109.

Ngoài ra, đặc tính của kháng thể (I) là liên kết với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 , mà dùng làm epitop, đôi khi được gọi là ái lực với epitop. Do đó, thuật ngữ "ái lực với epitop tăng" có cùng nghĩa với "khả năng liên kết đặc hiệu với epitop tăng."

Thuật ngữ "đặc hiệu" có thể phân biệt với thuật ngữ "chọn lọc".

Phương án khác về kháng thể (I), ưu tiên là ái lực của kháng thể (I) đối với epitop tăng khi có mặt ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 721 của integrin β_7 của người.

"Ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 721" chỉ gốc axit amin bất kỳ trong vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 721 và vùng riêng phần của nó có thể được chọn. Ví dụ cụ thể về "vùng riêng phần của nó" bao gồm: ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 417 đến 721 của integrin β_7 của người; ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 564 đến 721 của integrin β_7 của người; ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 563 của integrin β_7 của người; ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 417 đến 563 của integrin β_7 của người; và ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 416 của integrin β_7 của người. Có nghĩa là, ái lực của kháng thể (I) đối với epitop có thể được gia tăng khi có mặt của vùng bất kỳ trong số các vùng này.

Thuật ngữ "với sự có mặt của" chỉ vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người và ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 721 của integrin β_7 của người có thể có mặt trong cùng phân tử, hoặc hai vùng này có thể có mặt như hai phân tử riêng biệt. Ưu tiên là hai vùng này có mặt trong cùng phân tử. Thuật ngữ "với sự có mặt của" có thể được đọc là "bởi".

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng xác nhận rằng ái lực của kháng thể (I) nêu trên với epitop được gia tăng, bằng phương pháp thử

thử nghiệm miễn dịch được sử dụng phổ biến được mô tả trong, ví dụ, các ví dụ được mô tả dưới đây.

Ví dụ, tế bào được tạo ra để biểu hiện protein thể khảm người/chuột integrin β_7 (#4960), là các protein thể khảm người/chuột integrin β_7 khác nhau được mô tả trong Ví dụ 8, và các protein này gồm vùng ở vị trí gốc axit amin 1 đến 109 của integrin β_7 có nguồn gốc từ người và gồm vùng ở vị trí gốc axit amin 722 đến 798 của integrin β_7 có nguồn gốc từ người, được tạo ra, và protein thể khảm người/chuột integrin β_7 (#4961) trong đó vùng của #4960 ở vị trí gốc axit amin 379 đến 721 của integrin β_7 có nguồn gốc từ người được thay thế bằng vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 721 của integrin β_7 có nguồn gốc từ chuột được tạo ra. Trong trường hợp này, sự tăng ái lực của kháng thể (I) với epitop có thể được xác nhận bằng cách so sánh mức độ liên kết của kháng thể (I) giữa tế bào biểu hiện protein nói sau (#4961) và tế bào biểu hiện protein nói trước (#4960).

Phương án khác về kháng thể (I), ưu tiên là ái lực của kháng thể (I) với epitop được gia tăng bằng cách hoạt hóa integrin β_7 của người. Có thể là do integrin β_7 của người được hoạt hóa có đặc tính cấu trúc trong vùng gồm epitop, ái lực của kháng thể (I) với epitop được gia tăng.

Phương pháp hoạt hóa integrin β_7 của người là đã biết. Ví dụ, bằng cách cho phép phorbol este, như PMA, muối của mangan, hoặc tương tự hoạt động trên tế bào biểu hiện integrin β_7 của người, ví dụ, tế bào được chọn từ tế bào máu và tế bào miễn dịch, như tế bào huyết tương, tế bào NK, tế bào T, tế bào B, nguyên bào lympho, Tế bào có nguồn gốc từ u lympho Burkitt, và tế bào tua, integrin β_7 của người được biểu hiện trong tế bào có thể được hoạt hóa. Ngoài ra, không chỉ giới hạn ở các tế bào cụ thể nêu trên, tế bào được tạo ra để biểu hiện integrin β_7 của người có thể được sử dụng và xử lý bằng phorbol este, muối của mangan, hoặc tương tự để hoạt hóa integrin β_7 của người.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng xác nhận rằng ái lực của kháng thể (I) với epitop được gia tăng nhờ hoạt hóa integrin β_7 của người, bằng phương pháp thử nghiệm miễn dịch được sử dụng phổ biến được mô tả trong, ví dụ, các ví dụ được mô tả dưới đây.

Ví dụ, tế bào được tạo ra để biểu hiện #4960 hoặc #4961, là các protein thể khảm người/chuột integrin β_7 khác nhau được mô tả trong Ví dụ 8 và gồm vùng ở vị trí gốc axit amin 1 đến 109, được tạo ra, và tế bào được đưa vào để hoạt hóa integrin β_7 -có nghĩa như được mô tả trong Ví dụ 7. Sau đó, ái lực trước và sau khi xử lý hoạt hóa được so sánh với nhau bằng biện pháp sử dụng thử nghiệm miễn dịch. Do đó, sự gia tăng ái lực của kháng thể (I) với epitop trong tế bào sau khi hoạt hóa có thể được xác nhận.

Phương án khác của kháng thể (I) là, kháng thể (I) có thể là kháng thể kháng integrin β_7 của người có đặc tính là có ái lực cao với integrin β_7 của người được biểu hiện trên tế bào có nguồn gốc từ u tủy hơn với integrin β_7 của người được biểu hiện trên tế bào bình thường.

Tế bào bình thường không bị giới hạn cụ thể miễn là tế bào này có nguồn gốc từ người khỏe mạnh, và có thể là, ví dụ, tế bào bình thường có nguồn gốc từ máu. Trong số các tế bào bình thường này, tế bào huyết tương bình thường được ưu tiên.

Phương pháp xác nhận rằng kháng thể có ái lực cao hơn với integrin β_7 của người được biểu hiện trên tế bào u tủy hơn với integrin β_7 của người được biểu hiện trên tế bào bình thường này có thể dễ dàng được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực bằng phương pháp thử nghiệm miễn dịch được sử dụng phổ biến được mô tả trong, ví dụ, các ví dụ được mô tả dưới đây.

"Phương pháp thử nghiệm miễn dịch được sử dụng phổ biến" không bị giới hạn cụ thể miễn là phương pháp này liên quan đến phép đo sử dụng nhiều kháng thể khác nhau bất chấp kháng nguyên. Ví dụ về các phương pháp này có thể bao gồm phương pháp đếm tế bào theo dòng (FACS), phân loại tế bào được bao gồm tờ đây, thấm miễn dịch western, ELISA, phương pháp kết tủa miễn dịch, phương pháp SPR, và phương pháp QCM.

Phương án khác về kháng thể (I) là, epitop của kháng thể (I) ưu tiên là giống với epitop của kháng thể MMG49 được bộc lộ trong các ví dụ được mô tả sau đây. Kháng thể giống với kháng thể MMG49 được ưu tiên nhất. Về phương pháp

sản xuất kháng thể MMG49, có thể tham chiếu đến các ví dụ được mô tả dưới đây.

Phương án khác về kháng thể (I) là, kháng thể (I) ưu tiên là kháng thể theo phương án gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Tức là, kháng thể (I) có thể chỉ là vùng biến đổi của chuỗi nặng, hoặc có thể chỉ là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Kháng thể (I) được ưu tiên là kháng thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Vùng biến đổi còn được gọi là vị trí nhận diện kháng nguyên, và được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu là vị trí quan trọng đối với kháng thể để nhận diện kháng nguyên. Vùng biến đổi này có ba vùng gọi là vùng siêu biến (còn được gọi là vùng quyết định bổ thể (bổ thểarity determining regions - CDRs)), và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng biết rằng các CDR là các vùng cực kỳ quan trọng tham gia nhiều nhất vào chức năng nhận diện kháng nguyên của kháng thể.

Theo một phương án khác, vùng biến đổi của chuỗi nặng được bao gồm trong kháng thể (I) gồm một hoặc nhiều chuỗi nặng bất kỳ trong số chuỗi nặng CDR1, chuỗi nặng CDR2, và chuỗi nặng CDR3. Tức là, vùng biến đổi của chuỗi nặng có thể bao gồm chỉ chuỗi nặng CDR1, chuỗi nặng CDR2, hoặc chuỗi nặng CDR3, và tốt hơn là gồm ít nhất chuỗi nặng CDR3. Phương án được ưu tiên hơn gồm chuỗi nặng CDR1, chuỗi nặng CDR2, và chuỗi nặng CDR3 theo thứ tự đã định từ đầu tận cùng amin (đầu tận cùng N).

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có thể tương tự với vùng biến đổi của chuỗi nặng, tức là, gồm, ví dụ, chuỗi nhẹ bất kỳ trong số chuỗi nhẹ CDR1, chuỗi nhẹ CDR2, và chuỗi nhẹ CDR3, ưu tiên là gồm ít nhất chuỗi nhẹ CDR3, và ưu tiên là gồm chuỗi nhẹ CDR1, chuỗi nhẹ CDR2, và chuỗi nhẹ CDR3 theo thứ tự đã định từ đầu tận cùng amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Các vùng khác ngoài CDR1 đến CDR3 trong mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ đôi khi được gọi là FR. Cụ thể hơn là, vùng nằm giữa đầu tận cùng N và CDR1 được gọi là FR1, vùng nằm giữa CDR1 và CDR2 gọi là FR2, vùng nằm giữa CDR2 và CDR3 gọi là FR3, và vùng nằm giữa

CDR3 và đầu tận cùng cacboxy (đầu tận cùng C) gọi là FR4, và tên được đặt cho mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDR1 đến CDR3 và chuỗi nhẹ CDR1 đến CDR3 không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ về các vùng này bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6, chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7, và chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8 dùng làm chuỗi nặng CDR 1 đến 3 hoặc chuỗi nhẹ CDR 1 đến 3 của kháng thể MMG49.

Phương án ưu tiên về vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm chuỗi nặng CDR1 đến CDR3, có thể được đưa ra, ví dụ, vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, là vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể MMG49. Ngoài ra, phương án ưu tiên về vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm chuỗi nhẹ CDR1 đến CDR3, có thể đưa ra, ví dụ, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể MMG49.

Trình tự axit amin nêu trên của kháng thể MMG49 nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 4 và 6 đến 9 được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây. Các phần được gạch chân trong mỗi trình tự axit amin của chuỗi nặng và vùng biến đổi nêu trong SEQ ID NO: 4 và 9 trong Bảng 1 chỉ các phần ở vị trí CDR1, CDR2, và CDR3 theo thứ tự đã định từ đầu tận cùng amin.

Bảng 1:

<Trình tự axit amin của kháng thể MMG49>		
Ch uỗi nặ ng	CDR1 (SEQ ID NO: 1)	GYTFSSYW
	CDR2 (SEQ	MLPGSGSS

Ch uỗi nh ẹ	ID NO: 2)	
	CDR3 (SEQ ID NO: 3)	ARGDGN YWYFDV
	Vùng biến đổi (SEQ ID NO: 4)	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKIS CKASGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEMLPGSGSSNYNE KFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGN YWYFDVWGAG
	CDR1 (SEQ ID NO: 6)	SSVGY
	CDR2 (SEQ ID NO: 7)	ATS
	CDR3 (SEQ ID NO: 8)	QQWSSDPPT
	Vùng biến đổi (SEQ ID NO: 9)	MDFQVQIFSFLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVGYMHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSG SESGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSDPPTFGGGTKLEI K

Cấu trúc của kháng thể (I) không bị giới hạn. Ví dụ cụ thể về cấu trúc này bao gồm Fv, scFv, kháng thể đôi, kháng thể ba, và kháng thể tứ, và cấu trúc này cũng có thể là cấu trúc thu được bằng cách kết hợp các cấu trúc này một cách phù hợp. Ngoài ra, các cấu trúc này còn bao gồm các cấu trúc được kết hợp đôi khi còn được gọi là kháng thể phân đoạn. Kháng thể phân đoạn này có thể là protein tái tổ hợp được thiết kế nhân tạo gồm Fv, hoặc có thể là protein được dung hợp với phân tử sinh học, như protein.

Fv còn được gọi là đơn vị cấu trúc nhỏ nhất của kháng thể, và là cấu trúc mà trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được liên kết với nhau bằng tương tác không cộng hóa trị liên phân tử. Hơn nữa, Fv có thể là cấu trúc trong đó các nhóm thiol gồm các gốc cystein có mặt trong vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ tạo ra liên kết disulfit với nhau.

scFv là cấu trúc trong đó đầu tận cùng C của vùng biến đổi của chuỗi nặng và đầu tận cùng N của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nối với nhau bằng cầu nối, và còn được gọi là kháng thể chuỗi đơn. Ngoài ra, đầu tận cùng C và đầu tận cùng N được nối bằng cầu nối có thể là đầu tận cùng C của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và đầu tận cùng N của vùng biến đổi của chuỗi nặng. Cấu trúc của the scFv có thể được tạo ra bằng liên hợp dựa trên tương tác không cộng hóa trị liên phân tử hoặc tương tác tương tự như trong Fv.

Kháng thể đôi, kháng thể ba, và kháng thể tứ là các cấu trúc trong đó scFv nêu trên lần lượt tạo ra dime, trime, và tetrame và được liên kết ở trạng thái ổn định nhất về mặt cấu trúc nhờ tương tác không cộng hóa trị liên phân tử hoặc tương tác tương tự giữa vùng biến đổi như trong Fv hoặc tương tự.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng tạo ra kháng thể (I) có cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc khác nhau này: tạo cấu trúc vector biểu hiện bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật di truyền được sử dụng phổ biến; và sử dụng, với vector biểu hiện này, hệ biểu hiện nhận tế bào chủ phù hợp với sự sản sinh kháng thể, như tế bào nhân sơ (như *Escherichia coli* hoặc xạ khuẩn) hoặc tế bào nhân thật (như tế bào nấm men, tế bào côn trùng, hoặc tế bào

động vật có vú), hệ biểu hiện không chứa tế bào được sử dụng phổ biến, hoặc tương tự. Kháng thể được tạo ra có thể được đưa một cách thích hợp vào quy trình tinh chế được sử dụng phổ biến để được thu nhận ở tình trạng có độ tinh khiết cao.

Phương án khác của kháng thể (I) là, kháng thể (I) có thể chứa vùng hằng định. Vùng hằng định được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực như sau: vùng hằng định của chuỗi nặng gồm CH1, CH2, và CH3, và vùng hằng định của chuỗi nhẹ gồm CL. Ngoài ra, vùng gồm CH2 và CH3 đôi khi được gọi là vùng Fc.

Nguồn gốc cụ thể của vùng hằng định không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ về chúng có thể bao gồm vùng hằng định có nguồn gốc từ các loài động vật có khả năng sản xuất sinh khối, các loài động vật có quan hệ gần gũi với người, các loài động vật ít có khả năng gây ra tính sinh miễn dịch khi sử dụng cho người, và tương tự, ví dụ, vùng hằng định có nguồn gốc từ người, nguồn gốc từ chuột, nguồn gốc từ chuột nhắt, nguồn gốc từ thỏ, nguồn gốc từ khỉ, và nguồn gốc từ tinh tinh.

Trong kháng thể (I), nếu vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có nguồn gốc từ chuột, ví dụ, vùng hằng định có nguồn gốc từ người có thể được kết hợp vào, do đó tạo ra kháng thể (I) dưới dạng kháng thể thể khảm.

Ngoài ra, chuỗi nặng FR1 đến FR4 và/hoặc chuỗi nhẹ FR1 đến FR4 trong kháng thể thể khảm nói trên có thể được thay thế bằng trình tự axit amin có nguồn gốc từ người, do đó tạo ra kháng thể (I) dưới dạng kháng thể người hóa.

Ngoài ra, chuỗi nặng CDR1 đến CDR3 và/hoặc chuỗi nhẹ CDR1 đến CDR3 trong kháng thể người hóa nêu trên có thể được thay thế bằng trình tự axit amin có nguồn gốc từ người ở mức độ mà các chức năng của CDR không bị giảm, do đó tạo ra kháng thể (I) dưới dạng kháng thể người. Thuật ngữ "kháng thể người" đôi khi được gọi là "kháng thể người hóa hoàn toàn".

Ví dụ về cấu trúc của kháng thể (I) theo phương án gồm vùng hằng định có thể bao gồm các cấu trúc như Fab, F(ab')₂, tiểu kháng thể, và scFv-Fc, cũng như an globulin miễn dịch có cấu trúc bốn chuỗi gồm một cặp chuỗi nặng, mỗi chuỗi

có vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng hằng định của chuỗi nặng, và một cặp chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng hằng định của chuỗi nhẹ. Ngoài ra, cấu trúc thu được bằng cách kết hợp các cấu trúc này một cách thích hợp cũng có thể được chọn. Ngoài ra, các cấu trúc này gồm các cấu trúc kết hợp đôi khi còn được gọi là kháng thể phân đoạn. Kháng thể phân đoạn này có thể là protein tái tổ hợp được thiết kế nhân tạo gồm Fv, hoặc có thể là protein được dung hợp với phân tử sinh học, như protein.

Fab gồm phân đoạn chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và CH1 trong vùng hằng định của chuỗi nặng, và chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng hằng định của chuỗi nhẹ, và có cấu trúc trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được liên kết với nhau nhờ tương tác liên phân tử không cộng hóa trị nêu trên, hoặc được liên kết với nhau bằng cầu nối disulfit. Ngoài ra, Fab có thể là sao cho CH1 và CL tạo ra cầu nối disulfit giữa các nhóm thiol của gốc xystein tương ứng có mặt ở đó.

$F(ab')_2$ có cặp Fab, và có cấu trúc trong đó các CH1 tạo ra cầu nối disulfit giữa các nhóm thiol của gốc xystein tương ứng được bao gồm ở đó.

Tiểu kháng thể có cặp phân đoạn kháng thể, mỗi đoạn gồm scFv và CH3, và có cấu trúc mà trong đó mỗi phân đoạn kháng thể được liên kết với nhau nhờ tương tác không cộng hóa trị liên phân tử giữa các CH3.

scFv-Fc có cặp phân đoạn kháng thể, mỗi phân đoạn gồm scFv, CH2, và CH3, và có cấu trúc mà trong đó, giống như trong tiểu kháng thể, các phân đoạn kháng thể được liên kết với nhau nhờ tương tác không cộng hóa trị liên phân tử giữa các CH3, và tạo ra cầu nối disulfit giữa các nhóm thiol của gốc xystein được bao gồm trong các CH3 tương ứng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng tạo ra kháng thể (I) gồm vùng hằng định có cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc khác nhau này như với kháng thể (I) không gồm vùng hằng định, bằng cách tạo cấu trúc vectơ biểu hiện bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật di truyền được sử dụng phổ biến, và sử dụng, với vectơ biểu hiện này, hệ biểu hiện nhận tế bào chủ phù hợp để sản xuất kháng thể. Kháng thể được tạo ra có thể được đưa phù hợp

vào quy trình tinh chế được sử dụng phổ biến để được thu nhận ở tình trạng có độ tinh khiết cao.

Fab có thể thu được bằng cách, ví dụ, thiết kế globulin miễn dịch IgG với proteaza như papain. Ngoài ra, $F(ab')_2$, $F(ab)_2$ có thể thu được bằng cách thiết kế IgG với proteaza như pepsin.

Trong số các kháng thể (I) nêu trên, mỗi kháng thể gồm vùng hằng định, cấu trúc được ưu tiên là globulin miễn dịch. Typ phụ của globulin miễn dịch này không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ về chúng có thể bao gồm IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM. Trong số các typ phụ này, IgG được ưu tiên, và ví dụ, trong trường hợp IgG có nguồn gốc từ chuột, IgG2 được ưu tiên trong số 4 lớp phụ.

Trong số các kháng thể (I) nêu trên, mỗi kháng thể gồm vùng hằng định, kháng thể theo phương án được ưu tiên hơn là kháng thể gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 và/hoặc chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Kháng thể được ưu tiên nhất là kháng thể gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Đột biến có thể được đưa vào mỗi vùng có trình tự axit amin nêu trên tùy thuộc vào hoàn cảnh. Ưu tiên là đột biến này không được đưa vào chuỗi nặng CDR và chuỗi nhẹ CDR. Tức là, đột biến này ưu tiên là được đưa vào chuỗi nặng FR hoặc chuỗi nhẹ FR. Nếu kháng thể (I) gồm vùng hằng định, đột biến có thể còn được đưa vào ngoài đột biến để điều chỉnh hoạt tính ADCC hoặc hoạt tính CDC được mô tả dưới đây.

Số lượng gốc axit amin cụ thể mà tại đó đột biến được đưa vào không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, mức độ tương đồng giữa trình tự axit amin trước khi đưa đột biến vào và trình tự axit amin sau khi đưa đột biến vào là khoảng 70%, tốt hơn là khoảng 75%, tốt hơn nữa là khoảng 80%, tốt hơn nữa là khoảng 85%, tốt hơn nữa là khoảng 90%, tốt hơn nữa là khoảng 95%, tốt hơn nữa là khoảng 96%, tốt hơn nữa là khoảng 97%, tốt hơn nữa là khoảng 98%, tốt nhất là khoảng 99%. Giá trị số này là giá trị thu được bằng cách làm tròn.

Thuật ngữ "mức độ tương đồng" chỉ mức độ của các trình tự axit amin tương đồng với nhau trong hai hoặc nhiều trình tự axit amin có thể so sánh được. Do đó, khi mức độ tương đồng giữa hai trình tự axit amin cho trước tăng, có thể nói rằng các trình tự này không chỉ có mức độ tương đồng cao mà còn có mức độ tương tự cao.

Mức độ tương đồng của các axit amin có thể được tính toán bằng cách sử dụng công cụ phân tích có bán trên thị trường hoặc có sẵn trên Internet (ví dụ, phần mềm như FASTA, BLAST, PSI-BLAST, hoặc SSEARCH). Ví dụ, các điều kiện chính ban đầu để được sử dụng nói chung cho tra cứu BLAST là như được mô tả dưới đây. Tức là, giá trị (%) cho mức độ tương đồng giữa các trình tự axit amin có thể được tính toán bằng cách thực hiện tra cứu trên BLAST 2.1 cải tiến với blastp được sử dụng làm chương trình, giá trị Expect được đặt ở 10, toàn bộ Filter được tắt, BLOSUM62 được sử dụng cho Matrix, Gap existence cost, Per residue gap cost, và tỷ số Lambda được đặt lần lượt bằng 11, 1, và 0,85 (giá trị mặc định), và các thông số khác nhau khác cũng được đặt ở các giá trị mặc định.

Việc đưa đột biến nêu trên vào trình tự axit amin có nghĩa là thay thế, loại bỏ, chèn hoặc tương tự. Việc đưa đột biến vào cụ thể không bị giới hạn cụ thể miễn là việc đưa đột biến vào này có thể đạt được bằng cách chọn phương pháp được sử dụng phổ biến. Ví dụ, trong trường hợp thay thế, có thể chọn phương pháp thay thế bảo toàn.

Thuật ngữ "phương pháp thay thế bảo toàn" chỉ phương pháp bao gồm việc thay thế một gốc axit amin nhất định bằng một gốc axit amin có chuỗi bên tương tự với gốc axit amin đó.

Ví dụ, thay thế giữa gốc axit amin, mỗi gốc có chuỗi bên bazơ, như lysin, arginin, và histidin, là phương pháp thay thế bảo toàn. Ngoài ra, mỗi sự thay thế giữa: gốc axit amin, mỗi gốc có chuỗi bên axit, như axit aspartic và axit glutamic; gốc axit amin, mỗi gốc có chuỗi bên phân cực không mang điện, như glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, và xystein; gốc axit amin, mỗi gốc có chuỗi bên không phân cực, như alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin, và tryptophan; gốc axit amin, mỗi gốc có chuỗi bên phân

nhánh β , như threonin, valin, và isoleuxin; và gốc axit amin, mỗi gốc có chuỗi bên thơm, như tyrosin, phenylalanin, tryptophan, và histidin, tương tự là phương pháp thay thế bảo toàn.

Phương án khác về kháng thể (I), kháng thể (I) có thể có hoạt tính gây độc tế bào. Hoạt tính gây độc tế bào chỉ hoạt tính mà kháng thể liên kết với tế bào, và kết quả là, gây ra hủy hoại tế bào được liên kết với kháng thể.

Ví dụ về hoạt tính gây độc tế bào như vậy bao gồm hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC. Thuật ngữ "hoạt tính ADCC" là viết tắt của hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity), và là hoạt tính thu nạp tế bào có hoạt tính gây độc tế bào, như tế bào NK biểu hiện thụ thể đặc hiệu với vùng hằng định của kháng thể, đến vùng lân cận kháng thể, do đó gây ra hủy hoại tế bào mà liên kết với kháng thể thông qua hoạt động của tế bào này và tương tự.

Thuật ngữ "hoạt tính CDC" là viết tắt của hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (Bổ thể-Dependent Cytotoxicity), và chỉ hoạt tính mà kháng thể thu nạp bổ thể đến vùng lân cận nó, do đó gây ra hoạt động làm hủy hoại tế bào được liên kết với kháng thể thông qua hoạt động của bổ thể này.

Ở đây, mỗi hoạt tính trong số hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC có thể được điều chỉnh bằng cách đưa đột biến vào vùng hằng định, đồng thời tham khảo các tài liệu, như Lazar GA et al., Proc Natl Acad Sci USA, 103: 4005-10 (2006), Shields RL et al., J Biol Chem, 276: 6591-604 (2001)), Moore GL et al., J Immunol, 159:3613-21 (1997), An Z et al., MAbs, 1:572-9 (2009).

Ví dụ, nếu vùng hằng định là IgG₁ của người, hoạt tính ADCC có thể được gia tăng bằng cách đưa vào đột biến như S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, S298A, K334A, S298A/K334A, hoặc S298A/E333A/K334A.

Ngoài ra, nếu vùng hằng định là IgG₁ của người như nêu trên, hoạt tính ADCC có thể được giảm bằng cách đưa vào đột biến như V234A/G237A, hoặc H268Q/V309L/A330S/P331S.

Liên quan đến hoạt tính CDC, nếu vùng hằng định là IgG₁ của người, hoạt tính này có thể được gia tăng bằng cách đưa vào đột biến như S267E, H268F, S324T, S267E/H268F, S267E/S324T, H268F/S324T, hoặc S267E/H268F/S324T.

Hoạt tính ADCC có thể đo được theo phương pháp của Brunner K.T., et al. (Brunner, K.T., et al., Immunology, 1968. 14:181-96). Ví dụ, tế bào u tủy được nuôi cấy trong môi trường RPMI1640 có bổ sung 10% FCS, và được chuẩn bị sao cho số lượng tế bào có thể từ $0,5 \times 10^4$ đến $1,0 \times 10^4$. Bổ sung lượng thích hợp $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ vào môi trường và để cho phản ứng với hợp chất này ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ để đánh dấu tế bào bằng ^{51}Cr , và tế bào thu được được rửa và sau đó được dùng làm tế bào đích. Làm tế bào phản ứng, tế bào thu được bằng cách nuôi cấy tế bào tủy xương của chuột SCID trong 6 ngày trong môi trường RPMI1640 có bổ sung 10% FBS, 10 ng/ml GM-CSF của chuột, và 40 IU/ml IL2 của người, hoặc tương tự có thể được sử dụng. Vào đĩa 96 giếng, kháng thể cần được thử nghiệm hoặc isotyp kháng thể của nó dùng làm đối chứng được bổ sung ở nồng độ cuối cùng từ 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đến 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, và tế bào đích ($1,0 \times 10^4$ tế bào) và tế bào phản ứng (5×10^5 tế bào) được bổ sung thêm. Hỗn hợp được cho phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ và ly tâm, và sau đó ^{51}Cr được giải phóng trong dịch nổi được đo bằng thiết bị đếm γ . Hoạt tính ADCC có thể được xác định dựa vào phương trình sau.

$$\text{Hoạt tính ADCC} = \{ ([^{51}\text{Cr} \text{ giải phóng từ tế bào đích}] - [^{51}\text{Cr} \text{ giải phóng tự phát trong điều kiện không có kháng thể}]) / ([\text{lượng } ^{51}\text{Cr} \text{ giải phóng nhiều nhất do bổ sung 1\% Triton X-100}] - [^{51}\text{Cr} \text{ giải phóng tự phát trong điều kiện không có kháng thể}]) \} \times 100$$

Hoạt tính CDC cũng có thể đo được theo phương pháp của Brunner K.T., et al. (Brunner, K.T., et al., Immunology, 1968. 14:181-96). Ví dụ, tế bào u tủy được dùng làm tế bào đích được nuôi cấy trong môi trường RPMI1640 có bổ sung 10% FCS, và được tạo ra để số lượng tế bào có thể từ $0,5 \times 10^4$ đến $1,0 \times 10^4$. Bổ sung lượng thích hợp $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ vào môi trường và để phản ứng với hợp chất này ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ để đánh dấu tế bào bằng ^{51}Cr , và tế bào thu được được

rửa và sau đó được dùng làm tế bào đích. Kháng thể cần được thử nghiệm hoặc isotyp kháng thể dùng làm đối chứng được tạo huyền phù trong môi trường RPMI1640 có bổ sung huyết thanh bào thai bò được bổ sung vào đĩa 96 giếng ở nồng độ cuối cùng từ 0,5 µg/mL đến 50 µg/mL, và sau đó tế bào đích và a bổ thể được bổ sung, sau đó cho phản ứng trong 1,5 giờ. Chất lỏng phản ứng được ly tâm, và ^{51}Cr được giải phóng trong dịch nổi được đo bằng thiết bị đếm γ . Hoạt tính CDC có thể được xác định dựa vào phương trình sau.

Hoạt tính CDC = $\{([^{51}\text{Cr}] \text{ giải phóng từ tế bào đích}) - [^{51}\text{Cr}] \text{ giải phóng tự phát trong điều kiện không có kháng thể}) / ([\text{lượng } ^{51}\text{Cr} \text{ giải phóng nhiều nhất do bổ sung 1\% Triton X-100}] - [^{51}\text{Cr}] \text{ giải phóng tự phát trong điều kiện không có kháng thể})\} \times 100$

Kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào có thể thu được bằng cách, ví dụ, đánh giá sự có mặt hoặc không có mặt hoạt tính gây độc tế bào bằng cách sử dụng phương pháp nêu trên, và chọn lọc kháng thể có hoạt tính này.

Phương án khác về kháng thể (I), kháng thể (I) có thể là kháng thể đa đặc hiệu. Tức là, kháng thể (I) có thể có khả năng liên kết có tính đặc hiệu với kháng nguyên khác ngoài vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người (kháng nguyên sau đây gọi là kháng nguyên khác).

Kháng nguyên khác ưu tiên là kháng nguyên không tương tự về mặt cấu trúc với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người.

Kháng nguyên khác cụ thể không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ về chúng gồm CD3, CD16, C1q, và vùng u của virus adeno, và ít nhất một trong các kháng nguyên này ở dạng kết hợp phù hợp có thể được chọn phù hợp làm kháng nguyên khác. Ưu tiên là kháng nguyên trong các kháng nguyên được đưa ra làm ví dụ nêu trên được chọn làm kháng nguyên khác. Tức là, kháng thể đa đặc hiệu được ưu tiên làm kháng thể đặc hiệu kép.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng tạo ra kháng thể đa đặc hiệu như vậy bằng cách chọn phù hợp phương pháp được sử dụng phổ biến. Ví dụ, kháng thể đa đặc hiệu có thể thu được theo cách sau: tế bào lai được tạo ra bằng cách sử dụng tế bào sản sinh kháng thể, như tế bào B, thu được từ

động vật được gây miễn dịch bằng tế bào biểu hiện phân đoạn peptit tương ứng với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người, hoặc integrin β_7 thể khảm trong đó chỉ vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người có nguồn gốc từ người và phần còn lại không có nguồn gốc từ người, như có nguồn gốc từ chuột, được tạo ra; riêng biệt, tế bào lai được tạo ra bằng cách sử dụng tế bào sản sinh kháng thể, như tế bào B, thu được từ động vật được gây miễn dịch bằng kháng nguyên khác nêu trên; và thực hiện sàng lọc, bằng phương pháp được sử dụng phổ biến, đối với tế bào lai mới thu được bằng cách dung hợp tế bào giữa tế bào lai nêu trên (tế bào lai mới còn được gọi là thể lai cấp hai trong trường hợp sản sinh kháng thể đặc hiệu kép).

Ngoài những đề cập trên đây, ví dụ, trong trường hợp kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng quy trình được mô tả trong mục (1) đến (4) sau:

(1) Kháng thể có cấu trúc $F(ab')_2$ nêu trên, kháng thể này sử dụng vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người làm epitop, được tạo ra;

(2) Trong khi đó, kháng thể có cấu trúc $F(ab')_2$ mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khác cũng được tạo ra theo cách tương tự;

(3) Các kháng thể có cấu trúc $F(ab')_2$ tương ứng thu được trong (1) và (2) được xử lý bằng tác nhân khử, như DTT, và sau đó một trong các sản phẩm được xử lý bất kỳ được xử lý tiếp bằng thuốc thử Ellman; và

(4) Các kháng thể được xử lý có cấu trúc $F(ab')_2$ thu được trong (3) được trộn và được để cho phản ứng với nhau.

Kháng thể đặc hiệu kép còn có thể được tạo ra bằng quy trình được mô tả trong (A) đến (D) sau đây.

(A) Kháng thể sử dụng vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người làm epitop được tạo ra.

(B) Trong khi đó, kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khác được tạo ra theo cách tương tự.

(C) Trình tự axit amin của các vùng biến đổi tương ứng thu được trong (A) và (B) và trình tự bazơ của polypeptit mã hóa vùng biến đổi được nhận dạng.

(D) Vector biểu hiện có polynucleotit được kết hợp có trình tự bazơ tương ứng được nhận dạng trong (C) cùng với, nếu cần, polynucleotit có trình tự bazơ cho vùng hằng định và trình tự cầu nối được tạo ra, và sau đó vector biểu hiện được đưa vào tế bào chủ phù hợp để sản xuất kháng thể, như tế bào CHO.

Phương án khác về kháng thể (I), kháng thể (I) có thể liên kết vào đó xytotoxin (hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào). Xytotoxin không bị giới hạn cụ thể miễn là xytotoxin là hợp chất mà gây ra sự hủy hoại tế bào, như diệt tế bào hoặc ức chế sự sinh trưởng của tế bào.

Ví dụ về các xytotoxin này có thể bao gồm: tác nhân alkyl hóa, như xyclophosphamid hydrat, iphosphamid, thiotepa, busulfan, melphalan, nimustin hydroclorua, ranimustin, dacarbazin, và temozolomit; chất đối kháng kim loại, như metotrexat, pemetrexed natri hydrat, flouxil, doxifluridin, capexitabin, tegafur, xytarabin, gemxitabin hydroclorua, fludarabin phosphat, nelarabin, cladribin, và canxi levofolinat; chất kháng sinh, như doxorubixin hydroclorua, daunorubixin hydroclorua, pirarubixin, epirubixin hydroclorua, idarubixin hydroclorua, aclarubixin hydroclorua, amrubixin hydroclorua, mitoxantron hydroclorua, mitomycin C, actinomycin D, bleomycin hydroclorua, peplomycin hydroclorua, zinostatin stimalame, và calicheamixin; chất ức chế vi ống, như vincristin sulfat, vinblastin sulfat, vindesin sulfat, và paclitaxel; chất ức chế aromataza, như anastrozol, exemestan, letrozol, và fadrozol hydroclorua hydrat; tác nhân platin hóa, như xisplatin, carboplatin, nedaplatin, và oxaliplatin; chất ức chế topoisomeraza, như irinotecan hydroclorua hydrat, nogitecan hydroclorua, etoposid, và sobuzoxan; steroid vỏ thượng thận, như prednisolon và dexametason; thalidomit và dẫn xuất của nó, cụ thể là lenalidomit; bortezomib dùng làm chất ức chế proteaza; và các đồng vị phóng xạ, như 90-Ittri.

Trong số các hợp chất này, calicheamixin, melphalan, vincristine sulfat, doxorubixin hydroclorua, prednisolon, dexametason, thalidomit, lenalidomit, và bortezomib được ưu tiên, và calicheamixin chứng tỏ đặc tính liên kết với kháng thể tuyệt vời được ưu tiên hơn.

Mỗi trong số các xytotoxin này có bán trên thị trường, và một loại hoặc hai hoặc nhiều loại ở dạng kết hợp thích hợp có thể được chọn từ các xytotoxin nêu trên.

Cách thức liên kết giữa xytotoxin và kháng thể nêu trên không bị giới hạn cụ thể, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng liên kết xytotoxin với kháng thể nêu trên bằng cách, ví dụ, chọn phù hợp phương pháp kỹ thuật di truyền được sử dụng phổ biến hoặc kỹ thuật thiết kế protein. Cụ thể hơn là, có thể đưa ra, ví dụ, phương pháp bao gồm liên kết xytotoxin với nhóm chức, như nhóm amino, nhóm thiol, nhóm guanidyl, nhóm hydroxy, hoặc nhóm cacboxyl, của chuỗi bên gốc axit amin của kháng thể (I) thông qua cầu nối.

Kháng thể (I) có thể là kháng thể đa dòng hoặc có thể là kháng thể đơn dòng. Kháng thể (I) ưu tiên là kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ "đơn dòng" có nghĩa là thu được từ quần thể về cơ bản đồng nhất, và "kháng thể đơn dòng" chỉ kháng thể thu được từ quần thể này. Có nghĩa là, được hiểu rằng các kháng thể đơn lẻ được bao gồm trong quần thể này là giống hệt nhau ngoại trừ đột biến xảy ra trong tự nhiên có thể có mặt với lượng rất nhỏ.

Ngoài ra, liên quan đến đích liên kết đặc hiệu (epitop) của kháng thể, ví dụ, trong trường hợp kháng thể (I), epitop có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người. Về vấn đề này, trong trường hợp kháng thể đa dòng, epitop là nhiều vị trí trong vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người, trong khi trong trường hợp kháng thể đơn dòng, epitop là một vị trí duy nhất. Vì lý do này, kháng thể đơn dòng thể hiện tính đặc hiệu cao, và do đó có lợi thế hơn.

Thuật ngữ "đơn dòng" được sử dụng dưới dạng yếu tố cải biến được hiểu là chỉ thu được từ quần thể cơ bản là đồng nhất như mô tả trên đây, và không được hiểu là yếu tố cải biến để định rõ phương pháp sản xuất kháng thể.

Ngoài phương pháp nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng tạo ra kháng thể (I) bằng cách chọn lựa phương pháp lai, phương pháp ADN tái tổ hợp sử dụng tế bào chủ (III) chứa polynucleotit (II) được mô tả dưới đây, phân lập từ thư viện thực khuẩn thể, hoặc tương tự.

Ví dụ, có thể đưa ra phương pháp bao gồm: gây miễn dịch động vật phù hợp để sản xuất kháng thể, như chuột, chuột nhắt, hoặc thỏ, bằng peptit tương ứng với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người; sau đó thu hồi tế bào B và cho tế bào B thu hồi được vào phương pháp lai; và tiến hành sàng lọc bằng cách sử dụng chức năng được thể hiện bằng kháng thể (I) được mô tả trên đây làm chất chỉ thị, nhờ đó tạo ra kháng thể (I).

Ngoài những đề cập trên đây, có thể đưa ra phương pháp bao gồm: tạo ra tế bào biểu hiện integrin β_7 thể khảm trong đó chỉ vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 có nguồn gốc từ người và phần còn lại không có nguồn gốc từ người, như có nguồn gốc từ chuột; gây miễn dịch động vật phù hợp để sản xuất kháng thể, như chuột, chuột nhắt hoặc thỏ (ưu tiên là chuột), bằng tế bào; sau đó thu hồi tế bào B và đưa tế bào B thu hồi được vào phương pháp lai; và tiến hành sàng lọc bằng cách sử dụng chức năng được thể hiện bằng kháng thể (I) được mô tả trên đây làm chất chỉ thị, nhờ đó tạo ra kháng thể (I).

Ví dụ về chức năng được thể hiện bằng kháng thể (I) có thể bao gồm: tăng ái lực cho vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người khi có mặt ít nhất một phần của vùng ở vị trí gốc axit amin 380 đến 721 của integrin β_7 của người; và tăng ái lực thông qua sự hoạt hóa integrin β_7 của người. Do đó, kháng thể (I) có thể thu được bằng phương pháp được thể hiện trong phương pháp sàng lọc (X) được mô tả dưới đây, sử dụng chức năng như vậy.

Epitop cho kháng thể (I) có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người, và do đó kháng thể (I) được mong muốn là thể hiện hoạt tính gây độc tế bào hoặc hoạt tính tương tự trên tế bào biểu hiện integrin β_7 bằng cách kết hợp một hoặc hai hoặc nhiều hoạt tính không chỉ trong số hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC nêu trên, mà còn hoạt tính gây chết tế bào theo chương trình, hoạt tính chặn tín hiệu sống sót, và hoạt tính tương tự trên tế bào này. Do đó, chế phẩm gồm kháng thể (I) hữu dụng làm dược phẩm (VII) như được mô tả chi tiết dưới đây.

Cụ thể là, kháng thể (I) sử dụng vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người làm epitop, và ái lực của kháng thể (I) với epitop được gia

tăng thông qua sự hoạt hóa integrin β_7 . Integrin β_7 dạng hoạt hóa được biểu hiện trong tế bào máu, như tế bào huyết tương, và do đó kháng thể (I) được sử dụng làm thành phần hoạt tính của dược phẩm để điều trị bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư máu). Cụ thể là, kháng thể (I) được sử dụng hiệu quả làm dược phẩm điều trị bệnh gây ra sự bất thường trong tế bào nêu trên (ví dụ, bệnh u tủy hoặc bệnh đa u tủy).

(II) polynucleotit

Polynucleotit (II) là polynucleotit có trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin của kháng thể (I). Thuật ngữ "Polynucleotit" gồm, ví dụ, dạng sợi đơn hoặc dạng sợi đôi trong đó ribonucleotide, deoxyribonucleotide, nucleotit bất kỳ của nó hoặc tương tự được biến đổi phù hợp bằng phương pháp đã biết.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định một cách phù hợp trình tự bazơ của polynucleotit (II), ví dụ, trên máy tính dựa trên trình tự axit amin của kháng thể (I). Loại codon được sử dụng để xác định trình tự bazơ này không bị giới hạn. Trình tự bazơ tốt hơn được xác định khi xem xét tần suất codon của vật chủ trong đó polynucleotit được sử dụng.

Trình tự bazơ cụ thể của polynucleotit (II) không bị giới hạn cụ thể. Sự tương ứng giữa mỗi SEQ ID NO mà trong đó trình tự axit amin được xác định là một phương án của kháng thể (I) đã nêu và SEQ ID NO trong đó trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin này là như nêu trong Bảng 2 dưới đây. Tức là, trình tự bazơ của polynucleotit (II) được ưu tiên là trình tự bazơ nêu trong các SEQ ID NO: 11 đến 20.

Bảng 2

Trình tự axit amin	Trình tự bazơ
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 16

SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 20

Polynucleotit (II) có thể chọn phương án để được kết hợp vào vector. Vector không bị giới hạn cụ thể, và có thể là, ví dụ, vector để tách dòng hoặc vector để biểu hiện, và việc sử dụng nó có mục đích không bị giới hạn.

Ngoài ra, vector để biểu hiện có thể là vector cho tế bào nhân sơ, như *Escherichia coli* hoặc xạ khuẩn, hoặc có thể là vector cho tế bào nhân thật, như tế bào nấm men, tế bào côn trùng, hoặc tế bào động vật có vú.

Trình tự bazơ mã hóa a peptit tín hiệu được bổ sung thích hợp vào đầu cuối 5' của polynucleotit (II) (tương ứng với đầu tận cùng N của kháng thể (I)).

Phương pháp cụ thể để sử dụng polynucleotit (II) không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, polynucleotit (II) có thể được sử dụng để biểu hiện kháng thể (I) bằng cách được đưa vào tế bào chủ (III) sau.

(III) Tế bào chủ

Tế bào chủ (III) là tế bào chứa polynucleotit (II). Thuật ngữ "chứa" chỉ giữ trạng thái trong đó polynucleotit (II) có mặt trong tế bào, và có nghĩa là tế bào ở trạng thái không tự nhiên loại bỏ polynucleotit ra ngoài tế bào bất chấp sự loại bỏ có hoạt động hay không.

Phương án trong đó tế bào chủ (III) chứa polynucleotit (II) không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, polynucleotit có thể được chứa ở dạng vector trong tế bào, hoặc polynucleotit (II) có thể được chứa ở dạng được kết hợp vào bộ gen trong tế bào.

Loại tế bào cụ thể của tế bào chủ (III) có thể là tế bào nhân thật, như tế bào nấm men, tế bào côn trùng, hoặc tế bào động vật có vú, hoặc có thể là tế bào nhân sơ, như *Escherichia coli* hoặc xạ khuẩn, và không bị giới hạn cụ thể.

(IV) Thụ thể của kháng nguyên thể khảm

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm là protein giống thụ thể tế bào T (TCR) nhân tạo, và là protein trong đó vị trí nhận diện kháng nguyên được biểu hiện trên màng tế bào của tế bào T (tương ứng với vùng ngoại bào) được thay thế bằng vị

trí nhận diện kháng nguyên mong muốn và được tạo cấu trúc để có thể biểu hiện hiệu quả hơn chức năng, như hoạt tính gây độc tế bào, của chính tế bào T.

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) là thụ thể của kháng nguyên thể khảm mà epitop của nó giống hệt với epitop của kháng thể (I), và cụ thể hơn là, là protein có vị trí nhận diện kháng nguyên của kháng thể (I). Có nghĩa là, epitop có mặt trong vị trí nhận diện kháng nguyên được bao gồm trong thụ thể của kháng nguyên thể khảm có thể giống như vị trí nhận diện kháng nguyên được mô tả chi tiết trong kháng thể (I).

Cụ thể hơn là, thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) là protein trong đó vị trí nhận diện kháng nguyên của kháng thể (I), trình tự khoảng cách, vùng xuyên màng, yếu tố đồng kích thích, và vùng nội bào TCR được sắp xếp theo thứ tự đã định từ đầu tận cùng amin của thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV).

Vị trí nhận diện kháng nguyên của kháng thể (I) được sắp xếp trong thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) có thể là như được mô tả chi tiết trong kháng thể (I), và ví dụ cụ thể về chúng có thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Trong số đó, vị trí nhận diện kháng nguyên ưu tiên là có cấu trúc của scFv trong khi có vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Trong scFv này, ví dụ, giữa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, trình tự khoảng cách gồm khoảng 10 đến khoảng 25 gốc axit amin có thể được sắp xếp một cách phù hợp. Số lượng gốc axit amin được ưu tiên hơn là từ khoảng 15 đến khoảng 18. Trình tự khoảng cách này có thể là giống với trình tự khoảng cách nêu trên được sắp xếp trong thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV), hoặc có thể là khác trình tự này.

Trình tự khoảng cách được sắp xếp trong thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, trình tự khoảng cách có thể gồm khoảng 10 đến khoảng 25 gốc axit amin. Số lượng gốc axit amin được ưu tiên hơn là từ khoảng 15 đến khoảng 18.

Vùng xuyên màng được sắp xếp trong thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) không bị giới hạn cụ thể. Cụ thể là, vùng xuyên màng của tế bào có nguồn

gốc từ protein, như CD28 hoặc 4-1BB, được biểu hiện trong tế bào T hoặc tương tự có thể được chọn trong khi được cho phép để có một cách phù hợp đột biến được đưa vào đó.

Yếu tố đồng kích thích được sắp xếp trong thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) có thể là yếu tố đồng kích thích của tế bào T hoặc tương tự, và không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, 4-1BB, OX40, CD28, hoặc tương tự có thể được chọn trong khi được cho phép để có một cách phù hợp đột biến được đưa vào đó.

Vùng nội bào TCR được sắp xếp trong thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, vùng nội bào có nguồn gốc từ CD3, còn được gọi là chuỗi TCR ζ , hoặc tương tự có thể được chọn trong khi được cho phép để có một cách phù hợp đột biến được đưa vào đó. Ưu tiên là đột biến được đưa vào CD3 để bao gồm mootip hoạt hóa trên cơ sở thụ thể miễn dịch Tyrosin (ITAM).

Thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) ưu tiên là có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21.

Đột biến có thể được đưa thích hợp vào trình tự axit amin nhận dạng thụ thể nêu trên của kháng nguyên thể khảm. Ngoài ra, đột biến cũng có thể được đưa theo cách tương tự vào mỗi trong số vùng xuyên màng, yếu tố đồng kích thích, và vùng nội bào TCR nêu trên. Số lượng đột biến cụ thể được đưa vào không bị giới hạn cụ thể.

Ví dụ, mức độ tương đồng giữa trình tự axit amin trước khi đưa đột biến vào và an trình tự axit amin after việc đưa đột biến is about 70%, tốt hơn là khoảng 75%, tốt hơn nữa là khoảng 80%, tốt hơn nữa là khoảng 85%, tốt hơn nữa là khoảng 90%, tốt hơn nữa là khoảng 95%, tốt hơn nữa là khoảng 96%, tốt hơn nữa là khoảng 97%, tốt hơn nữa là khoảng 98%, tốt nhất là khoảng 99%. Giá trị số này là giá trị thu được bằng cách làm tròn.

Việc đưa đột biến vào trình tự axit amin nêu trên chỉ việc thay thế, loại bỏ, chèn hoặc tương tự. Việc đưa đột biến vào cụ thể không bị giới hạn cụ thể miễn là việc đưa đột biến vào này có thể đạt được bằng cách làm theo phương pháp

được sử dụng phổ biến. Ví dụ, trong trường hợp thay thế, có thể làm theo phương pháp thay thế bảo toàn.

Để tạo ra thụ thể của kháng nguyên thể khảm, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng tạo ra thụ thể của kháng nguyên thể khảm khi tham khảo phương pháp được mô tả trong, ví dụ, mỗi trong số các tài liệu phi sáng chế 4 đến 6.

(V) Polynucleotit

Polynucleotit (V) là polynucleotit mã hóa trình tự axit amin của thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) không giống polynucleotit (II).

Như trong polynucleotit (II), trình tự bazơ của polynucleotit (V) có thể được xác định phù hợp, ví dụ, trên máy tính dựa trên trình tự axit amin của thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV). Loại codon được sử dụng để xác định trình tự bazơ không bị giới hạn. Trình tự bazơ tốt hơn là được xác định khi xem xét tần suất codon của tế bào dùng làm đích mà polynucleotit được sử dụng.

Trình tự bazơ cụ thể không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, có thể đưa ra polynucleotit có trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 22, trình tự này được xác định dựa trên trình tự axit amin của thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21. Tất nhiên, việc xem xét loại codon được sử dụng không bị giới hạn, không cần phải nói, trình tự bazơ được xác định dựa trên trình tự axit amin này không bị giới hạn bởi trình tự bazơ nêu trong SEQ ID NO: 22.

Trình tự bazơ mã hóa peptit tín hiệu được bổ sung thích hợp vào đầu cuối 5' của polynucleotit (V) (tương ứng với đầu tận cùng N của thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV)).

Phương pháp cụ thể để sử dụng polynucleotit (V) không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, polynucleotit (V) có thể được sử dụng để biểu hiện thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) bằng cách được đưa vào tế bào (VI) sau.

Tế bào (VI)

Tế bào (VI) là tế bào chứa polynucleotit (V) không giống tế bào chủ (III). Thuật ngữ "chứa" có thể tương tự như trong tế bào chủ (III). Loại tế bào cụ

thể cũng có thể là giống như trong tế bào chủ (III), nhưng tế bào (VI) ưu tiên là có hoạt tính gây độc tế bào. Ví dụ về chúng có thể bao gồm tế bào T, tế bào NK, và tế bào K. Trong số đó, tế bào T diệt (đôi khi được gọi là tế bào T gây độc tế bào [CTL]), là loại tế bào T được ưu tiên nhất.

Ưu tiên là, nếu polynucleotit (V), mà mã hóa thụ thể của kháng nguyên thể khảm, được bao gồm trong tế bào (VI) được biểu hiện, vị trí nhận diện kháng nguyên của kháng thể (I) dùng làm bộ thể của thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) được để lộ ra bên ngoài tế bào, và vùng xuyên màng, yếu tố đồng kích thích, hoặc vùng nội bào TCR dùng làm bộ thể của thụ thể của kháng nguyên thể khảm (IV) được đặt trên màng tế bào hoặc bên trong tế bào.

Yếu tố đồng kích thích, hoặc vùng được đặt trên màng tế bào hoặc bên trong tế bào hoạt hóa tín hiệu gây ra hoạt tính gây độc tế bào trong tế bào nếu vị trí nhận diện kháng nguyên của kháng thể (I) liên kết với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người. Ngoài ra, ái lực của kháng thể (I) cho vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người được gia tăng nhờ sự hoạt hóa integrin β_7 của người. Do đó, kháng thể (I) tấn công, hoặc thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên, tế bào hoặc mô biểu hiện integrin β_7 dạng hoạt hóa dùng làm đích.

Nếu tế bào thể hiện chức năng này là tế bào T, tế bào này được gọi là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (VI-4). Giống tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm, tế bào có khả năng thể hiện hoạt tính gây độc tế bào, như tế bào NK, cũng có thể thể hiện tác động tương tự tác động của tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (tế bào này được gọi là tế bào NK thụ thể của kháng nguyên thể khảm) thông qua môi liên hệ giữa liên kết của vị trí nhận diện kháng nguyên với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người dạng hoạt hóa, và sự hoạt hóa tín hiệu mà gây ra hoạt tính gây độc tế bào ở màng tế bào hoặc vùng nội bào.

Như được mô tả trên đây, tế bào (VI) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào và tương tự trên tế bào hoặc mô biểu hiện dạng hoạt hóa integrin β_7 . Do đó, với kháng thể (I), chế phẩm gồm tế bào (VI) có thể được cho là có tác dụng làm dược phẩm

(IV) này như được mô tả chi tiết dưới đây. Dạng integrin β_7 hoạt hóa được biểu hiện trong tế bào máu, như tế bào huyết tương, và do đó tế bào (VI) được dùng làm thành phần hoạt tính của dược phẩm cho bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư máu). Cụ thể là, tế bào (VI) được sử dụng hiệu quả làm dược phẩm cho bệnh gây ra bất thường trong tế bào nêu trên (ví dụ, bệnh u tủy hoặc bệnh đa u tủy).

(VII) Dược phẩm

Dược phẩm (VII) gồm kháng thể (I) hoặc tế bào (VI). Tế bào (VI) ưu tiên là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (VI-4).

Hàm lượng của kháng thể (I) hoặc tế bào (VI) trong dược phẩm (VII) không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, trong trường hợp kháng thể (I), hàm lượng này có thể là từ khoảng 0,001 phần khối lượng đến khoảng 10 phần khối lượng so với 100 phần khối lượng của dược phẩm. Ngoài ra, trong trường hợp tế bào (VI), hàm lượng này có thể là từ khoảng 1 tế bào/mL đến khoảng 10^4 tế bào/mL.

Phương pháp sử dụng dược phẩm (VII) không bị giới hạn cụ thể. Bởi vì thành phần hoạt tính của dược phẩm là kháng thể hoặc tế bào, việc sử dụng qua đường tiêm hoặc sử dụng không qua đường ruột được ưu tiên. Ví dụ về chúng gồm sử dụng trong tĩnh mạch, sử dụng trong cơ, và sử dụng dưới da. Trong số đó, sử dụng trong tĩnh mạch được ưu tiên.

Dạng liều của dược phẩm (VII) có thể được bào chế cùng với chất mang dược dụng và được sử dụng phổ biến tùy thuộc vào phương pháp sử dụng nêu trên. Xem xét phương pháp sử dụng được ưu tiên nêu trên, dạng liều tốt hơn là thuốc tiêm.

Bệnh đích của dược phẩm (VII) không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ cụ thể về bệnh đích là bệnh ung thư, tốt hơn là bệnh ung thư máu, tốt hơn nữa là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương. Thuật ngữ "bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương" chỉ bệnh đặc trưng bởi sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương bất thường và sự tăng protein bất thường được tiết ra từ tế bào này. Ví dụ về bệnh này có thể bao gồm bệnh u tủy, bệnh đa u tủy, bệnh bạch cầu tế bào huyết tương, u tế bào huyết tương, bệnh chuỗi H, và chứng thoái hóa dạng tinh bột AL toàn thân. Theo một phương

án khác, bệnh đích của dược phẩm (VII) có thể là bệnh máu ác tính khác, như bệnh u lympho ác tính hoặc bệnh bạch cầu.

Đích sử dụng (đối tượng) của dược phẩm (VII) có thể là người bệnh đã phát triển bệnh nêu trên, hoặc có thể là động vật có nguy cơ phát triển bệnh nêu trên. Liệu "có nguy cơ phát triển" hay không có thể được xác định bằng phương pháp chẩn đoán (XI) được mô tả sau đây. Động vật có thể là, ví dụ, động vật có vú, và ưu tiên là người.

Liều dùng của dược phẩm (VII) thay đổi tùy thuộc vào các tình trạng khác nhau của đích sử dụng, như mức độ trầm trọng của bệnh, mức độ hiệu quả mong muốn đạt được bằng việc sử dụng này, khối lượng cơ thể, giới tính, độ tuổi và loại động vật, và không thể được xác định một cách không có điều kiện. Ví dụ, nếu thành phần hoạt tính là kháng thể (I), nói chung liều dùng có thể là từ khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ (khối lượng cơ thể) đến khoảng 10 g/kg (khối lượng cơ thể) mỗi ngày. Ngoài ra, nếu thành phần hoạt tính là tế bào (VI), nói chung liều dùng có thể là từ khoảng 10^4 tế bào/kg (khối lượng cơ thể) đến khoảng 10^9 tế bào/kg (khối lượng cơ thể).

Với liều dùng của chế phẩm, phác đồ sử dụng dược phẩm (VII) cũng có thể thay đổi tùy thuộc vào các điều kiện khác nhau của đích sử dụng, như mức độ trầm trọng của bệnh, và không thể được xác định một cách không có điều kiện. Ví dụ, dược phẩm (VII) được ưu tiên sử dụng với liều hàng ngày nêu trên ở tần suất từ một lần mỗi ngày đến một lần mỗi tháng.

(VIII) Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa (VIII) bệnh là phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh gồm bước sử dụng một lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể (I) hoặc tế bào (VI) cho đối tượng. Tế bào (VI) ưu tiên là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (VI-4).

Đối tượng có thể là giống như trong dược phẩm (VII). Nếu đối tượng là người bệnh đã phát triển bệnh, việc sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể (I) hoặc tế bào (VI) được mong muốn là đạt được hiệu quả điều trị trên người bệnh, và nếu đối tượng là động vật có nguy cơ phát triển bệnh, việc sử dụng mong

muốn là đạt được hiệu quả ngăn ngừa bệnh trên động vật. Như được mô tả trong phương pháp chẩn đoán (XI) được mô tả dưới đây, ngăn ngừa có nghĩa là giữ giá trị số đo được bằng phương pháp miễn dịch được sử dụng phổ biến không đạt đến giá trị số mà tại đó được chẩn đoán là bệnh đã phát triển.

Bệnh này có thể là giống như trong dược phẩm (VII), và được minh họa bởi, ví dụ, bệnh ung thư. Ví dụ ưu tiên về bệnh ung thư có thể là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương (ví dụ, bệnh đa u tủy).

Lượng có hiệu quả điều trị có thể là giống như liều dùng của dược phẩm (VII), và dạng bào chế của kháng thể (I) hoặc tế bào (VI) có thể là giống như dạng bào chế của dược phẩm (VII). Ngoài ra, phương pháp sử dụng đối với kháng thể (I) hoặc tế bào (VI), phác đồ sử dụng đối với chúng, và tương tự cũng có thể là như được mô tả chi tiết trong dược phẩm (VII).

Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa (VIII) bệnh có thể bao gồm phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đa u tủy gồm hướng đích dạng hoạt hóa của integrin β_7 của người. Ví dụ về hướng đích có thể là việc dùng kháng thể (I) hoặc tế bào (VI).

(IX) Sử dụng

Sử dụng (IX) là việc sử dụng kháng thể (I) hoặc tế bào (IV), để sản xuất dược phẩm.

Dược phẩm có thể là giống như dược phẩm (VII). Tế bào (IV) ưu tiên là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (VI-4).

Ngoài ra, bệnh đích của dược phẩm cũng tương tự, và dược phẩm được dùng để điều trị, ví dụ, bệnh ung thư, ưu tiên là bệnh ung thư máu, tốt hơn nữa là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương (ví dụ, bệnh u tủy hoặc bệnh đa u tủy).

Ngoài ra, hàm lượng kháng thể (I) hoặc tế bào (VI) dùng làm thành phần hoạt tính trong dược phẩm, dạng bào chế, phương pháp sử dụng, phác đồ sử dụng, và tương tự cũng có thể là giống như những điều được mô tả chi tiết trong dược phẩm (VII).

(X) Phương pháp sàng lọc

Phương pháp sàng lọc (X) là phương pháp sàng lọc thành phần hoạt tính của dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương, gồm bước chọn lọc, tạo ra thư viện hợp chất, hợp chất đích mà liên kết đặc hiệu với integrin β_7 của người và liên kết với vùng ở vị trí gốc axit amin từ 20 đến 109 của integrin β_7 của người.

Dược phẩm có thể là giống như dược phẩm (VII), và ví dụ về thành phần hoạt tính của dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, ưu tiên là bệnh ung thư máu, tốt hơn nữa là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương (ví dụ, bệnh u tủy hoặc bệnh đa u tủy) là kháng thể (I).

Thư viện hợp chất không bị giới hạn cụ thể, và có thể sử dụng thư viện hiện có. Thư viện hợp chất ưu tiên là thư viện kháng thể, và thư viện này ưu tiên là gồm tế bào lai được tạo ra bằng cách sử dụng tế bào sản sinh kháng thể, như tế bào B, thu được từ động vật được gây miễn dịch bằng kháng nguyên mong muốn.

Ở đây, kháng nguyên mong muốn không bị giới hạn cụ thể, và ưu tiên là, ví dụ, vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người. Kháng nguyên mong muốn tốt hơn nữa là integrin β_7 của người dạng hoạt hóa.

Phương pháp chọn lọc hợp chất đề xuất không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, có thể làm theo phương pháp bao gồm: chọn lọc hợp chất đề xuất mà liên kết đặc hiệu với integrin β_7 của người; xác nhận rằng hợp chất đề xuất này liên kết với phân đoạn peptit tương ứng với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 của người, bằng cách sử dụng phương pháp miễn dịch thử nghiệm được sử dụng phổ biến; và chọn lọc hợp chất đề xuất này.

Ngoài ra, có thể làm theo phương pháp bao gồm: chọn lọc hợp chất đề xuất mà liên kết đặc hiệu với integrin β_7 của người; tiếp theo xác nhận hợp chất đề xuất liên kết với tế bào biểu hiện integrin β_7 thể khảm trong đó chỉ vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 là có nguồn gốc từ người và phần còn lại không có nguồn gốc từ người, như có nguồn gốc từ chuột, được mô tả chi tiết trong kháng thể (I), bằng cách sử dụng phương pháp miễn dịch thử nghiệm được sử dụng phổ biến; và chọn lọc hợp chất đề xuất này. Phương pháp bao gồm chọn lọc hợp chất đề xuất này cũng có thể được làm theo.

Ngoài ra, cũng có thể làm theo phương pháp bao gồm: chọn lọc hợp chất đề xuất liên kết đặc hiệu với integrin β_7 của người; ngoài ra xử lý tế bào biểu hiện integrin β_7 thể khảm trong đó chỉ vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 là có nguồn gốc từ người và phần còn lại không có nguồn gốc từ người, như có nguồn gốc từ chuột, được mô tả chi tiết trong kháng thể (I) bằng phorbol este, muối của mangan, hoặc tương tự, và xác nhận hợp chất đề xuất thể hiện mức độ liên kết tăng sau khi xử lý so với trước khi xử lý; và chọn lọc hợp chất đề xuất này.

Ngoài ra, cũng có thể làm theo phương pháp bao gồm: chọn lọc hợp chất đề xuất liên kết đặc hiệu với integrin β_7 của người; ngoài ra tạo ra tế bào biểu hiện thể khảm mà trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 111 đến 378 của integrin β_7 của người được thay thế bằng vùng có nguồn gốc từ chuột được mô tả chi tiết trong kháng thể (I), và thể khảm mà trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 110 đến 721 của integrin β_7 của người được thay thế bằng vùng có nguồn gốc từ chuột; xác định hợp chất đề xuất thể hiện mức độ liên kết cao hơn đối với dạng trước đó; và chọn lọc hợp chất đề xuất này.

Ngoài ra, phương pháp sàng lọc (X) cũng có thể bao gồm bước chọn lọc hợp chất đề xuất bằng cách sử dụng sự có mặt của hoạt tính gây độc tế bào làm chỉ thị. Tế bào cụ thể dùng làm đích mà trên đó hoạt tính gây độc tế bào được xác định không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ về chúng có thể bao gồm tế bào máu biểu hiện integrin β_7 dạng hoạt hóa có nguồn gốc từ người có đặc tính trong vùng PSI của integrin β_7 của người được mô tả trên đây.

Ở đây, nếu hợp chất đề xuất được sàng lọc là kháng thể, bước chọn lọc hợp chất đề xuất bằng cách sử dụng sự có mặt của hoạt tính gây độc tế bào làm chỉ thị có thể là bước chọn lọc kháng thể có hoạt tính ADCC hoặc hoạt tính CDC.

Hợp chất đề xuất được chọn lọc bằng phương pháp sàng lọc (X) như được mô tả trên đây ưu tiên là kháng thể, tốt hơn nữa là kháng thể đơn dòng. Hợp chất đề xuất được chọn lọc ưu tiên nhất là kháng thể (I).

(XI) Phương pháp chẩn đoán

Phương pháp chẩn đoán (XI) là phương pháp chẩn đoán cho bệnh ung thư, và gồm bước cho mẫu thu được từ đối tượng tiếp xúc với kháng thể (I).

Đối tượng này có thể là giống như đối tượng được mô tả chi tiết trong phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa (VIII) bệnh.

Mẫu thu được từ đối tượng có thể là máu hoặc dịch tủy xương.

Phương pháp chẩn đoán cụ thể không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể bao gồm, ví dụ, chẩn đoán đối tượng đã phát triển, hoặc có nguy cơ phát triển, bệnh ung thư nếu phát hiện tế bào liên kết với kháng thể (I).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng xác định mức độ liên kết bằng cách làm theo phương pháp thử nghiệm miễn dịch được sử dụng phổ biến. Bất kỳ đối tượng nào đã phát triển bệnh ung thư và đối tượng nào có nguy cơ phát triển bệnh ung thư có thể được xác định tùy thuộc vào mức độ đo được ở đây.

Chẩn đoán bệnh ung thư cụ thể không bị giới hạn cụ thể, nhưng, ví dụ, đối tượng có thể được chẩn đoán là đã phát triển, hoặc có nguy cơ phát triển, bệnh ung thư máu, tốt hơn nữa là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương (ví dụ, bệnh u tủy hoặc bệnh đa u tủy) nếu tế bào liên kết với kháng thể (I) là tế bào huyết tương.

(XII) Kit

Kit (XII) là kit để chẩn đoán bệnh ung thư, gồm kháng thể (I).

Bệnh ung thư không bị giới hạn cụ thể, và có thể là như được mô tả chi tiết trong được phẩm (VII) nêu trên, và ưu tiên là bệnh ung thư máu, tốt hơn nữa là bệnh gây ra sự sinh trưởng tạo ung thư của tế bào huyết tương (ví dụ, bệnh u tủy hoặc bệnh đa u tủy).

Kit (XII) có thể đi kèm phù hợp với sách hướng dẫn. Trong sách hướng dẫn này, phương pháp được mô tả chi tiết trong phương pháp chẩn đoán (XI) nêu trên có thể được mô tả để làm tiêu chuẩn để chẩn đoán bệnh ung thư.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Bây giờ, các ví dụ để minh họa sáng chế chi tiết hơn sẽ được mô tả. Không cần phải nói, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ được mô tả dưới đây.

Phương pháp thử nghiệm: Đếm tế bào theo dòng chảy và phân loại tế bào

Trong các ví dụ sau đây, đếm tế bào theo dòng chảy (FACS) được sử dụng để chọn lọc tế bào được thực hiện theo cách thức sau.

Tế bào bạch cầu đơn nhân từ tủy xương thu được từ xương chậu của người bệnh u tủy đã có sự đồng ý thông báo được tạo huyền phù trong dung dịch ACK (150 mM NH_4Cl và 10 mM KHCO_3), và toàn bộ huyền phù được để tĩnh ở nhiệt độ 4°C trong 3 phút để loại bỏ tế bào hồng cầu. Tế bào bạch cầu đơn nhân từ tủy xương sau bước loại bỏ được rửa bằng PBS có bổ sung 2% huyết thanh bào thai bò, và sau đó, để ngăn chặn liên kết của kháng thể không đặc hiệu, thực hiện phong bế ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút trong PBS chứa 10% huyết thanh AB của người.

Sau đó, mỗi kháng thể (xem dưới đây) được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang được bổ sung vào đó để tiến hành nhuộm ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Sau đó, tế bào được rửa bằng PBS, và sau đó được tạo huyền phù trong PBS chứa 1 $\mu\text{g/ml}$ propidi iodua (PI), sau đó phân tích FACS. Tiến hành phân tích tế bào và phân loại tế bào bằng cách sử dụng thiết bị FACS Aricell Sorter (được sản xuất bởi Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

Để nhuộm tế bào, kháng thể đơn dòng sau đây được chọn và sử dụng một cách phù hợp.

- Kháng thể kháng CD34 của người được liên hợp với APC (được sản xuất bởi BD Pharmingen)

- Kháng thể kháng CD34 của người được liên hợp với PE-Cy7 (được sản xuất bởi BD Pharmingen)

- Kháng thể kháng CD19 của người được liên hợp với APC/Cy7 (được sản xuất bởi Biolegend)

- Kháng thể kháng CD38 của người được liên hợp với FITC (được sản xuất bởi eBioscience)

- Kháng thể kháng CD138 của người được liên hợp với APC (được sản xuất bởi Biolegend)

·Kháng thể kháng CD3 của người được liên hợp với PE/Cy7 (được sản xuất bởi Biolegend)

·Kháng thể kháng CD14 của người được liên hợp với FITC (được sản xuất bởi BD Pharmingen)

·Kháng thể kháng CD45 của người được liên hợp với PE/Cy7 (được sản xuất bởi Biolegend)

[Ví dụ 1]

Tạo thư viện kháng thể đơn dòng liên kết với dòng tế bào u tủy và không liên kết với máu ngoại vi của người khỏe mạnh

Trong liệu pháp kháng thể chống bệnh đa u tủy, quan trọng là sử dụng kháng thể liên kết với tế bào u tủy nhưng không liên kết với tế bào máu bình thường. Từ góc độ này, kháng thể như vậy được nhận dạng bằng phương pháp sau. Đầu tiên, 10.000 dòng hoặc nhiều hơn kháng thể đơn dòng mà được liên kết với các dòng tế bào u tủy khác nhau được tạo ra bằng phương pháp sau.

Chuột Balb/c được gây miễn dịch ở bàn chân hai lần mỗi tuần trong khoảng thời gian từ 2 tuần đến 3 tuần bằng cách sử dụng sáu loại dòng tế bào u tủy của người (tế bào MM.1s, tế bào RPMI8226, tế bào INA6, tế bào U266, tế bào OPM2, và tế bào KMS12BM) làm kháng nguyên. Sau đó, hạch lympho dưới đầu gối được loại bỏ, và huyền phù tế bào được tạo ra và được đưa vào dung hợp tế bào với dòng tế bào u tủy của chuột SP2/0 để tạo ra tế bào lai. Quá trình dung hợp tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp dùng polyetylen glycol (Phương pháp PEG). Sau đó, tế bào được nuôi cấy trong môi trường hypoxanthin-aminopterin-thymidin (môi trường HAT) để chọn lọc tế bào lai (>10.000 dòng).

Cuối cùng, bằng cách sử dụng dịch nổi nuôi cấy của tế bào lai, dịch nổi gồm kháng thể mà được liên kết với dòng tế bào u tủy được dùng để gây miễn dịch và không liên kết với tế bào bạch cầu đơn nhân có nguồn gốc từ máu ngoại vi của người khỏe mạnh được chọn lọc nhờ sử dụng FACS. Kháng thể đề xuất đặc hiệu cho tế bào u tủy thu được là kết quả của thử nghiệm nêu trên là khoảng 200 dòng, và tế bào lai biểu hiện các kháng thể đề xuất này được sinh trưởng và sau đó được bảo quản lạnh.

[Ví dụ 2]

Nhân dạng kháng thể liên kết đặc hiệu với tế bào u tủy trong tủy xương của người bệnh đa u tủy

Khoảng 200 dòng kháng thể đề xuất thu được trong Ví dụ 1 được mô tả trên đây được sử dụng để nhuộm tế bào tủy xương có nguồn gốc từ bệnh nhân u tủy, sau đó phân tích bằng cách sử dụng FACS.

Mỗi kháng thể đề xuất được bổ sung vào Tế bào tủy xương có nguồn gốc từ người bệnh đa u tủy, và tế bào được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút và sau đó được rửa. Kháng thể kháng IgG của chuột được liên hợp với PE được bổ sung dưới dạng kháng thể thứ cấp, và tế bào được ủ tiếp tục ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Sau khi rửa, cuối cùng, tế bào được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD138 của người được liên hợp với APC, kháng thể kháng CD38 của người được liên hợp với FITC, hoặc kháng thể kháng CD45 của người được liên hợp với PE/Cy7. Làm đối chứng âm, mẫu được bổ sung vào đó đối chứng isotyp thay cho kháng thể đề xuất được chuẩn bị đồng thời.

Phân tích các tế bào này bằng cách sử dụng FACS để chọn lọc kháng thể mà được liên kết với tế bào huyết tương bệnh u tủy $CD45^-CD38^{++}CD138^+$ và tế bào nguyên bản u tủy $CD45^-CD38^{++}CD138^-$, nhưng không liên kết với tế bào máu $CD45^+$.

Kết quả là, kháng thể MMG49 được nhận dạng là kháng thể đáp ứng điều kiện nêu trên (FIG. 1 và FIG. 2). Trong mỗi biểu đồ trên hình vẽ, trục Y biểu thị số lượng tế bào, và trục X biểu thị cường độ liên kết của kháng thể MMG49.

[Ví dụ 3]

Nhân dạng protein kháng nguyên mà kháng thể MMG49 liên kết

Protein kháng nguyên mà kháng thể MMG49 liên kết được nhận dạng bằng phương pháp tách dòng biểu hiện.

Đầu tiên, thư viện cADN được tạo ra từ tế bào MM.1s, mà kháng thể MMG49 được biết là liên kết với, bằng cách sử dụng hệ chọn chỉ số trên để tổng hợp cADN (Invitrogen), và được chèn vào vectơ pMXs của virus retro (được cung cấp bởi giáo sư Toshio Kitamura ở Viện Khoa học y học của Trường Đại học

Tokyo) sử dụng bộ nối BstXI (Invitrogen). Do đó, thư viện cADN được tạo ra được đưa vào tế bào plat-E (được cung cấp bởi giáo sư Toshio Kitamura), và tế bào BaF3 được gây nhiễm bằng virus retro thu được. Do đó, thu được tế bào BaF3 biểu hiện thư viện cADN có nguồn gốc từ MM.1s.

Tiếp theo, tế bào được cô nhiều lần bằng cách nhuộm tế bào với kháng thể MMG49 và phân loại tế bào dương tính bằng FACS (FIG. 3). Sau khi phân loại tế bào lần ba, hầu hết tế bào là tế bào được liên kết với kháng thể MMG49. Sau đó, đoạn chèn của virus retro được mang bởi các tế bào này được khuếch đại bằng PCR, và sau đó được xác định trình tự để nhận dạng trình tự bazơ của nó. Kết quả là, thấy rằng đoạn chèn được mang bởi tế bào là ITGB7.

[Ví dụ 4]

Xác nhận rằng kháng nguyên mà kháng thể MMG49 liên kết với là protein được biểu hiện bởi ITGB7 bằng cách tạo ra tế bào u tủy thiếu hụt ITGB7

Dòng tế bào u tủy U266 thiếu hụt ITGB7 được tạo ra bằng cách sử dụng hệ Crisp-cas9.

Đầu tiên, vector được tạo ra bằng cách chèn trình tự ADN sợi kép dùng làm trình tự đích đặc hiệu với ITGB7 vào vector PX330 (addgene). Vector này được đưa vào cùng với vector biểu hiện gen kháng hygromycin mạch thẳng (Clontech) dùng làm vector để chọn lọc thuốc vào tế bào U266 bằng cách sử dụng Nucleofector (nhãn hiệu) II (Lonza). Sau đó, đối với dòng mà đã sinh trưởng trong môi trường có bổ sung hygromycin, sự biểu hiện ITGB7 được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể FIB27 (kháng thể kháng integrin β_7 ; Biolegend), sau đó phân tích bằng FACS, nhờ đó nhận dạng tế bào thiếu hụt ITGB7.

Tiếp theo, tế bào thiếu hụt ITGB7 thu được được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể MMG49 và được phân tích bằng FACS. Kết quả là, phát hiện ra rằng kháng thể MMG49 liên kết với tế bào U266 kiểu đại, trong khi liên kết của kháng thể MMG49 biến mất hoàn toàn trong chủng thiếu hụt ITGB7 (FIG. 4). Điều này cho thấy rằng MMG49 được liên kết chỉ với protein được biểu hiện bởi ITGB7 (integrin β_7).

Tiếp theo, tiến hành kết tủa miễn dịch từ dịch ly giải của tế bào u tủy MM1s bằng cách sử dụng kháng thể MMG49, sau đó tiến hành SDS-PAGE. Tiếp theo, thực hiện WB bằng cách sử dụng kháng thể kháng integrin β_7 (Miltenyi). Kết quả là, integrin β_7 được phát hiện trong sản phẩm được kết tủa miễn dịch bằng kháng thể MMG49 (FIG. 5). Điều này cho thấy rằng kháng thể MMG49 được liên kết với integrin β_7 .

[Ví dụ 5]

Đo mẫu liên kết của kháng thể MMG49 trong các phân đoạn tế bào của Máu ngoại vi của người khỏe mạnh và Tủy xương của người bệnh u tủy

Bằng cách sử dụng kháng thể kháng integrin β_7 có bán sẵn trên thị trường (FIB27 kháng thể; Biolegend) và kháng thể MMG49, liên kết với các phân đoạn tế bào khác nhau trong máu ngoại vi của người khỏe mạnh và tế bào tủy xương được đo.

Tế bào hồng cầu được loại ra khỏi tế bào máu ngoại vi có nguồn gốc từ người khỏe mạnh bằng cách sử dụng HES40, và sau đó thuốc thử phong bế thụ thể Fc (Miltenyi) được bổ sung để phong bế liên kết của kháng thể không đặc hiệu. Sau đó, kháng thể MMG49 hoặc kháng thể FIB27, hoặc IgG2a của chuột dùng làm đối chứng isotyp được bổ sung, và tế bào được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút và sau đó được rửa. Kháng thể kháng IgG của chuột được liên hợp với PE được bổ sung dưới dạng kháng thể thứ cấp, và tế bào được ủ tiếp tục ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút.

Tế bào thu được được rửa, và sau đó, cuối cùng, được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD19 của người được liên hợp với APC/Cy7, kháng thể kháng CD14 của người được liên hợp với FITC, hoặc kháng thể kháng CD3 của người được liên hợp với PE/Cy7. Tế bào sau khi nhuộm được phân tích bằng cách sử dụng FACS, do đó đo được liên kết của kháng thể MMG49 và kháng thể FIB27 trong mỗi phân đoạn (FIG. 6).

Ngoài ra, 100 μ l PBS (chứa EDTA) có bổ sung 1 μ l máu ngoại vi của người khỏe mạnh được nhuộm theo cách tương tự bằng cách sử dụng kháng thể MMG49 hoặc kháng thể FIB27, và cuối cùng được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể

kháng CD235 của người được liên hợp với xanh hòa bình (BD Pharmingen) hoặc an kháng thể kháng CD41 của người được liên hợp với FITC (BD Pharmingen), và do đó sự có mặt hoặc không có liên kết của từng kháng thể với tế bào hồng cầu CD235⁺ và tiểu cầu cũng được nghiên cứu theo cách tương tự bằng phân tích FACS (FIGS. 6). Các kết quả của thử nghiệm nêu trên cho thấy rằng kháng thể FIB27 liên kết mạnh với nhiều tế bào lympho, trong khi liên kết của kháng thể MMG49 với tế bào máu bình thường nêu trên là cực yếu.

Ngoài ra, để làm sáng tỏ xem liên kết của kháng thể MMG49 với từng phân đoạn tế bào bình thường ngoại trừ tế bào u tủy không có trong tủy xương, tế bào tủy xương của người bệnh u tủy cũng được nhuộm theo cách tương tự bằng cách sử dụng kháng thể MMG49, và cuối cùng được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD34 của người được liên hợp với APC (được sản xuất bởi BD Pharmingen), kháng thể CD3 của người được liên hợp với Alexa647 (được sản xuất bởi BD Pharmingen), kháng thể người kháng CD19 được liên hợp với Cy7APC (được sản xuất bởi BD Pharmingen), kháng thể người kháng CD38 được liên hợp với PE-Cy7 (được sản xuất bởi BD Pharmingen), hoặc kháng thể người kháng CD14 được liên hợp với FITC (được sản xuất bởi BD Pharmingen). Tế bào tủy xương có nguồn gốc từ bệnh nhân u tủy sau khi nhuộm được phân tích bằng cách sử dụng FACS, và do đó liên kết của kháng thể MMG49 trong mỗi phân đoạn được đo (FIG. 7). Các kết quả của thử nghiệm nêu trên cho thấy rằng kháng thể MMG49 liên kết mạnh với tế bào u tủy, nhưng hầu như không liên kết với tất cả tế bào máu bình thường gồm tế bào gốc tạo máu và phân đoạn tế bào nguyên bản.

[Ví dụ 6]

Phân tích liên kết của MMG49 với các dòng tế bào khác nhau

Liên kết của kháng thể MMG49 và kháng thể FIB27 trong các dòng tế bào khác nhau (tế bào MM1s, tế bào U266, tế bào RPMI8226, và tế bào JJN3) được phân tích bằng cách sử dụng FACS. Phương pháp nhuộm là như trong trường hợp máu ngoại vi hoặc tương tự được mô tả trên đây trong Ví dụ 5.

Integrin β_7 được biết là tạo heterodime với integrin α_4 hoặc integrin α_E và được biểu hiện trên bề mặt tế bào. Do đó, sự biểu hiện của nó cũng được phân tích đồng thời bằng cách sử dụng FACS, với kháng thể kháng CD49d của người được liên hợp với Alexa647 (Biolegend) và kháng thể kháng CD103 của người được liên hợp với APC (Biolegend). CD103 biểu thị integrin α_E , và CD49d biểu thị integrin α_4 . Theo cách thức tương tự như trong ví dụ 5 được mô tả trên đây, mức độ biểu hiện của integrin α_E và integrin α_4 trong máu ngoại vi có nguồn gốc từ người khỏe mạnh cũng được nghiên cứu (FIG. 8).

Kết quả là, ITGA4 được biểu hiện ở hầu hết các dòng tế bào u tủy, và ITGAE không được biểu hiện ở dòng tế bào nào. Kháng thể FIB27 được liên kết với tất cả dòng tế bào u tủy, nhưng liên kết của kháng thể MMG49 không trùng khớp với mức độ biểu hiện của kháng thể FIB27. Ngoài ra, liên kết của kháng thể MMG49 hoặc kháng thể FIB27 với tế bào U266 thiếu hụt ITGA4 được tạo ra bằng cách sử dụng hệ Crisp-cas9 được nghiên cứu bằng FACS, và kết quả là, phát hiện ra rằng liên kết của cả hai kháng thể với tế bào U266 không xuất hiện do thiếu ITGA4. Có nghĩa là, phát hiện ra rằng cả hai kháng thể MMG49 và kháng thể FIB27 nhận diện integrin β_7 được biểu hiện là integrin $\alpha_4\beta_7$.

[Ví dụ 7]

Phân tích mối tương quan giữa sự hoạt hóa integrin và liên kết của kháng thể MMG49

Xem xét cách thức liên kết duy nhất của kháng thể MMG49 được mô tả trên đây, được cho rằng kháng thể MMG49 nhận diện integrin β_7 đã được biến đổi trong cấu trúc thông qua sự hoạt hóa.

Từ góc độ nêu trên, tế bào K562 được tạo ra để biểu hiện mạnh $\alpha_4\beta_7$ và tế bào CD4T từ máu ngoại vi bình thường của người được cô bằng cách sử dụng kit làm giàu tế bào CD4T (BD pharmingen) được rửa bằng 5 mM EDTA/HBS, và sau đó được ủ trong 1 mM Ca^{2+} /1 mM Mg^{2+} /HBS (dung dịch đệm cho hoạt tính thấp) hoặc 2 mM Mn^{2+} /HBS (dung dịch đệm hoạt hóa) cùng với kháng thể MMG49 hoặc kháng thể FIB27 ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó rửa. Kháng thể kháng IgG của chuột được liên hợp với PE được bổ sung dưới dạng

kháng thể thứ cấp, và tế bào được ủ tiếp tục ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Tế bào thu được được phân tích bằng cách sử dụng FACS, do đó đo được liên kết của kháng thể MMG49 và kháng thể FIB27 trong tế bào trong đó integrin $\alpha_4\beta_7$ đã được hoạt hóa.

Kết quả là, nhận thấy sự gia tăng liên kết của kháng thể MMG49 khi có mặt Mn^{2+} (FIG. 10). Trong khi đó, không nhận thấy sự thay đổi tương tự đối với kháng thể FIB27. Điều này đề xuất khả năng rằng kháng thể MMG49 là kháng thể đặc hiệu với dạng được hoạt hóa của integrin β_7 .

[Ví dụ 8]

Nhận dạng epitop cần thiết cho sự nhận diện bởi kháng thể MMG49

Để nhận dạng epitop được nhận diện bởi kháng thể MMG49, vector biểu hiện 8 loại protein thể khảm người/chuột integrin β_7 như minh họa trên FIG. 11 được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp PCR gộp chồng.

Mỗi vector biểu hiện được đưa vào tế bào 293T bằng phương pháp chuyển nhiễm dựa trên lipid (lipofection), và 48 giờ sau đó, phân tích sự có mặt hoặc không có mặt liên kết của kháng thể MMG49. Tế bào được tạo huyền phù trong PBS có bổ sung 1% huyết thanh bào thai bò, kháng thể MMG49 được bổ sung, và sau đó toàn bộ huyền phù được để tĩnh ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau khi rửa, bổ sung kháng thể kháng IgG của chuột được liên hợp với Alexa488, và toàn bộ huyền phù được để tĩnh ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó phân tích bằng FACS.

Kết quả là, thấy rằng kháng thể MMG49 liên kết mạnh với protein thể khảm integrin β_7 (#4960) trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 110 đến 721 có nguồn gốc từ chuột và phần còn lại (vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 và vùng ở vị trí gốc axit amin 722 đến 798) có các trình tự có nguồn gốc từ người theo cách gần như tương tự như trong trường hợp protein thể khảm integrin β_7 hoàn toàn có nguồn gốc từ người (#4927) (FIG. 11 đến FIG. 13).

Từ góc độ thực tế rằng vùng ở vị trí gốc axit amin 722 đến 798 gồm vùng xuyên màng (TM) và vùng nội bào (tế bào chất), và rằng vùng ở vị trí gốc axit amin từ 1 đến 19 là peptit tín hiệu, được thấy rằng epitop cần thiết cho liên kết

của kháng thể MMG49 có mặt trong vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 gồm vùng PSI.

Ngoài ra, thấy rằng kháng thể MMG49 có ái lực tăng một chút đối với protein thể khảm integrin β_7 (#4961) trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 110 đến 378 có nguồn gốc từ chuột, và trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 20 đến 109 và vùng có vị trí gốc axit amin 379 đến 798 có nguồn gốc từ người so với protein thể khảm integrin β_7 (#4960), và ái lực tăng đúng bằng mức độ liên kết như trong trường hợp protein thể khảm integrin β_7 hoàn toàn có nguồn gốc từ người (#4927).

Ngoài ra, cũng cho thấy rằng kháng thể MMG49 có khả năng liên kết tăng một chút đối với protein thể khảm integrin β_7 (#4944) trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 nêu trên, thể hiện là gồm epitop của kháng thể MMG49, và vùng ở vị trí gốc axit amin từ 1 đến 378 gồm vùng tương ứng với peptit tín hiệu ở vị trí gốc axit amin 1 đến 19 có nguồn gốc từ chuột, và trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 379 đến 798 có nguồn gốc từ người, và protein thể khảm integrin β_7 (#4945) trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 1 đến 416 có nguồn gốc từ người và vùng ở vị trí gốc axit amin từ 417 đến 798 có nguồn gốc từ người so với protein thể khảm integrin β_7 (#4946) trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 1 đến 563 có nguồn gốc từ chuột và vùng ở vị trí gốc axit amin từ 564 đến 798 có nguồn gốc từ người, và protein thể khảm integrin β_7 (#4947) trong đó vùng ở vị trí gốc axit amin từ 1 đến 721 có nguồn gốc từ chuột và vùng ở vị trí gốc axit amin từ 722 đến 798 có nguồn gốc từ người.

Từ các kết quả thử nghiệm nêu trên, cũng cho thấy rằng ái lực đặc hiệu, có nghĩa là, ái lực của kháng thể MMG49 đối với vùng ở vị trí gốc axit amin 20 đến 109 của integrin β_7 được gia tăng bởi vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 721 của integrin β_7 của người, có nghĩa là, khi có mặt vùng ở vị trí gốc axit amin 379 đến 721 của integrin β_7 của người.

[Ví dụ 9]

Xác định trình tự bazơ của Vùng biến đổi phân tử kháng thể của kháng thể MMG49

Lớp phụ của kháng thể MMG49 được xác nhận bằng cách sử dụng kit xác định Isotyp (Roche), và được xác định là lớp phụ IgG2a. Ngoài ra, trình tự bazơ và trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể MMG49 được xác định.

Phương pháp xác định trình tự được thực hiện bằng cách sử dụng kit khuếch đại Smarter RACE cDNA amplification kit (Clontech). Có nghĩa là, cADN được tạo ra từ mARN có nguồn gốc từ tế bào lai MMG49 sản sinh kháng thể MMG49 được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các phân đoạn cADN của vùng biến đổi của chuỗi H và chuỗi κ bằng phản ứng PCR, và đọc trình tự bazơ của chúng. Trình tự axit amin và trình tự bazơ, và vùng siêu biến (CDR1 đến CDR3) của vùng biến đổi của chuỗi H đọc được được thể hiện trên Bảng 3 và 4 dưới đây.

Trình tự axit amin và trình tự bazơ, và vùng siêu biến (CDR1 đến CDR3) của vùng biến đổi của chuỗi L (chuỗi κ) cũng được thể hiện trên Bảng 3 và 4 dưới đây.

Để xác định tính đặc hiệu của trình tự vùng biến đổi phân lập được của kháng thể MMG49, trình tự AND của vùng biến đổi được liên kết với vùng hằng định của IgG4 của người và trình tự vùng hằng định của chuỗi κ của IgL của người tạo ra kháng thể thể khảm. Cụ thể là, trình tự vùng biến đổi được chèn vào pFuse-CH-Ig-hG4 hoặc pFuse-CL-Ig-hk (invivogen) bằng cách sử dụng kit In-Fusion cloning kit (Takara). Sau đó, sản phẩm được đưa vào tế bào FreeStyle CHO-S cells (Invitrogen), và kháng thể thể khảm được tiết vào dịch nuôi cấy được thu hồi. Tiếp theo, tế bào MM1s mà kháng thể MMG49 liên kết và tế bào KMS12BM mà kháng thể MMG49 liên kết không liên kết được ủ trong dung dịch đệm có bổ sung MMG49-hIgG4, và được rửa. Sau đó, kháng thể kháng IgG của người được biotinyl hóa (Rockland) được bổ sung dưới dạng kháng thể thứ cấp, và tế bào được rửa lần nữa, và sau đó nhuộm bằng cách bổ sung streptavidin-PE (Biolegend), sau đó phân tích FACS. Kết quả là, MMG49-hIgG4 thể hiện mẫu nhuộm tương tự như mẫu nhuộm của kháng thể MMG49 nguyên bản, đề xuất rằng trình tự vùng biến đổi thu được là chính xác (FIG. 14).

[Bảng 3] Trình tự axit amin của MMG49>		
Chuỗi nặng	CDR1 (SEQ ID NO: 1)	GYTFSSYW
	CDR2 (SEQ ID NO: 2)	MLPGSGSS
	CDR3 (SEQ ID NO: 3)	ARGDGNYWYFDV
	Vùng biến đổi (SEQ ID NO: 4)	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAE LMKPGASVKISCKASGYTFSSYWIEWVKQ RPGHGLEWIGEMLPGSGSSNYNEKFKGKA TFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RGDGNYWYFDVWGAG
Chuỗi nhẹ	CDR1 (SEQ ID NO: 6)	SSVGY
	CDR2 (SEQ ID NO: 7)	ATS
	CDR3 (SEQ ID NO: 8)	QQWSSDPPT
	Vùng biến đổi (SEQ ID NO: 9)	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQS PAILSASPGEKVTMTCRASSSVGYMHWFO QKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSE SGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSDP PTFGGGTKLEIK

<Bảng 4: Trình tự bazơ của MMG49>		
Chuỗi nặng	CDR1 (SEQ ID NO: 11)	GGCTACACATTCAGTAGCTACTGG
	CDR2 (SEQ ID NO: 12)	ATGTTACCTGGAAGTGGTAGTTCT
	CDR3 (SEQ ID NO: 13)	GCAAGGGGGGATGGTAACTACTGGTACTTCG ATGTC
	Vùng biến đổi (SEQ ID NO: 14)	ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCC TGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAGGT TCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATG AAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCA AGGCTTCTGGCTACACATTCAGTAGCTACTG GATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAT GGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATGTTACCTG GAAGTGGTAGTTCTAACTACAATGAGAAGTT CAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACA TCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCA GCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA CTGTGCAAGGGGGGATGGTAACTACTGGTAC TTCGATGTCTGGGGCGCAGGG
Chuỗi nhẹ	CDR1 (SEQ ID NO: 16)	TCAAGTGTAGGTTAC
	CDR2 (SEQ ID NO: 17)	GCCACATCC
	CDR3 (SEQ ID NO: 18)	CAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCGACG

	Vùng biến đổi (SEQ ID NO: 19)	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCC TGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCCAG AGGACAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCA ATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCA CAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAGG TTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGA TCCTCCCCCAAACCCTGGATTTATGCCACAT CCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTT CAGTGGCAGTGAGTCTGGGACCTCTTACTCT CTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATG CTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAG TGACCCACCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAG CTGGAAATCAAA
--	-------------------------------------	---

[Ví dụ 10]

Tạo tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm bằng cách sử dụng vùng biến đổi phân tử kháng thể của kháng thể MMG49

Tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm (sau đây gọi là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49) được tạo ra bằng cách sử dụng trình tự vùng biến đổi phân tử kháng thể MMG49 theo quy trình sau với việc tham chiếu đến tài liệu phi sáng chế 2 đến 4 và tương tự.

(1) Tách dòng CD28 và CD3z:

Thu ARN từ tế bào Jurkat bằng cách sử dụng Trizol (Invitrogen), và cADN được tạo ra bằng cách sử dụng kit tổng hợp cADN Superscript III cDNA synthesis kit (Invitrogen). Sau đó, cADN được sử dụng làm khuôn để khuếch đại cADN của CD28 và CD3z bằng PCR, mỗi trong số chúng được tách dòng bằng cách sử dụng kit TA cloning (Invitrogen), và xác định trình tự bazơ của chúng bằng cách giải trình tự.

(2) Liên kết của bốn phân đoạn, tức là, VL/VH và CD28/CD3z có nguồn gốc từ kháng thể MMG49,:

Bằng cách sử dụng phương pháp PCR gộp chồng, các phân đoạn gen tương ứng của vùng VL và vùng VH có nguồn gốc từ kháng thể MMG49, và CD28 và CD3z được tách dòng trên đây được liên kết với nhau để tạo ra cADN thể khảm. Quy trình và đoạn mồi được sử dụng được minh họa trên FIG. 15. Trình tự bazơ của đoạn mồi được sử dụng được thể hiện trên Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Số	Tên đoạn mồi	Trình tự bazơ
23	49_car_vk-s5	gaattccaccatggattttcaagtgcagatt
24	49_car_vk-as6	gccggaaccgctagtgaggagccccgtttgatttcagcttggt
25	593_car_vk_as4	gctgccttctccgctgccagggttgccggaaccgctagtgaggcc
26	49_car_vh-s5	aaacctggcagcggagaaggcagccaggttcagctgcagcagtc
27	49_car_vh-as6	tgaggagacggtgaccgtgg
28	49_VKVH28as8	atacataactcaattgcggccgctgaggagacggtgaccgtgg
29	49carinfus1	ctaggcgccggaattccaccatggatttc
30	tcrcarinfuas4	aatgtcgacctcgagtggctgtagcgag

cADN thể khảm được liên kết được tách dòng bằng cách sử dụng Zeroblunt PCR cloning kit (Invitrogen), và sau đó giải trình tự để xác định trình tự bazơ của nó. Ngoài ra, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 21) được xác định dựa trên trình tự bazơ đã xác định và trình tự bazơ (SEQ ID NO: 22) được thể hiện trong danh mục trình tự. Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21 là trình tự thu được bằng cách chuyển thành trình tự axit amin từ codon khởi đầu (atg) ngay sau trình tự Kozak (gaattccacc) được thể hiện trên đây trong SEQ ID NO: 23, trình tự này đã được loại đi.

(3) Chèn vào vector biểu hiện:

Tiếp theo, cADN thể khảm được liên kết trong (2) được cắt bằng hai enzym giới hạn EcoRI/SalI, và được chèn vào vector MSCV-ires-GFP.

Vector virus retro cADN thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 được tạo ra bằng thử nghiệm trên được đưa vào tế bào 293T cùng với vector biểu hiện vỏ ngoài gag/pol và VSV-G bằng cách sử dụng

lipofectamin 2000 (invitrogen), nhờ đó tạo ra virus retro. Sau 48 giờ từ khi đưa gen vào, thu hồi dịch nổi và sử dụng làm dung dịch virus.

(4) Đưa vài tế bào T:

Tiếp theo, cADN của thụ thể có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 của kháng nguyên thể khảm được đưa vào tế bào T của người như được mô tả dưới đây.

Đầu tiên, tế bào bạch cầu đơn nhân từ máu ngoại vi của người được bổ sung vào đĩa 48 giếng được phủ bằng kháng thể kháng CD3 (eBioscience) và được nuôi cấy trong 72 giờ. X-VIVO15 (Lonza) có bổ sung 10% huyết thanh AB của người và IL-2 (175 IU/L) được dùng làm môi trường nuôi cấy, và tế bào bạch cầu đơn nhân từ máu ngoại vi được kích thích. Sau đó, dung dịch virus được tạo ra trên đây được bổ sung vào đĩa 48 giếng được phủ bởi Retronectin (Takara), và virus được hấp phụ lên Retronectin bằng cách ly tâm ở tốc độ $1.700 \times g$ trong 120 phút. Sau đó, tế bào bạch cầu đơn nhân từ máu ngoại vi (gồm tế bào T) sau khi kích thích được bổ sung, và gen được đưa vào. Sau đó, tiếp tục nuôi cấy trong môi trường nêu trên để khuếch đại tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49, được sử dụng trong nghiên cứu sau. Tế bào T được tạo ra để biểu hiện cấu trúc CAR bằng cách sử dụng vùng biến đổi của kháng thể MMG49 được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể kháng F(ab')₂ của người được liên hợp với PE (Jackson Laboratory), và kết quả là, sự biểu hiện của F(ab')₂ của người được phát hiện tỷ lệ với sự biểu hiện của GFP chỉ ra sự đưa vào của cấu trúc này (FIG. 16). Có nghĩa là, xác nhận rằng CAR được đưa vào được biểu hiện trên bề mặt tế bào.

[Ví dụ 11]

Phân tích sự nhận diện của tế bào khối u biểu hiện ITGB7 bằng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 và hoạt tính gây độc tế bào của nó.

Tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 được tạo ra bằng phương pháp nêu trên hoặc tế bào T đối chứng chỉ có GFP được đưa vào được nuôi cấy đồng thời với tế bào K562 không biểu hiện integrin β_7 hoặc tế bào K562 được tạo ra để biểu hiện mạnh integrin $\alpha_4\beta_7$, và lượng

xytokin được tạo ra được xác định định lượng. Cụ thể là, 1×10^5 mỗi trong số tế bào T và tế bào đích được bổ sung vào đĩa 96 giếng. Sau 24 giờ, thu hồi dịch nổi, và đo lượng sản sinh IFN- γ bằng ELISA. Phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng kit Quantikine (R&D). Kết quả là, chỉ trong nuôi cấy đồng thời tế bào K562 được tạo ra để biểu hiện mạnh integrin $\alpha_4\beta_7$ với tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49, quan sát thấy sự sản sinh IFN- γ và IL2 cao hơn so với trong đối chứng (tế bào T thu được bằng cách nuôi cấy tương tự tế bào bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi được kích thích có vector biểu hiện GFP được đưa vào) (FIG. 17).

Tiếp theo, tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T đối chứng chỉ có GFP được đưa vào được nuôi cấy đồng thời với dòng tế bào u tủy mà kháng thể MMG49 liên kết (tế bào MM.1s, tế bào RPMI8226, và tế bào JJN3) hoặc tế bào mà kháng thể MMG49 không liên kết (KMS12BM, Molt4, và tế bào Raji), và lượng xytokin được tạo ra được xác định định lượng theo cách tương tự. Kết quả là, chỉ khi tế bào MM.1s, tế bào RPMI8226, và tế bào JJN3, là các tế bào mà kháng thể MMG49 liên kết, được nuôi cấy đồng thời với tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49, quan sát thấy sự sản sinh IFN- γ và IL2 cao hơn trong đối chứng (tế bào T thu được bằng cách nuôi cấy tương tự tế bào bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi được kích thích có vector biểu hiện GFP được đưa vào) (FIG. 18 và FIG. 19). Các kết quả thể hiện rằng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 được hoạt hóa bằng cách nhận diện kháng nguyên được nhận diện bởi kháng thể MMG49 (đôi khi được gọi là kháng nguyên MMG49).

Ngoài ra, xem tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 có hủy hoại dòng tế bào u tủy được nghiên cứu bằng thử nghiệm về tính gây độc tế bào ^{51}Cr . Đầu tiên, tế bào K562 không biểu hiện integrin β_7 hoặc tế bào K562 được tạo ra để biểu hiện mạnh integrin $\alpha_4\beta_7$ được dùng làm tế bào đích được nuôi cấy trong môi trường RPMI1640 có bổ sung 10% FCS, và được chuẩn bị sao cho số lượng tế bào là từ $0,5 \times 10^4$ đến $1,0 \times 10^4$.

Lượng thích hợp $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ được bổ sung vào đó và để phản ứng với hợp chất này ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ để đánh dấu tế bào bằng ^{51}Cr , và tế bào thu được được rửa và sau đó được dùng làm tế bào đích. Tế bào đích được trộn với tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 được tạo huyền phù trong môi trường RPMI1640 có bổ sung huyết thanh bào thai bò, và tế bào được nuôi cấy đồng thời trong 4 giờ.

Sau đó, ^{51}Cr được giải phóng vào dịch nổi được đo bằng thiết bị đếm γ . Tỷ lệ phần trăm hủy hoại tế bào (%) được xác định dựa vào sự biểu hiện sau (1).

$$(A-B)/(C-D) \times 100 \quad (1)$$

A: Lượng ^{51}Cr được giải phóng từ tế bào được sử dụng trong thử nghiệm

B: Lượng giải phóng ^{51}Cr tự phát trong tình trạng không có kháng thể

C: Lượng giải phóng ^{51}Cr nhiều nhất có bổ sung 1% Triton X-100

D: Lượng giải phóng ^{51}Cr tự phát trong tình trạng không có kháng thể.

Kết quả là, trong tế bào K562 được tạo ra để biểu hiện mạnh integrin $\alpha_4\beta_7$ mà kháng thể MMG49 liên kết, quan sát thấy sự hủy hoại tế bào cao hơn bởi tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 so với trong tế bào T chỉ biểu hiện GFP dùng làm đối chứng (FIG. 20).

Tiếp theo, tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 hoặc tế bào T đối chứng chỉ có GFP được đưa vào được nuôi cấy đồng thời với dòng tế bào u tủy mà kháng thể MMG49 liên kết (tế bào MM1s, tế bào RPMI8226, và tế bào JJN3) hoặc tế bào mà kháng thể MMG49 không liên kết (KMS12BM, Molt4, và tế bào Raji), và nghiên cứu tương tự được thực hiện. Kết quả là, chỉ trong tế bào K562 được tạo ra để biểu hiện mạnh integrin $\alpha_4\beta_7$ mà kháng thể MMG49 liên kết, quan sát thấy sự hủy hoại tế bào cao hơn gây ra bởi tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 so với trong tế bào T chỉ biểu hiện GFP dùng làm đối chứng (FIG. 21).

Kết quả nêu trên thể hiện rằng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 có thể hủy hoại đặc biệt là tế bào biểu hiện kháng nguyên được nhận diện bởi kháng thể MMG49.

[Ví dụ 12]

Phân tích khả năng loại bỏ tế bào u tủy được thể hiện bởi tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 in vivo

Hiệu quả điều trị bệnh trên bệnh đa u tủy được nghiên cứu in vivo nhờ sử dụng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49.

Dòng tế bào u tủy tế bào MM1s (4×10^5 tế bào) được ghép vào tủy xương của chuột NOG được đưa vào chiếu xạ ở cường độ 2,4 Gy. Sau 5 ngày, các con chuột được chia nhóm thành nhóm sử dụng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 và nhóm đối chứng sử dụng tế bào T, và mỗi nhóm được sử dụng theo đường trong tĩnh mạch liều 5×10^6 tế bào mỗi con chuột. Sau 7 ngày từ khi sử dụng, tủy xương được phân tích. Kết quả là, nhận thấy rõ ràng sự sinh trưởng đáng kể của tế bào u tủy trong tất cả các con chuột của nhóm đối chứng sử dụng tế bào T, trong khi khối u gần như biến mất hoàn toàn trong nhóm sử dụng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49. Các kết quả thể hiện rằng việc sử dụng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 có khả năng loại bỏ khối u biểu hiện kháng nguyên MMG49 ngay cả trong điều kiện in vivo (FIG. 22).

Ngoài ra, hiệu quả điều trị bệnh trên bệnh đa u tủy được nghiên cứu in vivo bằng cách sử dụng mô hình được gây bệnh u tủy toàn thân.

Dòng tế bào u tủy tế bào MM1s (5×10^6 tế bào) có gen luxiferaza được đưa vào được ghép theo đường trong tĩnh mạch vào chuột NOG được đưa vào chiếu xạ ở cường độ 2,4 Gy. Sau 5 ngày từ khi ghép, mức độ ghéo của tế bào khối u được đo bằng cách sử dụng hệ chụp ảnh IVIS (PerkinElmer). Sau đó, các con chuột được chia nhóm thành nhóm sử dụng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 và nhóm đối chứng sử dụng tế bào T, và mỗi nhóm được sử dụng theo đường trong tĩnh mạch liều 3×10^6 tế bào cho mỗi con chuột sau khi ghép 5 ngày và 7 ngày. Sau 7 ngày từ khi sử dụng tế bào T lần hai, đo thể tích khối u lại bằng cách sử dụng hệ chụp ảnh IVIS. Kết quả là, nhận thấy rõ ràng sự sinh trưởng đáng kể của tế bào u tủy trong tất cả các con chuột của

nhóm đối chứng sử dụng tế bào T, trong khi khối u gần như biến mất hoàn toàn trong nhóm sử dụng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 (FIG. 23). Các kết quả thể hiện rằng việc sử dụng tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm có nguồn gốc từ kháng thể MMG49 có khả năng loại bỏ khối u biểu hiện kháng nguyên MMG49 ngay cả trong điều kiện *in vivo*.

[Ví dụ 13]

Đối với epitop của kháng thể MMG49, thử nghiệm để nghiên cứu, chi tiết hơn, các kết quả của nghiên cứu trong Ví dụ 8 được thực hiện. Vector để biểu hiện ba loại protein thể khảm người/chuột integrin β_7 như minh họa trên FIG. 25 được tạo ra, và mỗi trong số các vector biểu hiện được đưa vào tế bào 293T bằng phương pháp lipofection. Sau 48 giờ, sự có mặt hoặc không có mặt liên kết của kháng thể MMG49 được phân tích bằng FACS.

Kết quả là, thấy rằng kháng thể MMG49 liên kết mạnh với protein thể khảm integrin β_7 (ch5.1 trên FIG. 25) trong đó các vùng ở vị trí gốc axit amin 1 đến 32 và vị trí 91 đến 798 của protein integrin β_7 có nguồn gốc từ chuột, và phần còn lại (vùng ở vị trí gốc axit amin 33 đến 90) có trình tự có nguồn gốc từ người theo cách gần như tương tự như trong trường hợp của protein integrin β_7 hoàn toàn có nguồn gốc từ người (#4927 trên FIG. 11) (FIG. 25).

Do đó, đề xuất mạnh mẽ rằng epitop của kháng thể MMG49 được bao gồm trong gốc axit amin ở vị trí 33 đến 90 của protein integrin β_7 của người.

[Ví dụ 14]

Vector biểu hiện integrin β_7 của người, integrin β_7 của chuột, và các biến thể khác nhau thu được bằng cách gây đột biến chỉ một hoặc hai axit amin của integrin β_7 của người thành trình tự axit amin có nguồn gốc từ chuột (R35E/N36D, H38D, M41L/L42Q, và A48V) được đưa vào tế bào 293T bằng phương pháp lipofection, và tiến hành thử nghiệm theo cách tương tự như trong Ví dụ 8. Kết quả là, như được thể hiện trên FIG. 26, thấy rằng chỉ có biến thể A48V có ái lực giảm đáng kể đối với kháng thể MMG49 so với integrin β_7 của người, và có giá trị số gần với giá trị cố của integrin β_7 của chuột. Các kết quả này chứng tỏ rằng gốc axit

amin ở vị trí 48 của integrin β_7 của người có liên quan mật thiết đến epitop của kháng thể MMG49, hoặc được bao gồm trong epitop của kháng thể MMG49.

Trình tự bazơ và trình tự axit amin được mô tả ở đây được thể hiện dưới đây.

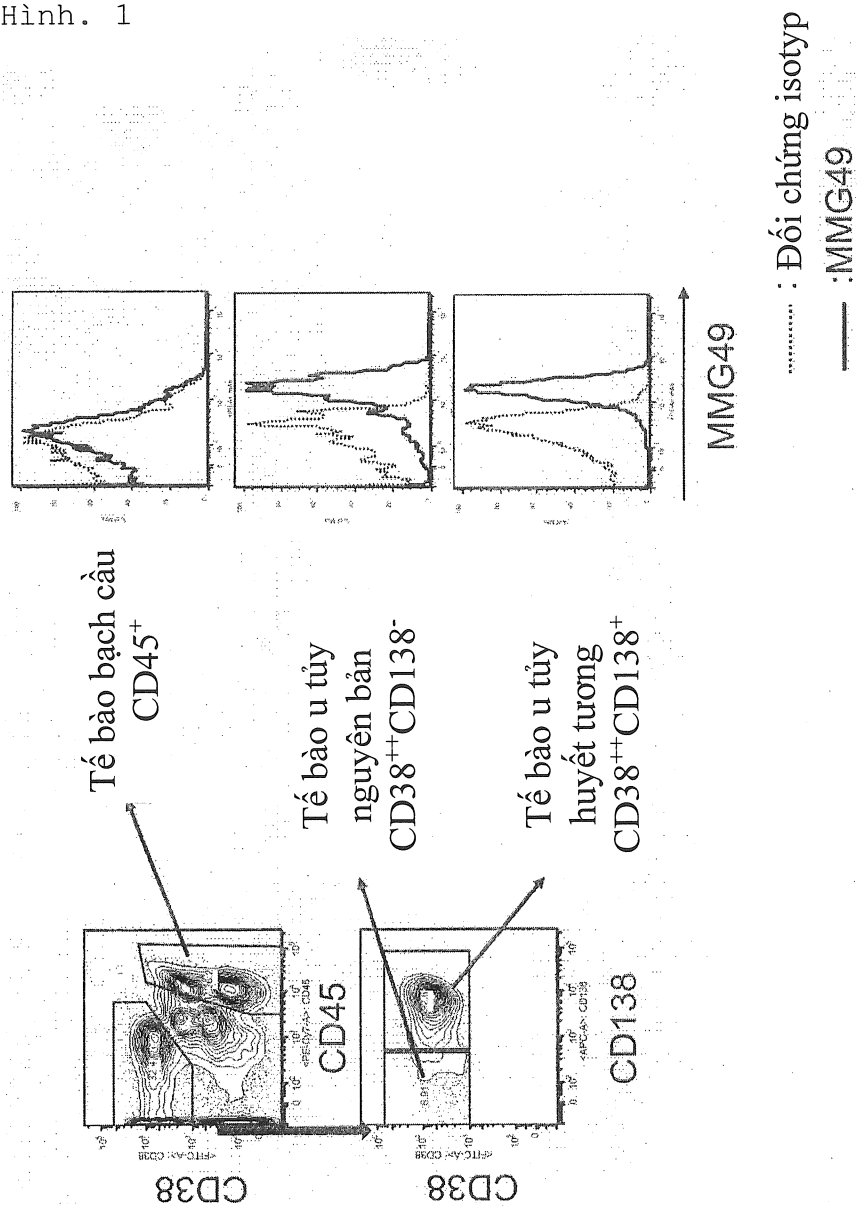
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng integrin β_7 của người, trong đó kháng thể này gồm:
vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm
CDR1 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1,
CDR2 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và
CDR3 của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; và
vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm
CDR1 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6,
CDR2 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7, và
CDR3 của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gồm:
vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;
và
vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.
3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu.
4. Thụ thể của kháng nguyên thể khảm, gồm vị trí nhận diện kháng nguyên của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
5. Tế bào mà biểu hiện thụ thể của kháng nguyên thể khảm theo điểm 4.
6. Polynucleotit mà mã hóa thụ thể của kháng nguyên thể khảm theo điểm 4.
7. Vector chứa polynucleotit theo điểm 6.
8. Tế bào, trong đó tế bào này chứa polynucleotit theo điểm 6 hoặc vector theo điểm 7.
9. Tế bào theo điểm 8, trong đó tế bào này là tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm hoặc tế bào NK.

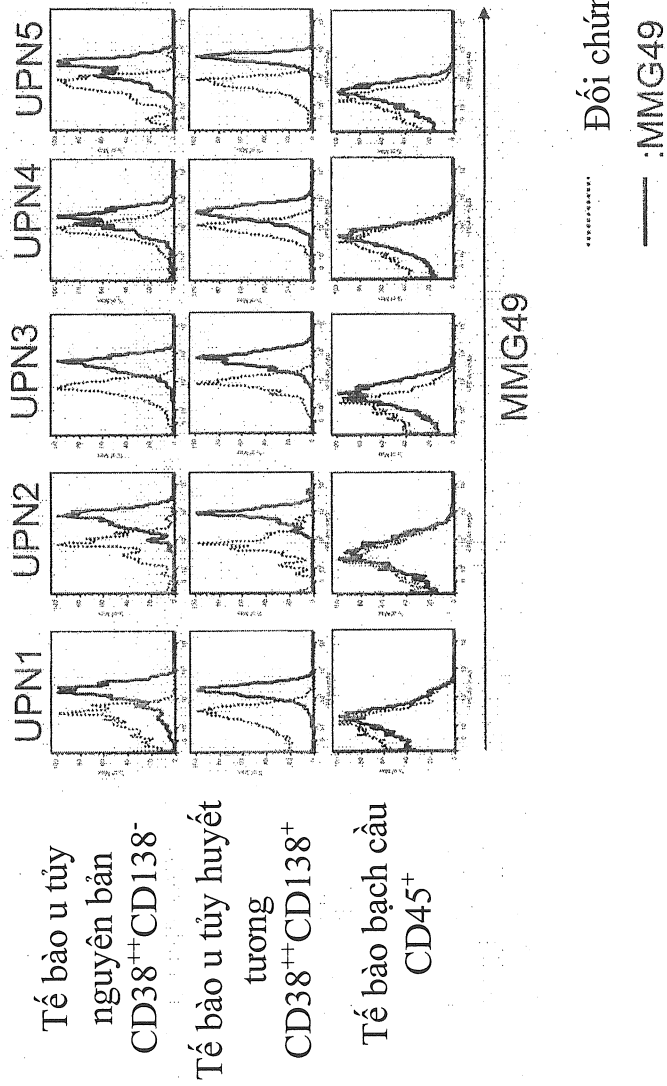
10. Dược phẩm để điều trị bệnh đa u tủy, trong đó dược phẩm này chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

11. Dược phẩm để điều trị bệnh đa u tủy, trong đó dược phẩm này chứa tế bào T thụ thể của kháng nguyên thể khảm hoặc tế bào NK theo điểm 9.

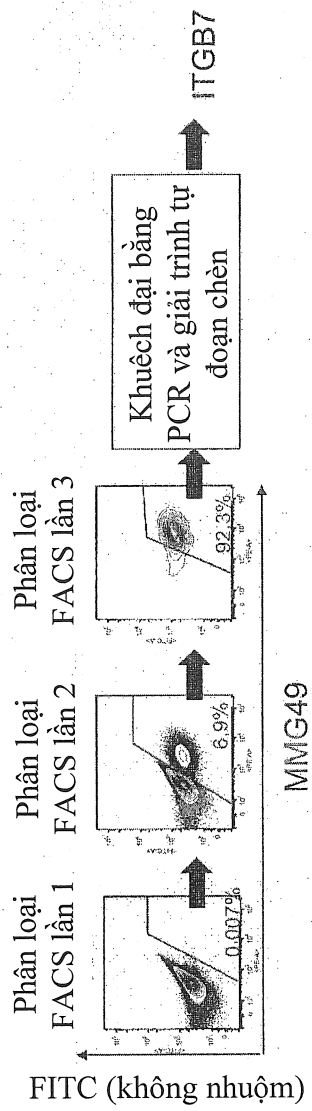
Hình. 1



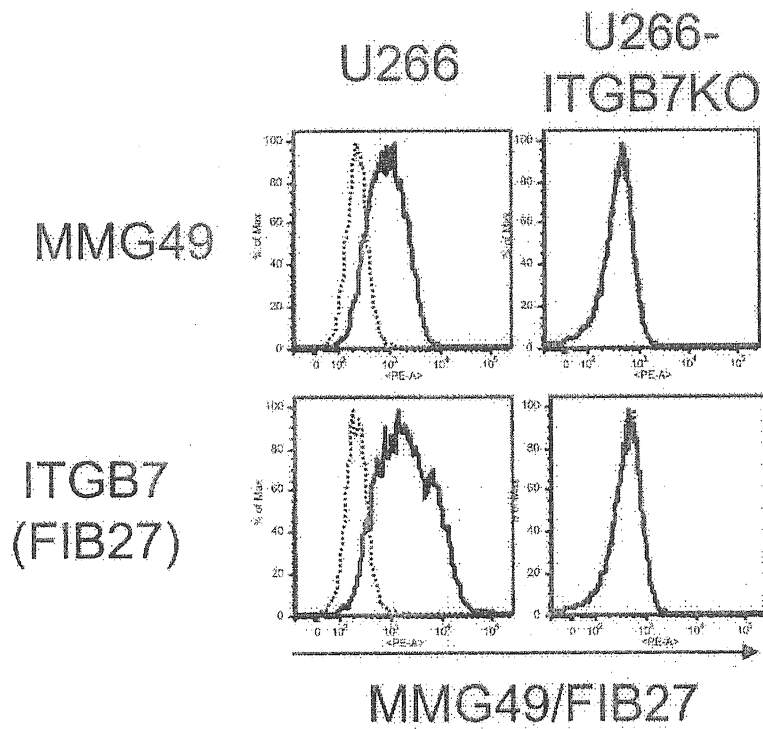
Hình. 2



Hình. 3

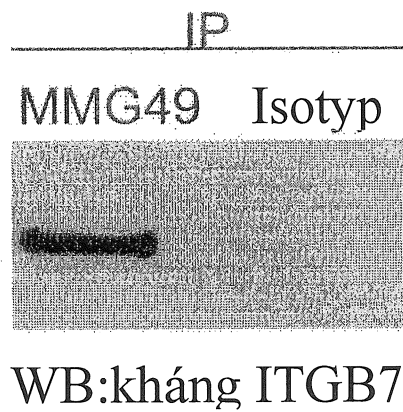


Hình. 4

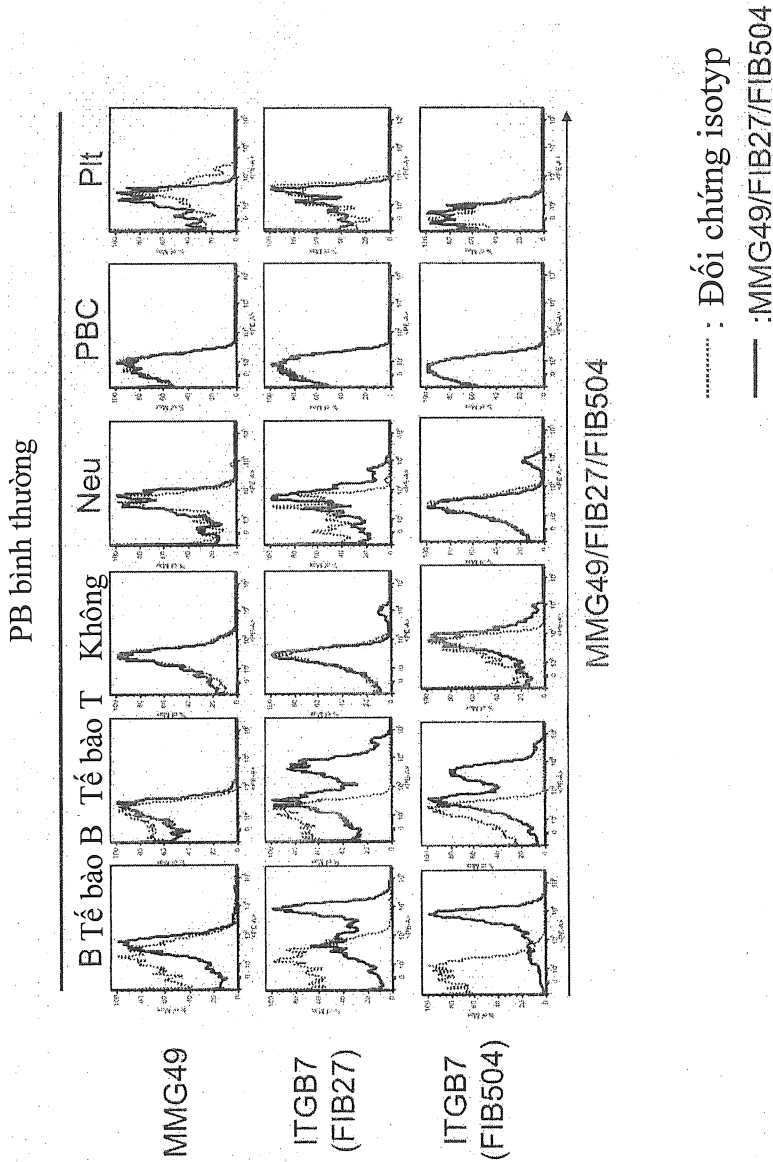


..... :Đối chứng isotyp
 ——— :MMG49

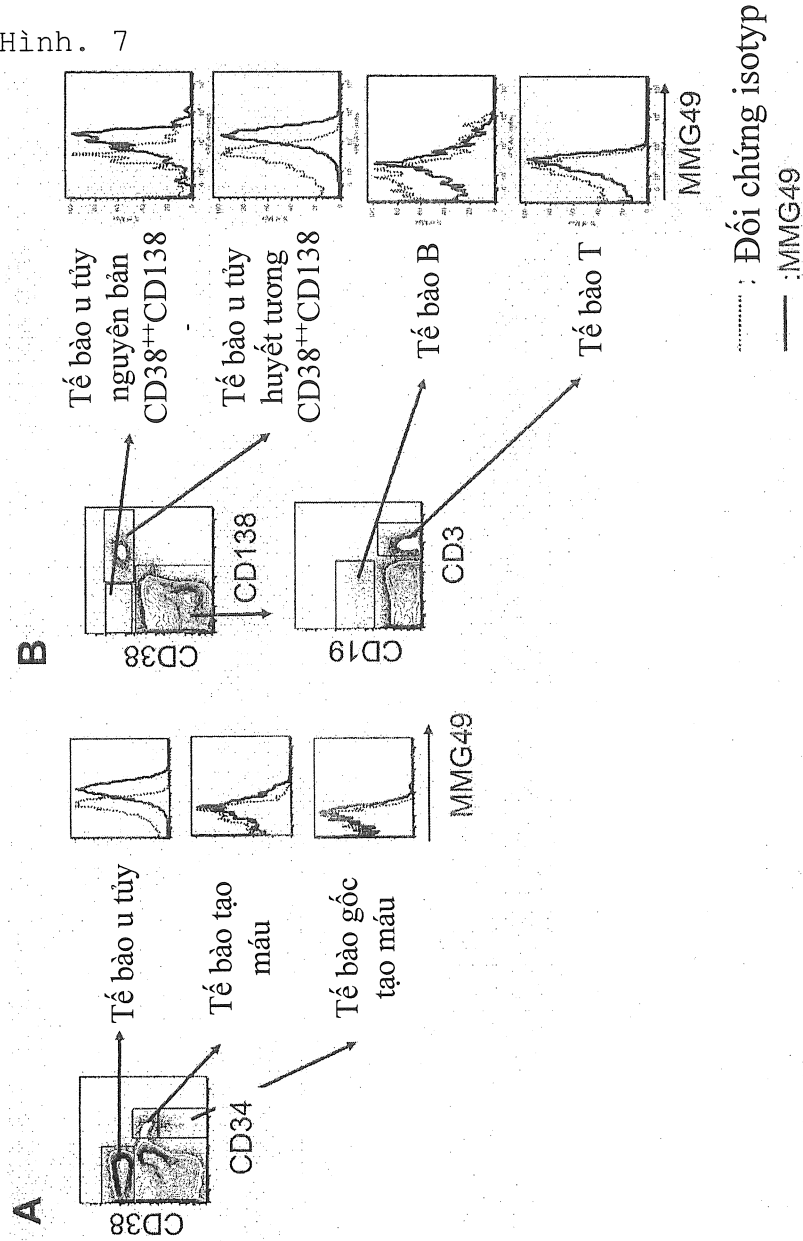
Hình. 5



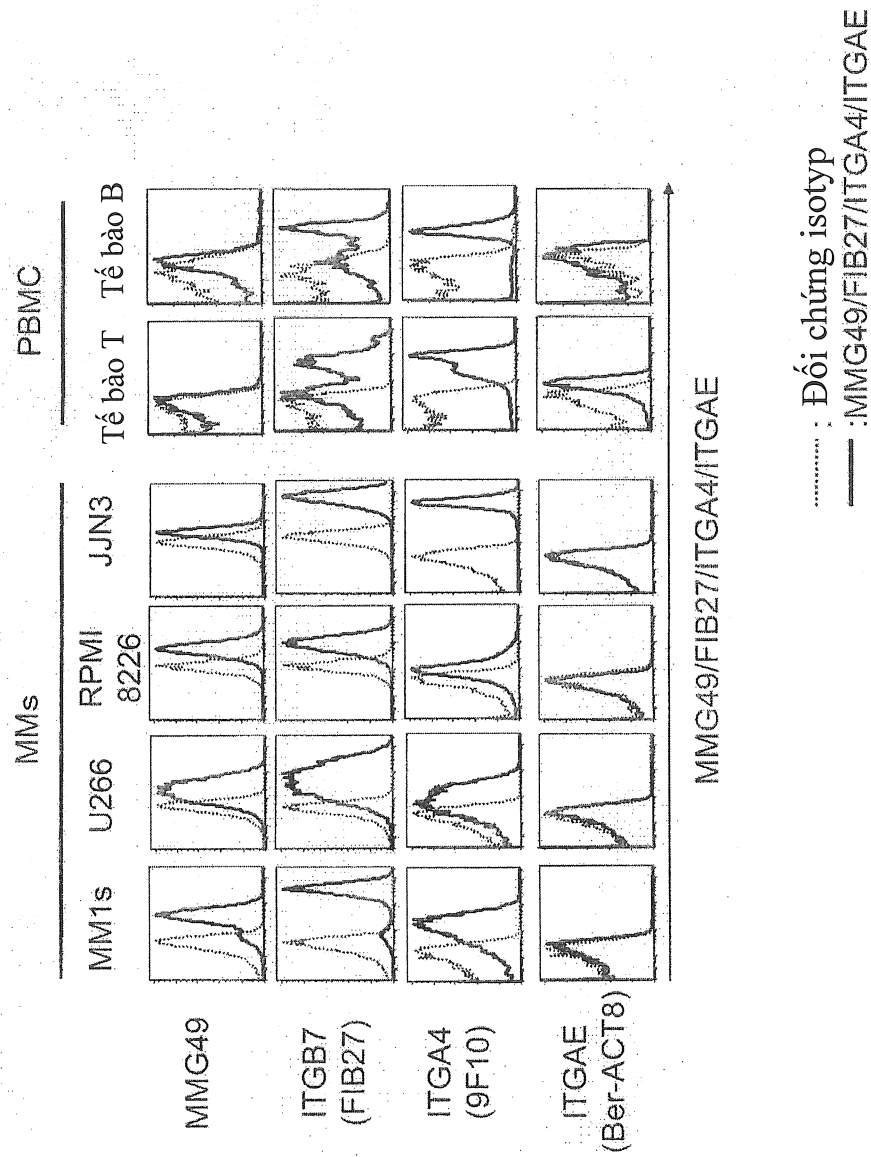
Hình.6



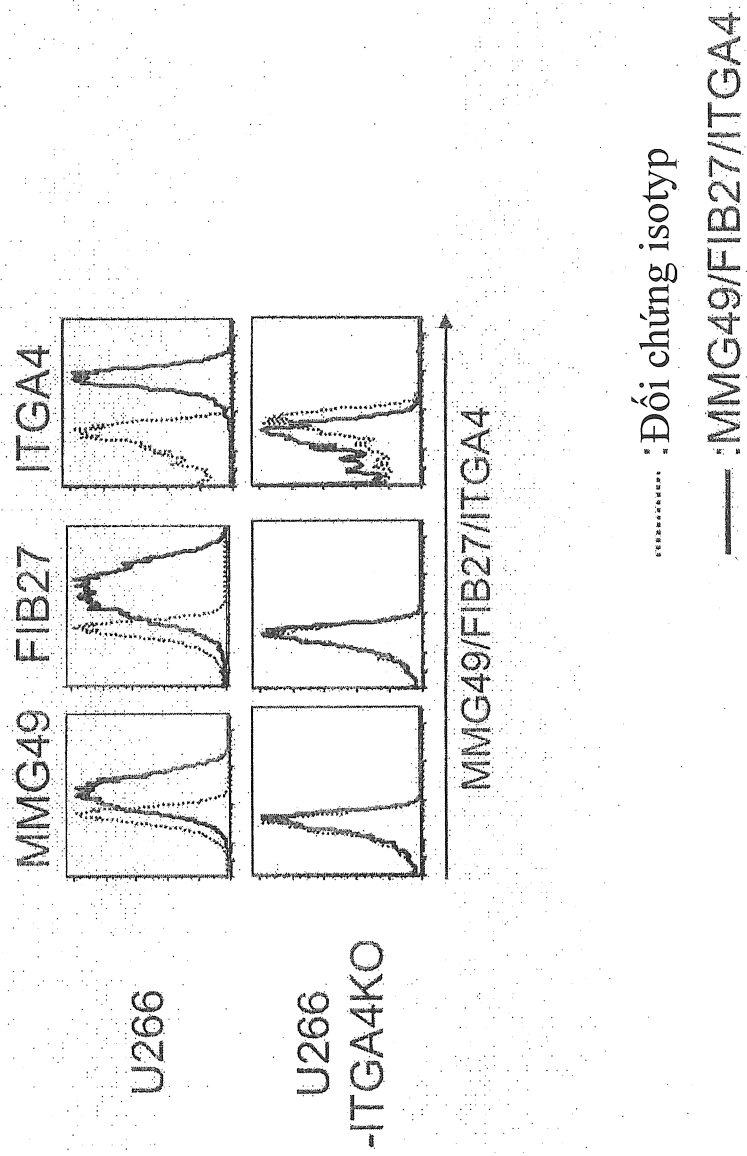
Hình. 7



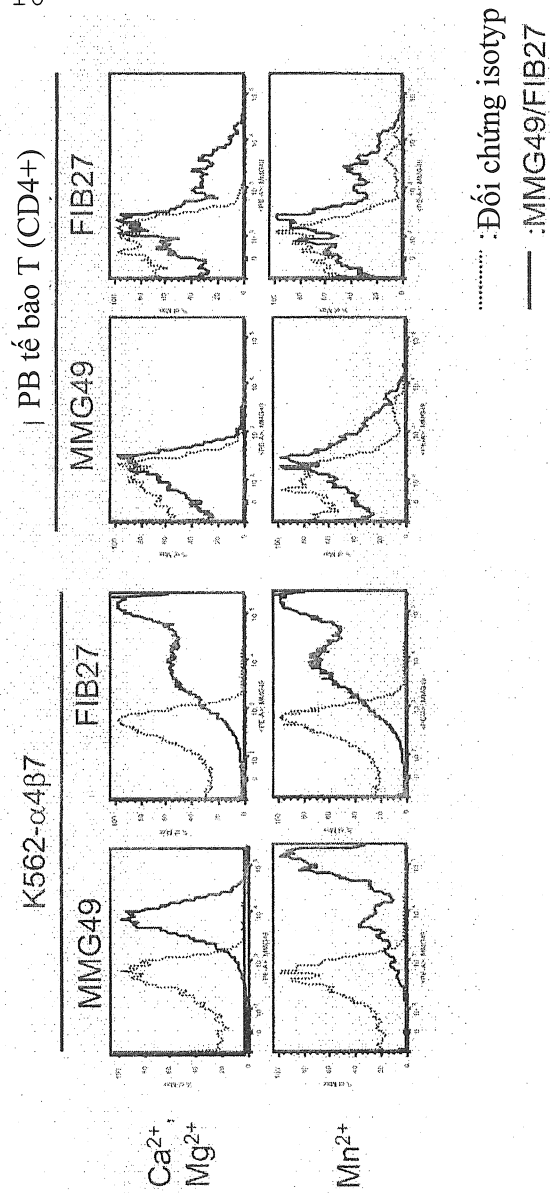
Hình. 8



Hình. 9

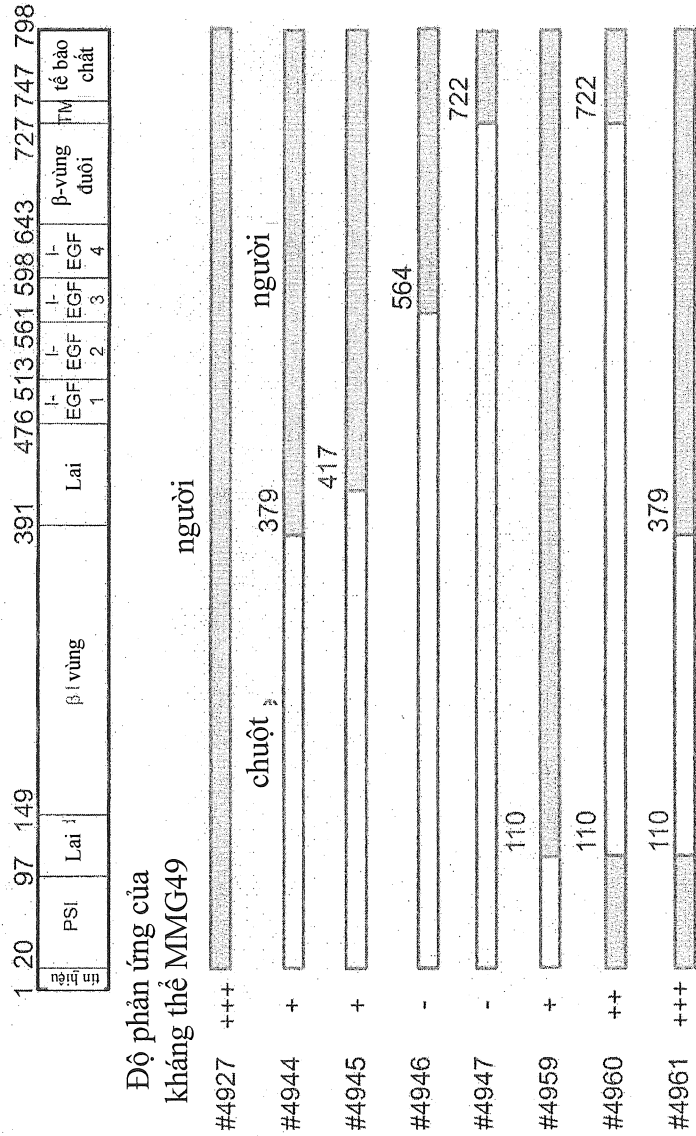


Hình. 10

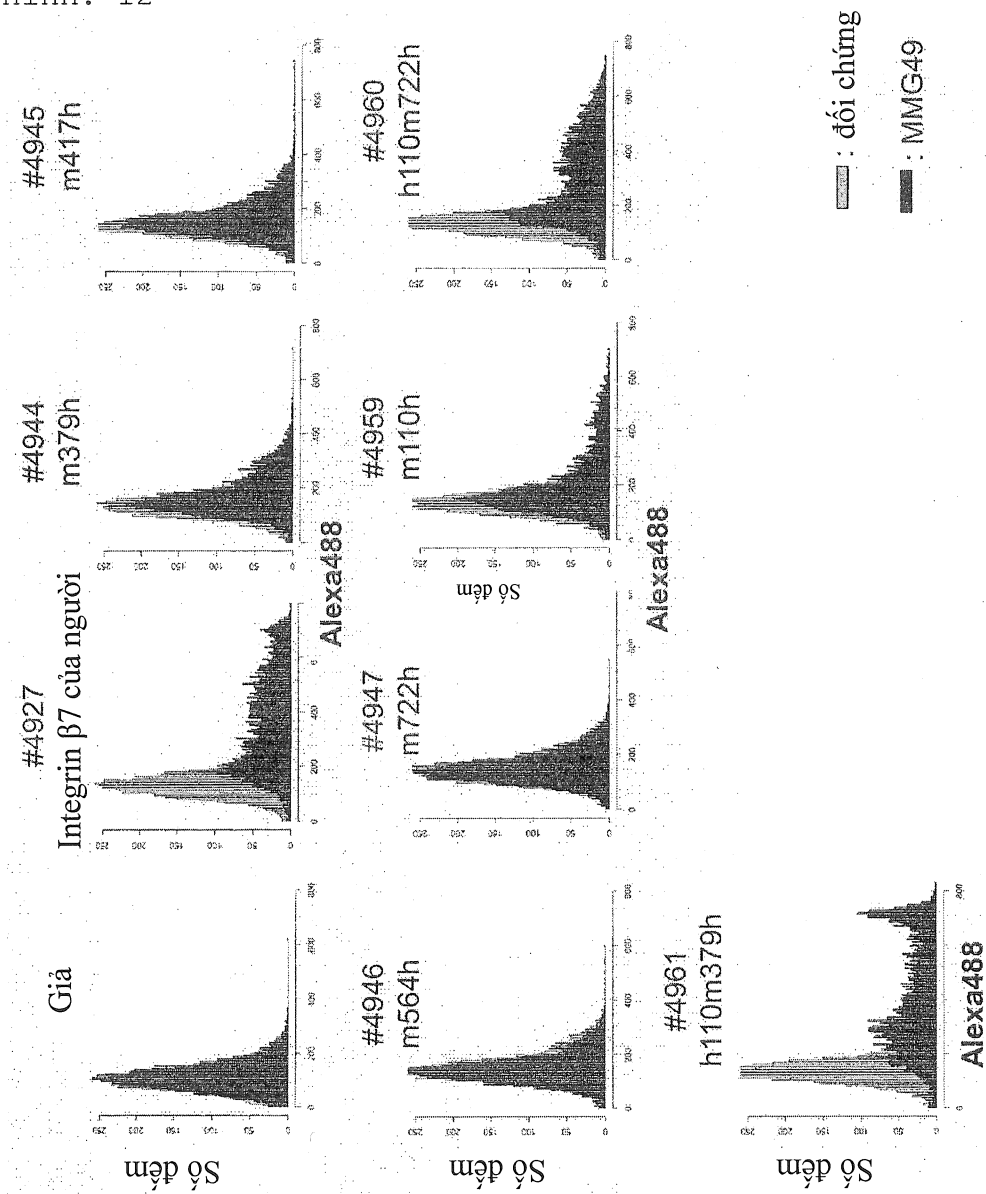


Hình. 11

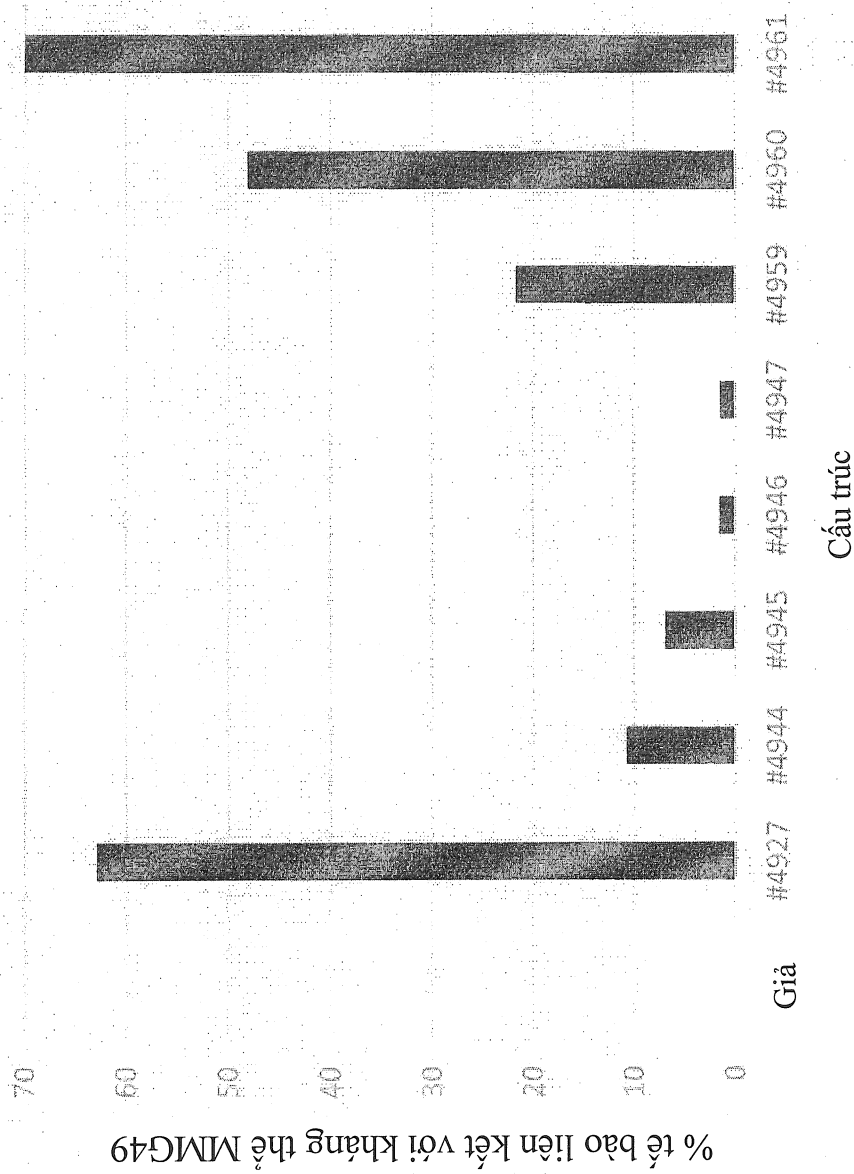
Integrin $\beta 7$



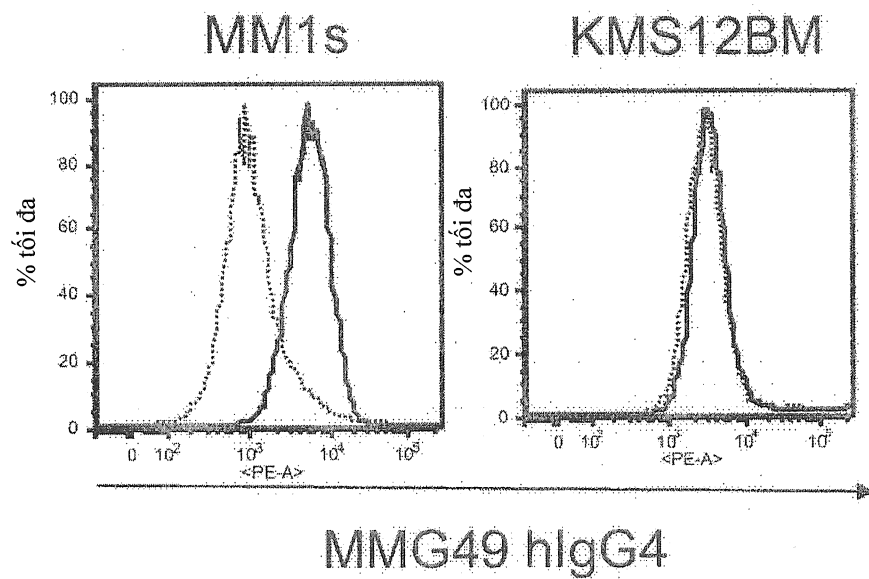
Hình. 12



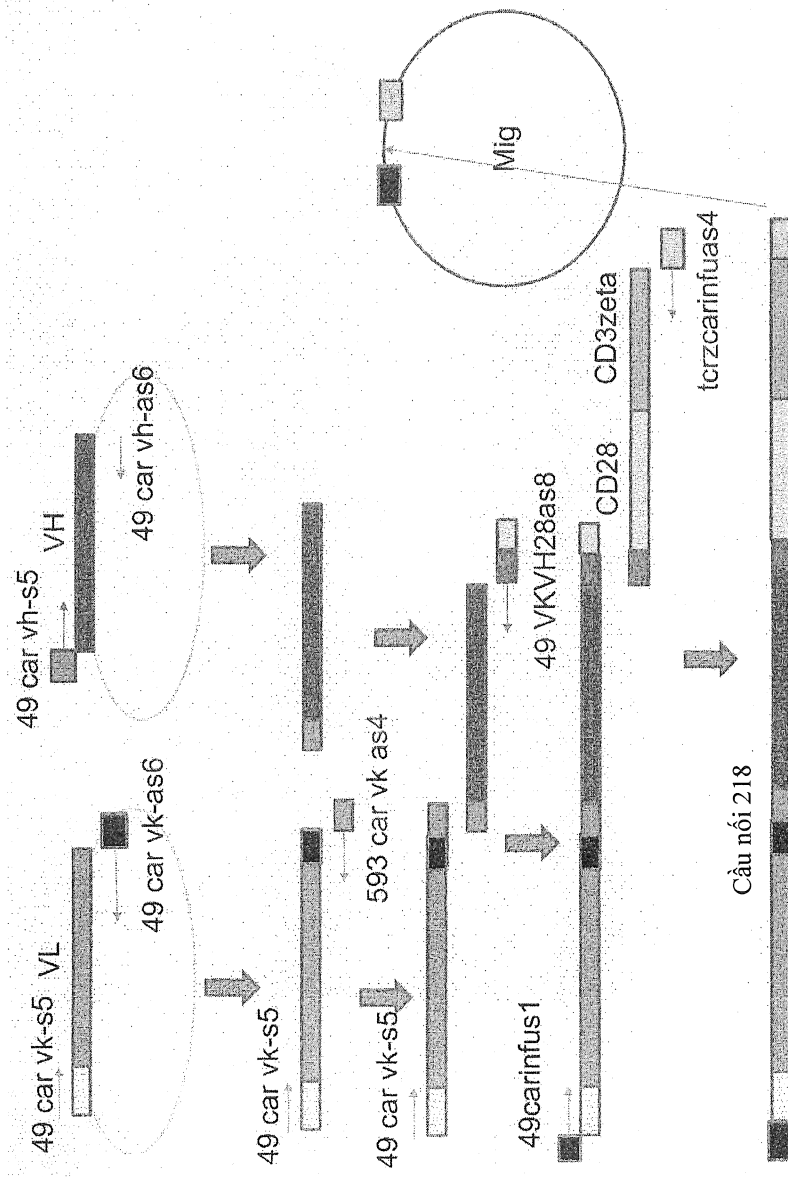
Hình. 13



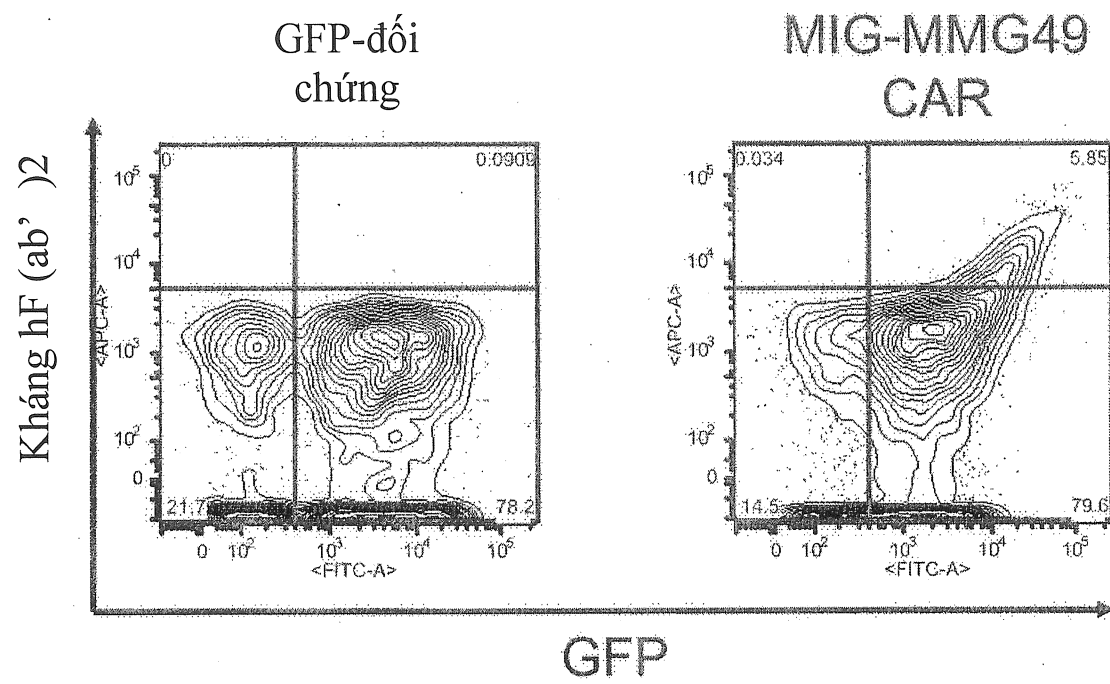
Hình. 14



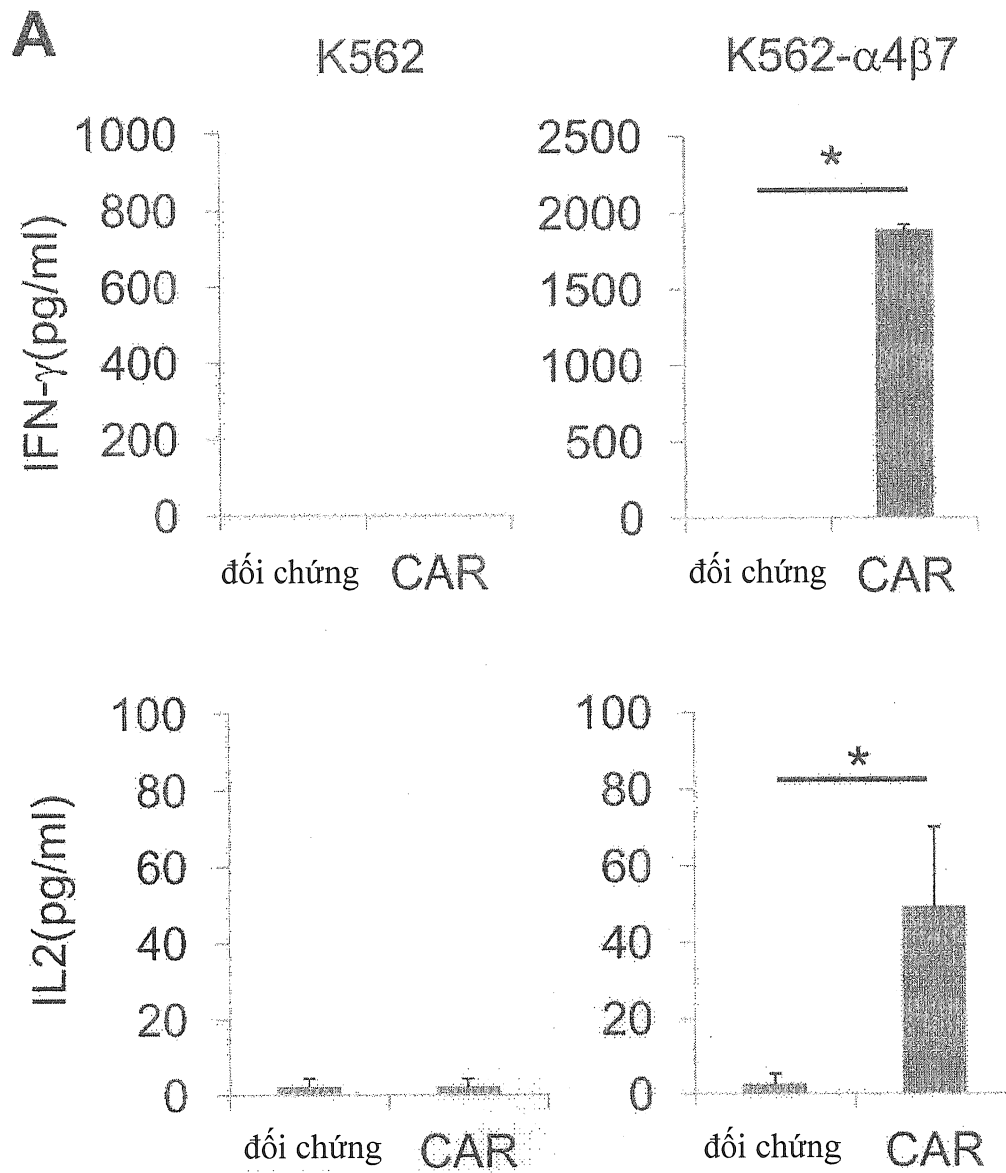
Hình. 15



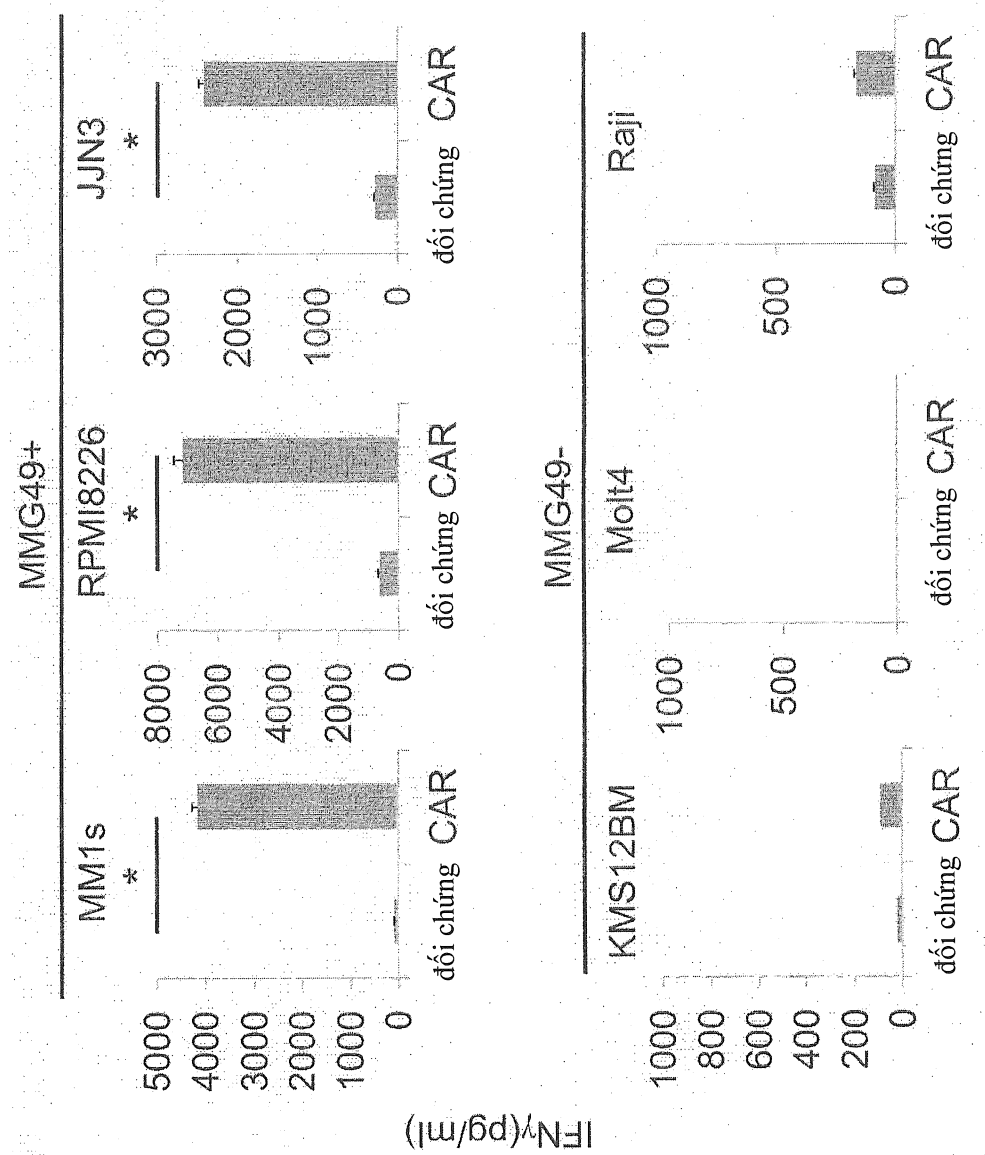
Hình. 16



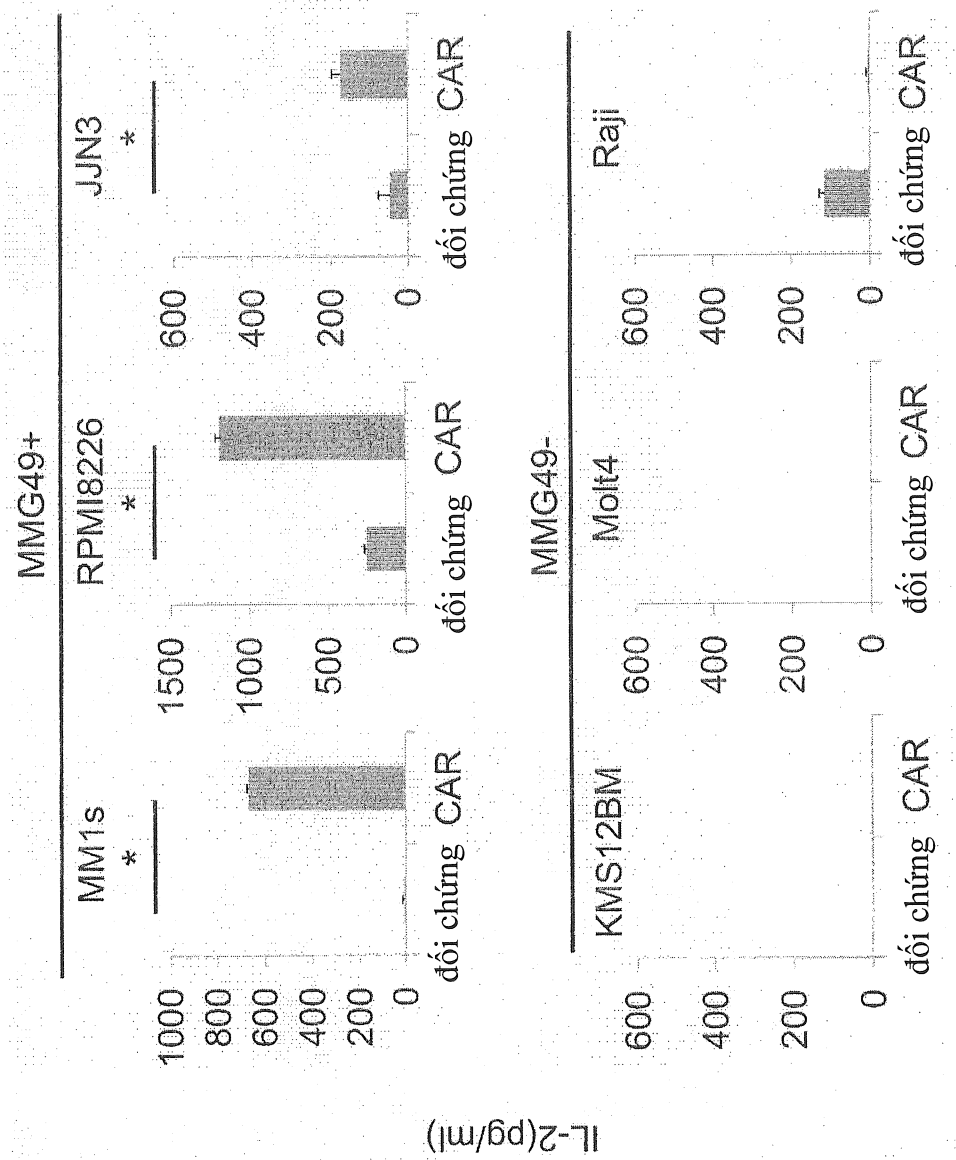
Hình. 17



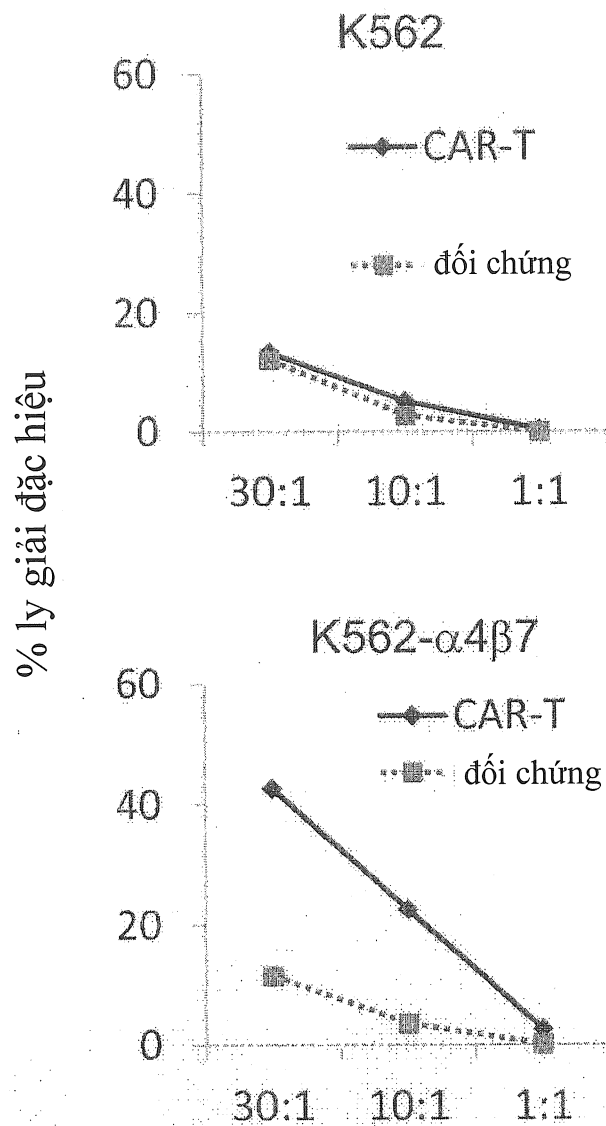
Hình. 18



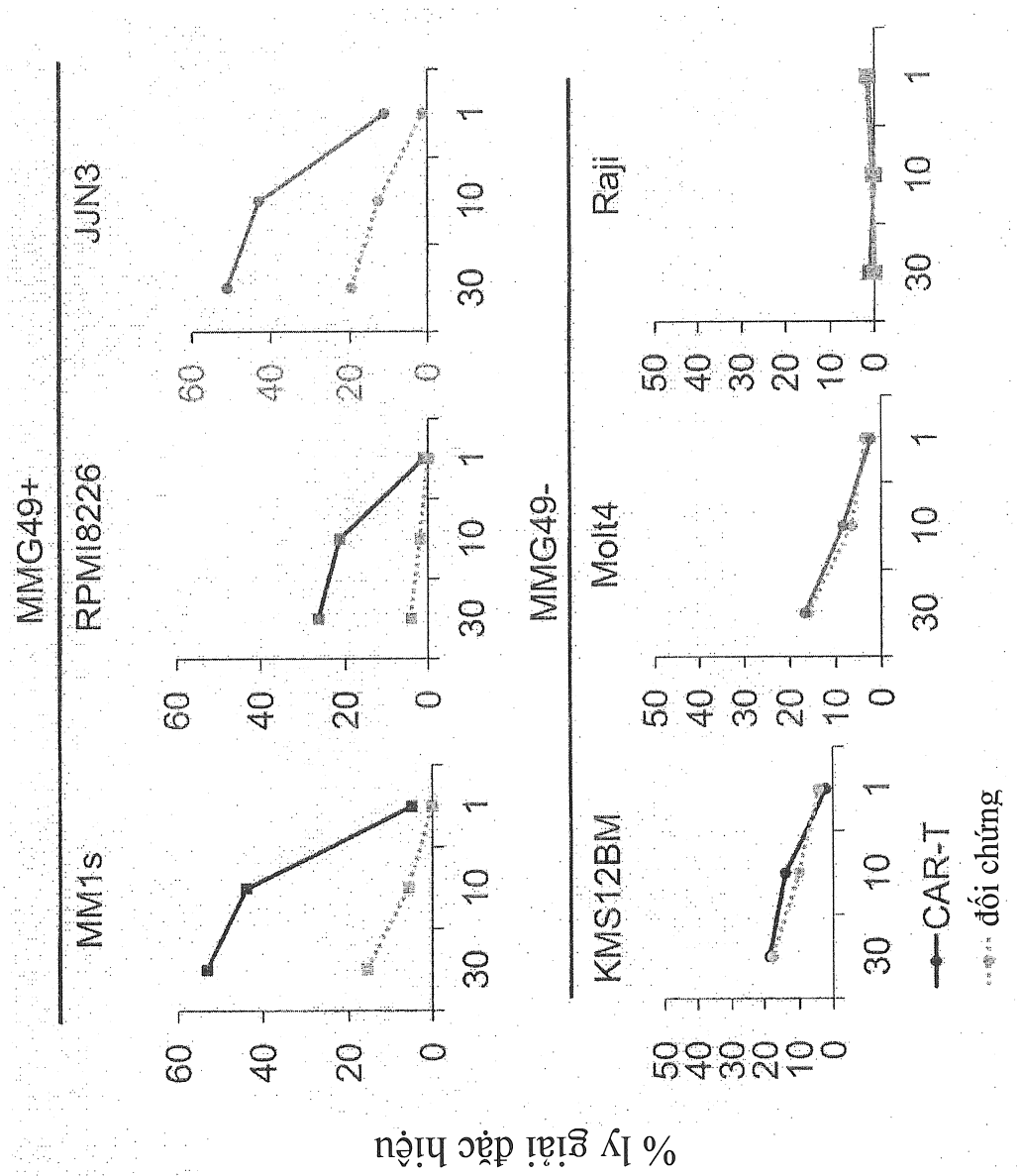
Hình. 19



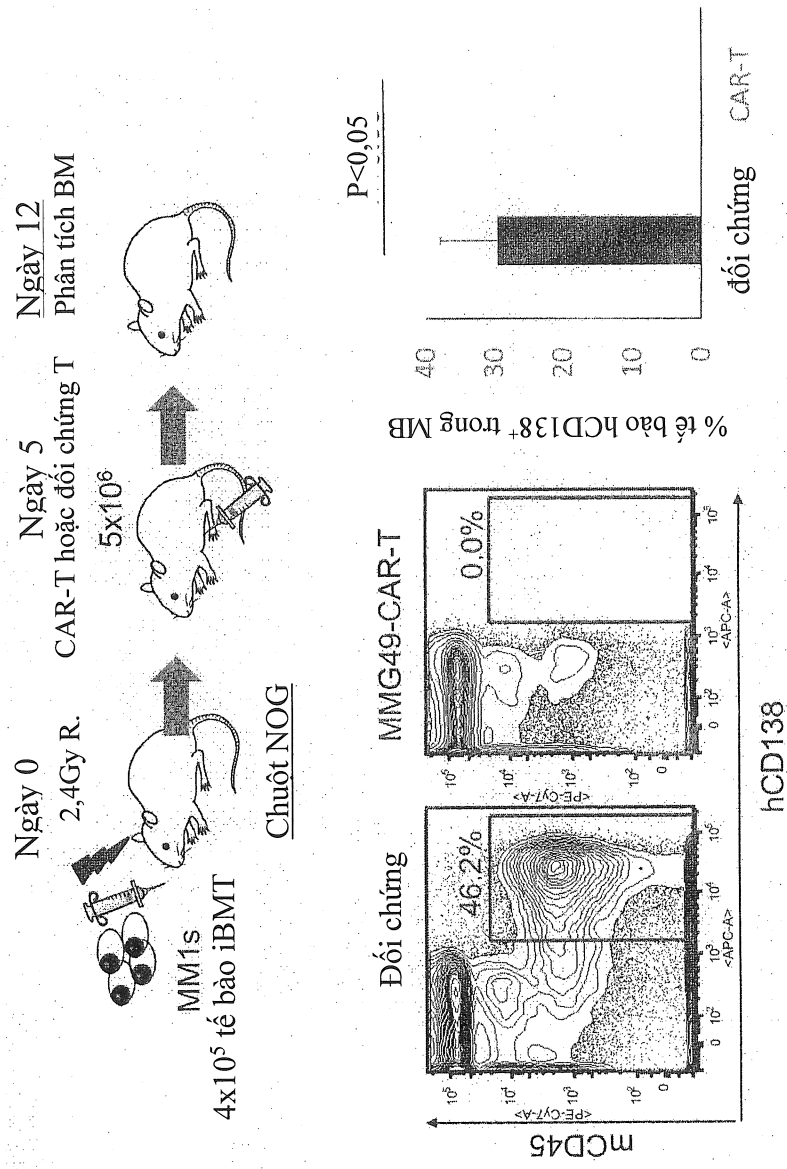
Hình. 20



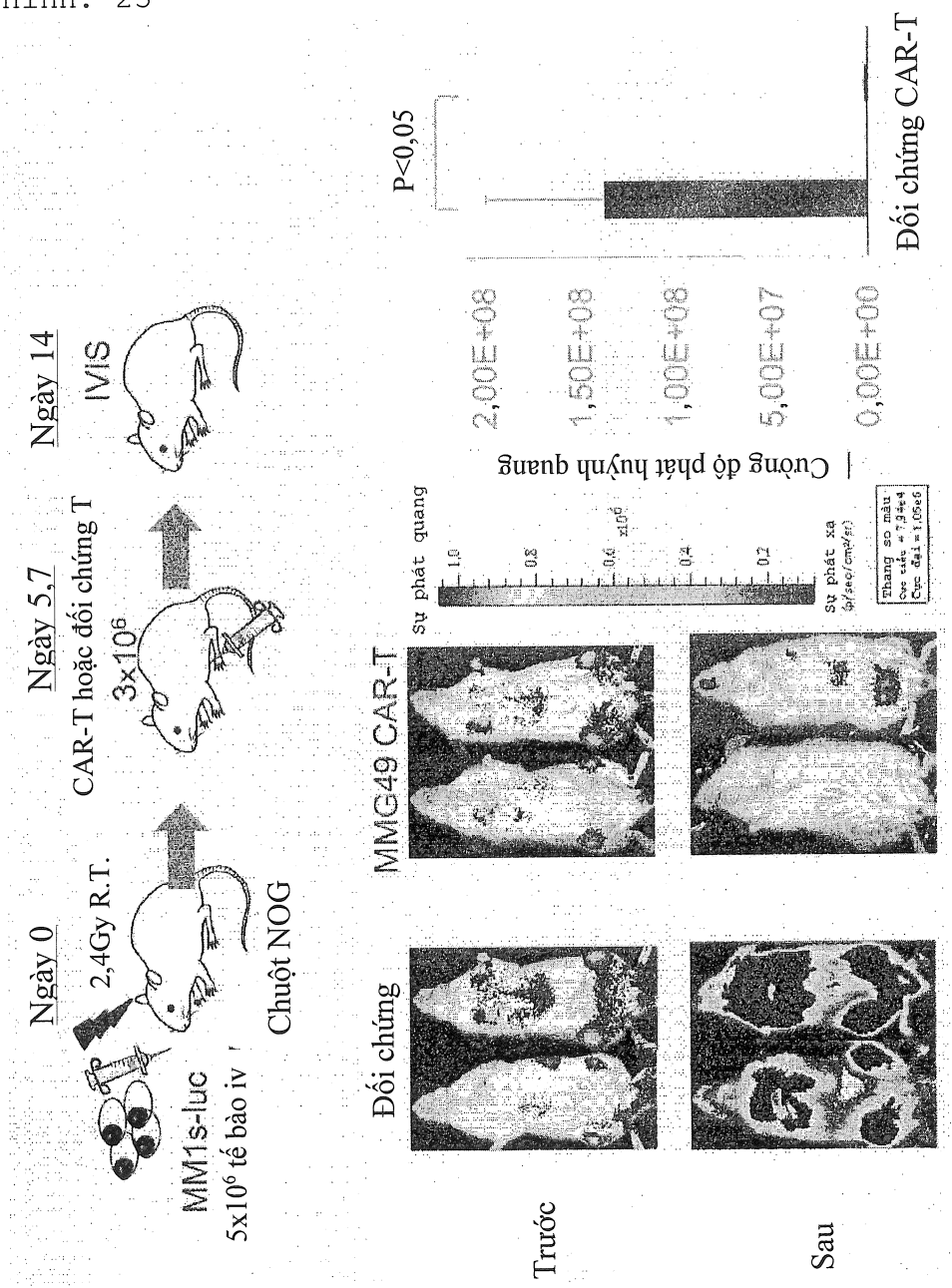
Hình. 21



Hình. 22



Hình. 23



Hinh. 24

A So sánh: integrin $\beta 7$ của người và chuột

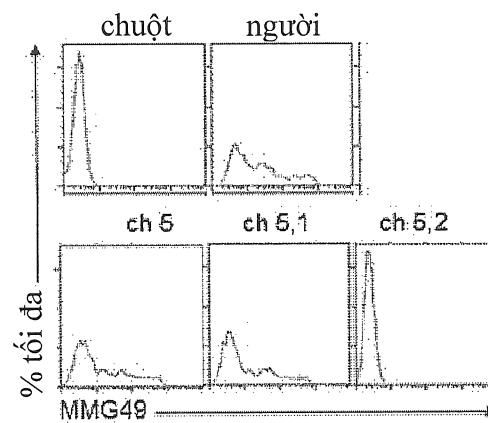
```

human b7 1: inva:pmvvlvllvltstetellaklpskgdatvknkphlsmllssqkppscokllshstawcklrfatagkazakakafellakg 90
mouse b7 1: invdptvllalllssstcelvltltscelkewndd:slscsqvysqkllshstscavckqlnfetiasozafzazkzefellakg 90
                                     * * * * *
human b7 91: cpellleefegqdevl:cdpflscgargegto:lpzqevnvlr:pepzo:lvrlr:agvpyvlylmdlsyxkddleavroigellv 180
mouse b7 91: cpagqlleefegqevl:cdpflsqdrhigat:qapgrivlr:pepgrivlr:agvpyvlylmdlsyxkddleavroigellv 180
                                     * * * * *
human b7 181: elavtvtshvaigfsgvdatv:efvstvtgsklreep:ptllscqseefehvllitldgafrevgsgsvsgnllspesgeftallqaal 270
mouse b7 181: elvqlqvltshvaigfsgvdatv:efvstvtgsklreep:ptllscqseefehvllitldgafrevgsgsvsgnllspesgeftallqaal 270
                                     * * * * *
human b7 271: cceqlgwntvsnrlvftstidvftadpcklccipmisdgchldnclvgsstlfdyvtvqvaqlsamtqplfvavtazalvqcelr 360
mouse b7 271: cceqlgwntvsnrlvftstidvftadpcklccipmisdgchldnclvgsstlfdyvtvqvaqlsamtqplfvavtazalvqcelr 360
                                     * * * * *
human b7 361: elipzavghlssdsnv:qolmdvayhlsstvtlrsalspavtshs:scgpepnekgadrgqchvtainqvtfvvtlqathcle 450
mouse b7 361: qitpksavrlstgrsnv:qolmdvayhlsstvtlrsalspavtshs:scgpepnekgadrgqchvtainqvtfvvtlqathcle 450
                                     * * * * *
human b7 451: zpfmlrmlkagfsl:vlvhlhldnchcsu:qfapachdqgqlkqav:scakar:ghlccsvallssyflmksucakavkylcska 540
mouse b7 451: zpfmlrmlkagfsl:vlvhlhldnchcsu:qfapachdqgqlkqav:scakar:ghlccsvallssyflmksucakavkylcska 540
                                     * * * * *
human b7 541: gncocercscs:ossgalceodda:ctherheglcghfgrc:cevgchcanrtgac:scgmdsc:lsprgicshgcrkncoccldeg 630
mouse b7 541: gncocercscs:ossgalceodda:ctherheglcghfgrc:cevgchcanrtgac:scgmdsc:lsprgicshgcrkncoccldeg 630
                                     * * * * *
human b7 631: ygalctcpacktpobrrhndc:qclpftgplamc:stacthtwtl:alartldgncrntlmv:lfefvndmratvrvrpfkrg 720
mouse b7 631: ygalctcpacktpobrrhndc:qclpftgplamc:stacthtwtl:alartldgncrntlmv:lfefvndmratvrvrpfkrg 720
                                     * * * * *
human b7 721: lhtqatvlcvesivavglg:vlvrlsvtvdrrvysfhef:qccmwkqdsnp:yvsnaittlnbfq--eadsetl 790
mouse b7 720: vthraillctsgivavglg:vlvrlsvtvdrrvysfhef:qccmwkqdsnp:yvsnaittlnbfq--eadsetl 790
                                     * * * * *

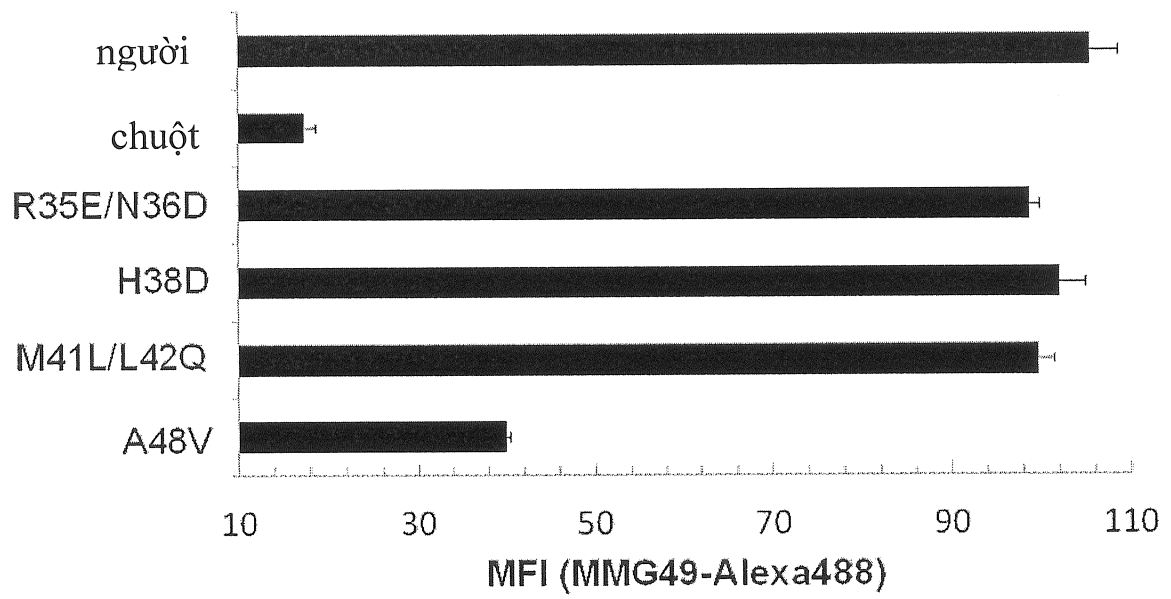
```

Hình. 25

		chuột
Chuột		
		người
Người		
	90	
ch 5		
	33	90
ch 5,1		
	33	
ch 5,2		



Hình. 26



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> OSAKA UNIVERSITY

<120> Kháng thể kháng integrin $\beta 7$ của người, thụ thể của kháng nguyên thể khảm, polynucleotit mã hóa thụ thể, tế bào chứa polynucleotit và được phẩm để điều trị bệnh đa u tủy chứa kháng thể này

<130> P16-107WO

<150> JP 2015-159240

<151> 2015-08-11

<160> 31

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> CDR1 VH của kháng thể MMG49

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> CDR2 VH của kháng thể MMG49

<400> 2

Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser
1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> CDR3 VH của kháng thể MMG49

<400> 3

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 4
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> VH của kháng thể MMG49

<400> 4

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 115 120 125

Gly Ala Gly
 130

<210> 5
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng của kháng thể MMG49

<400> 5

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1		5		10		15											
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Met	Lys		
			20					25					30				
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe		
		35					40					45					
Ser	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu		
		50				55					60						
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Met	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Tyr	Asn		
65					70					75					80		
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn		
				85					90						95		
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val		
			100					105						110			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Asp	Gly	Asn	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp		
		115					120					125					
Gly	Ala	Gly	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro		
		130					135				140						
Val	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val		
145					150					155					160		
Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser		
				165					170					175			
Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu		
			180					185					190				
Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser		
		195					200					205					
Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val		
		210				215					220						
Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro		
225					230					235					240		

Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
 245 250 255
 Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile
 260 265 270

 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
 275 280 285

 Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 290 295 300

 Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu
 305 310 315 320

 Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
 325 330 335

 Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
 340 345 350

 Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro
 355 360 365

 Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr
 370 375 380

 Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys
 385 390 395 400

 Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415

 Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val
 420 425 430

 Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
 435 440 445

 His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> CDR1 VL của kháng thể MMG49

<400> 6

Ser Ser Val Gly Tyr
1 5

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> CDR2 VL của kháng thể MMG49

<400> 7

Ala Thr Ser
1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> CDR3 VL của MMG49

<400> 8

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 9

<211> 128

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> VL của kháng thể MMG49

<400> 9

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 10
<211> 234
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể MMG49

<400> 10

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
130 135 140

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
165 170 175

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
195 200 205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
210 215 220

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230

<210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> CDR1 VH của kháng thể MMG49

<400> 11
ggctacacat tcagtagcta ctgg
24

<210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> CDR2 VH của kháng thể MMG49

<400> 12
atgttacctg gaagtggttag ttct
24

<210> 13
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> CDR3 VH của kháng thể MMG49

<400> 13
 gcaagggggg atggtaacta ctggtacttc gatgtc
 36

<210> 14
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> VH của kháng thể MMG49

<400> 14
 atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag
 60

gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc
 120

tgcaaggctt ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct
 180

ggacatggcc ttgagtggat tggagagatg ttacctggaa gtggtagtgc taactacaat
 240

gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg
 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag gggggatggt
 360

aactactggt acttcgatgt ctggggcgca ggg
 393

<210> 15
 <211> 1383
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng của kháng thể MMG49

<400> 15
 atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag
 60

gttcagctgc agcagttctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc
120

tgcaaggctt ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct
180

ggacatggcc ttgagtggat tggagagatg ttacctggaa gtggtagttc taactacaat
240

gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg
300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag gggggatggg
360

aactactggg acttcgatgt ctggggcgca ggggctaaaa caacagcccc atcgggtctat
420

ccactggccc ctgtgtgtgg agatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc
480

aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtggg
540

gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca ccctcagcag ctcagtgact
600

gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc
660

agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca
720

tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag
780

atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggg ggtggatgtg
840

agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca
900

gctcagacac aaacccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggg cagtgcctc
960

cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaagggt caacaacaaa
1020

gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca
1080

caggtatatg tcttgctcc accagaagaa gagatgacta agaaacagggt cactctgacc
1140

tgcatgggtc cagacttcac gcctgaagac atttacgtgg agtggacca caacgggaaa
1200

acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcttgact ctgatgggtc ttacttcacg
1260

tacagcaagc tgagagtga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca
1320

gtgggtccacg aggggtctgca caatcaccac acgactaaga gcttctcccg gactccgggt
1380

aaa
1383

<210> 16
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> CDR1 VL của kháng thể MMG49

<400> 16
tcaagtgtac gttac
15

<210> 17
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> CDR2 VL của kháng thể MMG49

<400> 17
gccacatcc
9

<210> 18
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> CDR3 VL của kháng thể MMG49

<400> 18
cagcagtga gtagtgaccc accgacg
27

<210> 19
<211> 384
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> VL của kháng thể MMG49

<400> 19

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc
60

agaggacaaa ttgtttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag
120

gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcactgggtt ccagcagaag
180

ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcctt
240

gctcgcttca gtggcagtga gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag
300

gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgaccacc gacgttcggt
360

ggaggcacca agctggaaat caaa
384

<210> 20

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể MMG49

<400> 20

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc
60

agaggacaaa ttgtttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag
120

gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcactgggtt ccagcagaag
180

ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcctt
240

gctcgcttca gtggcagtga gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag
300

gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgaccacc gacgttcggt
360

ggaggcacca agctggaaat caaagcagat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca
420

tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac
480

cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg
540

aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg
600

ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca
660

tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt
702

<210> 21

<211> 485

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> CAR được mô tả trong ví dụ

<400> 21

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 145 150 155 160

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 165 170 175

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190

Gly Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 195 200 205

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 210 215 220

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 245 250 255

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
 260 265 270

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
 275 280 285

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
 290 295 300

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
 305 310 315 320

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
 325 330 335

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 340 345 350

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 355 360 365

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro

370

375

380

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 385 390 395 400

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
 405 410 415

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 420 425 430

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 435 440 445

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 450 455 460

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 465 470 475 480

Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 22
 <211> 1468
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> CAR được mô tả trong ví dụ

<400> 22
 gaattccacc atggattttc aagtcagat tttcagcttc ctgctaata gtcgttcagt
 60

cataatgtcc agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc
 120

aggggagaag gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcaactggt
 180

ccagcagaag ccaggatcct ccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc
 240

tggagtcct gctcgcttca gtggcagtga gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag
 300

cagagtggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgacccacc
 360

gacgttcggt ggaggcacca agctggaaat caaacggggc tccactagcg gttccggcaa
420

acctggcagc ggagaaggca gccaggttca gctgcagcag tctggagctg agctgatgaa
480

gcctggggcc tcagtgaaga tatcctgcaa ggcttctggc tacacattca gtagctactg
540

gatagagtgg gtaaagcaga ggccctggaca tggccttgag tggattggag agatgttacc
600

tggaagtggg agttctaact acaatgagaa gttcaagggc aaggccacat tcaactgcaga
660

tacatcctcc aacacagcct acatgcaact cagcagcctg acatctgagg actctgccgt
720

ctattactgt gcaagggggg atggtaacta ctgggtacttc gatgtctggg gcgcagggac
780

cacggtcacc gtctcctcag cggccgcaat tgaagttatg tatcctcctc cttacctaga
840

caatgagaag agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacaccttt gtccaagtcc
900

cctatttccc ggaccttcta agcccttttg ggtgctggg gtggttggtg gagtcctggc
960

ttgctatagc ttgctagtaa cagtggcctt tattattttc tgggtgagga gtaagaggag
1020

caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cggccccggc ccaccgcaa
1080

gcattaccag ccctatgccc caccacgcga cttcgagcc tatcgctcca gagtgaagtt
1140

cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct
1200

caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggacctga
1260

gatgggggga aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa
1320

agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa
1380

ggggcacgat ggcctttacc agggctctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcct
1440

tcacatgcag gccctgcccc ctcgctaa
1468

<210> 23
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 23
 gaattccacc atggattttc aagtcagat t
 31

<210> 24
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 24
 gccggaaccg ctagtggagc cccgtttgat ttccagcttg gt
 42

<210> 25
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 25
 gctgccttct ccgctgccag gtttgccgga accgctagtg gagcc
 45

<210> 26
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 26
 aaacctggca gcggagaagg cagccaggtt cagctgcagc agtc
 44

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 27
tgaggagacg gtgaccgtgg
20

<210> 28
<211> 44
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 28
atacataact tcaattgcgg ccgctgagga gacggtgacc gtgg
44

<210> 29
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 29
ctaggcgccg gaattccacc atggattttc
30

<210> 30
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 30
aatgtcgacc tcgagtggct gtttagcgag
29

<210> 31
<211> 798
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Met	Val	Ala	Leu	Pro	Met	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Arg
1				5					10					15	

Gly Glu Ser Glu Leu Asp Ala Lys Ile Pro Ser Thr Gly Asp Ala Thr

32525

30

Glu Trp Arg Asn Pro His Leu Ser Met Leu Gly Ser Cys Gln Pro Ala
35 40 45

Pro Ser Cys Gln Lys Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys
50 55 60

Lys Gln Leu Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu Ala Arg Arg Cys
65 70 75 80

Ala Arg Arg Glu Glu Leu Leu Ala Arg Gly Cys Pro Leu Glu Glu Leu
85 90 95

Glu Glu Pro Arg Gly Gln Gln Glu Val Leu Gln Asp Gln Pro Leu Ser
100 105 110

Gln Gly Ala Arg Gly Glu Gly Ala Thr Gln Leu Ala Pro Gln Arg Val
115 120 125

Arg Val Thr Leu Arg Pro Gly Glu Pro Gln Gln Leu Gln Val Arg Phe
130 135 140

Leu Arg Ala Glu Gly Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu
145 150 155 160

Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu Arg Val Arg Gln Leu Gly His
165 170 175

Ala Leu Leu Val Arg Leu Gln Glu Val Thr His Ser Val Arg Ile Gly
180 185 190

Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Ser Thr Val
195 200 205

Pro Ser Lys Leu Arg His Pro Cys Pro Thr Arg Leu Glu Arg Cys Gln
210 215 220

Ser Pro Phe Ser Phe His His Val Leu Ser Leu Thr Gly Asp Ala Gln
225 230 235 240

Ala Phe Glu Arg Glu Val Gly Arg Gln Ser Val Ser Gly Asn Leu Asp
245 250 255

Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Leu Cys Gln
 260 265 270

Glu Gln Ile Gly Trp Arg Asn Val Ser Arg Leu Leu Val Phe Thr Ser
 275 280 285

Asp Asp Thr Phe His Thr Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly Ile Phe
 290 295 300

Met Pro Ser Asp Gly His Cys His Leu Asp Ser Asn Gly Leu Tyr Ser
 305 310 315 320

Arg Ser Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Val Ala Gln Ala
 325 330 335

Leu Ser Ala Ala Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Ala
 340 345 350

Leu Pro Val Tyr Gln Glu Leu Ser Lys Leu Ile Pro Lys Ser Ala Val
 355 360 365

Gly Glu Leu Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Met Asp
 370 375 380

Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Leu Glu His Ser Ser Leu
 385 390 395 400

Pro Pro Gly Val His Ile Ser Tyr Glu Ser Gln Cys Glu Gly Pro Glu
 405 410 415

Lys Arg Glu Gly Lys Ala Glu Asp Arg Gly Gln Cys Asn His Val Arg
 420 425 430

Ile Asn Gln Thr Val Thr Phe Trp Val Ser Leu Gln Ala Thr His Cys
 435 440 445

Leu Pro Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Arg Ala Leu Gly Phe Ser Glu
 450 455 460

Glu Leu Ile Val Glu Leu His Thr Leu Cys Asp Cys Asn Cys Ser Asp
 465 470 475 480

Thr Gln Pro Gln Ala Pro His Cys Ser Asp Gly Gln Gly His Leu Gln

485

490

495

Cys Gly Val Cys Ser Cys Ala Pro Gly Arg Leu Gly Arg Leu Cys Glu
500 505 510

Cys Ser Val Ala Glu Leu Ser Ser Pro Asp Leu Glu Ser Gly Cys Arg
515 520 525

Ala Pro Asn Gly Thr Gly Pro Leu Cys Ser Gly Lys Gly His Cys Gln
530 535 540

Cys Gly Arg Cys Ser Cys Ser Gly Gln Ser Ser Gly His Leu Cys Glu
545 550 555 560

Cys Asp Asp Ala Ser Cys Glu Arg His Glu Gly Ile Leu Cys Gly Gly
565 570 575

Phe Gly Arg Cys Gln Cys Gly Val Cys His Cys His Ala Asn Arg Thr
580 585 590

Gly Arg Ala Cys Glu Cys Ser Gly Asp Met Asp Ser Cys Ile Ser Pro
595 600 605

Glu Gly Gly Leu Cys Ser Gly His Gly Arg Cys Lys Cys Asn Arg Cys
610 615 620

Gln Cys Leu Asp Gly Tyr Tyr Gly Ala Leu Cys Asp Gln Cys Pro Gly
625 630 635 640

Cys Lys Thr Pro Cys Glu Arg His Arg Asp Cys Ala Glu Cys Gly Ala
645 650 655

Phe Arg Thr Gly Pro Leu Ala Thr Asn Cys Ser Thr Ala Cys Ala His
660 665 670

Thr Asn Val Thr Leu Ala Leu Ala Pro Ile Leu Asp Asp Gly Trp Cys
675 680 685

Lys Glu Arg Thr Leu Asp Asn Gln Leu Phe Phe Phe Leu Val Glu Asp
690 695 700

Asp Ala Arg Gly Thr Val Val Leu Arg Val Arg Pro Gln Glu Lys Gly
705 710 715 720

Ala	Asp	His	Thr	Gln	Ala	Ile	Val	Leu	Gly	Cys	Val	Gly	Gly	Ile	Val
				725					730					735	
Ala	Val	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Tyr	Arg	Leu	Ser	Val	Glu	Ile
			740					745					750		

Tyr	Asp	Arg	Arg	Glu	Tyr	Ser	Arg	Phe	Glu	Lys	Glu	Gln	Gln	Gln	Leu
		755					760					765			

Asn	Trp	Lys	Gln	Asp	Ser	Asn	Pro	Leu	Tyr	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Thr
	770					775					780				

Thr	Ile	Asn	Pro	Arg	Phe	Gln	Glu	Ala	Asp	Ser	Pro	Thr	Leu
785					790					795			