



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

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



1-0033636

(51)⁷ A61K 39/395; C12N 15/63; C07K 16/00 (13) B

(21) 1-2016-02370

(22) 02/05/2003

(62) 1-2004-01282

(86) PCT/US2003/013910 02/05/2003

(87) WO 2003/092623 A3 13/11/2003

(30) 60/377,440 02/05/2002 US

(45) 25/10/2022 415

(43) 26/09/2016 342A

(73) Wyeth Holdings LLC (US)

235 East 42nd Street, New York, New York 10017 USA

(72) KUNZ, Arthur (US); MORAN, Justin, Keith (US); RUBINO, Joseph, Thomas (US); JAIN, Neera (US); VIDUNAS, Eugene, Joseph (US); SIMPSON, John, McLean (US); ROBBINS, Paul, David (US); MERCHANT, Nishith (US); DIJOSEPH, John, Francis (US); RUPPEN, Mark, Edward (US); DAMLE, Nitin, Krishnaji (US); POPPLEWELL, Andrew, George (GB).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP THUỐC CHỨA DẪN XUẤT

CALICHEAMIXIN VÀ KHÁNG THỂ KHÁNG CD22 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin - chất mang và dược phẩm chứa thể liên hợp này. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng monome-kháng thể và việc sử dụng thể liên hợp này. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bào chế thể liên hợp thuốc gây độc tế bào dạng monome/chất mang có mức tải thuốc cao và phân đoạn liên hợp thấp (LCF) giảm đáng kể.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Bản mô tả đề cập đến các phương pháp sản xuất các thể liên hợp thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang (“các thể liên hợp”) có mức tải thuốc cao hơn và có phân đoạn liên hợp thấp (LFC) hầu như giảm. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các thể liên hợp kháng thể kháng CD22-calicheamixin đơn thể. Bản mô tả cũng đề cập đến các thể liên hợp theo sáng chế, và các phương pháp tinh chế các thể liên hợp này. Sáng chế đề cập đến được phẩm chứa các thể liên hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thể liên hợp thuốc được phát triển đối với liệu pháp chữa trị bằng thuốc có hệ thống là các tác nhân gây độc tế bào đặc hiệu đích. Nội dung này bao gồm việc tạo cặp tác nhân điều trị bệnh với phân tử chất mang có tính đặc hiệu đối với quần thể tế bào đích xác định. Các kháng thể có ái lực cao đối với các kháng nguyên là sự lựa chọn tốt yếu làm các phân tử đích. Với khả năng sử dụng các kháng thể đơn dòng có ái lực cao, các xu hướng điều trị bằng kháng thể ngày càng có triển vọng. Các chất có độc tính mà đã được liên hợp với các kháng thể đơn dòng bao gồm các độc tố, các thuốc gây độc tế bào có phân tử lượng thấp, các chất cải biến đáp ứng sinh học và các chất đồng vị phóng xạ. Các thể liên hợp kháng thể-độc tố thường được gọi là các độc tố miễn dịch trong khi các thể liên hợp miễn dịch bao gồm các kháng thể và các thuốc có phân tử lượng thấp như metotrexat và Adriamycin lại được gọi là các thể liên hợp hoá miễn dịch. Các chất điều biến miễn dịch bao gồm các chất cải biến miễn dịch được biết là có các chức năng điều hoà, ví dụ các lymphokin, các yếu tố sinh trưởng và yếu tố độc của rắn mang bành hoạt hoá bổ thể (CVF). Các thể liên hợp miễn dịch phóng xạ bao gồm các chất đồng vị phóng xạ, các chất đồng vị này có thể được sử dụng làm các chất chữa trị để giết chết các tế bào nhờ quá trình phóng xạ của chúng hoặc được sử dụng để ghi ảnh phóng xạ. Việc phân phát các thuốc gây độc tế bào đặc hiệu qua trung gian kháng thể đến các tế bào ung thư được tin là không chỉ làm tăng hiệu quả chống ung thư của chúng mà còn ngăn ngừa sự hấp thụ không đích bởi các mô bình thường, do đó, làm tăng các chỉ số chữa trị.

Sáng chế đề cập đến các thể liên hợp miễn dịch bao gồm một kháng thể làm chất dẫn tới đích và có tính đặc hiệu đối với các quyết định tổ kháng nguyên nằm trên bề mặt của các tế bào ác tính liên hợp với một thuốc gây độc tế bào. Sáng chế đề cập đến các thể liên hợp thuốc gây độc tế bào-kháng thể, trong đó kháng thể có tính đặc hiệu đối với các quyết định tổ kháng nguyên đối với các bệnh ác tính tế bào B, các bệnh rối loạn tăng sinh tế bào lympho và các bệnh viêm mạn tính. Bản mô tả đề cập đến các phương pháp sản xuất các thể liên hợp miễn dịch và việc sử dụng chúng trong điều trị.

Một số chất chữa trị dựa trên kháng thể để điều trị các bệnh khác nhau, bao gồm bệnh ung thư và bệnh viêm khớp dạng thấp, đã được chấp thuận cho sử dụng lâm sàng hoặc trong các thử nghiệm lâm sàng đối với nhiều bệnh ác tính bao gồm các bệnh ác tính tế bào B như u lympho không Hodgkin. Một chất chữa trị dựa trên kháng thể như vậy là rituximab (RituxanTM), loại kháng thể $\gamma 1$ dạng khảm không được đánh dấu của người (vùng +m $\gamma 1$ V), kháng thể này đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào CD20, được biểu hiện trên các tế bào B. Các chất chữa trị dựa trên kháng thể như vậy dựa vào khả năng gây độc tế bào qua trung gian bổ thể (CDCC) hoặc khả năng gây độc tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) chống lại các tế bào B, hoặc dựa vào việc sử dụng các chất đồng vị phóng xạ như ¹³¹I hoặc ⁹⁰Y, các chất chữa trị này có các vấn đề về bào chế và sử dụng liên quan đối với các bác sỹ lâm sàng và bệnh nhân. Tương tự, đã biết IgG hoặc Fab' kháng CD22 liên hợp với độc tố miễn dịch để điều trị u lympho B ở người, Shetie, M. A., (1991) Cancer Research, 51, No. 21, 5876-5880. Vì vậy, cần có thể hệ các thể liên hợp miễn dịch có thể khắc phục được các hạn chế của các chất chữa trị dựa trên kháng thể hiện tại để điều trị nhiều bệnh ác tính bao gồm các bệnh ác tính tạo máu như u lympho không Hodgkin (NHL) mà có thể sản xuất được một cách dễ dàng và có hiệu quả, có thể được sử dụng lặp đi lặp lại mà không gây đáp ứng miễn dịch.

Các thể liên hợp miễn dịch bao gồm thành viên của họ các tác nhân kháng khuẩn và chống ung thư có công hiệu, được nhóm thành calicheamixin hoặc phức hợp LL-E33288 (bằng Mỹ số 4970198 (1990)), đã được phát triển để sử dụng trong việc điều trị các bệnh u tủy. Có công hiệu nhất của các calicheamixin được ký hiệu là $\gamma 1$, ở đây được gọi đơn giản là gama. Các hợp chất này chứa metyltrisulfit mà có thể được cho phản ứng với các tiol thích hợp để tạo thành các disulfit, đồng thời tạo ra nhóm

chức như hydrazit hoặc nhóm chức khác hữu ích cho việc gắn dẫn xuất calicheamixin với chất mang (bằng Mỹ số 5053394). Việc sử dụng các thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin đơn thể/chất mang để phát triển các liệu pháp chữa trị đối với nhiều bệnh ung thư đã bị hạn chế cả bởi khả năng sử dụng các tác nhân đích đặc hiệu (các chất mang) cũng như các phương pháp liên hợp dẫn đến sự hình thành protein kết tụ khi lượng dẫn xuất calicheamixin sẽ được liên hợp với chất mang (tức là mức tải thuốc) tăng lên. Khi mức tải thuốc cao hơn làm tăng công hiệu hiện có của thể liên hợp, mong muốn có được sự tải thuốc trên chất mang nhiều tới mức vẫn giữ được ái lực của protein chất mang. Sự có mặt của protein kết tụ, có thể có độc tính và gây miễn dịch không đặc hiệu và, do đó, phải loại ra khỏi các ứng dụng chữa trị, làm cho quy trình sản xuất các thể liên hợp này trên quy mô lớn trở nên khó khăn hơn và làm giảm hiệu suất của sản phẩm. Lượng calicheamixin được tải trên protein chất mang (mức tải thuốc), lượng kết tụ được hình thành trong phản ứng liên hợp và hiệu suất của thể liên hợp đơn thể được tinh chế cuối cùng có thể thu được đều có liên quan với nhau. Do đó, sự giảm bớt phải được thực hiện giữa mức tải thuốc cao hơn và hiệu suất của đơn thể cuối cùng bằng cách điều chỉnh lượng dẫn xuất calicheamixin phản ứng sẽ được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng liên hợp.

Xu hướng kết tụ đối với các thể liên hợp thuốc gây độc tế bào, nhất là các thể liên hợp calicheamixin, đặc biệt nghiêm trọng khi các phản ứng liên hợp được thực hiện với các thành phần liên kết được mô tả trong bằng Mỹ các số 5877296 và 5773001. Trong trường hợp này, các thể liên hợp được tạo ra ở dạng kết tụ chiếm tỷ lệ cao và rất khó được tinh chế bằng các quy trình ban đầu này (quy trình CMA) để sử dụng chữa trị. Đối với một số protein chất mang, các thể liên hợp có các mức tải thuốc thậm chí tốt nhất thực tế không thể tạo ra được ngoại trừ trên quy mô nhỏ. Do vậy, cần phải cải tiến các phương pháp liên hợp các thuốc gây độc tế bào, ví dụ các calicheamixin, với các chất mang để làm giảm thiểu lượng kết tụ và, do đó, cho phép mức tải thuốc càng cao càng tốt với hiệu suất sản phẩm thích hợp.

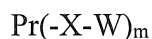
Trước đó, các phương pháp liên hợp để bào chế dẫn xuất calicheamixin đơn thể/chất mang với mức tải thuốc/hiệu suất cao hơn và quá trình kết tụ giảm đã được mô tả (các bằng Mỹ số 5712374 và 5714856). Mặc dù các quy trình này tạo ra các chế phẩm liên hợp có hàm lượng kết tụ giảm đáng kể, sau đó đã phát hiện ra rằng nó tạo ra các thể liên hợp chứa các mức cao không mong muốn (45-65%, % diện tích HPLC)

của phân đoạn liên hợp thấp (LCF), một phân đoạn hầu như chỉ bao gồm kháng thể không liên hợp. Sự có mặt của LCF trong sản phẩm là việc sử dụng kháng thể không có hiệu quả vì nó không chức thuốc gây độc tế bào. Nó cũng có thể cạnh tranh với thể liên hợp calicheamixin-chất mang đối với đích và làm giảm đáng kể khả năng hướng đích của thể liên hợp, dẫn đến sự giảm hiệu quả của thuốc gây độc tế bào. Do đó, mong muốn có được quy trình mà có thể tạo ra các mức LCF thấp hơn đáng kể và có các mức độ kết tụ chấp nhận được mà hầu như không làm biến đổi các đặc tính vật lý của thể liên hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Bản mô tả đề cập đến các phương pháp sản xuất thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang (“các thể liên hợp”) với mức tải cao và phân đoạn liên hợp thấp (LCF) hầu như giảm. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến việc sản xuất thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/chất mang, các thể liên hợp, các dược phẩm, phương pháp tinh chế các thể liên hợp và việc sử dụng các thể liên hợp. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 (CMC-544).

Bản mô tả cũng đề cập đến quy trình liên hợp cải tiến để sản xuất các thể liên hợp tạo ra các mức LCF thấp hơn đáng kể (dưới 10%) mà không có sự biến đổi nào đáng kể về các đặc tính vật lý hoặc hoá học. Bản mô tả cũng đề cập đến việc cải tiến hơn nữa quy trình liên hợp không chỉ dẫn đến sự giảm đáng kể các mức LCF mà còn dẫn đến sự giảm đáng kể sự kết tụ so với các quy trình được mô tả trước đó và tạo ra mức tải thuốc hầu như tăng lên. Các thể liên hợp theo sáng chế có công thức:



trong đó:

Pr là chất mang có bản chất protein;

X là liên kết bao gồm sản phẩm của nhóm phản ứng bất kỳ mà có thể phản ứng với chất mang có bản chất protein;

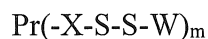
W là dẫn xuất thuốc gây độc tế bào;

m là mức tải trung bình đối với sản phẩm liên hợp đã được tinh chế sao cho thuốc gây độc tế bào chiếm từ 7 đến 9% khối lượng thể liên hợp; và

(-X-W) là dẫn xuất thuốc gây độc tế bào.

Theo một phương án, các thể liên hợp theo sáng chế được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước: (1) bổ sung dẫn xuất thuốc gây độc tế bào vào chất mang có bản chất protein, trong đó dẫn xuất thuốc gây độc tế bào chiếm từ 4,5 đến 11% khối lượng chất mang có bản chất protein; (2) ủ dẫn xuất thuốc gây độc tế bào và chất mang có bản chất protein trong dung dịch đệm không ái nhân, tương thích với protein và có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 9, để tạo ra thể liên hợp thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang, trong đó dung dịch này còn bao gồm (a) đồng dung môi hữu cơ và (b) chất phụ trợ bao gồm ít nhất một axit cacboxylic C₆-C₁₈ hoặc muối của nó, và trong đó quá trình ủ được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 35°C trong khoảng thời gian từ 15 phút đến 24 giờ; và (3) cho thể liên hợp được tạo ra ở bước (2) thực hiện quy trình tách bằng sắc ký để tách các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang có bản chất protein có mức tải nằm trong khoảng từ 4 đến 10% khối lượng của thuốc gây độc tế bào và có phân đoạn liên hợp thấp dưới 10% ra khỏi chất mang có bản chất protein không được liên hợp, dẫn xuất thuốc gây độc tế bào và các thể liên hợp kết tụ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 có công thức :



trong đó: Pr là kháng thể kháng CD22; X là liên kết thủy phân được chứa sản phẩm của nhóm phản ứng bất kỳ mà có thể phản ứng với kháng thể; W là gốc calicheamixin; m là tải lượng trung bình đối với sản phẩm liên hợp đã tinh chế sao cho calicheamixin chiếm khoảng 4-10% khối lượng thể liên hợp; và (-X-S-S-W)_m là dẫn xuất calicheamixin, trong đó phân tử kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa

(a) SEQ ID NO: 1 cho CDR-H1,

(b) trình tự GINPGNNYATYRRKFQG của gH7 trong Fig. 6 hoặc SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:16 cho CDR-H2, và

(c) SEQ ID NO:3 cho CDR-H3;

và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa

(d) SEQ ID NO:4 cho CDR-L1,

(e) SEQ ID NO:5 cho CDR-L2, và

(f) SEQ ID NO:6 cho CDR-L3.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chất mang có bản chất protein của thể liên hợp được chọn từ nhóm bao gồm các hormon, các yếu tố sinh trưởng, các kháng thể, các đoạn kháng thể, kháng thể dạng khảm, kháng thể người, kháng thể được làm tương thích với người, các chất tương tự kháng thể và các bản sao của chúng đã được thao tác về mặt di truyền hoặc bằng enzym.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể dạng khảm, kháng thể người, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab và đoạn F(ab)₂.

Theo phương án khác, kháng thể được làm tương thích với người là kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt tế bào CD22.

Theo phương án ưu tiên, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR, và bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) và vùng biến đổi của chuỗi nặng là 5/44-gH7 (SEQ IS ID NO:27).

Theo phương án ưu tiên khác, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:28.

Theo phương án ưu tiên khác nữa, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR bao gồm chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:30.

Theo phương án ưu tiên khác nữa, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:28 và chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:30.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR, là kháng thể biến dị thu được bằng quy trình thuần thực ái lực và có tính đặc hiệu tăng đối với CD22 của người.

Theo khía cạnh khác, thuốc gây độc tế bào được sử dụng để tạo ra thể liên hợp thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang theo sáng chế là chất ức chế quá trình

trùng hợp tubulin, một tác nhân alkyl hoá liên kết và gây rối loạn ADN, chất ức chế quá trình tổng hợp protein, hoặc là chất ức chế tyrosin kinaza.

Theo một phương án, thuốc gây độc tế bào được chọn từ các calicheamixin, tiotepa, các taxan, vincristin, daunorubixin, doxorubixin, epirubixin, các esperamixin, actinomycin, autramycin, các azaserin, các bleomycin, tamoxifen, idarubixin, các dolastatin/auristatin, các hemiasterlin và các maytasinoit.

Theo một phương án ưu tiên, thuốc gây độc tế bào là calicheamixin. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, calicheamixin là gama calicheamixin hoặc dẫn xuất N-acetyl gama calicheamixin.

Theo khía cạnh khác nữa, thuốc gây độc tế bào được gắn nhóm chức 3-mercapto-3-methyl butanoyl hydrazit và liên hợp với chất mang có bản chất protein thông qua thành phần liên kết thuỷ phân được, phần liên kết này có khả năng giải phóng thuốc gây độc tế bào ra khỏi thể liên hợp sau khi liên kết và đi vào các tế bào đích.

Theo phương án ưu tiên của khía cạnh này, thành phần liên kết thuỷ phân được là axit 4-(4-axetylphenoxy) butanoic (AcBut).

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, axit octanoic hoặc muối của nó, axit decanoic hoặc muối của nó sẽ được sử dụng làm chất phụ trợ trong suốt quá trình dung hợp để làm giảm sự kết tụ và làm tăng mức tải thuốc.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, các thể liên hợp theo sáng chế được tinh chế nhờ quy trình tách bằng sắc ký.

Theo một phương án, quy trình tách bằng sắc ký được sử dụng để tách thể liên hợp dẫn xuất thuốc dạng đơn thể-chất mang là sắc ký dựa theo kích thước (SEC).

Theo phương án khác, quy trình tách bằng sắc ký được sử dụng để tách thể liên hợp dẫn xuất thuốc dạng đơn thể-chất mang là HPLC, FPLC hoặc sắc ký Sephacryl S-200.

Theo phương án ưu tiên, quy trình tách bằng sắc ký được sử dụng để tách thể liên hợp dẫn xuất thuốc dạng đơn thể-chất mang là sắc ký tương tác kỵ nước (HIC). Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, HIC được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường sắc ký Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, môi trường sắc ký Butyl Sepharose 4

Fast Flow, môi trường sắc ký Octyl Sepharose 4 Fast Flow, môi trường sắc ký Toyopearl Ether-650M, môi trường sắc ký HIC Macro-Prep methyl hoặc môi trường sắc ký HIC Macro-Prep t-butyl. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên hơn, HIC được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường sắc ký Butyl Sepharose 4 Fast Flow.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thể liên hợp dẫn xuất thuốc dạng đơn thể-chất mang được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên của khía cạnh này, thuốc gây độc tế bào được sử dụng là calicheamixin và chất mang được sử dụng là kháng thể.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể dạng khảm, kháng thể người, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab và đoạn F(ab)₂. Theo khía cạnh được đặc biệt ưu tiên hơn, kháng thể được làm tương thích với người kháng kháng nguyên bề mặt tế bào CD22 sẽ được sử dụng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR, và bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) và vùng biến đổi của chuỗi nặng là 5/44-gH7 (SEQ IS ID NO:27).

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:28.

Theo phương án ưu tiên, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR bao gồm chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:30.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:28 và chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:30.

Theo phương án khác nữa, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR, là kháng thể biến dị thu được bằng quy trình thuần thực ái lực và có tính đặc hiệu tăng đối với CD22 của người.

Theo phương án ưu tiên, calicheamixin là gama calicheamixin hoặc dẫn xuất N-axetyl gama calicheamixin.

Theo một phương án, dẫn xuất calicheamixin được gắn nhóm chức 3-mercapto-3-metyl butanoyl hydrazit.

Theo phương án khác, thành phần liên kết được sử dụng để liên hợp thuốc với chất mang là thành phần liên kết thuỷ phân được, thành phần liên kết này có khả năng giải phóng thuốc gây độc tế bào ra khỏi thể liên hợp sau khi liên kết và đi vào các tế bào đích. Theo phương án ưu tiên, thành phần liên kết thuỷ phân được là axit 4-(4-axetylphenoxy) butanoic (AcBut).

Khía cạnh khác của sáng chế là đề cập đến thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 có công thức $\text{Pr}(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$, trong đó Pr là kháng thể kháng CD22; X là liên kết có thể thuỷ phân bao gồm sản phẩm của nhóm phản ứng bất kỳ có thể phản ứng với kháng thể; W là gốc calicheamixin; m là mức tải trung bình đối với sản phẩm liên hợp đã được tinh chế sao cho calicheamixin chiếm từ 4 đến 10% khối lượng thể liên hợp; và $(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$ là dẫn xuất calicheamixin được tạo ra bởi quy trình theo sáng chế.

Theo một phương án của khía cạnh này, kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể dạng khảm, kháng thể người, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab và đoạn F(ab)_2 .

Theo phương án ưu tiên, kháng thể này là kháng thể kháng CD22 có tính đặc hiệu với CD22 của người, và bao gồm chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi bao gồm CDR có ít nhất một trong số các trình tự được ký hiệu là H1 trên Fig.1 (SEQ ID NO:1) đối với CDR-H1, là H2 trên Fig.1 (SEQ ID NO:2) hoặc H2' (SEQ ID NO:13) hoặc H2'' (SEQ ID NO:15) hoặc H2''' (SEQ ID NO:16) đối với CDR-H2, là H3 trên Fig.1 (SEQ ID NO:3) đối với CDR-H3, và bao gồm chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi bao gồm CDR có ít nhất một trong số các trình tự được ký hiệu là L1 trên Fig.1 (SEQ ID NO:4) đối với CDR-L1, là L2 trên Fig.1 (SEQ ID NO:5) đối với CDR-L2 hoặc là L3 trên Fig.1 (SEQ ID NO:6) đối với CDR-L3.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng thể kháng CD22 bao gồm chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi bao gồm CDR có ít nhất một trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 đối với CDR-H1, SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:13 hoặc SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:16 đối với CDR-H2, hoặc SEQ ID NO:3 đối với CDR-H3, và chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi bao gồm CDR có ít nhất một trong số các trình tự

nêu trong SEQ ID NO:4 đối với CDR-L1, SEQ ID NO:5 đối với CDR-L2 hoặc SEQ ID NO:6 đối với CDR-L3.

Theo phương án ưu tiên khác nữa, kháng thể kháng CD22 bao gồm SEQ ID NO:1 đối với CDR-H1, SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:13 hoặc SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:16 đối với CDR-H2, SEQ ID NO:3 đối với CDR-H3, SEQ ID NO:4 đối với CDR-L1, SEQ ID NO:5 đối với CDR-L2 và SEQ ID NO:6 đối với CDR-L3.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể kháng CD22 được ghép CDR và bao gồm vùng biến đổi chứa các khu vực làm khung thể nhận của người và các CDR thể cho không phải của người.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người có khung thể nhận của người, trong đó các khu vực của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể là dựa trên trình tự liên ứng của nhóm phụ I của người và bao gồm các gốc thể cho không phải của người tại các vị trí 1, 28, 48, 71 và 93. Theo phương án khác, kháng thể được làm tương thích với người này còn bao gồm các gốc thể cho không phải của người tại các vị trí 67 và 69.

Theo một phương án ưu tiên, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa khu vực làm khung thể nhận của người dựa trên trình tự liên ứng của nhóm phụ I của người và còn bao gồm các gốc thể cho không phải của người tại các vị trí 2, 4, 37, 38, 45 và 60. Theo phương án khác, kháng thể được ghép CDR này còn bao gồm gốc thể cho không phải của người tại vị trí 3.

Theo phương án khác nữa, kháng thể được ghép CDR bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) và vùng biến đổi của chuỗi nặng là 5/44-gH7 (SEQ IS ID NO:27).

Theo phương án khác, kháng thể được ghép CDR bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:28 và chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:30.

Theo phương án khác nữa, kháng thể được ghép CDR bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:28 và chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:30.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD22 được ghép CDR, là kháng thể biến dị thu được bằng quy trình thuần thực ái lực và có tính đặc hiệu tăng đối với CD22 của người.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD22 là kháng thể dạng khảm bao gồm các trình tự của các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng lần lượt nêu trong SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8.

Theo phương án khác nữa kháng thể kháng CD22 bao gồm thể lai CDR với trình tự CDR thể cho được cắt ngắn, trong đó phần còn thiếu của CDR thể cho được thay thế bằng trình tự khác và tạo thành CDR chức năng.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, dẫn xuất thuốc gây độc tế bào hoặc là gama calicheamixin hoặc là dẫn xuất N-acetyl gama calicheamixin.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm đông khô ổn định của thể liên hợp thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang. Theo phương án ưu tiên, chế phẩm đông khô ổn định của thể liên hợp thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang được bào chế bằng cách (a) hoà tan thể liên hợp thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang tới nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2mg/ml trong dung dịch bao gồm chất bảo quản lạnh ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1,5% đến 5% khối lượng, tác nhân tạo khối polyme ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5% đến 1,5% khối lượng, chất điện phân ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01M đến 0,1M, tác nhân tạo điều kiện hoà tan ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,05% khối lượng, tác nhân đệm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 50mM sao cho độ pH cuối cùng của dung dịch nằm trong khoảng từ 7,8 đến 8,2, và nước; (b) phân dung dịch trên vào các lọ nhỏ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ +5°C đến +10°C; (c) làm lạnh dung dịch ở nhiệt độ làm lạnh nằm trong khoảng từ -35°C đến -50°C; (d) cho dung dịch đã được làm lạnh này khởi đầu bước làm khô ở nhiệt độ thấp với áp suất làm khô ban đầu nằm trong khoảng từ 20 đến 80 micron (2,67-10,67Pa) ở nhiệt độ bảo quản nằm trong khoảng từ -10°C đến -40°C trong khoảng thời gian từ 24 đến 78 giờ; và (e) cho sản phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp của bước (d) thực hiện bước làm khô thứ hai với áp suất làm khô nằm trong khoảng từ 20 đến 80 micron (2,67-10,67Pa) ở nhiệt độ bảo quản nằm trong khoảng từ +10°C đến +40°C trong khoảng thời gian từ 15 đến 30 giờ.

Theo một phương án, chất bảo quản lạnh được sử dụng trong quy trình làm đông khô thể liên hợp thuốc gây độc tế bào/chất mang được chọn từ alditol, mannitol, sorbitol, inozitol, polyetylen glycol, axit aldonic, axit uronic, axit aldaric, các aldoza, các ketoza, các đường amino, các glyxeraldehyt, arabinoza, lyxoza, pentoza, riboza, xyloza, galactoza, glucoza, hexoza, idoza, mannoza, taloza, heptoza, fructoza, axit gluconic, lactoza, mannitol, metyl α -glucopyranozit, maltoza, axit isoascorbic, axit ascorbic, lacton, sorboza, axit glucaric, erytroza, treoza, arabinoza, alloza, altroza, guloza, erytruloza, ribuloza, xyluloza, psicoza, tagatoza, axit glucuronic, axit gluconic, axit galacturonic, axit mannuronic, glucosamin, galactosamin, sacaroza, trehaloza, axit neuraminic, các arabinan, các fructan, các fucan, các galactan, các galacturonan, các glucan, các mannan, các xylan, levan, fucoidan, caraginan, galactocaroloza, các pectin, các axit pectic, amyloza, pululan, glycogen, amylopectin, xenluloza, dextran, pustulan, chitin, agaroza, keratin, chondroitin, dermatan, axit hyaluronic, axit alginic, gồm xantan, tinh bột, etylen glycol, polypropylen glycol, glyxerol và pentaerytritol.

Theo phương án ưu tiên, chất bảo quản lạnh là sacaroza, chất này có mặt ở nồng độ 1,5% khối lượng.

Theo một phương án, chất tạo khối polyme được sử dụng trong quy trình đông khô được chọn từ Dextran 40 hoặc hydroxyetyl tinh bột 40 và ở nồng độ 0,9% khối lượng.

Theo phương án khác, chất điện phân được sử dụng trong dung dịch làm đông khô là natri clorua, có mặt ở nồng độ 0,05M.

Theo phương án ưu tiên, tác nhân tạo điều kiện hoà tan sẽ được sử dụng trong quy trình đông khô. Tốt hơn là, tác nhân tạo điều kiện hoà tan là chất hoạt động bề mặt. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, chất hoạt động bề mặt là polysorbat 80, có mặt ở nồng độ 0,01% khối lượng.

Theo một phương án, tác nhân đệm được sử dụng là trometamin, có mặt ở nồng độ 0,02M. Tốt hơn là, độ pH của dung dịch này là 8,0 ở lúc bắt đầu quy trình đông khô. Dung dịch chứa thể liên hợp thuốc gây độc tế bào/chất mang được phân vào các lọ nhỏ ở nhiệt độ +5°C trước khi khởi đầu quy trình.

Theo phương án ưu tiên, dung dịch trong các lọ nhỏ này được làm lạnh ở nhiệt độ -45°C; dung dịch đã được làm lạnh được cho qua bước làm khô ở nhiệt độ thấp ban

đầu ở áp suất làm khô ban đầu 60 micron (8Pa) ở nhiệt độ bảo quản -30°C trong 60 giờ; và sản phẩm đã được làm khô lạnh được cho qua bước làm khô thứ hai ở áp suất làm khô 60 micron (8Pa) ở nhiệt độ bảo quản $+25^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến được phẩm bao gồm liệu có hiệu quả chữa bệnh của thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang được bào chế theo phương pháp của sáng chế.

Theo một phương án, chất mang trong thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang là chất mang có bản chất protein từ các hormon, các yếu tố sinh trưởng, các kháng thể và các chất tương tự kháng thể.

Theo phương án ưu tiên, chất mang có bản chất protein là kháng thể đơn dòng của người, kháng thể dạng khảm, kháng thể người hoặc kháng thể được làm tương thích với người.

Theo phương án ưu tiên, kháng thể được làm tương thích với người là kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt tế bào CD22.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên của khía cạnh này theo sáng chế, kháng thể kháng CD22 có tính đặc hiệu đối với CD22 của người và bao gồm chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi bao gồm CDR có ít nhất một trong số các trình tự được ký hiệu là H1 trên Fig.1 (SEQ ID NO:1) đối với CDR-H1, là H2 trên Fig.1 (SEQ ID NO:2) hoặc H2' (SEQ ID NO:13) hoặc H2'' (SEQ ID NO:15) hoặc H2''' (SEQ ID NO:16) đối với CDR-H2, là H3 trên Fig.1 (SEQ ID NO:3) đối với CDR-H3, và bao gồm chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi bao gồm CDR có ít nhất một trong số các trình tự được ký hiệu là L1 trên Fig.1 (SEQ ID NO:4) đối với CDR-L1, là L2 trên Fig.1 (SEQ ID NO:5) đối với CDR-L2 hoặc là L3 trên Fig.1 (SEQ ID NO:6) đối với CDR-L3.

Theo phương án ưu tiên khác, kháng thể kháng CD22 bao gồm chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi bao gồm CDR có ít nhất một trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 đối với CDR-H1, SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:13 hoặc SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:16 đối với CDR-H2, hoặc SEQ ID NO:3 đối với CDR-H3, và chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi bao gồm CDR có ít nhất một trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:4 đối với CDR-L1, SEQ ID NO:5 đối với CDR-L2 hoặc SEQ ID NO:6 đối với CDR-L3.

Theo phương án ưu tiên khác nữa, kháng thể kháng CD22 bao gồm SEQ ID NO:1 đối với CDR-H1, SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:13 hoặc SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:16 đối với CDR-H2, SEQ ID NO:3 đối với CDR-H3, SEQ ID NO:4 đối với CDR-L1, SEQ ID NO:5 đối với CDR-L2 và SEQ ID NO:6 đối với CDR-L3.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người được ghép CDR và bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) và vùng biến đổi của chuỗi nặng là 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên khác, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể được ghép CDR, có tính đặc hiệu với CD22 của người và bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:28 và chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:30.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người là kháng thể biến dị có tính đặc hiệu tăng đối với CD22 của người và thu được bằng quy trình thuần thực ái lực.

Theo một phương án, thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể là calicheamixin và tốt hơn là được chọn từ gama calicheamixin hoặc N-acetyl calicheamixin.

Theo một phương án, dược phẩm này có thể chứa tùy chọn tác nhân có hoạt tính sinh học bổ sung. Tác nhân có hoạt tính sinh học như vậy có thể là thuốc gây độc tế bào, tác nhân sinh trưởng hoặc hormon.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh rối loạn tăng sinh bằng cách cung cấp cho đối tượng liệu có hiệu quả chữa trị của dược phẩm theo sáng chế. Dược phẩm này có thể được cung cấp qua đường dưới da, qua đường trong màng bụng, qua đường trong tĩnh mạch, qua đường trong động mạch, qua đường trong tuỷ, qua đường trong vỏ, qua biểu bì, qua da, qua đường trong mũi, tại chỗ, qua đường ruột, qua đường trong âm đạo, qua đường dưới lưỡi hoặc qua đường trực tràng. Theo phương án ưu tiên, dược phẩm theo sáng chế được cung cấp qua đường trong tĩnh mạch.

Theo một phương án, dược phẩm này được cung cấp cho đối tượng là người đang chịu đau đớn do bệnh tăng sinh như bệnh ung thư. Theo phương án ưu tiên, bệnh

ung thư này là bệnh ác tính tế bào B. Bệnh ác tính tế bào B có thể là bệnh bạch cầu hoặc u lympho biểu hiện kháng nguyên bề mặt tế bào CD22.

Theo phương án khác nữa, bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu mô (carcinoma) hoặc ung thư mô liên kết (sarcoma).

Khía cạnh kháng của sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ác tính tế bào B bằng cách cung cấp cho bệnh nhân mắc bệnh ác tính như vậy được phẩm có hiệu quả chữa trị, được phẩm này bao gồm thể liên hợp thuốc gây độc tế bào-kháng thể kháng CD22. Theo phương án ưu tiên, bệnh ác tính tế bào B là u lympho, đặc biệt là u lympho không Hodgkin.

Theo một phương án, thuốc gây độc tế bào được sử dụng để bào chế các thể liên hợp theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm calicheamixin, tiotepa, các taxan, vincristin, daunorubixin, doxorubixin, epirubixin, actinomycin, autramycin, các azaserin, các bleomycin, tamoxifen, idarubixin, các dolastatin/auristatin, các hemiasterlin các maytasinoid và các esperamixin.

Theo phương án ưu tiên, thuốc gây độc tế bào là gama calicheamixin hoặc N-axetyl calicheamixin.

Theo phương án khác, việc điều trị bao gồm cung cấp thể liên hợp thuốc gây độc tế bào theo sáng chế với một hoặc nhiều tác nhân có hoạt tính sinh học được chọn từ các kháng thể, các yếu tố sinh trưởng, các hormon, các xytokin, các chất kháng hormon, các xantin, các interleukin, các interferon và các thuốc gây độc tế bào.

Theo phương án ưu tiên, tác nhân có hoạt tính sinh học là kháng thể và kháng kháng nguyên bề mặt tế bào được biểu hiện trên các tế bào B ác tính. Theo phương án ưu tiên khác, kháng thể kháng các kháng nguyên bề mặt tế bào được biểu hiện trên các tế bào B ác tính được chọn từ nhóm bao gồm các kháng thể kháng CD19, kháng CD20 và kháng CD33. Các kháng thể như vậy bao gồm kháng thể kháng CD20, rituximab (RituxanTM).

Theo phương án khác, các tác nhân có hoạt tính sinh học là các xytokin hoặc các yếu tố sinh trưởng và bao gồm, không giới hạn, interleukin-2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF và G-CSF.

Theo phương án khác, các tác nhân có hoạt tính sinh học là các hormon và bao gồm các estrogen, các androgen, các progestin và các corticosteroid.

Theo phương án khác nữa, tác nhân có hoạt tính sinh học là thuốc gây độc tế bào được chọn từ doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, aclarubicin, zorubicin, mitoxantron, epirubicin, carubicin, nogalamyxin, menogaril, pitarubicin, valrubicin, xytarabin, gemxitabin, trifluridin, anxitabin, enoxitabin, azaxitidin, doxifluridin, gougérotin, puromyxin, tegafo, tiazoferin, adriamycin, xisplatin, carboplatin, xyclophosphamid, dacarbazin, vinblastin, mitoxantron, bleomycin, mecloetamin, prednison, procarbazine, metotrexat, flurouraxil, etoposid, taxol, các chất tương tự taxol, và mitomycin.

Theo phương án ưu tiên, được phẩm có hiệu quả chữa trị của thể liên hợp thuốc gây độc tế bào-kháng thể kháng CD22 được cung cấp cùng với một hoặc nhiều tổ hợp tác nhân gây độc tế bào dưới dạng một phần của chế độ điều trị, trong đó hỗn hợp tác nhân gây độc tế bào được chọn từ: CHOP (xyclophosphamid, doxorubicin, vincristin, prednison và procarbazine); CHOP (xyclophosphamid, doxorubicin, vincristin và prednison); COP (xyclophosphamid, vincristin và prednison); CAP-BOP (xyclophosphamid, doxorubicin, procarbazine, bleomycin, vincristin và prednison); m-BACOD (metotrexat, bleomycin, doxorubicin, xyclophosphamid, vincristin, dexametazon và leucovorin); ProMACE-MOPP (prednison, metotrexat, doxorubicin, xyclophosphamid, etoposid, leucovorin, vincristin và procarbazine); ProMACE-CytaBOM (prednison, metotrexat, doxorubicin, xyclophosphamid, etoposid, leucovorin, xytarabin, bleomycin và vincristin); MACOP-B (metotrexat, doxorubicin, xyclophosphamid, vincristin, prednison, bleomycin và leucovorin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazine); ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastin và dacarbazin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazine) xen kẽ với ABV (adriamycin/doxorubicin, bleomycin và vinblastin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazine) xen kẽ với ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastin và dacarbazin); ChIVPP (clorambuxil, vinblastin, dacarbazin và prednison); IMVP-16 (ifosfamid, metotrexat và etoposid); MIME (metyl-gag, ifosfamid, metotrexat và etoposid); DHAP (dexametazon, xytarabin liều cao và xisplatin); ESHAP (etoposid, metylprednison, xytarabin liều cao và xisplatin); CEPP(B) (xyclophosphamid, etoposid, procarbazine, prednison và

bleomycin); CAMP (lomustin, mitoxantron, xytarabin và prednizon); và CVP-1 (xyclophosphamit, vincristin và prednizon).

Theo phương án ưu tiên, dược phẩm có hiệu quả chữa trị của thể liên hợp thuốc gây độc tế bào-kháng thể kháng CD22 được cung cấp trước khi cung cấp một hoặc nhiều tổ hợp thuốc gây độc tế bào trên đây. Theo phương án ưu tiên khác, dược phẩm có hiệu quả chữa trị của thể liên hợp thuốc gây độc tế bào-kháng thể kháng CD22 được cung cấp sau khi cung cấp một hoặc nhiều tổ hợp thuốc gây độc tế bào trên đây dưới dạng một phần của chế độ điều trị.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh u lympho cấp tính, bao gồm việc cung cấp cho bệnh nhân đang cần điều trị bệnh này dược phẩm có hiệu quả chữa trị của thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 cùng với một hoặc nhiều tác nhân có hoạt tính sinh học.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến việc sử dụng dược phẩm theo sáng chế để điều trị cho đối tượng mắc bệnh rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư. Đặc biệt là, bệnh ung thư này là bệnh ác tính tế bào B, biểu hiện kháng nguyên CD22 trên bề mặt tế bào này. Đặc biệt là, bệnh ác tính tế bào B hoặc là bệnh bạch cầu hoặc là bệnh u lympho. Theo một phương án, bệnh ung thư này là bệnh ung thư biểu mô hoặc bệnh bạch cầu.

Theo một phương án, liều có hiệu quả chữa trị của dược phẩm sẽ được cung cấp qua đường dưới da, qua đường trong màng bụng, qua đường trong tĩnh mạch, qua đường trong động mạch, qua đường trong tuỷ, qua đường trong vỏ, qua biểu bì, qua da, qua đường trong mũi, tại chỗ, qua đường ruột, qua đường trong âm đạo, qua đường dưới lưỡi hoặc qua đường trực tràng.

Theo phương án ưu tiên, liều có hiệu quả chữa trị của dược phẩm theo sáng chế sẽ được cung cấp qua đường trong tĩnh mạch.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến việc sử dụng thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 theo sáng chế để điều trị cho đối tượng mắc bệnh ác tính tế bào B như bệnh u lympho không Hodgkin. Theo một phương án, thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 được cung cấp với một hoặc nhiều tác nhân có hoạt tính sinh học.

Theo một phương án, các tác nhân có hoạt tính sinh học được chọn từ nhóm bao gồm các kháng thể, các yếu tố sinh trưởng, các hormon, các xytokin, các chất kháng hormon, các xantin, các interleukin, các interferon và các thuốc gây độc tế bào.

Theo phương án ưu tiên, tác nhân có hoạt tính sinh học là kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt tế bào được biểu hiện trên các tế bào B ác tính, ví dụ các kháng thể kháng CD19, kháng CD20 và kháng CD33. Theo phương án ưu tiên, kháng thể kháng CD20 là rituximab (RituxanTM).

Theo phương án khác, các tác nhân có hoạt tính sinh học bao gồm các xytokin hoặc các yếu tố sinh trưởng như interleukin-2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF và G-CSF hoặc các hormon, các hormon này bao gồm các estrogen, các androgen, các progestin và các corticosteroid.

Theo phương án khác, tác nhân có hoạt tính sinh học là thuốc gây độc tế bào được chọn từ doxorubixin, daunorubixin, idarubixin, aclarubixin, zorubixin, mitoxantron, epirubixin, carubixin, nogalamyxin, menogaril, pitarubixin, valrubixin, xytarabin, gemxitabin, trifluridin, anxitabin, enoxitabin, azaxitidin, doxifluridin, pentostatin, broxuridin, capexitabin, cladribin, dexitabin, floxuridin, fludarabin, gougerotin, puromyxin, tegafo, tiazofofurin, adriamycin, xisplatin, carboplatin, xyclophosphamit, dacarbazin, vinblastin, vincristin, mitoxantron, bleomycin, mecloretamin, prednizon, procarbazin, metotrexat, fluorouraxil, etopozit, taxol, các chất tương tự taxol, và mitomycin.

Theo phương án ưu tiên, liệu có hiệu quả chữa trị của thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 được cung cấp cùng với một hoặc nhiều tổ hợp tác nhân gây độc tế bào dưới dạng một phần của chế độ điều trị, trong đó hỗn hợp tác nhân gây độc tế bào được chọn từ: CHOP (xyclophosphamit, doxorubixin, vincristin, prednizon và procarbazin); CHOP (xyclophosphamit, doxorubixin, vincristin và prednizon); COP (xyclophosphamit, vincristin và prednizon); CAP-BOP (xyclophosphamit, doxorubixin, procarbazin, bleomycin, vincristin và prednizon); m-BACOD (metotrexat, bleomycin, doxorubixin, xyclophosphamit, vincristin, dexametazon và leucovorin); ProMACE-MOPP (prednizon, metotrexat, doxorubixin, xyclophosphamit, etopozit, leucovorin, vincristin và procarbazin); ProMACE-CytaBOM (prednizon, metotrexat, doxorubixin,

xyclorophosphamit, etopozit, leucovorin, xytarabin, bleomycin và vincristin); MACOP-B (metotrexat, doxorubicin, xyclorophosphamit, vincristin, prednison, bleomycin và leucovorin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazin); ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastin và dacarbazin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazin) xen kẽ với ABV (adriamycin/doxorubicin, bleomycin và vinblastin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazin) xen kẽ với ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastin và dacarbazin); ChIVPP (clorambuxil, vinblastin, dacarbazin và prednison); IMVP-16 (ifosfamid, metotrexat và etopozit); MIME (metyl-gag, ifosfamid, metotrexat và etopozit); DHAP (dexametazon, xytarabin liều cao và xisplatin); ESHAP (etopozit, metylprednison, xytarabin liều cao và xisplatin); CEPP(B) (xyclorophosphamit, etopozit, procarbazin, prednison và bleomycin); CAMP (lomustin, mitoxantron, xytarabin và prednison); và CVP-1 (xyclorophosphamit, vincristin và prednison); ESHOP (etopozit, metylprednison, xytarabin liều cao, vincristin và xisplatin); EPOCH (etopozit, vincristin và doxorubicin trong 96 giờ với các liều lớn duy nhất xyclorophosphamit và prednison qua đường miệng); ICE (ifosfamid, xyclorophosphamit và etopozit); CEPP(B) (xyclorophosphamit, etopozit, procarbazin, prednison và bleomycin); CHOPP-B (xyclorophosphamit, doxorubicin, vincristin, prednison và bleomycin); CEPP-B (xyclorophosphamit, etopozit, procarbazin và bleomycin) và P/DOCE (epirubicin hoặc doxorubicin, vincristin, xyclorophosphamit và prednison).

Theo một phương án ưu tiên, thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 được cung cấp trước khi cung cấp một hoặc nhiều tổ hợp thuốc gây độc tế bào dưới dạng một phần của chế độ điều trị.

Theo phương án ưu tiên khác, liệu có hiệu quả chữa trị thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 được cung cấp sau khi cung cấp một hoặc nhiều tổ hợp thuốc gây độc tế bào dưới dạng một phần của chế độ điều trị.

Theo phương án ưu tiên khác nữa, liệu có hiệu quả chữa trị thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 được cung cấp cùng với kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt tế bào trên các tế bào B ác tính và bao gồm tùy chọn một hoặc nhiều tổ hợp thuốc gây độc tế bào dưới dạng một phần của chế độ điều trị.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể kháng CD22 theo sáng chế để sản xuất thuốc điều trị bệnh rối loạn tăng sinh. Thuốc như vậy có thể được sử dụng để điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh một cách đơn độc hoặc kết hợp với các tác nhân có hoạt tính sinh học khác.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện trình tự axit amin của các CDR của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt (SEQ ID NO:1-6).

Fig.2 thể hiện trình tự ADN và trình tự protein của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể đơn dòng chuột nhắt 5/44.

Fig.3 thể hiện trình tự đầy đủ vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của kháng thể đơn dòng chuột nhắt 5/44.

Fig.4 thể hiện chiến lược loại bỏ vị trí glycozyl hoá và lyzin phản ứng trong CDR-H2.

Fig.5 thể hiện mẫu ghép đối với trình tự chuỗi nhẹ 5/44. DPK-9 là trình tự làm khung thể nhận dòng mầm của người. Các đường thẳng đứng chỉ ra các khác biệt giữa các gốc của chuột nhắt và người. Các trình tự được gạch chân chỉ ra các gốc thể cho mà vẫn được giữ lại trong mảnh ghép. Các CDR được chỉ ra bằng các chữ cái in nghiêng đậm (không được thể hiện đối với DPK-9). Mảnh ghép gL1 có 6 gốc làm khung thể cho, gL2 có 7 gốc làm khung thể cho.

Fig.6 thể hiện mẫu ghép đối với trình tự chuỗi nặng 5/44. DP7 là trình tự làm khung thể nhận dòng mầm của người. Các đường thẳng đứng chỉ ra các khác biệt giữa các gốc của chuột nhắt và người. Các trình tự được gạch chân chỉ ra các gốc thể cho mà vẫn được giữ lại trong mảnh ghép. Các CDR được chỉ ra bằng các chữ cái in nghiêng đậm (không được thể hiện đối với DP7). Mảnh ghép gH4 và gH6 có 6 gốc làm khung thể cho. Các mảnh ghép gH5 và gH7 có 4 gốc làm khung thể cho.

Fig.7 thể hiện bản đồ vector pMRR14.

Fig.8 thể hiện bản đồ vector pMRR10.1.

Fig.9 thể hiện các kết quả thử nghiệm Biacore của các thể đột biến 5/44 dạng khảm.

Fig.10 thể hiện các oligonucleotit đối với các tổ hợp gen gH1 và gL1 của 5/44.

Fig.11 thể hiện bản đồ plasmit của vectơ trung gian pCR2.1(544gH1).

Fig.12 thể hiện bản đồ plasmit của vectơ trung gian pCR2.1(544gL1).

Fig.13 thể hiện các đoạn oligonucleotit được sử dụng để tạo ra các mảnh ghép lớn hơn.

Fig.14 là đồ thị thể hiện thử nghiệm cạnh tranh giữa kháng thể 5/44 của chuột nhắt được đánh dấu huỳnh quang và các thể biến dị được ghép.

Fig.15 là đồ thị thể hiện thử nghiệm cạnh tranh giữa kháng thể 5/44 của chuột nhắt được đánh dấu huỳnh quang và các thể biến dị được ghép.

Fig.16 thể hiện trình tự ADN và protein đầy đủ của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được ghép.

Fig.17 là sơ đồ tượng trưng thể liên hợp kháng thể-NAc-gama calicheamixin DMH.

Fig.18 là đồ thị thể hiện tác dụng của CMC-544 đến sự tăng sinh u lympho tế bào B RAMOS.

Fig.19 là đồ thị thể hiện tác dụng của CMC-544 đến các u lympho tế bào B lớn theo mô hình dị ghép trong cơ thể ở chuột nhắt trần.

Fig.20 là đồ thị so sánh các tác dụng của CMC-544 được thực hiện với quá trình liên hợp CMA-676 và quá trình liên hợp CMC-544 đến sự tăng sinh của u lympho RL.

Fig.21 là đồ thị cho thấy rằng u lympho RL lớn được điều trị bằng rituximab (RituxanTM) nhạy với việc điều trị bằng CMC-544.

Fig.22 là đồ thị thể hiện tác dụng của rituximab (RituxanTM) đến tác dụng gây độc tế bào của CMC-544.

Fig.23 là đồ thị thể hiện tác dụng của CMC-544, rituximab (RituxanTM) và CMA-676 đến sự sống sót của các chuột nhắt SCID có u lympho B RAMOS ác tính sớm.

Fig.24 là đồ thị thể hiện tác dụng của CMC-544, rituximab (Rituxan™) và CMA-676 đến sự sống sót của các chuột nhắt SCID có u lympho B RAMOS ác tính muộn.

Fig.25 là đồ thị thể hiện tác dụng của CMC-544, rituximab (Rituxan™) và CMA-676 đến sự sống sót của các chuột nhắt SCID có u lympho B RAMOS ác tính muộn.

Fig.26 là đồ thị thể hiện tác dụng của CMC-544, rituximab (Rituxan™) và CMA-676 đến sự sống sót của các chuột nhắt SCID có u lympho B RAMOS ác tính muộn.

Fig.27 là đồ thị thể hiện tác dụng của CMC-544, rituximab (Rituxan™) và CMA-676 đến sự sống sót của các chuột nhắt SCID có u lympho B RAMOS ác tính muộn.

Fig.28 là đồ thị thể hiện hoạt tính chống ung thư của CMC-544 có và không có rituximab (Rituxan™) đối với u lympho RL không Hodgkin.

Fig.29 là đồ thị thể hiện hoạt tính chống ung thư của CMC-544 và CHOP đối với u lympho RL không Hodgkin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thể liên hợp theo sáng chế bao gồm thuốc gây độc tế bào được tạo dẫn xuất bằng một thành phần liên kết có nhóm phản ứng bất kỳ, nhóm này phản ứng được với chất mang có bản chất protein để tạo ra thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào-chất mang có bản chất protein. Đặc biệt là, các thể liên hợp theo sáng chế chế bao gồm thuốc gây độc tế bào được tạo dẫn xuất bằng một thành phần liên kết có nhóm phản ứng bất kỳ, nhóm này phản ứng được với kháng thể được sử dụng làm chất mang có bản chất protein để tạo ra thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào-kháng thể. Đặc biệt là, kháng thể này phản ứng kháng kháng nguyên bề mặt tế bào trên các tế bào B ác tính. Được mô tả dưới đây là quy trình cải tiến để tạo ra và tinh chế các thể liên hợp như vậy. Việc sử dụng các đồng dung môi, các chất phụ trợ và các điều kiện phản ứng đặc hiệu cụ thể cùng với quy trình tách sẽ tạo ra thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/kháng thể với sự giảm đáng kể LCF. Dạng đơn thể này so với dạng kết tụ có hiệu quả chữa trị cao hơn đáng kể, làm giảm thiểu LCF, và sự kết tụ hầu như

giảm tạo ra khả năng ứng dụng nguyên liệu kháng thể để chữa bệnh bằng cách ngăn không cho LCF cạnh tranh với phân đoạn liên hợp cao hơn (HCF).

I. Các chất mang

Các chất mang/các tác nhân hướng đích theo sáng chế tốt hơn là các chất mang có bản chất protein/các tác nhân hướng đích. Ví dụ về các chất mang/các tác nhân hướng đích bao gồm các hormon, các yếu tố sinh trưởng, các kháng thể, các đoạn kháng thể, các chất tương tự kháng thể và các bản sao của chúng đã được thao tác về mặt di truyền hoặc bằng enzym, sau đây được chỉ ra dưới dạng số ít hoặc dưới dạng nhóm “các chất mang”. Đặc tính cơ bản của chất mang là khả năng nhận biết và liên kết với kháng nguyên hoặc thụ thể liên kết với các tế bào không mong muốn và sau đó sẽ được hấp thụ. Ví dụ về các chất mang được mô tả trong bằng Mỹ số 5053394. Các chất mang được ưu tiên để sử dụng theo sáng chế là các kháng thể và các chất tương tự kháng thể.

Một số khung protein không phải globulin miễn dịch đã được sử dụng để tạo ra các chất tương tự kháng thể, liên kết với các epitop kháng nguyên có tính đặc hiệu của một kháng thể (Công bố đơn PCT số WO 00/34784). Ví dụ, khung “minibody”, liên quan đến sự gấp nếp của globulin miễn dịch, đã được thiết kế bằng cách loại bỏ 3 sợi beta ra khỏi vùng viền đôi của chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng (Tramontano et al., J. Mol. Recognit. 7:9, 1994). Protein này bao gồm 61 gốc axit amin và có thể được sử dụng để biểu hiện 2 vòng xoắn siêu biến. Hai vòng xoắn này là ngẫu nhiên và là các sản phẩm được lựa chọn để liên kết với kháng nguyên nhưng đến đây khung này lại có khả năng ứng dụng phần nào bị giới hạn do các vấn đề về độ hoà tan. Khung khác được sử dụng để biểu hiện các vòng xoắn là tendamistat, một protein ức chế đặc hiệu các alpha-amilaza của động vật có vú và có dạng tám nếp beta 6 sợi, gồm 74 gốc axit amin, được liên kết với nhau bằng 2 liên kết disulfit (McConnell and Hoess, J. Mol. Biol. 250:460, 1995). Khung này bao gồm 3 vòng xoắn nhưng tới nay chỉ có 2 trong 3 vòng xoắn này được kiểm tra khả năng ngẫu nhiên hoá.

Các protein khác đã được thử làm khung và đã được sử dụng để biểu hiện các gốc ngẫu nhiên trên các bề mặt xoắn alpha (Nord et al., Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord et al., Protein Eng. 8:601, 1995), các vòng xoắn giữa các xoắn alpha trong các cuộn xoắn alpha (Ku and Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6552, 1995) và các

vòng xoắn được neo với nhau bằng các liên kết cầu disulfit, chẳng hạn các vòng xoắn của các chất ức chế proteaza nhỏ (Marland et al., Biochemistry 35:8045, 1996; Marland et al., Biochemistry 35:8058, 1996; Rottgen and Collins, Gene 164:243, 1995; Wang et al., J. Biol. Chem. 270:12250, 1995).

Ví dụ về các chất mang kháng thể mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng, các kháng thể dạng khảm, các kháng thể được làm tương thích với người, các kháng thể người và các đoạn có hoạt tính sinh học của chúng. Tốt hơn là, các kháng thể như vậy kháng các kháng nguyên bề mặt tế bào được biểu hiện trên các tế bào đích và/hoặc các mô đích ở các bệnh rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư. Ví dụ về các kháng thể đặc hiệu kháng các kháng nguyên bề mặt tế bào trên các tế bào đích bao gồm, không giới hạn, các kháng thể kháng kháng nguyên CD22, kháng nguyên này biểu hiện quá mức trên hầu hết các u lympho tế bào B; G5/44, một dạng được là tương thích với người của kháng thể đơn dòng kháng CD22 của chuột; các kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt tế bào CD33, kháng nguyên này biểu hiện trên một số u tủy của người, nhất là bệnh bạch cầu tủy cấp; hP67.6, một dạng được là tương thích với người của kháng thể chuột kháng CD33 (bằng Mỹ số 5773001); kháng thể kháng kháng nguyên PEM được phát hiện trên nhiều u nguyên bào mô, được ký hiệu là mP67.6 (I.D. Bernstein et al., J. Clin. Invest. 79:1153 (1987) và I.D. Bernstein et al., J. Immunol. 128:867-881 (1992)) và kháng thể được làm tương thích với người kháng kháng nguyên Lewis Y cacbohydrat biểu hiện quá mức trên nhiều u rắn, được ký hiệu là hu3S193 (bằng Mỹ số 6310185 B1). Ngoài ra, một số kháng thể được bán trên thị trường như rituximab (Rituxan™) và trastuzumab (Herceptin™) cũng có thể được sử dụng làm các chất mang/các tác nhân hướng đích. Rituximab (Rituxan™) là kháng thể kháng CD20 dạng khảm được sử dụng để điều trị các u lympho tế bào B khác nhau còn trastuzumab (Herceptin™) là kháng thể kháng Her2 được là tương thích với người được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú.

Được lấy làm ví dụ ở đây đối với việc sử dụng làm chất mang theo sáng chế là phân tử kháng thể được làm tương thích với người được ghép CDR, kháng kháng nguyên bề mặt tế bào CD22 và được ký hiệu là G5/44. Kháng thể này là dạng được là tương thích với người của kháng thể đơn dòng kháng CD22 của chuột mà kháng kháng nguyên bề mặt tế bào CD22 biểu hiện trên một số u lympho của người. Thuật ngữ “phân tử kháng thể được ghép CDR” được sử dụng ở đây để chỉ phân tử kháng thể,

trong đó chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa một hoặc nhiều vùng quyết định bổ thể (các CDR) bao gồm, nếu cần, CDR cải biến (sau đây gọi là CDR) từ kháng thể cho (ví dụ kháng thể đơn dòng của chuột) được ghép vào khung vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể nhận (ví dụ kháng thể người). Tốt hơn là, kháng thể được ghép CDR như vậy có vùng biến đổi bao gồm các vùng khung thể nhận của người cũng như một hoặc nhiều CDR được chỉ ra trên đây.

khi các CDR được ghép, trình tự khung vùng biến đổi bất kỳ của thể nhận thích hợp có thể được sử dụng cho lớp/loại kháng thể thể cho mà các CDR được tạo ra từ đó, bao gồm các vùng khung của chuột nhất, linh trưởng và người. Ví dụ về các khung của người mà có thể được sử dụng theo sáng chế là KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY và POM (Kabat et al., Seq. of Proteins of Immunol. Interest, 1:310-334 (1994)). Ví dụ, KOL và NEWM có thể được sử dụng đối với chuỗi nặng, REI có thể được sử dụng đối với chuỗi nhẹ và EU, LAY và POM có thể được sử dụng đối với cả chuỗi nặng lẫn chuỗi nhẹ.

Trong kháng thể được ghép CDR theo sáng chế, kháng thể nhận được ưu tiên sử dụng là kháng thể có các chuỗi tương đồng với các chuỗi của kháng thể cho. Các chuỗi nặng và nhẹ của thể nhận không nhất thiết phải có nguồn gốc từ cùng một kháng thể và, nếu cần, có thể bao gồm các chuỗi kết hợp có các vùng khung có nguồn gốc từ các chuỗi khác nhau.

Tương tự, trong kháng thể được ghép CDR theo sáng chế, các vùng khung không cần có trình tự chính xác như các vùng khung của kháng thể thể nhận. Ví dụ, các gốc bất thường có thể được thay đổi thành các gốc thường xảy ra hơn đối với lớp hoặc loại chuỗi thể nhận đó. Theo sách khác, các gốc được lựa chọn trong các vùng khung của thể nhận có thể được thay đổi sao cho chúng tương ứng với gốc được tìm thấy ở cùng vị trí này trong kháng thể thể cho hoặc tương ứng với gốc mà sự thay thế bảo toàn đối với gốc này được tìm thấy ở cùng vị trí trong kháng thể thể cho. Những thay đổi này nên giữ ở mức cần thiết tối thiểu để phục hồi ái lực của kháng thể thể cho. Quy trình để lựa chọn các gốc trong các vùng khung thể nhận mà có thể cần được thay đổi được đề cập trong Công bố đơn PCT số WO 91/09967.

Các gốc thể cho là các gốc từ kháng thể thể cho, tức là kháng thể mà các CDR có nguồn gốc từ đó.

Kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi là CDR-H2 (như được xác định bởi Kabat et al., Seq. of Proteins of Immunol. Interest, 1:310-334 (1994)) có trình tự H2' mà trình tự vị trí glycozyl hóa tiềm ẩn đã được loại bỏ để làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi là CDR-H2 (như được xác định bởi Kabat et al., Seq. of Proteins of Immunol. Interest, 1:310-334 (1994)) có trình tự H2'' với gốc lyzin ở vị trí 60. Gốc lyzin này, được định vị ở vị trí tiếp xúc trong CDR-H2 và được coi là có khả năng phản ứng với các tác nhân liên hợp dẫn đến sự giảm ái lực liên kết với kháng nguyên, sẽ được thay thế bằng axit amin khác.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi là CDR-H2 (như được xác định bởi Kabat et al., Seq. of Proteins of Immunol. Interest, 1:310-334 (1994)) có trình tự H2''' mà cả trình tự vị trí glycozyl hóa tiềm ẩn lẫn gốc lyzin ở vị trí 60 đều được thay thế bằng các axit amin khác.

Kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm: kháng thể hoàn chỉnh với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ; đoạn có hoạt tính sinh học của nó, ví dụ Fab, Fab cải biến, Fab', F(ab')₂ hoặc đoạn Fv; monome hoặc dime chuỗi nhẹ hoặc nặng; hoặc kháng thể chuỗi đơn như Fv chuỗi đơn, trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nối với nhau bằng peptit liên kết. Tương tự, các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được liên kết với các vùng kháng thể khác nếu thích hợp.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể bao gồm đoạn Fab được cải biến, trong đó việc cải biến là bổ sung một hoặc nhiều axit amin để gắn phân tử tác động hoặc thụ thể vào đầu tận cùng C của chuỗi nặng của nó. Tốt hơn là, các axit amin bổ sung tạo thành vùng nối cải biến chứa một hoặc hai gốc xystein để phân tử tác động hoặc thụ thể có thể được gắn vào.

Các miền của vùng hằng định của kháng thể theo sáng chế, nếu có, có thể được chọn để có chức năng dự định của kháng thể này, đặc biệt là các chức năng tác động mà có thể cần thiết hoặc không cần thiết. Ví dụ, các khu của vùng hằng định có thể là các khu IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM của người. Đặc biệt là, các khu của vùng hằng định của IgG người có thể được sử dụng, nhất là các isotyp IgG1 và IgG3 khi các

kháng thể này được sử dụng nhằm mục đích chữa bệnh và các chức năng tác động của kháng thể là cần thiết. Theo cách khác, các isotyp IgG2 và IgG4 có thể được sử dụng hoặc vùng Fc của IgG1 có thể được gây đột biến để loại bỏ chức năng tác động khi kháng thể này được sử dụng nhằm mục đích chữa bệnh và các chức năng tác động của kháng thể sẽ không bắt buộc hoặc không cần thiết.

Kháng thể được mô tả có thể có mức ái lực liên kết ít nhất là $5 \times 10^{-8} \text{M}$, tốt hơn là có mức ái lực liên kết ít nhất là $5 \times 10^{-9} \text{M}$, tốt hơn nữa là có mức ái lực liên kết ít nhất là $0,75 \times 10^{-10} \text{M}$, và tốt nhất là có mức ái lực liên kết ít nhất là $0,5 \times 10^{-10} \text{M}$.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến các thể liên hợp độc tố miễn dịch và bản mô tả đề cập đến các phương pháp để tạo ra các thể liên hợp này bằng cách sử dụng các thể biến dị kháng thể hoặc các chất tương tự kháng thể. Theo phương án ưu tiên, các thể biến dị của kháng thể theo sáng chế sẽ kháng CD22 và thể hiện ái lực được cải thiện đối với CD22. Các thể biến dị như vậy có thể thu được bằng một số quy trình thuần thực ái lực, bao gồm việc gây đột biến các CDR (Yang et al., J. Mol. Biol. 254, 392-403, 1995), sắp xếp lại chuỗi (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), sử dụng các chủng đột biến của E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 260, 359-368, 1996), sắp xếp lại ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), biểu hiện thể thực khuẩn (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) và PCR lồng (Cramer et al., 391, 288-291, 1998).

Bất kỳ hệ tế bào chủ/vector nào thích hợp đều có thể được sử dụng để biểu hiện các trình tự ADN mã hóa chất mang bao gồm các kháng thể theo sáng chế. Hệ vi khuẩn, ví dụ E. coli, và các hệ vi sinh vật khác có thể được sử dụng ở chủng mục nhất định để biểu hiện các đoạn kháng thể như các đoạn Fab và $F(ab')_2$, đặc biệt là các đoạn Fv và các đoạn kháng thể chuỗi đơn, ví dụ các Fv chuỗi đơn. Các hệ biểu hiện là tế bào chủ có nhân điển hình, ví dụ tế bào động vật có vú, có thể được sử dụng để sản sinh các kháng thể lớn hơn bao gồm các phân tử kháng thể hoàn chỉnh. Các tế bào chủ động vật có vú thích hợp bao gồm các tế bào CHO, các tế bào u tủy, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, các tế bào thể lai, các tế bào NSO, VERO hoặc PER C6. Các hệ biểu hiện thích hợp còn bao gồm các động vật và thực vật chuyển gen.

II. Các tác nhân chữa bệnh

Các tác nhân chữa bệnh thích hợp cho việc sử dụng theo sáng chế là các thuốc gây độc tế bào có tác dụng ức chế hoặc phá vỡ quá trình trùng hợp tubulin, các tác nhân alkyl hóa có tác dụng liên kết và phá hủy ADN, và các tác nhân ức chế quá trình tổng hợp protein hoặc các protein cần thiết của tế bào như các protein kinaza, các enzym và các cyclin. Ví dụ về các thuốc gây độc tế bào như vậy bao gồm, không giới hạn, tiotepa, các taxan, vincristin, daunorubixin, doxorubixin, epirubixin, actinomycin, autramycin, các azaserin, các bleomycin, tamoxifen, idarubixin, các dolastatin/auristatin, các hemiasterlin, calicheamixin, các esperamixin và các maytasinoit. Các thuốc gây độc tế bào được ưu tiên là các calicheamixin, ví dụ các chất kháng sinh chống ung thư methyl trisulfit. Ví dụ về các calicheamixin thích hợp cho việc sử dụng theo sáng chế được mô tả, ví dụ, trong bằng Mỹ các số 4671958, 4970198, 5053394, 5037651 và 5079233. Các calicheamixin được ưu tiên là các dẫn xuất gama- calicheamixin hoặc các dẫn xuất N-acetyl gama- calicheamixin.

III. Các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào/chất mang

Các thể liên hợp theo sáng chế có công thức: $\text{Pr}(-\text{X}-\text{W})_m$

trong đó:

Pr là chất mang có bản chất protein;

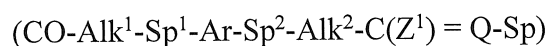
X là liên kết bao gồm sản phẩm của nhóm phản ứng bất kỳ mà có thể phản ứng với chất mang có bản chất protein;

W là thuốc gây độc tế bào;

m là mức tải trung bình đối với sản phẩm liên hợp đã được tinh chế sao cho calicheamixin chiếm từ 4 đến 10% khối lượng thể liên hợp; và

$(-\text{X}-\text{W})_m$ là thuốc gây độc tế bào

tốt hơn là, X có công thức



trong đó

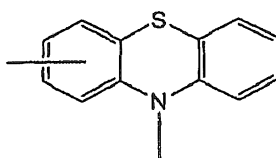
Alk^1 và Alk^2 độc lập là liên kết hoặc mạch alkylen (C_1-C_{10}) phân nhánh hoặc không phân nhánh;

Sp^1 là liên kết, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, -NR'-, -N(CH₂CH₂)₂N- hoặc -X-Ar'-Y-(CH₂)_n-Z, trong đó X, Y và Z độc lập là liên kết, -NR'-, -S- hoặc -O-, với điều kiện khi n=0 thì ít nhất một trong số Y và Z phải là liên kết và Ar' là 1,2-, 1,3- hoặc 1,4-phenylen được thế tùy ý bằng một, hai hoặc ba nhóm trong số (C₁-C₅)alkyl, (C₁-C₄)alkoxy, (C₁-C₄)tioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', -(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' hoặc -S(CH₂)_nCONHR', với điều kiện khi Alk¹ là liên kết, Sp^1 là liên kết;

n là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 5;

R' là mạch (C₁-C₅) phân nhánh hoặc không phân nhánh được thế tùy ý bằng một hoặc hai nhóm trong số -OH, (C₁-C₄)alkoxy, (C₁-C₄)tioalkoxy, halogen, nitro, (C₁-C₃)dialkylamino hoặc (C₁-C₅)trialkylamoni-A⁻, trong đó A⁻ là anion được dùng tạo muối;

Ar là 1,2-, 1,3- hoặc 1,4-phenylen được thế tùy ý bằng một, hai hoặc ba nhóm trong số (C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₅)alkoxy, (C₁-C₄)tioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' hoặc -S(CH₂)_nCONHR', trong đó n và R' được xác định như trên hoặc là 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- hoặc 2,7-naphtyliden hoặc



với mỗi naphtyliden hoặc phenotiazin được thế tùy ý bằng một, hai, ba hoặc bốn nhóm trong số (C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₅)alkoxy, (C₁-C₄)tioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', hoặc -S(CH₂)_nCONHR', trong đó n và R' được xác định như trên, với điều kiện khi Ar là phenotiazin thì Sp^1 là liên kết chỉ liên kết với nitơ;

Sp^2 là liên kết, -S- hoặc -O-, với điều kiện khi Alk² là liên kết thì Sp^2 là liên kết;

Z¹ là H, (C₁-C₅)alkyl hoặc phenyl được thế tùy ý bằng một, hai hoặc ba nhóm trong số (C₁-C₅)alkyl, (C₁-C₅)alkoxy, (C₁-C₄)tioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' hoặc -S(CH₂)_nCONHR', trong đó n và R' được xác định như trên; Sp là gốc (C₁-C₁₈) có hoá

trị hai hoặc ba dạng mạch thẳng hoặc phân nhánh, gốc aryl hoặc heteroaryl có hoá trị hai hoặc ba, gốc (C_3-C_{18}) xycloalkyl hoặc heteroxycloalkyl có hoá trị hai hoặc ba, gốc aryl- hoặc heteroaryl-aryl(C_1-C_{18}) có hoá trị hai hoặc ba, gốc xycloalkyl- hoặc heteroxycloalkyl-alkyl(C_1-C_{18}) có hoá trị hai hoặc ba hoặc gốc alkyl (C_2-C_{18}) không no, trong đó heteroaryl tốt hơn là furyl, thienyl, N-methylpyrolyl, pyridinyl, N-methylimidazolyl, oxazolyl, pyrimidinyl, quinolyl, isoquinolyl, N-methylcacbazoyl, aminocourmarinyl hoặc phenazinyl và trong đó nếu Sp là gốc hoá trị ba thì Sp có thể được thế tiếp bằng (C_1-C_5) dialkylamino thấp, (C_1-C_5) alkoxy thấp, hydroxy hoặc các nhóm (C_1-C_5) alkyltio thấp; và

Q là =NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH- hoặc =NHO-.

Tốt hơn là, Alk^1 là mạch alkylen (C_1-C_{10}) phân nhánh hoặc không phân nhánh; Sp' là liên kết, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO- hoặc -NR'-, trong đó R' được xác định như trên, với điều kiện khi Alk^1 là liên kết thì Sp^1 là liên kết;

Ar là 1,2-, 1,3- hoặc 1,4-phenylen được thế tùy ý bằng một, hai hoặc ba nhóm trong số (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_5) alkoxy, (C_1-C_4) tioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' hoặc -S(CH₂)_nCONHR', trong đó n và R' được xác định như trên hoặc Ar là 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- hoặc 2,7-naphtyliden, mỗi phenylen hoặc naphtyliden được thế tùy ý bằng một, hai, ba hoặc bốn nhóm trong số (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_5) alkoxy, (C_1-C_4) tioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', hoặc -S(CH₂)_nCONHR'.

Z^1 là (C_1-C_5) alkyl hoặc phenyl được thế tùy ý bằng một, hai hoặc ba nhóm trong số (C_1-C_5) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, (C_1-C_4) tioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' hoặc -S(CH₂)_nCONHR'; Alk^2 và Sp^2 đều là liên kết còn Sp và Q được xác định trên đây.

Bảng Mỹ số 5773001 mô tả các chất liên kết mà có thể được sử dụng với các dẫn xuất ái nhân, đặc biệt là các hydrazit và các chất ái nhân có liên quan, được tạo ra từ các calicheamixin. Các thành phần liên kết này đặc biệt hữu ích trong các trường hợp mà hoạt tính tốt hơn sẽ được thu nhận khi liên kết được hình thành giữa thuốc và thành phần liên kết thuỷ phân được. Các thành phần liên kết này chứa hai nhóm chức. Một nhóm thường là axit cacboxylic được dùng để phản ứng với chất mang.

Nhóm chức axit này, khi được hoạt hoá chính xác, có thể tạo ra liên kết amit với nhóm amin tự do của chất mang, ví dụ amin ở mạch bên của lyzin của kháng thể hoặc chất mang có bản chất protein khác. nhóm chức còn lại thường là nhóm cacbonyl, tức là aldehyt hoặc keton, nhóm này sẽ phản ứng với tác nhân chữa trị được cải biến thích hợp. Các nhóm cacbonyl có thể phản ứng với nhóm hydrazit trên thuốc để tạo ra liên kết hydrazon. Liên kết này có thể được thuỷ phân, cho phép giải phóng tác nhân chữa trị ra khỏi thể liên hợp sau khi liên kết với các tế bào đích.

Thành phần liên kết hai chức năng được ưu tiên nhất để sử dụng theo sáng chế là axit 4-(4-axetylphenoxy) butanoic (AcBut) dẫn đến sản phẩm ưu tiên, trong đó thể liên hợp bao gồm β -calicheamixin, γ -calicheamixin hoặc N-axetyl γ - calicheamixin được tạo nhóm chức bằng cách cho phản ứng với 3-mercapto-3-metyl butanoyl hydrazit, thành phần AcBut, và chất mang đích kháng thể IgG của người hoặc được là tương thích với người.

IV. Tạo thể liên hợp dạng đơn thể

Bản chất kỵ nước tự nhiên của nhiều thuốc gây độc tế bào bao gồm các calicheamixin gây ra nhiều khó khăn cho việc bào chế các thể liên hợp thuốc dạng đơn thể có các mức tải thuốc tốt và hiệu suất phù hợp cần thiết cho các ứng dụng chữa trị. Sự tăng độ kỵ nước của liên kết được tạo ra bởi các thành phần liên kết như thành phần liên kết AcBut, được mô tả trong bằng Mỹ số 5773001, cũng như sự tăng khoảng cách cộng hoá trị để tách tác nhân chữa trị ra khỏi chất mang (kháng thể) làm cho vấn đề này càng trầm trọng.

Sự kết tụ thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào/chất mang với các mức tải thuốc cao hơn xảy ra do tính chất kỵ nước của các thuốc. Mức tải thuốc thường được giới hạn để thu được các lượng sản phẩm đơn thể phù hợp. Trong một số trường hợp, ví dụ với các thể liên hợp trong bằng Mỹ số 5877296, thường khó tạo ra các thể liên hợp có hiệu suất hữu hiệu với các mức tải hữu hiệu cho các ứng dụng chữa trị sử dụng các điều kiện phản ứng được mô tả trong bằng Mỹ số 5053394 do sự kết tụ dư thừa. Các điều kiện phản ứng này sử dụng DMF là đồng dung môi trong phản ứng liên hợp. Vì vậy, các phương pháp cho các mức tải thuốc/hiệu suất cao hơn mà không có sự kết tụ hoặc hao hụt nguyên liệu hiện có là cần thiết.

Các cải tiến để làm giảm sự kết tụ được mô tả trong bằng Mỹ các số 5712374 và 5714586. Được mô tả trong các patent này là các chất mang có bản chất protein bao gồm, không giới hạn, các protein như các kháng thể người hoặc được là tương thích với người được sử dụng làm các tác nhân chữa trị gây độc tế bào, ví dụ h67.6 và các kháng thể được làm tương thích với người khác được mô tả ở đây. Ở các bệnh nhân này, việc sử dụng dung dịch đệm không ái nhân, tương thích với protein, chứa (i) propylen glycol làm đồng dung môi và (ii) chất phụ trợ bao gồm ít nhất một axit C₆-C₁₈ cacboxylic, đã được phát hiện là thường tạo ra các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang có mức tải thuốc/hiệu suất cao hơn và làm giảm sự kết tụ để có hoạt tính tốt. Các axit ưu tiên được mô tả ở đây là các axit từ C₇ đến C₁₂ và axit được ưu tiên nhất là axit octanoic (ví dụ axit caprylic) hoặc các muối của nó. Các dung dịch đệm ưu tiên đối với các thể liên hợp, được tạo ra từ các este N-hydroxysuccinimit (Osu) hoặc các este được hoạt hoá tương đương khác, là muối đệm phosphat (PBS) hoặc axit N-2-hydroxyetyl piperazin-N'-2-etansulfonic (đệm HEPES). Dung dịch đệm này được sử dụng trong các phản ứng liên hợp không thể chứa các amin tự do hoặc các chất ái nhân. Đối với các loại thể liên hợp khác, các dung dịch đệm phù hợp có thể được xác định dễ dàng. Theo cách khác, việc sử dụng dung dịch đệm không ái nhân, tương thích với protein, chứa t-butanol mà không bổ sung chất phụ trợ cũng được phát hiện là tạo ra các thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/chất mang có mức tải thuốc/hiệu suất cao hơn và mức độ kết tụ giảm.

Lượng đồng dung môi cần để tạo ra thể liên hợp dạng đơn thể thay đổi nhất định giữa các protein và có thể được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này xác định mà không cần phải thí nghiệm nhiều. Lượng chất phụ trợ cần để tạo ra một cách hữu hiệu thể liên hợp dạng đơn thể cũng thay đổi giữa các kháng thể. Lượng này cũng có thể được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này xác định mà không cần phải thí nghiệm nhiều. Trong bằng Mỹ các số 5712374 và 5714586, việc bổ sung propylen glycol với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 60%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10% đến 40%, và tốt nhất là 30% tổng thể tích, và chất phụ trợ bao gồm ít nhất một axit C₆-C₁₈ cacboxylic hoặc muối của nó, tốt hơn là axit caprylic hoặc muối của nó, với lượng nằm trong khoảng từ 20mM đến 100mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 40mM đến 90mM và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 60mM đến 90mM, vào hỗn hợp phản ứng liên hợp để tạo ra các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế

bào dạng đơn thể/chất mang có mức tải thuốc/hiệu suất cao hơn và mức độ kết tụ giảm. Các đồng dung môi hữu cơ tương thích với protein khác ngoài propylen glycol, ví dụ etylen glycol, etanol, DMF, DMSO, v.v., cũng có thể được sử dụng. Một số hoặc toàn bộ đồng dung môi hữu cơ này đã được sử dụng để tải thuốc vào hỗn hợp liên hợp.

Theo cách khác, trong các patent này, nồng độ của axit C₆-C₁₈ cacboxylic hoặc muối của nó có thể được tăng tới 150-300mM và đồng dung môi giảm tới 1-10%. Theo một phương án, axit cacboxylic là axit octanoic hoặc muối của nó. Theo phương án ưu tiên, axit cacboxylic là axit decanoic hoặc muối của nó. Theo phương án ưu tiên khác, axit cacboxylic là axit caprylic hoặc muối của nó, axit này có ở nồng độ 200mM cùng với propylen glycol hoặc etanol 5%.

Theo phương án khác trong các patent này, t-butanol ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 25%, tốt hơn là 15% tổng thể tích dung dịch, có thể được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng liên hợp để tạo ra các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang có mức tải thuốc/hiệu suất cao hơn và mức độ kết tụ giảm.

Các điều kiện liên hợp đã được thiết lập này đã được áp dụng để tạo ra CMA-676 (Gemtuzumab Ozogamicin) mà hiện được bán với tên Mylotarg™. Khi giới thiệu cách điều trị này đối với bệnh bạch cầu tủy cấp (AML), thông qua sắc ký trao đổi ion, đã biết được rằng calicheamixin không được phân bố trên kháng thể một cách đồng đều. Hầu hết calicheamixin nằm trên khoảng một nửa kháng thể trong khi nửa còn lại tồn tại trong LCF, phân đoạn này chỉ chứa một lượng nhỏ calicheamixin. Do vậy, rất cần có sự cải thiện các phương pháp liên hợp các thuốc gây độc tế bào như calicheamixin với các chất mang, để làm giảm thiểu lượng kết tụ và cho mức tải thuốc đều cao hơn với hiệu suất sản phẩm liên hợp được cải thiện đáng kể.

Một ví dụ cụ thể là thể liên hợp G5/44-NAc-gama-calicheamixin DMH AcBut, được chỉ ra là CMC-544 và được thể hiện một cách khái quát trên Fig.17. Mức giảm lượng LCF đến dưới 10% tổng lượng kháng thể là cần để phát triển CMC-544 và các cách chọn khác nhau để làm giảm các mức LCF đã được xem xét. Các đặc tính khác của thể liên hợp miễn dịch này, ví dụ khả năng liên kết kháng nguyên hoặc khả năng gây độc tế bào, sẽ không bị ảnh hưởng bởi dung dịch cuối cùng. Các cách chọn được

xem xét bao gồm việc cải biến kháng thể về mặt di truyền hoặc vật lý, các kỹ thuật tách bằng sắc ký hoặc việc cải biến các điều kiện phản ứng.

Phản ứng của kháng thể G5/44 với NAc-gama-calicheamixin DMH AcBut OSu bằng cách sử dụng các điều kiện phản ứng cũ (CMA-676 Process Conditions) tạo ra sản phẩm có các đặc tính vật lý (mức tải thuốc, LCF và mức độ kết tụ) giống với CMA-676. Tuy nhiên, mức LCF cao (nằm trong khoảng từ 50 đến 60%) tồn tại sau khi liên hợp được cho rằng không thích hợp. Các điều kiện phản ứng tối ưu đã được xác định thông qua phương pháp thiết kế thống kê thực nghiệm, trong đó các biến số phản ứng chính như nhiệt độ, độ pH, lượng xăn xuất calicheamixin đưa vào và nồng độ chất phụ trợ, đã được đánh giá. Việc phân tích các thí nghiệm này chứng tỏ rằng lượng calicheamixin đưa vào và nồng độ chất phụ trợ có ảnh hưởng nhiều nhất đến mức phân đoạn liên hợp thấp LCF và sự hình thành kết tụ trong khi nhiệt độ và độ pH gây ảnh hưởng thấp hơn. Các thí nghiệm bổ sung cũng đã cho thấy rằng các nồng độ của chất mang có bản chất protein (kháng thể) và đồng dung môi (etanol) đều ít quan trọng hơn (so với lượng calicheamixin đưa vào và nồng độ chất phụ trợ) trong việc điều chỉnh các mức LCF và kết tụ. Để làm giảm mức LCF đến dưới 10%, lượng dẫn xuất calicheamixin đưa vào đã được tăng nằm trong khoảng từ 3% đến 8,5% (khối lượng/khối lượng) tỷ lệ với lượng kháng thể có trong hỗn hợp phản ứng. Chất phụ trợ được thay đổi từ axit octanoic hoặc muối của nó ở nồng độ 200mM (quy trình CMA-676) đến axit decanoic hoặc muối của nó ở nồng độ 37,5mM. Phản ứng liên hợp xảy ra tốt hơn ở nhiệt độ tăng không đáng kể (nằm trong khoảng từ 30 đến 35°C) và độ pH nằm trong khoảng từ 8,2 đến 8,7. Các điều kiện phản ứng hợp nhất những thay đổi này đã làm giảm LCF đến dưới 10% trong khi mức tải calicheamixin tăng, và sau đây được chỉ ra là điều kiện quy trình CMC-544 hoặc các điều kiện quy trình “mới”. Việc so sánh các kết quả thu được với các điều kiện quy trình CMA-676 và CMC-544 được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: So sánh các điều kiện quy trình CMA-676 và CMC-544

Các điều kiện/các kết quả	Các điều kiện quy trình CMA-676	Các điều kiện quy trình CMC-544
Calicheamixin đưa vào	3,0% (khối lượng/khối lượng, dựa trên khối lượng bột)	8,5% (khối lượng/khối lượng)
Dạng và nồng độ chất phụ trợ	Axit octanoic/natri	

Nhiệt độ	octanoat; 200mM 26°C	Axit decanoic/natri decanoat; 37,5mM 31-35°C
Độ pH	7,8	8,2-8,7
Mức tải calicheamixin (% khối lượng; bằng thử nghiệm UV)	2,4-3,5	7,0-9,0
Phân đoạn liên hợp thấp (LCF) (trước tinh chế)	45-65% diện tích HPLC	<10%
Mức độ kết tụ (trước tinh chế)	≈5%	<5%
Mức độ kết tụ (sau tinh chế)	≤2%	<2%

Việc tăng lượng calicheamixin đưa vào đã làm tăng mức tải thuốc từ 2,5-3,0% khối lượng lên đến 7,0-9,0% khối lượng và không làm tăng mức độ kết tụ protein trong hỗn hợp phản ứng. Do sự giảm mức độ kết tụ và LCF nên các điều kiện quy trình CMC-544 dẫn tới sản phẩm đồng nhất hơn. CMC-544 đã được điều chế thành công theo quy trình liên hợp mới này ở mức vài gam kháng thể.

Trong các phản ứng trên, nồng độ kháng thể có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 15mg/ml và nồng độ của dẫn xuất calicheamixin, ví dụ este N-Axetyl-gama-calicheamixin DMH AcBut OSu (được sử dụng để tạo ra các thể liên hợp được thể hiện trên Fig.17), nằm trong khoảng từ 4,5 đến 11% khối lượng kháng thể. Đồng dung môi là etanol mà nhờ đó các kết quả tốt đã được chứng tỏ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 6 đến 11,4% (dựa trên thể tích). Các phản ứng này được thực hiện trong dung dịch đệm PBS, HEPES, N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-(4-axit butansulfonic) (HEPBS) hoặc dung dịch đệm tương thích khác ở độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 9, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 35°C và trong khoảng thời gian từ 15 phút đến 24 giờ. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được khoảng pH thích hợp cho các loại thể liên hợp khác. Đối với nhiều kháng thể, các thay đổi nhỏ trong việc kết hợp các chất phụ trợ nói trên đã được phát hiện là cải thiện được mức tải thuốc và hiệu suất thể liên hợp dạng đơn thể, và biết rằng chất mang có bản chất protein cụ thể bất kỳ đều có thể cần tới một số thay đổi tối thiểu trong các điều kiện chính xác hoặc việc lựa chọn các chất phụ trợ để đạt được các kết quả tối ưu.

V. Tách và tinh chế thể liên hợp

Sau khi liên hợp, các thể liên hợp dạng đơn thể có thể được tách ra khỏi các chất phản ứng không được liên hợp (chẳng hạn chất mang có bản chất protein và thuốc gây độc tế bào/calicheamixin tự do) và/hoặc dạng kết tụ của các thể liên hợp bằng các phương pháp thông thường, ví dụ sắc ký dựa theo kích thước (SEC), sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), sắc ký trao đổi ion (IEC) hoặc sắc ký hội tụ (CF). Các thể liên hợp đã được tinh chế là dạng đơn thể và thường chứa từ 4 đến 10% khối lượng thuốc gây độc tế bào/calicheamixin. Theo phương án ưu tiên, các thể liên hợp được tinh chế bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC). Theo các quy trình được sử dụng trước đó để sản xuất trên quy mô công nghiệp các thể liên hợp thuốc gây độc tế bào/calicheamixin-kháng thể (quy trình CMA-676), bước tách sau liên hợp duy nhất được áp dụng là sắc ký dựa theo kích thước (SEC). Mặc dù bước này rất hữu hiệu cả ở việc loại bỏ thể liên hợp bị kết tụ lẫn việc hoàn thành quá trình trao đổi đậm đặc với chế phẩm nhưng nó không có hiệu quả làm giảm hàm lượng LCF. Do đó, quy trình dựa trên SEC hoàn toàn phụ thuộc vào mặt hóa học của phản ứng liên hợp để kiểm soát hàm lượng LCF của sản phẩm cuối cùng. Bất lợi khác của SEC là sự giới hạn thể tích của hỗn hợp phản ứng liên hợp được nạp lên cột sắc ký (thường không quá 5% thể tích nền của cột xử lý). Điều này làm hạn chế một cách nghiêm trọng tới dung lượng mỗi phân đoạn (và do đó, tới khả năng sản xuất) mà có thể được cấp trong khoang sản xuất nhất định. Cuối cùng, quy trình tinh chế bằng SEC còn dẫn tới sự pha loãng đáng kể dung dịch thể liên hợp, làm giảm nồng độ protein này mà có thể chắc chắn đạt được trong chế phẩm.

Khi thuốc gây độc tế bào có tính kỵ nước cao, ví dụ dẫn xuất calicheamixin, và được sử dụng trong thể liên hợp, thì sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) là phương pháp ưu tiên để tạo ra sự tách hữu hiệu kháng thể được liên hợp và kháng thể không được liên hợp. HIC thể hiện 3 ưu điểm chính so với SEC: (1) nó có khả năng làm giảm hữu hiệu hàm lượng LCF cũng như thể kết tụ; (2) khả năng tải của cột đối với HIC cao hơn nhiều; và (3) HIC cho phép tránh được sự pha loãng quá mức sản phẩm.

Một số môi trường HIC có hiệu lực cao thích hợp cho việc sử dụng trên quy mô công nghiệp, ví dụ Butyl, Phenyl và Octyl Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), có thể tách một cách hữu hiệu các thành phần không được liên hợp và các thể kết tụ của thể liên hợp ra khỏi các thành phần được liên hợp dạng đơn thể sau khi thực hiện quy trình liên hợp.

VI. Các dược phẩm và chế phẩm

Sáng chế cũng đề cập đến quy trình bào chế dược phẩm/chế phẩm dùng để chữa trị hoặc chẩn đoán, bao gồm việc trộn thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang theo sáng chế với tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/chất mang có thể là hoạt chất duy nhất trong dược phẩm/chế phẩm dùng để chữa trị hoặc chẩn đoán hoặc có thể được kèm theo các hoạt chất khác bao gồm các thành phần kháng thể khác, ví dụ các kháng thể kháng CD19, kháng CD20, kháng tế bào T, kháng IFN γ hoặc kháng LPS, hoặc các thành phần không phải kháng thể như các xytokin, các yếu tố sinh trưởng, các hormon, các kháng hormon, các thuốc gây độc tế bào và các xantin.

Các xytokin và các yếu tố sinh trưởng mà có thể được sử dụng để điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư, và các chất mà có thể được sử dụng cùng với các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào/chất mang theo sáng chế, bao gồm các interferon, các interleukin như interleukin 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF và G-CSF.

Các hormon thường được sử dụng để điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư và các hormon mà có thể được sử dụng cùng với các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào/chất mang theo sáng chế, bao gồm estrogen như diethylstilbestrol và estradiol, các androgen như testosterone và Halotestin, các progestin như Megace và Provera, và các cortisteroit như prednizon, dexametazon và hydrocortizon.

Các kháng hormon như các kháng estrogen, tức là tamoxifen, các kháng androgen, tức là flutamit và các tác nhân kháng adrenal, thường được sử dụng để điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư và có thể được sử dụng cùng với các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào/chất mang theo sáng chế.

Các tác nhân hoá trị liệu/chống ung thư mà thường được sử dụng để điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư và các tác nhân mà có thể được sử dụng cùng với các thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào/chất mang theo sáng chế bao gồm, không giới hạn, adramyxin, xisplatin, cacboplatin, vinblastin, vincristin, bleommyxin,

metotrexat, doxorubixin, các flurouraxil, etopozit, taxol và các chất tương tự của nó, và mitomycin.

Các dược phẩm tốt hơn là nên bao gồm lượng có hiệu quả chữa bệnh của thể liên hợp theo sáng chế. Thuật ngữ “lượng có hiệu quả chữa bệnh” được sử dụng ở đây để chỉ lượng tác nhân chữa bệnh cần để điều trị, làm thuyên giảm hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh đích, hoặc để biểu hiện tác dụng chữa bệnh hoặc phòng ngừa có thể phát hiện được. Đối với thể liên hợp bất kỳ, liều có hiệu quả chữa bệnh có thể được ước lượng đầu tiên bằng các thử nghiệm nuôi cấy tế bào hoặc bằng các mô hình động vật, thường là động vật gặm nhấm, thỏ, chó, lợn hoặc linh trưởng. Mô hình động vật cũng có thể được sử dụng để xác định khoảng nồng độ thích hợp và đường cung cấp. Tiếp theo, thông tin như vậy có thể được sử dụng để xác định các liều hữu hiệu và các đường cung cấp ở người.

Lượng có hiệu quả chính xác đối với đối tượng là người sẽ phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, sức khỏe nói chung của đối tượng, độ tuổi, thể trọng và giới tính của đối tượng, chế độ ăn, thời gian và tần số cung cấp, các hỗn hợp thuốc, độ nhạy của phản ứng và độ dung nạp/phản ứng đối với liệu pháp. Lượng này có thể được xác định bằng việc thí nghiệm thông thường và theo sự hướng dẫn của bác sỹ lâm sàng. Nói chung, liều hữu hiệu nằm trong khoảng từ $0,1\text{mg/m}^2$ đến 50mg/m^2 , tốt hơn là nằm trong khoảng từ $0,4\text{mg/m}^2$ đến 30mg/m^2 , tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2mg/m^2 đến 9mg/m^2 , liều này được tính dựa trên chất mang có bản chất protein.

Các dược phẩm có thể được cung cấp riêng rẽ cho bệnh nhân hoặc có thể được kết hợp với các tác nhân, thuốc hoặc hormon khác. Liều mà ở đó thể liên hợp dẫn xuất thuốc gây độc tế bào dạng đơn thể/kháng thể theo sáng chế được cung cấp sẽ phụ thuộc vào tính chất của tình trạng bệnh cần được điều trị, loại bệnh u lympho hoặc bạch cầu ác tính và vào thể liên hợp sẽ được sử dụng để phòng ngừa hoặc để điều trị tình trạng bệnh đang tồn tại.

Tần số cấp liều sẽ phụ thuộc vào thời gian bán hủy của thể liên hợp và thời gian kéo dài tác dụng của nó. Nếu thể liên hợp có thời gian bán hủy ngắn (ví dụ nằm trong khoảng từ 2 đến 10 giờ) thì có thể cần cung cấp một hoặc nhiều liều/ngày. Theo cách khác, nếu phân tử thể liên hợp có thời gian bán hủy dài (ví dụ nằm trong khoảng từ 2

đến 15 ngày) thì có thể chỉ cần cung cấp liều ngày một lần, tuần một lần hoặc thậm chí 1 hoặc 2 tháng một lần.

Dược phẩm cũng có thể chứa chất mang được dùng dùng để cung cấp thể liên hợp kháng thể. Chất mang này phải không tự gây sản sinh kháng thể có hại cho cá thể tiếp nhận dược phẩm và phải không độc. Các chất mang thích hợp có thể là các đại phân tử lớn, trao đổi chậm như các protein, các polypeptit, các liposom, các polysacarit, các axit polylactic, các axit polyglucolic, các axit amin dạng polyme, các đồng polyme axit amin và các hạt virus bất hoạt.

Các muối được dùng có thể được sử dụng, ví dụ các muối của axit vô cơ như hydroclorua, hydrobromua, phosphat và sulfat, hoặc các muối của axit hữu cơ như axetat, propionat, malonat và benzoat.

Các chất mang được dùng trong các dược phẩm này có thể còn chứa các chất lỏng như nước, nước muối, glyxerol và etanol. Ngoài ra, các chất phụ trợ như các tác nhân làm ẩm hoặc nhũ tương hoá hoặc các chất đệm pH, có thể có trong các dược phẩm này. Các chất mang như vậy cho phép các dược phẩm được bào chế dưới dạng viên nén, viên tròn, viên kẹo, viên nhộng, dạng lỏng, dạng gel, sirô, bột nhão hoặc huyền phù, để bệnh nhân tiêu hóa.

Các dạng ưu tiên cho việc cung cấp bao gồm các dạng thích hợp cho việc cung cấp ngoài đường tiêu hoá, ví dụ bằng cách tiêm hoặc truyền, chẳng hạn bằng cách tiêm liều lớn hoặc truyền liên tục. Nếu sản phẩm được dùng để tiêm hoặc truyền thì sản phẩm này có thể tạo thành dạng huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong tá dược lỏng chứa dầu hoặc nước và có thể chứa các tác nhân bảo ché như các tác nhân tạo huyền phù, bảo quản, ổn định và/hoặc phân tán.

Mặc dù độ ổn định của các dung dịch thể liên hợp đệm là đủ để ổn định trong thời gian ngắn nhưng kém ổn định trong thời gian dài. Để tăng cường độ ổn định của thể liên hợp và làm tăng thời gian sử dụng của nó, thể liên hợp kháng thể-thuốc này có thể được làm đông khô thành dạng khô, để hoàn nguyên trước khi sử dụng với chất lỏng vô trùng thích hợp. Các vấn đề liên quan đến quá trình làm đông khô dung dịch protein này sẽ được ghi nhận. Sự mất đi cấu trúc bậc 2, bậc 3 và bậc 4 có thể xảy ra trong các quy trình làm lạnh và làm khô. Do đó, các chất bảo quản lạnh có thể phải đóng vai trò là chất ổn định vô định hình của thể liên hợp và duy trì tính hợp nhất cấu

trúc của protein này trong quy trình đông khô. Theo một phương án, chất bảo quản lạnh hữu ích theo sáng chế là rượu đường như alditol, mannitol, sorbitol, inozitol, polyetylen glycol và hỗn hợp của chúng. Theo phương án khác, chất bảo quản lạnh là axit đường, bao gồm axit aldonic, axit uronic, axit aldaric và hỗn hợp của chúng.

Các chất bảo quản lạnh theo sáng chế cũng có thể là hydrat cacbon. Các hydrat cacbon thích hợp là các hợp chất aldehyt hoặc keton chứa hai hoặc nhiều nhóm hydroxyl. Các hydrat cacbon này có thể là dạng vòng hoặc thẳng, ví dụ các aldoza, các ketoza, các đường amino, các alditol, các inozitol, các axit aldonic, các axit uronic hoặc các axit aldaric hoặc các hỗn hợp của chúng. Hydrat cacbon này cũng có thể là mono-, di- hoặc poly-hydrat cacbon, ví dụ disacarit hoặc polysacarit. Các hydrat cacbon thích hợp bao gồm, ví dụ, các glyxeraldehyt, arabinoza, lyxoza, pentoza, riboza, xyloza, galactoza, glucoza, hexoza, idoza, mannoza, taloza, heptoza, glucoza, fructoza, axit gluconic, sorbitol, lactoza, mannitol, metyl α -glucopyranozit, maltoza, axit isoascorbic, axit ascorbic, lacton, sorboza, axit glucaric, erytroza, treoza, arabinoza, alloza, altroza, guloza, erytruloza, ribuloza, xyluloza, psicoza, tagatoza, axit glucuronic, axit gluconic, axit galacturonic, axit mannuronic, glucosamin, galactosamin, sacaroza, trehaloza, axit neuraminic hoặc các dẫn xuất của chúng. Các polyhydrat cacbon bao gồm, ví dụ, các arabinan, các fructan, các fucan, các galactan, các galacturonan, các glucan, các mannan, các xylan (ví dụ inulin), levan, fucoidan, caraginan, galactocaroloza, các pectin, các axit pectic, amyloza, pululan, glycogen, amylopectin, xenluloza, dextran, pustulan, chitin, agaroza, keratin, chondroitin, dermatan, axit hyaluronic, axit alginic, gồm xantan hoặc tinh bột. Trong số đó, các hydrat cacbon đặc biệt hữu ích là sacaroza, glucoza, lactoza, trehaloza và các hỗn hợp của chúng. Sacaroza là chất bảo quản lạnh đặc biệt hữu ích.

Tốt hơn là, chất bảo quản lạnh theo sáng chế là hydrat cacbon hoặc rượu “đường”, rượu này có thể là rượu polyhydric. Các hợp chất polyhydric là các hợp chất chứa nhiều hơn một nhóm hydroxyl. Tốt hơn là, các hợp chất polyhydric này có dạng mạch thẳng. Các hợp chất polyhydric thích hợp bao gồm, ví dụ, các glycol như etylen glycol, polypropylen glycol, glyxerol hoặc pentaerytritol; hoặc các hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án ưu tiên, tác nhân bảo quản lạnh là sacaroza, trehaloza, mannitol hoặc sorbitol.

Khi đã được bào chế, các dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp một cách trực tiếp cho đối tượng. Các đối tượng được điều trị có thể là động vật. Tuy nhiên, ưu tiên các dược phẩm phù hợp đối với việc cung cấp cho đối tượng là người.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp theo một số cách bao gồm, không giới hạn, qua đường miệng, qua đường trong tĩnh mạch, qua đường trong cơ, qua đường trong động mạch, qua đường trong tuỷ, qua đường trong vỏ, qua đường trong tâm thất, qua biểu bì, qua da (xem Công bố đơn PCT số WO98/20734), qua đường dưới da, qua đường trong màng bụng, qua đường trong mũi, qua đường ruột, tại chỗ, qua đường dưới lưỡi, qua đường trong âm đạo hoặc qua đường trực tràng. Các tia nhỏ cũng có thể được sử dụng để cung cấp các dược phẩm theo sáng chế. Thông thường, các dược phẩm này có thể được bào chế dưới dạng các dung dịch có thể tiêm, hoặc dưới dạng các dung dịch lỏng hoặc dưới dạng các huyền phù. Các dạng rắn thích hợp cho việc tạo dung dịch hoặc huyền phù trong các tá dược lỏng trước khi tiêm cũng có thể được bào chế.

Việc phân phát trực tiếp các dược phẩm này thường được thực hiện bằng cách tiêm qua đường dưới da, qua đường trong màng bụng, qua đường trong tĩnh mạch hoặc qua đường trong cơ, hoặc được cung cấp tới khoang gian bào của mô. Các dược phẩm này cũng có thể được cung cấp vào vị trí thương tổn. Việc điều trị bằng liều lượng có thể là chế độ liều duy nhất hoặc chế độ đa liều.

Biết rằng hoạt chất trong dược phẩm này là thể liên hợp thuốc gây độc tế bào/chất mang có bản chất protein. Thông thường, nó dễ được phân giải trong đường dạ dày-ruột. Do đó, nếu dược phẩm này được cung cấp qua đường dạ dày-ruột thì nó phải chứa các tác nhân bảo vệ thể liên hợp khỏi quá trình phân giải nhưng lại có tác dụng giải phóng thể liên hợp khi nó được hấp thụ từ đường dạ dày-ruột.

Sự thảo luận chi tiết các chất mang dược dụng có thể sử dụng trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Sáng chế đề cập cụ thể đến dẫn xuất calicheamycin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người (G5/44), CMC-544, để sử dụng điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh được đặc trưng bởi các tế bào biểu hiện các kháng nguyên CD22 trên bề mặt của chúng.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng CMC-544 để sản xuất dược phẩm hoặc thuốc điều trị bệnh rối loạn tăng sinh được đặc trưng bởi các tế bào biểu hiện CD22.

CMC-544 cũng có thể được sử dụng trong liệu pháp chữa bệnh bất kỳ, trong đó mong muốn làm giảm mức các tế bào biểu hiện CD22 trong đối tượng đang cần được điều trị bằng dược phẩm hoặc thuốc được mô tả ở đây. Đặc biệt là, dược phẩm hoặc thuốc này sẽ được sử dụng để điều trị cho người hoặc động vật mắc các bệnh rối loạn tăng sinh là bệnh u lympho và bệnh bạch cầu, các bệnh này biểu hiện kháng nguyên CD22 trên bề mặt tế bào. Các tế bào biểu hiện CD22 này có thể tuần hoàn trong cơ thể hoặc xuất hiện với số lượng lớn không mong muốn được định vị ở vị trí cụ thể trong cơ thể.

Tốt hơn là, CMC-544 có thể được sử dụng để điều trị các bệnh ác tính dòng tế bào lympho B bao gồm bệnh u lympho và bệnh bạch cầu, tốt nhất là bệnh U Lympho không Hodgkin (NHL), bệnh bạch cầu lympho cấp (ALL), bệnh đa u tủy và bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL). CMC-544 có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với các tác nhân có hoạt tính sinh học khác để điều trị cho các đối tượng mắc các bệnh ác tính tế bào B.

Các tác nhân có hoạt tính sinh học thường được sử dụng bao gồm các yếu tố sinh trưởng, các xytokin và các thuốc gây độc tế bào. Các thuốc gây độc tế bào, thường được sử dụng để điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh như bệnh ung thư và có thể được sử dụng cùng với CMC-544, bao gồm antraxyclin như doxorubixin, daunorubixin, idarubixin, aclarubixin, zorubixin, mitoxantron, epirubixin, carubixin, nogalamyxin, menogaril, pitarubixin và valrubixin trong thời gian tới 3 ngày; và nucleozit pyrimidin hoặc purin như xytarabin, gemxitabin, trifluridin, anxitabin, enoxitabin, azaxitidin, doxifluridin, pentostatin, broxuridin, capexitabin, cladribin, dexitabin, fludarabin, gougerotin, puromyxin, tegafo, tiazofurin. Các tác nhân hoá trị liệu/chống ung thư mà có thể được cung cấp cùng với CMC-544 bao gồm adramyxin, xisplatin, cacboplatin, xyclophosphamit, dacarbazin, vinblastin, vincristin, mitoxantron, bleommyxin, mecloretamin, prednizon, procarbazine, metotrexat, các flurouraxil, etopozit, taxol và các chất tương tự của nó, và mitomyxin. CMC-544 có thể được cung cấp đồng thời với một hoặc nhiều tác nhân chữa bệnh này. Theo cách khác, CMC-544 có thể được cung cấp kế tiếp với thời với một hoặc nhiều tác nhân chữa bệnh này.

CMC-544 có thể được cung cấp đơn độc, đồng thời hoặc kế tiếp với hỗn hợp các tác nhân có hoạt tính sinh học khác như các yếu tố sinh trưởng, các cytokin, các steroid, các kháng thể như kháng thể kháng CD22, rituximab (Rituxan™) và các tác nhân hóa trị liệu dưới dạng một phần của chế độ điều trị. Các chế độ điều trị được thiết lập để điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh lympho ác tính bao gồm CHOPP (cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin, prednison và procarbazin); CHOP (cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin và prednison); COP (cyclophosphamid, vincristin và prednison); CAP-BOP (cyclophosphamid, doxorubicin, procarbazin, bleomycin, vincristin và prednison); m-BACOD (metotrexat, bleomycin, doxorubicin, cyclophosphamid, vincristin, dexametazon và leucovorin); ProMACE-MOPP (prednison, metotrexat, doxorubicin, cyclophosphamid, etopozit, leucovorin, vincristin và procarbazin); ProMACE-CytaBOM (prednison, metotrexat, doxorubicin, cyclophosphamid, etopozit, leucovorin, xytarabin, bleomycin và vincristin); MACOP-B (metotrexat, doxorubicin, cyclophosphamid, vincristin, prednison, bleomycin và leucovorin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazin); ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastin và dacarbazin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazin) xen kẽ với ABV (adriamycin/doxorubicin, bleomycin và vinblastin); MOPP (mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazin) xen kẽ với ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastin và dacarbazin); ChIVPP (clorambuxil, vinblastin, dacarbazin và prednison). Liệu pháp chữa trị có thể bao gồm giai đoạn chữa trị cảm ứng, giai đoạn chữa trị củng cố và giai đoạn chữa trị duy trì. CMC-544 có thể được cung cấp đơn độc, đồng thời hoặc kế tiếp với chế độ bất kỳ trong số các chế độ chữa trị được xác định trên đây dưới dạng một phần của giai đoạn chữa trị cảm ứng, giai đoạn chữa trị củng cố và giai đoạn chữa trị duy trì.

Các thể liên hợp theo sáng chế cũng có thể được cung cấp cùng với các tác nhân có hoạt tính sinh học và hóa trị liệu khác dưới dạng một phần của chế độ hóa trị liệu kết hợp để điều trị các bệnh u lympho tiến triển tái phát. Cơ chế điều trị như vậy bao gồm IMVP-16 (ifosfamid, metotrexat và etopozit); MIME (metyl-gag, ifosfamid, metotrexat và etopozit); DHAP (dexametazon, xytarabin liều cao và xisplatin); ESHAP (etopozit, metylprednison, xytarabin liều cao và xisplatin); EPOCH (etopozit, vincristin và doxorubicin trong 96 giờ với các liều lớn duy nhất cyclophosphamid và prednison qua đường miệng); CEPP(B) (cyclophosphamid, etopozit, procarbazin,

prednizon và bleomycin); CAMP (lomustin, mitoxantron, xytarabin và prednizon); và CVP-1 (xyclophosphamit, vincristin và prednizon), CHOPP-B (xyclophosphamit, doxorubixin, vincristin, prednizon và bleomycin); CEPP-B (xyclophosphamit, etopozit, procarbazin và bleomycin) và P/DOCE (epirubixin hoặc doxorubixin, vincristin, xyclophosphamit và prednizon). Các chế độ điều trị bổ sung đối với các bệnh u lympho tiến triển có thể bao gồm trong giai đoạn 1 đường điều trị đầu tiên bằng CHOP (xyclophosphamit, doxorubixin, vincristin và prednizon)-rituximab (RituxanTM)-CMC-544, tiếp theo trong giai đoạn 2 và giai đoạn 3 bằng CHOP-rituximab (RituxanTM), CHOP-CMC-544 hoặc CHOP- rituximab (RituxanTM)-CMC-544. Theo cách khác, giai đoạn 1 có thể có đường điều trị đầu tiên bằng COP (xyclophosphamit, vincristin và prednizon)-rituximab (RituxanTM)-CMC-544, tiếp theo trong giai đoạn 2 và giai đoạn 3 bằng COP-rituximab (RituxanTM), COP-CMC-544 hoặc COP-rituximab (RituxanTM)-CMC-544. Theo phương án khác, việc điều trị các bệnh u lympho có thể bao gồm đường điều trị thứ nhất hoặc thứ hai bằng thể liên hợp thuốc kháng thể CMC-544 trong giai đoạn 1, tiếp theo trong giai đoạn 2 và giai đoạn 3 bằng CMC-544 và CHOP (xyclophosphamit, doxorubixin, vincristin và prednizon), CMC-544 và COP (xyclophosphamit, vincristin và prednizon), CMC-544 với rituximab (RituxanTM) hoặc rituximab (RituxanTM) đơn độc. Theo phương án khác nữa, việc điều trị các bệnh u lympho có thể bao gồm đường điều trị thứ nhất bằng thể liên hợp thuốc kháng thể CMC-544, tiếp theo trong giai đoạn 2 và giai đoạn 3 bằng CMC-544 đơn độc hoặc kết hợp với các chế độ điều trị bao gồm, không giới hạn, ESHOP (etopozit, metylprednizon, xytarabin liều cao, vincristin và xisplatin); EPOCH (etopozit, vincristin và doxorubixin trong 96 giờ với các liều lớn duy nhất xyclophosphamit và prednizon qua đường miệng); IMVP-16 (ifosfamid, metotrexat và etopozit); ASHAP (Adramyxin, solumedrol, Ara-C và xisplatin); MIME (metyl-gag, ifosfamid, metotrexat và etopozit); ICE (ifosfamid, xyclophosphamit và etopozit). Chi tiết về các thuốc gây độc tế bào khác nhau được sử dụng trong hoá trị liệu các bệnh ác tính bao gồm các chế độ hoá trị liệu kết hợp, các liều lượng, v.v. mà được đề cập trong đơn này có thể được tìm thấy trong các tài liệu Cancer Principles and Practice of Oncology, Eds. Vincent T. DeVita, Samuelo Hellman, Steven A. Rosenberg, 6th Edition, Publishers: Lippincott, Williams and Wilkins (2001) và Physicians's Cancer

Chemotherapy Drug Manual, Eds. Edward Chu and Vincent T. DeVita, Publishers: Jones and Bartlett (2002).

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị cho các đối tượng là người và động vật đang chịu đau đớn hoặc có nguy cơ mắc các bệnh rối loạn tăng sinh được đặc trưng bởi các tế bào biểu hiện CD22, phương pháp này bao gồm việc cung cấp cho đối tượng lượng hữu hiệu CMC-544 theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo các kháng thể tuyển chọn

Nhóm kháng thể kháng CD22 đã được lựa chọn từ các thể lai bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn lựa chọn sau đây: Sự liên kết với các tế bào Daudi, sự thu hút các tế bào Daudi, sự liên kết với các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), sự thu hút PBMC, ái lực (lớn hơn 10^{-9}M), $\gamma 1$ của chuột nhắt và tốc độ sinh sản. 5/44 được lựa chọn làm kháng thể ưu tiên.

I. Tách dòng gen và biểu hiện phân tử kháng thể 5/44 dạng khảm

a) Tạo các tế bào thể lai 5/44 và chế phẩm ARN từ đó

Thể lai 5/44 được tạo ra bằng kỹ thuật lai thông thường nhờ gây miễn dịch cho chuột nhắt bằng protein CD22 của người. ARN được tạo ra từ các tế bào thể lai 5/44 bằng cách sử dụng bộ kit RNEasy (Qiagen, Crawley, UK; Catalogue No. 74106). ARN thu được được phiên mã ngược thành ADN bổ trợ như được mô tả dưới đây.

b) Phân bố của CD22 trên các khối u NHL

Nghiên cứu hoá ứng động miễn dịch đã được thực hiện để kiểm tra tính ngẫu nhiên và sự phân bố của thuốc nhuộm bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng kháng CD22 của 5/44. Các kháng thể kháng CD20 và kháng CD79a đối chứng đã được đưa vào nghiên cứu để xác nhận các vùng tế bào B của các khối u.

Tổng số 50 khối u đã được nghiên cứu và phân loại như sau bằng cách sử dụng các hệ thống phân loại Working Formulation và REAL:

- 7 khối u bạch cầu nguyên bào lympho B/u lympho (Cao/I)
- 4 khối u B-CLL/u lympho tế bào lympho (Thấp/A)
- 3 khối u nguyên bào lympho/u tế bào miễn dịch (Thấp/A)

- 1 tế bào Mantle (Trung bình/F)
- 14 khối u lympho giữa nang (Từ thấp đến trung bình/D)
- 13 khối u lympho tế bào lớn khuếch tán (Từ trung bình đến cao/G, H)
- 6 khối u không thể phân loại (K)
- 2 khối u lympho tế bào T

Có 40 khối u lympho tế bào B dương tính đối với kháng nguyên CD22 với kháng thể 5/44 ở nồng độ 0,1µg/ml và 6 khối u khác dương tính khi nồng độ này tăng tới 0,5µg/ml. Đối với 2 khối u tế bào B còn lại âm tính ở nồng độ 0,1µg/ml, mô còn lại không đủ để thử ở nồng độ cao hơn. Tuy nhiên, việc thử đồng thời với kháng thể kháng CD22 khác được ký hiệu là 6/13 (Celltech, Slough, UK), cho mức nhuộm màu cao hơn 5/44, dẫn tới toàn bộ 48 khối u tế bào B nhuộm dương tính đối với CD22.

Do đó, có thể kết luận rằng kháng nguyên CD22 được biểu hiện rộng trên các khối u tế bào B và, do đó, tạo ra đích thích hợp cho liệu pháp miễn dịch trong bệnh NHL.

c) Tách dòng V_H và V_L của 5/44 bằng kỹ thuật PCR

Các trình tự ADN bổ trợ mã hoá các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ của 5/44 đã được tổng hợp bằng enzym phiên mã ngược để tạo ra các bản sao ADN bổ trợ sợi đơn của ARN thông tin có trong ARN tổng số. Tiếp theo, ADN bổ trợ này được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các trình tự vùng V của chuỗi bằng cách sử dụng cặp mồi oligonucleotit đặc hiệu bằng Phản ứng chuỗi sử dụng enzym polymeraza (PCR).

i) Tổng hợp ADN bổ trợ

ADN bổ trợ được tổng hợp trong thể tích phản ứng 20µl chứa các chất phản ứng sau: Tris-HCl 50mM có độ pH=8,3, KCl 75mM, dithiothreitol 10mM, MgCl₂ 3mM, dATP, dTTP, dCTP và dGTP đều có nồng độ 0,5mM, RNAsin 20 đơn vị, 75ng mỗi hexanucleotit ngẫu nhiên, 2µg ARN của 5/44 và enzym phiên mã ngược của Moloney Murine Leukemia Virus 200 đơn vị. Sau khi ủ ở 42°C trong 60 phút, phản ứng được kết thúc bằng cách đun nóng ở 95°C trong 5 phút.

ii) PCR

Các mẫu ADN bổ trợ này được dùng cho phản ứng PCR bằng cách kết hợp các đoạn mỗi đặc hiệu đối với các chuỗi nặng và nhẹ. Các nguồn mỗi suy diễn được thiết kế để ủ với các trình tự bảo toàn của peptit tín hiệu đã được sử dụng làm các đoạn mỗi xuôi chiều. Các trình tự này, theo thứ tự, đều chứa vị trí giới hạn (S_{ful} của V_L; HindIII của V_H) cách 7 nucleotit từ các đầu 5' của chúng, trình tự GCCGCCACC (SEQ ID NO:50) cho phép dịch mã tối ưu các ARN thông tin tạo thành, codon khởi đầu và đoạn có chiều dài nằm trong khoảng từ 20 đến 30 nucleotit dựa trên các trình tự peptit dẫn đầu của các kháng thể chuột nhất đã biết (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

Các đoạn mỗi đầu 3' được thiết kế để làm quay khớp nối J-C của khung 4 của kháng thể và chứa vị trí giới hạn để enzym BsiWI tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách dòng đoạn PCR V_L. Các đoạn mỗi đầu 3' của chuỗi nặng là hỗn hợp được thiết kế để làm quay khớp nối J-C của kháng thể. Đoạn mỗi đầu 3' bao gồm vị trí giới hạn ApaI để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách dòng. Vùng đầu 3' của các đoạn mỗi này chứa trình tự kết hợp dựa trên các trình tự được tìm thấy trong các kháng thể chuột nhất đã biết (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

Các hỗn hợp đoạn mỗi được mô tả trên đây cho phép các sản phẩm PCR đối với V_H và V_L được tách dòng một cách trực tiếp vào vector biểu hiện thích hợp (xem dưới) để tạo ra các chuỗi nặng và nhẹ dạng khảm (chuột nhất-người) và để các gen này được biểu hiện trong các tế bào động vật có vú để tạo ra các kháng thể dạng khảm có isotyp mong muốn.

Các đợt ủ (100µl) đối với PCR được thiết lập như sau. Mỗi hỗn hợp phản ứng chứa Tris-HCl 10mM có độ pH=8,3, MgCl₂ 1,5mM, KCl 50mM, gelatin 0,01% (khối lượng/thể tích), dATP, dTTP, dCTP và dGTP đều có nồng độ 0,25mM, hỗn hợp mỗi đầu 5' 10pmol, mỗi đầu 3' 10pmol, 1µl ADN bổ trợ và Taq polymeraza 1 đơn vị. Các hỗn hợp phản ứng được ủ ở 95°C trong 5 phút và sau đó thực hiện chu kỳ 94°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút. Sau 30 chu kỳ, các phần phân ước của mỗi phản ứng được phân tích bằng cách điện di trên gel agarosa.

Đối với vùng V của chuỗi nặng, sản phẩm ADN đã được khuếch đại chỉ thu được khi nguồn môi ử trong lúc bắt đầu khung 1 thay thế nguồn peptit tín hiệu. Các đoạn này đã được tách dòng trong các vector đọc trình tự ADN. Trình tự ADN được xác định và dịch mã thành trình tự axit amin suy diễn. Trình tự suy diễn này bị thay đổi khi so sánh với trình tự protein đầu N được xác định bằng thực nghiệm. Fig.1 thể hiện trình tự axit amin của các CDR của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt. Fig.2 và Fig.3 thể hiện trình tự ADN/protein của các vùng V lần lượt của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ của 5/44 đơn dòng của chuột nhắt.

iii) Tách dòng phân tử các đoạn PCR

Các trình tự vùng V của chuột được tách dòng tiếp vào các vector biểu hiện pMRR10.1 và pMRR14 (Fig.7 và Fig.8). Đây là các vector dùng để biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa ADN mã hoá các vùng hằng định của chuỗi nhẹ kappa của người và chuỗi nặng gamma-4 của người. Vùng V_L được tách dòng trong vector biểu hiện bằng cách cắt và gắn giới hạn từ vector đọc trình tự, bằng cách sử dụng các vị trí giới hạn SfuI và BsiWI, tạo ra plasmit pMRR10(544cL) (Fig.8). ADN chuỗi nặng được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn môi đầu 5' để đưa vào peptit tín hiệu do điều này không thực hiện được trong chiến lược tách dòng - đoạn dẫn đầu kháng thể chuỗi nặng của chuột nhắt từ thể lai của chuột nhắt khác (được gọi là 162) đã được sử dụng. Đoạn môi đầu 3' có trình tự như sau:

5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCCT
GGCACTCATTCTCAAGGGAGTGCAGTGTGAGGTGCAGCTCGTCGTCGAGTC
TGG3' (SEQ ID NO:51).

Đoạn môi ngược giống với đoạn môi được sử dụng trong quá trình tách dòng gen V_H ban đầu. Sản phẩm PCR tạo thành được cắt bằng các enzym HindIII và Apal, tách dòng và trình tự ADN của nó được xác nhận, tạo plasmit pMRR10(544cH) (Fig.7). Quá trình đồng chuyển nhiễm nhanh cả hai vector biểu hiện vào các tế bào CHO đã tạo ra kháng thể 5/44 dạng khảm. Điều này đạt được bằng cách sử dụng chất phản ứng Lipofectamin theo các quy trình của nhà sản xuất (InVitrogen: Life Technology, Groningen, The Netherlands. Catalogue no. 11668-027).

II. Loại bỏ vị trí glycozyl hoá và lyzin phản ứng

Trình tự của vị trí glycozyl hoá được liên kết với N tiềm ẩn đã được quan sát trong CDR-H2, có trình tự axit amin N-Y-T (Fig.3). Kỹ thuật SDS-PAGE, thẩm tách protein và nhuộm hydrat cacbon các gel của 5/44 và các đoạn của nó (bao gồm Fab) chỉ ra rằng vị trí này đã được glycozyl hoá thực sự (không được thể hiện). Ngoài ra, gốc lyzin được quan sát tại vị trí tiếp xúc trong CDR-H2, có khả năng làm giảm ái lực liên kết của kháng thể bằng cách tạo ra vị trí bổ sung dùng để liên hợp với tác nhân mà kháng thể này có thể được liên hợp.

Chiến lược PCR đã được sử dụng để tạo ra các thay thế axit amin trong trình tự CDR-H2 nhằm loại bỏ vị trí glycozyl hoá và/hoặc lyzin phản ứng như được thể hiện trên Fig.4. Các đoạn mỗi xuôi chiều mã hoá các đột biến N55Q, T57A hoặc T57V đã được sử dụng để loại bỏ vị trí glycozyl hoá (Fig.4) và đoạn mỗi xuôi chiều thứ tư chứa thay thế K60R đã được tạo ra để loại bỏ gốc lyzin phản ứng (Fig.4). Đoạn mỗi ngược của khung 4 đã được sử dụng trong mỗi quá trình khuếch đại PCR này. Các sản phẩm PCR này được cắt bằng các enzym XbaI và ApaI và lồng vào pMRR14(544cH) (cũng được cắt bằng XbaI và ApaI) để tạo ra các plasmit biểu hiện mã hoá các thể đột biến này. Các đột biến N55Q, T57A và T57V loại bỏ vị trí glycozyl hoá bằng cách thay đổi trình tự axit amin khác với liên ứng N-X-T/S trong khi đột biến K60R thay thế lyzin có khả năng phản ứng bằng gốc arginin tích điện dương tương tự. Các plasmit biến dị của cH tạo thành được đồng chuyển nhiễm với plasmit cL để tạo ra các thể biến dị kháng thể dạng khảm được biểu hiện.

III. Đánh giá hoạt tính của các gen dạng khảm

Hoạt tính của các gen dạng khảm được đánh giá bằng quá trình chuyển nhiễm nhanh vào các tế bào CHO và xác định các hằng số ái lực bằng phân tích BiaCore.

Ái lực của 5/44 dạng khảm hoặc các thể biến dị của nó, mà vị trí glycozyl hoá hoặc lyzin phản ứng của chúng đã được loại bỏ, đã được nghiên cứu bằng kỹ thuật BIA đối với việc liên kết với các cấu trúc CD22-mFc. Các kết quả được thể hiện trên Fig.9. Tất cả các phép đo liên kết đều được thực hiện trong thiết bị BIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). Thử nghiệm này được thực hiện bằng việc thu giữ CD22mFc thông qua kháng Fc chuột nhất được cố định. Kháng thể này ở pha hoà tan. Các mẫu thử, mẫu chuẩn và các mẫu đối chứng (50µl) được tiêm lên

kháng Fc chuột nhất được cố định kèm theo kháng thể ở pha hoà tan. Sau mỗi chu kỳ, phần bề mặt được hoàn nguyên bằng 50µl HCl 40mM ở 30µl/phút. Phân tích động học được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm BIAevaluation 3.1 (Pharmacia).

Việc loại bỏ vị trí glycozyl hoá trong cấu trúc T57A dẫn tới sự liên kết nhanh hơn không đáng kể và sự phân ly chậm hơn đáng kể so với 5/44 dạng khảm, cho mức cải thiện ái lực khoảng 5 lần. Đột biến N55Q không ảnh hưởng tới ái lực. Kết quả này không được hy vọng do nó cho thấy rằng việc loại bỏ chính hydrat cacbob này rõ ràng không ảnh hưởng đến sự liên kết (như với sự thay đổi N55Q). Ái lực được cải thiện chỉ được quan sát với sự thay đổi T57A. Có thể giải thích là, bất kể sự có mặt của hydrat cacbon, treonin ở vị trí 57 gây ra tác dụng âm tính đối với sự liên kết sẽ được loại bỏ bằng sự chuyển hoá treonin thành alanin. Giả thiết rằng kích thước nhỏ của alanin là không quan trọng và rằng tác dụng âm tính của treonin là liên quan đến kích thước của nó là phù hợp với kết quả thu được bằng cách sử dụng đột biến T57V: Việc thay thế bằng valin ở vị trí 57 là không có lợi (kết quả không thể hiện).

Việc loại bỏ gốc lyzin bằng đột biến K60R có tác dụng trung tính tới ái lực, nghĩa là việc đưa gốc arginin vào sẽ loại bỏ vị trí có khả năng phản ứng mà không ảnh hưởng đến ái lực.

Do đó, các đột biến dùng để loại bỏ vị trí glycozyl hoá và để loại bỏ lyzin phản ứng đều thuộc thiết kế cho được là tương thích với người.

Ví dụ 2: Ghép CDR của 5/44

Việc tách dòng phân tử các gen đối với các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể 5/44 và việc sử dụng chúng để tạo ra các kháng thể 5/44 dạng khảm (chuột nhất/người) đã được mô tả trên đây. Các trình tự nucleotit và axit amin của các vùng V_L và V_H của 5/44 của chuột nhất lần lượt được trình bày trên Fig.2 và Fig.3 (SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8). Ví dụ này mô tả việc ghép CDR của kháng thể 5/44 lên các khung của người để làm giảm khả năng gây miễn dịch tiềm ẩn ở người theo phương pháp của Adair và các đồng tác giả (Công bố đơn PCT số WO91/09967).

I. Ghép CDR của chuỗi nhẹ của 5/44

Việc xếp thẳng hàng trình tự protein với các trình tự liên ứng từ vùng V chuỗi nhẹ kapa nhóm phụ I của người đã chỉ ra mức tương đồng về trình tự là 64%. Do đó,

để tạo cấu trúc chuỗi nhẹ được ghép CDR, các vùng khung thể nhận được chọn tương ứng với các vùng của trình tự DPK9, dòng mầm O12 của nhóm phụ I VK của người. Trình tự khung 4 của thể nhận có nguồn gốc từ trình tự JK1 thuộc dòng mầm vùng J của người.

Việc so sánh trình tự axit amin của các vùng khung 5/44 của chuột và trình tự thể nhận được thể hiện trên Fig.5 và cho thấy rằng có 27 sự khác biệt giữa các chuỗi thể cho và thể nhận. Tại mỗi vị trí, việc phân tích được thực hiện bằng khả năng gốc của chuột tham gia liên kết kháng nguyên, một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, thông qua các tác dụng đối với việc bao gói hoặc tại giao diện V_H/V_L . Nếu một gốc của chuột được coi là quan trọng và hoàn toàn khác so với gốc của người về kích thước, độ phân cực hoặc điện tích thì gốc đó của chuột được giữ lại. Dựa trên phân tích này, hai thể biến dị của chuỗi nhẹ được ghép CDR, có các trình tự nêu trong SEQ ID NO:19 và SEQ ID NO:20 (Fig.5), đã được cấu trúc.

II. Ghép CDR của chuỗi nặng của 5/44

Việc ghép CDR của chuỗi nặng của 5/44 đã được thực hiện bằng cách sử dụng chiến lược tương tự như được mô tả đối với chuỗi nhẹ. Vùng V của chuỗi nặng của 5/44 được phát hiện là tương đồng với các chuỗi nặng của người thuộc nhóm phụ I (độ tương đồng về trình tự là 70%) và ,do đó, trình tự DP7, khung dòng mầm VH1-3 thuộc nhóm phụ I của người đã được sử dụng làm khung thể nhận. Các trình tự khung 4 của thể nhận có nguồn gốc từ trình tự JH4 thuộc dòng mầm vùng J của người.

Việc so sánh chuỗi nặng của 5/44 với các vùng khung được thể hiện trên Fig.6, trong đó có thể thấy rằng của nặng của 5/44 khác với trình tự của thể nhận tại 22 vị trí. Việc phân tích sự liên quan mà bất kỳ vị trí nào trong số các vị trí này có thể có đối với việc liên kết kháng nguyên đã dẫn đến 5 thể biến dị của các chuỗi nặng được ghép CDR được cấu trúc, có các trình tự nêu trong SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 và SEQ ID NO:27 (Fig.6).

III. Tạo cấu trúc các gen đối với các trình tự được ghép

Các gen đã được thiết kế để mã hoá các trình tự được ghép gH1 và gL1, và một loạt các oligonucleotit chồng lớp đã được thiết kế và cấu trúc (Fig.10). Kỹ thuật lắp ghép bằng PCR đã được áp dụng để cấu trúc các gen vùng V được ghép CDR. Các thể tích phản ứng 100µl đã được thiết lập chứa Tris-HCl 10mM có độ pH=8,3, $MgCl_2$

1,5mM, KCl 50mM, gelatin 0,001%, dATP, dTTP, dCTP và dGTP đều có nồng độ 0,25mM, mỗi đoạn môi “trong” 1pmol (T1, T2, T3, B1, B2, B3), mỗi đoạn môi “ngoài” 10pmol (F1, R1) và Taq polymeraza 1 đơn vị (AmpliTaq, Applied BioSystems, catalogue no. N808-0171). Các thông số của chu kỳ PCR là 94°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút, đối với 30 chu kỳ. Tiếp theo, các sản phẩm phản ứng cho chạy trên gel agarosa 1,5%, tách và thu hồi bằng cách sử dụng các cột quay QIAGEN (QIAquick gel extraction kit, cat no. 28706). ADN được giải hấp bằng thể tích 30µl. Tiếp theo, các mẫu (1µl) ADN của gH1 và gL1 được tách dòng trong vectơ tách dòng pCR2.1 TOPO của InVitrogen TOPO TA (catalogue no. K4500-01) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vectơ không biểu hiện này đóng vai trò là trung gian tách dòng tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định trình tự số lượng lớn các dòng. Việc xác định trình tự ADN bằng các đoạn môi đặc hiệu vectơ đã được sử dụng để xác nhận các dòng chính xác chứa gH1 và gL1, tạo ra các plasmit pCR2.1 (544gH1) và pCR2.1 (544gL1) (các Fig.11 và 12).

Phương pháp thay thế đoạn oligonucleotit đã được sử dụng để tạo ra các mảnh ghép được là tương thích với người là gH4, gH5, gH6 và gH7, và gL2. Fig.13 thể hiện các đoạn oligonucleotit này. Để cấu trúc mỗi thể biến dị, vectơ pCR2.1 (544gH1) hoặc pCR2.1 (544gL1) đã được cắt bằng các enzym giới hạn được ký hiệu bằng XmaI/SacII đối với chuỗi nặng và XmaI/BstEII đối với chuỗi nhẹ. Đoạn vectơ lớn là gel được tinh chế từ agarosa và được sử dụng để gắn với đoạn oligonucleotit. Các đoạn này bao gồm 2 oligonucleotit bổ trợ (được thể hiện trên Fig.13) được trộn với nhau ở nồng độ 0,5pmol/µl trong thể tích 200µl Tris-HCl 12,5mM có độ pH=7,5, MgCl₂ 2,5mM, NaCl 25mM, dithioerythritol 0,25mM. Việc ủ đạt được bằng cách đun nóng tới 95°C trong 3 phút trong bể nước (có thể tích 500ml), tiếp theo cho hỗn hợp phản ứng nguội dần tới nhiệt độ trong phòng. Sau đó, đoạn oligonucleotit đã được ủ được pha loãng 10 lần bằng nước trước khi gắn vào vectơ đã được cắt thích hợp. Việc xác định trình tự ADN được sử dụng để xác nhận trình tự chính xác, tạo ra các plasmit pCR2.1 (5/44-gH4-7) và pCR2.1 (5/44-gL2). Tiếp theo, các trình tự đã được ghép biến đổi được tách dòng trong các vectơ biểu hiện pMRR14 (chuỗi nặng) và pMR10.1 (chuỗi nhẹ).

IV. Hoạt tính liên kết với CD22 của các trình tự được ghép CDR

Các vector mã hoá các thể biến dị được ghép đã được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào CHO theo nhiều cách kết hợp cùng với các chuỗi kháng thể dạng khảm ban đầu. Hoạt tính liên kết được so sánh bằng thử nghiệm cạnh tranh, bằng cách cạnh tranh với việc liên kết của kháng thể 5/44 ban đầu của chuột nhất trong việc liên kết với các tế bào Ramos (được thu nhận từ ATCC, dòng nguyên bào lympho của người từ u lympho Burkitt, biểu hiện CD22 bề mặt). Thử nghiệm này được coi là cách tốt nhất để so sánh các mảnh ghép về khả năng liên kết của chúng với CD22 bề mặt tế bào. các kết quả được thể hiện trên các Fig.14 và 15. Như có thể thấy, có rất ít sự khác biệt giữa các mảnh ghép này, tất cả đều thể hiện hiệu quả hơn của thể khảm về việc cạnh tranh so với thể gốc của chuột. Việc đưa thêm 3 gốc của người vào cuối CDR-H2 (gH6 và gH7) đã không làm ảnh hưởng tới việc liên kết.

Mảnh ghép kết hợp với số gốc tối thiểu của chuột gL1gH7 đã được lựa chọn. Mảnh ghép chuỗi nhẹ gL1 có 6 gốc cho. Các gốc V2, V4, L37 và Q45 là các gốc bao gói rất quan trọng. Gốc H38 là tại giao diện V_H/V_L . Gốc D60 là gốc bề mặt sát với CDR-L2 và có thể trực tiếp góp phần vào việc liên kết với kháng nguyên. Trong số các gốc này, V2, L37, Q45 và D60 được phát hiện trong các trình tự dòng mầm của các gen kapa của người từ các nhóm phụ khác. mảnh ghép chuỗi nặng gH7 có 4 gốc khung cho (gốc R28 được coi là một phần của CDR-H1 theo định nghĩa cấu trúc được sử dụng trong việc ghép CDR (Adair và các đồng tác giả (1991), Công bố đơn PCT số WO91/09967). Các gốc E1 và A71 là các gốc bề mặt sát với các CDR. Gốc I48 là gốc bao gói tiềm ẩn. Gốc T93 xuất hiện tại giao diện V_H/V_L . Trong số các gốc này, E1 và A71 được phát hiện trong các gen dòng mầm khác của nhóm phụ I của người. Gốc I48 được phát hiện trong nhóm phụ 4 dòng mầm của người và T73 được phát hiện trong nhóm phụ 3 dòng mầm của người.

Trình tự ADN và protein đầy đủ của cả hai chuỗi nặng và nhẹ này, bao gồm các vị trí các intron trong các gen của vùng hằng định do các vector tạo ra, được thể hiện trên Fig.16 và được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:28 đối với chuỗi nhẹ và SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:30 đối với chuỗi nặng.

ADN mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này được cắt ra khỏi các vector. ADN chuỗi nặng được cắt tại vị trí HindIII của đầu 5', sau đó được xử lý bằng đoạn Klenow

của ADN polymeraza I của *E. coli* để tạo ra đầu bằng 5'. Việc cắt tại vị trí EcoRI của đầu 3' tạo ra đoạn chuỗi nặng, đoạn này được tinh chế từ các gel agarosa. Theo cách tương tự, đoạn chuỗi nhẹ đã được tạo ra, tạo đầu bằng tại vị trí SfuI của đầu 5' và có vị trí EcoRI ở đầu 3'. Cả hai đoạn này được tách dòng trong các vector biểu hiện dựa trên DHFR và được sử dụng để tạo ra các dòng tế bào ổn định bằng các tế bào CHO.

Ví dụ 3: Liên hợp NAc-gama-calicheamixin DMH AcBut với kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người (G5/44)

Trong phản ứng liên hợp thông thường, kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người (G5/44) được liên hợp với NAc-gama-calicheamixin DMH AcBut Osu (dẫn xuất calicheamixin) (Fig.17), trong đó nồng độ protein đích là 7,5mg/ml và mức tải dẫn xuất calicheamixin đích là 8,5% khối lượng protein. Độ pH của phản ứng đích là $8,5 \pm 0,2$ và các nồng độ đích của các thành phần phản ứng khác như sau: N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-(4-axit butansulfonic) (HEPBS) 50mM, natri decanoat 37,5mM và tổng lượng etanol là 9% (thể tích/thể tích). Phản ứng được thực hiện ở $33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 1 giờ. Các kết quả phân tích của phản ứng đặc trưng này trước khi tinh chế như sau: Protein: 7,34mg/ml; mức tải calicheamixin: 82,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$; mức độ kết tụ: 93,25%; và protein không được liên hợp (LCF): 1,07% (% vùng UV được xác định bằng HPLC).

Tác dụng của các chất phụ trợ hoạt động bề mặt khác nhau và nồng độ của chúng tới năng suất và độ tinh sạch của sản phẩm đã được thử để xác định tác dụng của chúng đến sự sản sinh đơn thể được liên hợp (Bảng 2). Các phản ứng được thực hiện, trong đó mọi thông số được giữ không đổi ngoại trừ chất phụ trợ và nồng độ của nó. Các thể liên hợp được tạo ra từ các phản ứng này được phân tích về nồng độ protein, mức tải calicheamixin, hàm lượng kết tụ và LCF. Mặc dù tất cả các axit cacboxylic nằm trong khoảng từ C₆ (hexanoat) đến C₁₂ (dodecanoat) cho các kết quả chấp nhận được, các kết quả chung tốt nhất (LCF thấp, mức độ kết tụ thấp và mức thu hồi thể liên hợp dạng đơn thể cao) đã được thu nhận với decanoat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30mM đến 50mM.

Bảng 2: Tác dụng của sự tương đồng và nồng độ của chất phụ trợ đến các kết quả liên hợp

Chất phụ trợ/nồng độ	Mức thu hồi protein (% thu hồi)	% kết tụ	% LCF
Hexanoat-500mM	51,3	3,36	38,3
Heptanoat-400mM	49,9	4,7	20,6
Octanoat-200mM	57,3	3,27	10,6
Nanonoat-100mM	54,7	1,41	0,3
Decanoat-50mM	56,7	1,35	0,2
Undecanoat-20mM	46,9	2,95	0,6
Dodecanoat-5mM	65,6	0,78	7,0

Ví dụ 4: Quy trình tinh chế bằng sắc ký

I. Các quy trình tách bằng sắc ký

Mặc dù Butyl Sepharose 4 Fast Flow được xác nhận là môi trường HIC tốt nhất nhưng các kết quả chấp nhận được có thể được thu nhận bằng các cải biến nhỏ về các điều kiện sắc ký bằng cách sử dụng các nhựa khác như Octyl Sepharose Fast Flow, PPG-600C (Tosoh Biosep), Fractogel EMD Propyl (EM Processing) và Source 15ISO (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Nguyên liệu để tinh chế là hỗn hợp phản ứng liên hợp chứa protein 7,2mg/ml ở mức tải dẫn xuất calicheamixin 83 μ g/mg, với hàm lượng kết tụ 10,1% (% diện tích được xác định bởi HPLC), và hàm lượng LCF 5,6% (% diện tích được xác định bởi HPLC).

Sau khi phản ứng liên hợp được kết thúc, hỗn hợp phản ứng được pha loãng 4 lần bằng cách bổ sung dung dịch kali phosphat vào đến nồng độ phosphat cuối cùng là 0,7M (độ pH=8,2). Sau khi trộn lẫn, dung dịch này được lọc qua dụng cụ lọc có cỡ lỗ 0,45 micromet. Dung dịch đã được pha loãng này được nạp lên cột Butyl Sepharose 4 Fast Flow. Tổng lượng protein được nạp lên cột là 29mg/ml thể tích lỏng. Sau khi rửa bằng kali phosphat 0,7M, cột được giải hấp bằng gradien từng bước với kali phosphat có nồng độ từ 0,7M đến 4M, độ pH=8,2. Các phân đoạn được giải hấp trong bằng gradien từng bước được gom lại để xử lý tiếp, với hỗn hợp gom bao gồm thể liên hợp

dạng đơn thể và dưới 1% diện tích mỗi mức độ kết tụ và LCF. Hỗn hợp này được nạp lên cột loại muối Sephadex G-25 (Amersham Biosciences) để trao đổi với dung dịch đệm thích hợp đối với chế phẩm, bao gồm Tris-Cl 20mM và natri clorua 100mM ở độ pH=8,0. Chế phẩm CMC-544 đã được trao đổi đệm, đã tinh chế có các đặc tính sau: Mức tải calicheamixin: 81µg/mg; mức độ kết tụ: 0,4% (% diện tích được xác định bằng HPLC) và LCF: 0,8% (% diện tích được xác định bằng HPLC).

Ví dụ 5: Phân tích sự liên kết của thể liên hợp miễn dịch NAc-gama-calicheamixin DMH AcBut-G5/44 (CMC-544)

Thể liên hợp miễn dịch của kháng thể kháng CD22 được là tương thích với người (G5/44) với calicheamixin (CMC-544) được tạo ra bằng quy trình liên hợp trên đây đã được phân tích bằng nghiên cứu liên kết để xác định thể liên hợp được tạo ra bằng quy trình cải tiến này có tác dụng đối nghịch nào tới việc liên kết với kháng nguyên hay không. Bảng 3 cho thấy rằng quy trình liên hợp này không có tác dụng nào đến ái lực liên kết với kháng nguyên của kháng thể này. Thể liên hợp miễn dịch CMC-544 được tạo ra bằng quy trình liên hợp cũ hay mới đều liên kết với kháng nguyên đích với ái lực như nhau, không khác so với ái lực của kháng thể không được liên hợp G5/44.

Bảng 3: Ái lực liên kết của CMC-544 được tạo ra bằng các quy trình liên hợp CMA-676 và CMC-544

Kháng thể kháng CD22	K _D (M)	K _A (1/M)	k _d (1/s)	k _a (1/Ms)	% LCF
G5/44 được là tương thích với người	1,30×10 ⁻¹⁰	7,90×10 ⁹	2,80×10 ⁻⁵	2,20×10 ⁵	100
CMC-544 (21µg/mg) (quy trình CMA-676)	1,20×10 ⁻¹⁰	8,10×10 ⁹	6,10×10 ⁻⁵	4,90×10 ⁵	25
CMC-544 (87µg/mg) (quy trình CMC-544)	1,50×10 ⁻¹⁰	6,60×10 ⁹	6,90×10 ⁻⁵	4,60×10 ⁵	3,3

Các phân tích cảm biến sinh học được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị BIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). CD22mFc được cố định cộng hoá trị lên mẫu dò cảm biến sinh học được phủ cacboxymethyl dextran-được hoạt hoá bởi N-hydroxysuccinimide (CM5) bằng phương pháp hoá học gắn amin chuẩn ở hàm lượng protein khoảng 2000 đơn vị cộng hưởng. Các mẫu CMC-544 hoặc G5/44

được pha loãng bằng dung dịch đệm HBS (HEPES 10mM, độ pH=7,4, chứa NaCl 150mM, EDTA 3mM và polysorbat 20 0,005% (thể tích/thể tích)) và được tiêm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 100nM lên bề mặt mẫu dò cảm biến sinh học được phủ CD22mFc ở tốc độ chảy 30 μ l/phút trong 3 phút để cho phép liên kết. Sau giai đoạn liên kết, việc hoà tan kháng thể đã được liên kết được theo dõi bằng cách rửa mẫu dò bằng dung dịch đệm HBS trong khoảng thời gian 15 phút. Phần bề mặt có tính kháng nguyên được hoàn nguyên bằng cách rửa mẫu dò cảm biến sinh học với 15 μ l dung dịch đệm hoàn nguyên (NaOH 10mM và NaCl 200mM) trong 30 giây, tiếp theo để ổn định trong 2 phút trước khi thực hiện chu kỳ tiếp theo. Các hằng số động học được tính bằng phân tích hồi quy bình phương nhỏ nhất không tuyến tính bằng cách sử dụng mô hình phù hợp cung liên kết Langmuir và chương trình BIAevaluation (phiên bản 3.1, BIAcore). Sự liên kết với kháng nguyên của CMC-544 được phân tích bằng cộng hưởng co nguyên sinh bề mặt bằng cách sử dụng CD22mFc được cố định cộng hoá trị trên mẫu dò cảm biến sinh học. Các kết quả phân tích động học đối với sự liên kết của CMC-544 và G5/44 với CD22mFc cho thấy rằng, sau khi các dữ liệu được làm phù hợp một cách tổng quát với mô hình liên kết Langmuir (1:1) bằng cách bù chuyển khối, cả CMC-544 lẫn G5/44 không được liên hợp đều liên kết với CD22 với ái lực như nhau (CMC-544:CD22 có $K_D=200\text{pM}$; G5/44:CD22 có $K_D=235\text{pM}$). Việc liên hợp với calicheamixin không ảnh hưởng tới khả năng liên kết một cách có hiệu quả với CD22mFc của G5/44.

Sự liên kết của CMC-44 và G5/44 với CD22 biểu hiện trên bề mặt của các tế bào u lympho B cũng được kiểm tra bằng bào kế dạng dòng. Kháng thể đơn dòng gemtuzumab kháng CD33 (hP67.6) và thể liên hợp calicheamixin của nó CMA-676 (gemtuzumab ozogamixin) được sử dụng làm các mẫu đối chứng phù hợp isotyp trong quá trình đánh giá này. Rituximab (RituxanTM), một kháng thể đơn dòng dạng khảm IgG1 của người-kháng CD20 của người, cũng được sử dụng làm các mẫu đối chứng âm tính. IgG1 và IgG4 đa dòng của người đã được tinh chế cũng được sử dụng làm các mẫu đối chứng âm tính. Sự liên kết của CMC-44 và G5/44 với CD22 trên Ramos hoặc RL BCL là như nhau và khác biệt so với sự liên kết của IgG4 đa dòng của người. RL BCL thể hiện mức biểu hiện CD22 trên bề mặt thấp hơn so với Ramos BCL. Trái lại, sự liên kết của CMA-676 hoặc gL1gH7 với BCL giống với sự liên kết IgG4 đa dòng của người, phù hợp với sự thiếu biểu hiện CD33 của chúng (số liệu không thể hiện).

Các tế bào giống nhau này chứng tỏ sự liên kết mạnh của rituximab kháng CD20 (Rituxan™). Khác với hP67.6 và CMA-676, cả CMC-544 và G5/44 đều không chứng tỏ bất kỳ sự liên kết nào với các tế bào u bạch cầu CD22⁻ CD33⁺ HL-60 (số liệu không thể hiện). Các kết quả này cho thấy rằng việc liên hợp của G5/44 với calicheamixin không ảnh hưởng tới tính đặc hiệu kháng nguyên của nó. CMC-544 nhận biết một cách đặc hiệu CD22 trên các tế bào B của người nhưng không nhận biết đặc hiệu CD22 trên các tế bào B của chuột, chuột cống, chó, lợn hoặc linh trưởng (cynomolgus và rhesus) (số liệu không thể hiện).

Ví dụ 6: Phân tích các tác dụng trong ống nghiệm và trong cơ thể của CMC-544

I. Tính độc tế bào in vitro

Tác dụng của CMC-544 được tạo ra bằng các quy trình CMA-676 và CMC-544 đến sự tăng sinh trong ống nghiệm của các dòng tế bào u lympho tế bào B CD22⁺, RL, Daudi, Raji và Ramos đã được so sánh. Thể liên hợp calicheamixin phù hợp isotyp có đích là CD33 của người (CMA-676) đã được sử dụng để thể hiện các tác dụng không đặc hiệu kháng nguyên của thể liên hợp này. Việc sử dụng N-Ac gama calicheamixin DMH không được liên hợp (thuốc này được giải phóng ra khỏi thể liên hợp nhờ quá trình thủy phân bằng axit) trong quá trình đánh giá này đã chỉ ra rằng mỗi dòng tế bào được sử dụng này nhạy với các tác dụng gây chết của calicheamixin. Bảng 4 thể hiện các kết quả đánh giá này dựa trên đương lượng calicheamixin còn Bảng 5 thể hiện các kết quả đánh giá này dưới dạng nồng độ của protein kháng thể được liên hợp. Sự phân phát calicheamixin qua trung gian CD22 tới các tế bào CD22⁺ có hiệu quả tiêu diệt các tế bào đích cao gấp ít nhất 10 lần so với bản thân thuốc không được liên hợp. Thể liên hợp đối chứng phù hợp isotyp (CMA-676) thể hiện khả năng gây độc tế bào thấp hơn hoặc tương đương với dẫn xuất calicheamixin không được liên hợp. Bảng 4 cho thấy rõ ràng thể liên hợp được tạo ra bởi quy trình liên hợp CMC-544 có thể gây ra tác dụng gây độc tế bào tương đương ở nồng độ kháng thể thấp hơn so với thể liên hợp được tạo ra bởi quy trình liên hợp CMA-676.

Bảng 4: Sự ức chế tăng sinh bởi calicheamixin được liên hợp (IC₅₀ Pm của calicheamixin)

Các dòng u lympho tế bào	Mức tải CMC-544 theo quy	Mức tải CMC-544 theo quy	Mức tải CMA-676 đối	N-axetyl gama calicheamixin
--------------------------	--------------------------	--------------------------	---------------------	-----------------------------

B	trình CMC-544: 65µg/mg	trình CMA-676: 35µg/mg	chứng âm tính: 35µg/mg	DMH
RL #1	6	30	600	226
#2	12	40	400	270
Daudi #1	21	80	1886	260
Raji #1	500	ND*	2800	460
#2	560	520	4100	490
Ramos #1	200	130	ND	700
#2	260	ND	ND	1000

*ND: Không xác định

Bảng 5: Sự ức chế tăng sinh bởi kháng thể được liên hợp (IC₅₀ µg/ml của kháng thể)

Các dòng u lympho tế bào B	Mức tải CMC-544 theo quy trình CMC-544: 65µg/mg	Mức tải CMC-544 theo quy trình CMA-676: 35µg/mg	Mức tải CMA-676 đối chứng âm tính: 35µg/mg	Đối chứng kháng thể G5/44
RL #1	0,09	0,86	17,14	>100
#2	0,18	1,14	11,43	>100
Daudi #1	0,32	2,29	53,89	>100
Raji #1	7,69	ND*	80,00	>100
#2	8,62	14,86	117,14	>100
Ramos #1	3,08	3,71	ND	>100
#2	4,00	ND	ND	>100

*ND: Không xác định

Khả năng gây độc tế bào trong cơ thể: CMC-544 được tạo ra bởi quy trình CMC-544 còn được đánh giá trong các thể dị ghép u lympho tế bào B. Trong các nghiên cứu này, hai khối u lympho tế bào B là RAMOS và RL đã được sử dụng. U lympho RL là dòng tế bào có nguồn gốc từ NHL không Burkitt trong khi RAMOS lại có nguồn gốc từ u lympho Burkitt. Trong thí nghiệm tương trưng được thể hiện trên Fig.18, CMC-544 và bản sao kháng thể chuột nhất của nó được thể hiện là có hiệu quả ức chế, theo kiểu phụ thuộc liều, sự tăng sinh của u lympho tế bào B RAMOS.

Thể liên hợp của kháng thể được làm tương thích với người được thể hiện là có hiệu quả hơn so với bản sao chuột nhất của nó. Trong nghiên cứu này, liều thấp nhất

của thể liên hợp calicheamixin mà có khả năng gây ức chế sự tăng sinh đáng kể của u lympho là 10 μ g/kg Nac-gama calicheamixin DMH được liên hợp. Trái lại, kháng thể không được liên hợp, G5/44, ở 10mg/kg được cung cấp qua đường trong màng bụng theo chế độ tương tự dưới dạng các thể liên hợp lại không có tác dụng nào tới sự tăng sinh khối u.

Các nghiên cứu tương tự đã được thực hiện theo mô hình u lympho RL. Bảng 6 thể hiện các phân tích kết hợp của 3 thí nghiệm độc lập, trong đó các tác dụng chống ung thư của CMC-544 được đánh giá đối với các khối u NHL RL ở giai đoạn có kích thước nằm trong khoảng từ 300 đến 400mg ở chuột nhắt trần. CMC-544, theo kiểu phụ thuộc liều, làm cho các khối u thoái triển qua khoảng thời gian 3 tuần. Liều tối thiểu có hiệu quả của CMC-544 trong mô hình u lympho RL đã được thiết lập từ các phân tích thống kê của các nghiên cứu này là 20 μ g/kg dựa trên hàm lượng calicheamixin. Không có tế bào chết nào trong số bất kỳ 3 nghiên cứu này. Các liều CMC-544 cao hơn (nằm trong khoảng từ 60 đến 320 μ g/kg) hầu như gây thoái triển hoàn toàn u lympho RL. Tương tự, các kết quả thu được với hai mô hình u lympho tế bào B chứng tỏ khả năng gây thoái triển khối u của CMC-544.

Bảng 6: Tác dụng chống ung thư của CMC-544 đối với các thể dị ghép NHL RL ở chuột nhắt trần

Liều calicheamixin (μ g/kg)	Mức tăng sinh khối u tương đối trung bình ¹	% T/C2	Giá trị P theo đối chứng ³
Đối chứng	6,74	-	-
20	2,87	43	0,011
40	1,34	20	<0,001
60	0,58	9	<0,001
80	0,54	8	<0,001
160	0,21	3	<0,001
320	0,10	1	<0,001

¹Mức tăng sinh khối u tương đối (RTG) được tính bằng (khối lượng u ở tuần thứ 3/khối lượng u ở ngày thứ nhất) đối với mỗi động vật.

²100 $\times$ (RTG trung bình đối với liều CMC-544/RTG trung bình đối với nhóm đối chứng).

³Giá trị p từ phép so sánh t-test một chiều của CMC theo đối chứng, bằng cách sử dụng RTG chuyển hạng làm biến số hữu hạn, Biến số sai số đối với tất cả các phép thử t-test dựa trên biến số tập hợp, s^2 , ở tất cả các nhóm điều trị ($s^2=154,54$).

Khả năng của CMC-544 được tạo ra bởi quy trình mới này ức chế sự tăng sinh của các thể dị ghép u lympho tế bào B lan rộng bằng cách sử dụng các mô hình u lympho RAMOS và RL cũng đã được nghiên cứu. Các khối u được cho tăng sinh đến giai đoạn có kích thước 1,5g hoặc 2g sau khi CMC-544 hoặc thể liên hợp đối chứng âm tính phù hợp isotyp (CMA-676) được cung cấp qua đường trong màng bụng ở liều calicheamixin được liên hợp là 160 μ g/kg theo chế độ cấp liều ban đầu vào các ngày 1, 5 và 9. Chế độ cấp liều tương tự được thực hiện trước đó để gây ra quá trình thoái triển kéo dài của các khối u ở giai đoạn kích thước nhỏ (Bảng 6). Như được thể hiện trên Fig.19, việc cung cấp CMC-544 cho chuột nhất mang u lympho RAMOS làm thối triển dần khối lượng u lympho tồn tại trước đó và đến ngày thứ 20, 3 trong số 4 chuột nhất mang khối u đã không còn khối u. Việc theo dõi các chuột nhất không còn khối u này tới ngày thứ 50 cho thấy không có bất kỳ sự tăng sinh nào của u lympho RAMOS đã thối triển. Trái lại, mẫu đối chứng phù hợp isotyp, CMA-676, không có tác dụng nào tới sự tăng sinh khối u. Có 4 trong số 5 chuột nhất mang khối u lớn được điều trị bằng CM-676 phải được mổ trước ngày 15 do khối u nặng chiếm đến 15% khối lượng cơ thể của chúng.

Thí nghiệm tương tự sử dụng CMC-544 đã được thực hiện theo mô hình u lympho RL. Việc cung cấp CMC-544 qua đường trong màng bụng ở liều 160 μ g/kg theo chế độ tương tự như đã được mô tả trước đó đã làm thối triển trên 90% khối lượng tồn tại trước đó của u lympho RL trong vòng 30 ngày. tuy nhiên, đến ngày 45, có 2 chuột nhất trong nhóm có các u lympho đã bị teo lại thể hiện sự tái tăng sinh các khối u này. Các kết quả này chỉ ra rằng CMC-544 có thể làm thối triển các u lympho đã được thiết lập nhỏ cũng như lớn. Trong một số ít nghiên cứu không được thể hiện ở đây, các u lympho RL mà đã tái tăng sinh lan tỏa sau quá trình thoái triển được cảm ứng bởi CMC-544 khởi đầu đã được điều trị lặp lại bằng CMC-544. Các nghiên cứu này cho thấy rằng các khối u RL vẫn phản ứng với giai đoạn điều trị thứ hai bằng CMC-544 và lại thối triển. Do đó, việc điều trị bằng CMC-544 có hiệu quả chống lại các khối u lympho tế bào B nhỏ và lớn với khả năng điều trị lặp lại.

II. so sánh trong cơ thể thể liên hợp được tạo ra bằng các quy trình liên hợp CMA-676 và CMC-544

Fig.20 thể hiện các kết quả thí nghiệm tương trung, trong đó các chuột nhất mang u lympho RL giai đoạn đã tiếp nhận 2 liều khác nhau (80 và 320 μ g/kg của calicheamixin được liên hợp) của CMC-544 được tạo ra bằng quy trình liên hợp CMA-676 và quy trình liên hợp CMC-544 bằng cách sử dụng chế độ cấp liều chuẩn. Hiệu quả chống ung thư quan sát được là phụ thuộc vào liều như mong muốn và không có sự khác biệt nào về hiệu quả của cả hai chế phẩm CMC-544. Trái lại, N-acetyl-gama calicheamixin DMH không được liên hợp mà được cung cấp qua đường trong màng bụng ở 160 μ g/kg đã không hoạt động. Tuy nhiên, có thể khẳng định rằng, đối với mỗi liều calicheamixin được liên hợp, lượng protein kháng thể được cung cấp ở dạng thể liên hợp là cao gấp 4 lần đối với CMC-544 được tạo ra bằng quy trình CMA-676 so với CMC-544 được tạo ra bởi quy trình CMC-544. Do hàm lượng calicheamixin của thể liên hợp đích có chức năng cơ bản là tạo ra tác dụng chống ung thư nên có thể phân phát lượng calicheamixin cần thiết thông qua thể liên hợp được ra bởi quy trình mới này bằng cách sử dụng các lượng kháng thể đích nhỏ hơn. Mức tải tăng của thể liên hợp được tạo ra bởi quy trình CMC-544 là có hiệu quả do lượng LCF thấp.

III. Điều trị các khối u kháng bằng rituximab (rituxanTM)

Vấn đề tiếp theo cần được giải quyết là các u lympho tế bào B nào tăng sinh sau khi việc điều trị không liên tục bằng rituximab (RituxanTM) kháng CD20 từ nguồn thương mại vẫn có thể phản ứng với việc điều trị bằng CMC-544. Để giải quyết vấn đề này, các u lympho RL tiến triển (không giai đoạn) đã được điều trị bằng rituximab (RituxanTM) trong 3 tuần. Chủng nào liệu pháp điều trị bằng rituximab (RituxanTM) còn tiếp tục thì sự tăng sinh của u lympho RL còn bị ức chế. Khi dừng liệu pháp điều trị bằng rituximab (RituxanTM), các u lympho RL tăng sinh nhanh đến kích thước khoảng 1g, tại thời điểm này chúng được điều trị bằng CMC-544 ở liều 160 μ g/kg qua đường trong màng bụng. Như được thấy trên các Fig.21 và 22, các u lympho RL này vẫn phản ứng với CMC-544 với 80% số chuột nhất không còn khối u tới ngày 60. Do đó, CMC-544 có thể làm thoái triển các u lympho tế bào B bằng 3 liều trong khi chỉ có thể bị ức chế bằng cách cung cấp liên tục rituximab (RituxanTM).

Ví dụ 8: Tác dụng trong ống nghiệm và trong cơ thể của CMC-544

I. Các nghiên cứu về khả năng liên kết và độc tính

CMC-544 đã được đánh giá về khả năng liên kết của nó với CD22 và cả về độc tính của nó theo các mô hình trong ống nghiệm và trong cơ thể. CMC-544 cũng được so sánh với CMA-676, một thể liên hợp đôi chứng âm tính phù hợp isotyp của hP67.6 (IgG4) với calicheamixin được liên kết với AcBut, và được so sánh với rituximab (RituxanTM), một kháng thể đơn dòng kháng CD22 của IgG1 dạng khảm (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA) được bán trên thị trường và được mua từ Medworld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). Các kháng thể sau đã được sử dụng trong các nghiên cứu về vùng liên kết của G5/44: BU12 (Celltech, Slough, UK); BLCAM, HD239 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA); RFB-4 (Anzell Corp, Bayport, MN); SHCL-1, Leu 14 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); 4KB128 và To 15 (Dako Corp, Carpinteria, CA); M6/13 và M5/44 (Celltech, Slough, UK). Các kháng thể bổ sung được dùng trong các nghiên cứu phòng bế là SJ10 (Immunotech, Fullerton, CA) và M17.1.1, M19.1.1, M38.1.1 (Celltech, Slough, UK). Các dòng tế bào dùng cho các nghiên cứu này, bao gồm dòng tế bào u lympho Berkitt Ramos (CRL-1923) và dòng tế bào u lympho không Hodgkin (NHL) RL (CRL-2261), đều được thu nhận từ American Type Culture Collection. Các dòng tế bào này được xác định là không có chất nấm bằng thử nghiệm phát hiện chất nấm nhờ phản ứng PCR (ATCC, Manassas, VA). Các dòng tế bào này được duy trì dưới dạng các môi trường nuôi cấy huyền phù trong môi trường RPMI chứa FBS 10%, HEPES 10mM, natri pyruvat 1mM, glucoza 0,2%, natri penixilin G 100U/ml và streptomycin 100µg/ml.

G5/44 có thể ức chế sự liên kết của các kháng thể đơn dòng của chuột có tính đặc hiệu đã biết với CD22 hay không đã được đánh giá bằng phân tích BIAcore bằng cách sử dụng Fc-CD22 được cố định với mẫu dò BIAcore CM5. Các đơn vị cộng hưởng plasmon bề mặt (RU), được thu nhận có hoặc không có sự bão hoà trước của Fc-CD22 được cố định với G5/44, đã được so sánh. Việc phân tích tương tác phân tử sinh học được thực hiện bằng BIACORE 2000. Các kháng thể được cho qua bề mặt mẫu đối chứng trống (tế bào dòng 1 đóng vai trò là mẫu đối chứng, không gắn protein) và bề mặt kiểm tra của Fc-CD22 (tế bào dòng 2) được cố định trên mẫu dò cảm biến CM5 nhờ phương pháp hoá học gắn amin tới mức 9,042RU. Sơ đồ cảm biến thu được

là đáp ứng (RU) đối với tế bào dòng 2 trừ đáp ứng (RU) đối với tế bào dòng 1. Sơ đồ cảm biến thứ hai được thu nhận trước hết bằng cách bão hoà các tế bào dòng bằng G5/44 (100µg/ml) trước khi đưa các kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD22 vào, các kháng thể này đã được xác định trước đó về sự liên kết của chúng. Ngay khi đó mức đáp ứng của G5/44, các kháng thể đơn dòng kháng CD22 của chuột đã được tiêm nhỏ giọt một cách riêng rẽ mà không loại bỏ G5/44. Đáp ứng kết hợp thứ hai được tạo ra do sự liên kết của kháng thể đơn dòng kháng CD22 của chuột với CD22 đã được phong bế G5/44 cũng được ghi lại. Nếu kháng thể chuột liên kết với CD22 tại các vị trí không liên quan đến các vị trí được chiếm lĩnh bởi G5/44 thì các đáp ứng kết hợp là phụ trợ. Nếu sự liên kết của G5/44 với CD22 làm gián đoạn hoặc ngăn chặn sự liên kết của kháng thể thứ hai thì các đáp ứng kết hợp không phải là phụ trợ. Mỗi phép đo kết hợp thứ hai được chính xác hoá đối với việc tách tương tác G5/44:CD22.

G5/44 đã ngăn chặn sự liên kết chỉ của các kháng thể liên kết với epitop A/vùng 1 tương tự Ig của CD22 (SHCL1 Leu 14 và HD239), điều này chỉ ra rằng G5/44 cũng liên kết trong vùng này của CD22. Các kháng thể liên kết với epitop B/vùng 3 tương tự Ig của CD22 (RFB-4), epitop C/vùng 4 tương tự Ig của CD22 (To 15) và vùng 2 tương tự Ig của CD22 (4KB128), không bị phong bế bởi G5/44. Các kết quả này chỉ ra rằng vị trí liên kết với G5/44 trên CD22 không được định vị trên vùng tương tự Ig đầu tiên do nó ngăn chặn sự liên kết của các kháng thể đơn dòng kháng CD22 có chức năng nhận biết vùng tương tự Ig đầu tiên của CD22 (epitop A). Kháng thể kháng CD22 khác, M6/13 (Celltech, Slough, UK), có tính đặc hiệu phụ chưa biết cũng bị phong bế bởi G5/44 (Celltech, Slough, UK), do vậy, cho phép lập bản đồ vị trí liên kết của M6/13 với epitop A/vùng 1 tương tự Ig của CD22. Kháng thể M5/44, có nguồn gốc từ G5/44 của chuột và có tính đặc hiệu tương tự G5/44, ức chế sự liên kết của G5/44 và đóng vai trò là mẫu đối chứng dương tính. Kháng thể kháng CD19 là BU12 đóng vai trò là mẫu đối chứng âm tính trong các đánh giá này. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 7.

Bảng 7: Sự liên kết của kháng thể đơn dòng kháng CD22 của chuột có các đặc hiệu xác định đối với Fc-CD22 được điều trị trước bằng G5/44. Đáp ứng liên kết được thể hiện dưới dạng đơn vị cộng hưởng plasmon bề mặt (RU)

Kháng thể	Epitop/vùng Ig của CD22	Đáp ứng 1 với G5/44	Đáp ứng 2 sau kháng thể đơn dòng kháng CD22 thứ 2	Đáp ứng 3 (đáp ứng 2-1)	Đáp ứng 3 được điều chỉnh đối với việc tách g5/44	Liên kết của kháng thể đơn dòng thứ 2 mà không điều chỉnh G5/44 đối với nền	Mức ức chế bởi G5/44 (%)
Kháng CD22, SHCL-1 Leu 14	A 1	654,3	579,8	-74,5	9	29,3	69
Kháng CD22 HD239	A 1	710,5	628,7	-81,8	1,7	19,3	91
Kháng CD22 M6/13	? ?	710,0	652,7	-57,3	26,2	152,4	83
Kháng CD22 RFB-4	B 3	703,5	1108,5	405	488,5	534	9
Kháng CD22 4KB128	? 2	691,0	1343,5	652,5	736,0	738,8	0
Kháng CD22 To 15	C 4	676,9	1163,6	486,7	570,2	614,6	7
Kháng CD22 M5/44	Đối chứng dương tính	725,1	679,3	-45,8	37,7	613,9	94
Kháng CD19 BU12	Đối chứng âm tính	686,2	602,7	-83,5	0	0	0

Bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng của chuột có các đặc hiệu liên kết đã biết đối với các vùng cụ thể với CD22, khả năng G5/44 ngăn chặn sự liên kết của các kháng thể này với các tế bào B đã được nghiên cứu. Ngoài ra, khả năng các kháng thể đơn dòng này ngăn chặn sự liên kết của G5/44 với các tế bào B cũng được nghiên cứu. Trong các nghiên cứu này, 1×10^5 tế bào Ramos trước tiên được cho tiếp xúc với kháng thể kháng CD22 của chuột (G5/44 được là tương thích với người $10 \mu\text{g/ml}$ hoặc kháng CD22 đơn dòng của chuột) trong 1 giờ ở 4°C trước khi cho các tế bào này tiếp xúc với G5/44 ($10 \mu\text{g/ml}$). Các tế bào được ủ thêm trong 1 giờ ở 4°C . sau khi điều trị bằng kháng thể, các tế bào B được tạo viên và rửa bằng BSA PBS-1% và $100 \mu\text{l}$ kháng thể thứ 2 thích hợp được bổ sung vào (hoặc là FITC-(chuỗi nặng và nhẹ) của dê kháng người hoặc là FITC-(chuỗi nặng và nhẹ) của dê kháng chuột) được pha loãng theo tỷ lệ 1:100 trong BSA PBS-1% trong 30 phút ở 4°C . Các tế bào lại được tạo viên, rửa và hoà tan lại trong BSA PBS-1% và bổ sung vào ống chứa $250 \mu\text{l}$ formaldehyt PBS-1%. Cường độ huỳnh quang được gắn với các tế bào được đo bằng bào kế dạng dòng bằng cách sử dụng bào kế dạng dòng BD FACSort.

Các kết quả này cho thấy rằng sự tiếp xúc trước của G5/44 với các tế bào B CD22⁺ dẫn đến sự ức chế đáng kể quá trình liên kết tiếp theo của các kháng thể đơn dòng kháng CD22 M5/44 và M6/13. Trái lại, sự liên kết của các kháng thể đơn dòng kháng CD22 RFB4, To 15, HD239 và 4KB với các tế bào B không bị ức chế bởi G5/44. Sự ức chế không đáng kể của G5/44 đối với sự liên kết của HD239 với các tế bào B khi được phát hiện bằng bào kế dạng dòng là không mong muốn, đặc biệt là khi phân tích BIAcore chỉ ra rằng G5/44 có thể ngăn chặn sự liên kết của HD239 với CD22. Sự ức chế không mạnh của G5/44 đối với sự liên kết của HD239 có thể được giải thích dựa trên sự khác biệt về ái lực tương đối của chúng đối với CD22. Khi các kháng thể đơn dòng kháng CD22 của chuột trên đây được kiểm tra khả năng ức chế sự liên kết của G5/44 với các tế bào B CD22⁺, SHCL1 và M6/13, mà không phải các kháng thể đơn dòng kháng CD22 khác, ức chế sự liên kết của G5/44. Các epitop liên kết của HD239 và SHCL1 đã được lập bản đồ đối với vùng tương tự Ig đầu tiên của CD22. Tuy nhiên, các epitop được nhận biết bởi M6/13 hoặc M5/44 không được lập bản đồ. Các nghiên cứu ngăn chặn được chi tiết hoá trên đây chỉ ra rằng các kháng thể này nhận biết các epitop định vị trên vùng tương tự Ig đầu tiên của CD22, được gọi chung là epitop A.

Hai mươi nghìn tế bào Ramos đã được ủ với các liều CMC-544 khác nhau có và không có rituximab (Rituxan™) trong 96 giờ. Sau 96 giờ, khả năng sống của tế bào được đo bằng sự thải loại propidi iodua được phân tích bằng bào kế dạng dòng. Khả năng sống trung bình của các lỗ từ 3 đến 6 được tính và mức ức chế khả năng sống của tế bào đáp ứng liều đã được tính đối với các điều trị khác nhau. Mức ức chế khả năng sống của tế bào đáp ứng cơ sở được tính từ nồng độ bằng 0 của CMC-544. Phép hồi quy lôgistic đã được sử dụng để kiểm tra xem CMC-544 có gây ra quá trình ức chế phụ thuộc liều có ý nghĩa thống kê đối với sự tăng sinh tế bào Ramos hay không qua liều nằm trong khoảng từ 0,01 đến 3ng calicheamixin DMH/ml. Phép hồi quy lôgistic cũng đã được sử dụng để kiểm tra xem sự tương tác của CMC-544 với rituximab (Rituxan™) có ý nghĩa thống kê hay không. Nồng độ ức chế trung bình (IC_{50}) cũng được tính và tính hiệu quả của mỗi điều trị liên quan đến việc điều trị chỉ bằng CMC-544 đã được ghi lại. Phân tích thống kê được thực hiện bằng quy trình PROBIT trong SAS version 8.2.

Các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng CMC-544 có gây ra quá trình ức chế phụ thuộc liều đối với sự tăng sinh tế bào Ramos qua liều nằm trong khoảng từ 0,01 đến 3ng calicheamixin DMH/ml. Nồng độ ức chế trung bình (IC_{50}) của CMC-544 đơn độc là 0,029ng/ml. Rituximab (Rituxan™) ở các nồng độ 2, 20 và 200 μ g/ml đã được bổ sung vào các tế bào đã được xử lý bằng CMC-544 để xác định xem sự tương tác của rituximab (Rituxan™) với hoạt tính gây độc tế bào của CMC-544 có ý nghĩa thống kê hay không. Rituximab (Rituxan™), được bổ sung vào ở nồng độ 20 và 200 μ g/ml mà không có CMC-544, không ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng sinh của tế bào (mức tăng sinh của mẫu đối chứng lần lượt là 111,7% và 94%). Khi kết hợp với CMC-544, cả 3 nồng độ của rituximab (Rituxan™) tạo ra các dịch chuyển có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) sang trái trong đường xiên và phần bị chặn của cung đáp ứng liều CMC-544. Việc kết hợp với rituximab có nồng độ 2 và 200 μ g/ml tạo ra các dịch chuyển lớn nhất trong các cung đáp ứng liều. Hai cung này không khác biệt nhau một cách có ý nghĩa thống kê nhưng lại khác biệt một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với việc kết hợp với liều 20 μ g/ml. Nghiên cứu thứ 2 (các kết quả không được báo cáo) khẳng định các kết quả quan sát được trong nghiên cứu thứ nhất. Nồng độ ức chế trung bình đối với các hỗn hợp của rituximab (Rituxan™) có nồng độ 2, 20 và 200 μ g/ml với CMC-544 lần lượt là 0,0072, 0,0081 và 0,0072ng/ml. Nồng độ ức chế trung bình của

hỗn hợp CMC-544 cộng với rituximab (RituxanTM) có hiệu quả cao gấp khoảng 4 lần so với IC₅₀ của CMC-544 đơn độc.

II. Các mảnh dị ghép dưới da có hoạt tính chống ung thư trong cơ thể và các u lympho tế bào B phân tán hệ thống ở chuột nhắt SCID

Chuột nhắt trần cái, nặng 18-22g, được cho chiếu xạ toàn cơ thể (400rad). Việc chiếu xạ còn ức chế hệ miễn dịch của chuột nhắt tăng cường hấp thụ khối. Sau khi chiếu xạ 3 ngày, các chuột nhắt được tiêm qua đường dưới da bằng 10⁷ tế bào RL trong Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, được pha loãng trong môi trường RPMI theo tỷ lệ 1:1) ở mặt lưng thuộc sườn phải. Khi các khối u đạt tới kích thước thích hợp (0,3g, thường sau 21 ngày), CMC-544, rituximab (RituxanTM) hoặc liệu pháp CHOP (xem dưới) đã được cung cấp trong nước muối vô trùng ở 0,2ml/chuột nhắt qua đường trong màng bụng. Ngày đầu tiên cung cấp thuốc được coi là ngày 1. Hai liều bổ sung đã được cấp vào các ngày 5 và 9 (điều trị = q4D×3). Liệu pháp CHOP bao gồm xyclophosphamit (C), (CytosanTM, Bristol-Meyers Squibb Co., Princeton, NJ) 40mg/kg qua đường trong màng bụng; doxorubicin HCl (H), (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO) 3,3mg/kg qua đường trong màng bụng; vincristin (O), (GensiSicor Pharmaceuticals, Irvine, CA) 0,5mg/kg qua đường trong màng bụng; và prednizon (P), (Roxane Labs., Columbia, OH) 0,2mg/kg qua đường miệng. CHO được cung cấp theo chế độ cấp liều tương tự CMC-544 và rituximab (RituxanTM) (q4D×3) trong khi prednizon được cung cấp qua đường miệng trong các ngày còn lại đối với 5 liều (q2D×5). Các khối u được đo ít nhất một lần mỗi tuần và được tính là: khối lượng khối u (g) = 0,5×(chiều rộng khối u/2)×(chiều dài khối u). Các giá trị trung bình SEM của nhóm được tính và so sánh với nhóm đối chứng về ý nghĩa thống kê bằng cách sử dụng nhiều phép thử T-test. Các giá trị trung bình nhóm được ghi lại tới 50 ngày hoặc cho đến khi có một chuột nhắt chết (làm thay đổi giá trị trung bình nhóm) hoặc khối u tăng sinh quá lớn (>3,5g) và chuột nhắt này sẽ chết. Sau thời điểm này, khối lượng khối u được ghi lại chỉ đối với từng chuột nhắt riêng rẽ ở tất cả các nhóm điều trị. Số chuột không có khối u vào cuối quá trình nghiên cứu đối với mỗi nhóm điều trị cũng được ghi lại.

Để xác định tác dụng của CMC-544 đơn độc hoặc kết hợp với các tác nhân có hoạt tính sinh học khác đối với các u lympho lan tỏa, mô hình chuột nhắt SICD đã

được sử dụng. Chuột nhắt đực SICD (CB17 SICD), nặng 20-25g, được tiêm bằng 106 tế bào Ramos qua tĩnh mạch đuôi (0,2ml). Sau khi tiêm tế bào 3 ngày hoặc 9 ngày, các chuột nhắt được cung cấp tá dược lỏng, các thể liên hợp (CMC-544 hoặc CMA-676) hoặc rituximab (RituxanTM) qua đường trong màng bụng đối với tổng cộng 3 liều. Đối với chế độ điều trị 3 ngày, các chuột nhắt được cung cấp liều vào các ngày 3, 7 và 11. Đối với chế độ điều trị 9 ngày, các chuột nhắt được cung cấp liều vào các ngày 9, 13 và 17. Trong chế độ điều trị 9 ngày, các hỗn hợp giữa CMC-544 và rituximab (RituxanTM) cũng được cung cấp như được mô tả dưới đây. Các chuột nhắt được theo dõi hằng ngày về sự xuất hiện bệnh liệt chi sau, thời điểm mà chúng sẽ bị giết chết. Sử dụng từ 7 đến 10 chuột nhắt/nhóm điều trị. Thời gian sống sót trung bình nhóm ($\pm$ SD), thời gian sống sót trung vị, tối thiểu và tối đa đều được tính. Sự khác biệt về phân bố sống sót giữa các nhóm đã được xác định bằng phép thử hạng Log không thông số với ý nghĩa được ghi lại ở mức 0,05. Các cung sống sót được xây dựng bằng phương pháp Kaplan-Meier.

Nghiên cứu ban đầu đã kiểm tra tác dụng của 2 chế độ cấp liều khác nhau đến thời gian sống sót của các chuột nhắt SCID có u lympho lan toả. Nghiên cứu thứ nhất kiểm tra sự khởi đầu cấp thuốc 3 ngày sau khi các tế bào khối u được tiêm qua đường trong tĩnh mạch (mô hình tiến triển) trong khi nghiên cứu thứ hai làm trì hoãn cấp thuốc cho đến 9 ngày sau khi tiêm tế bào khối u (kiểu đã được thiết lập). Trong mỗi nghiên cứu, CMC-544 (160 μ g/kg), CMA-676 (160 μ g/kg), hoặc rituximab (RituxanTM) (20mg/kg) đã được cung cấp 3 liều qua đường trong màng bụng cách nhau 4 ngày (Q4D $\times$ 3). Theo mô hình tiến triển, các chuột nhắt được điều trị bằng tá dược lỏng có thời gian sống sót trung bình là 27 ngày (Fig.23, Bảng 8). CMA-676, mẫu đối chứng isotyp đối với CMC-544, không làm tăng thời gian sống sót một cách có ý nghĩa ($p>0,05$). CMC-544 làm tăng thời gian sống sót một cách có ý nghĩa tới 41 ngày trong khi rituximab có ảnh hưởng lớn, làm tăng thời gian sống sót tới trên 125 ngày (lớn hơn CMC-544 một cách có ý nghĩa, $p<0,05$). Việc trì hoãn cấp liều cho đến khi các tế bào khối u có cơ hội lan toả (hướng đích) và tích tụ trong các mô đích (mô hình đã được thiết lập) đã làm thay đổi các kết quả đối với CMC-544 và rituximab (RituxanTM). Một lần nữa, CMA-676 không có tác dụng đáng kể tới thời gian sống sót (Fig.24, Bảng 8). Rituximab (RituxanTM) làm tăng thời gian sống sót trung bình tới 62,6 ngày trong khi CMC-544 làm tăng thời gian sống sót tới 83,5 ngày. Không có sự khác biệt nào đáng

kể giữa các tác dụng của CMC-544 và rituximab (Rituxan™) theo mô hình đã được thiết lập.

Bảng 8: Các số đo mô tả thời gian sống sót

Nghiên cứu	Hợp chất	Thời gian sống sót trung bình	Thời gian sống sót trung vị	Độ lệch chuẩn	Thời gian sống sót tối thiểu	Thời gian sống sót tối đa	Số động vật
Mô hình tiến triển	CMA-676	32,9	34,0	3,9	28,0	36,0	7
	CMC-544	41,0	38,0	10,1	32,0	60,0	7
	Rituximab	128,4	>130,0	4,7	119,0	>130,0	7
	Tá được lỏng	27,2	28,0	1,4	25,0	28,0	8
Mô hình đã được thiết lập	CMA-676	33,7	31,0	4,6	30,0	42,0	7
	CMC-544	83,5	76,5	41,6	34,0	>130,0	8
	Rituximab	62,6	37,0	46,2	31,0	>130,0	7
	Tá được lỏng	30,5	29,0	3,6	27,0	36,0	8

Nghiên cứu sơ bộ đã được thực hiện để xác định rituximab (Rituxan™) có tác dụng nào không, dương tính hoặc âm tính, tới đáp ứng sống sót của CMC-544. CMC-544 (160µg/kg) đã được cung cấp có hoặc không có rituximab (Rituxan™) (20mg/kg, được gọi dán nhãn hỗn hợp thuốc liều cao (HD)). Ngoài ra, các liều CMC-544 thấp hơn (80µg/kg) đã được đồng cung cấp với các liều rituximab (Rituxan™) thấp hơn (10mg/kg). Các hợp chất này không được cung cấp riêng biệt lần lượt ở các liều 80µg/kg và 10mg/kg do số chuột nhất trong nghiên cứu này có hạn. Hỗn hợp này, CMC-544 (80µg/kg) với rituximab (Rituxan™) (10mg/kg), được dán nhãn là hỗn hợp liều trung bình (MD) đã được sử dụng để xác định tác dụng của các hỗn hợp liều thấp đến sự sống sót của chuột nhất SCID. CMC-544 (160µg/kg) và rituximab (Rituxan™) (20mg/kg), được cung cấp đơn độc, thể hiện như được báo cáo theo mô hình đã được thiết lập trên đây. Mỗi hợp chất này kéo dài thời gian sống sót trung bình lần lượt đến 58,5 và 50,5 ngày (Fig.25, Bảng 9). Khi kết hợp, thời gian sống sót trung bình tăng không đáng kể (mặc dù không có ý nghĩa thống kê, $p>0,05$) đến 64,4 ngày đối với hỗn hợp liều cao. Hỗn hợp liều trung bình giữa CMC-544 (80µg/kg) và rituximab (Rituxan™) (10mg/kg) làm tăng đáng kể ($p<0,05$ so với nhóm được điều trị bằng tá được lỏng) thời gian sống sót đến giá trị trung bình 92,4 ngày. Các kết quả này cho ra

rằng các hỗn hợp liều thấp hơn giữa CMC-544 và rituximab (Rituxan™) là đáng tin cậy.

Bảng 9: Các số đo mô tả thời gian sống sót đối với nghiên cứu kết hợp ban đầu

Hợp chất	Thời gian sống sót trung bình	Thời gian sống sót trung vị	Độ lệch chuẩn	Thời gian sống sót tối thiểu	Thời gian sống sót tối đa	Số động vật
CMC MD+Ritux MD	92,4	>100,0	16,0	62,0	>100,0	10
CMC HD+Ritux HD	64,4	58,5	26,7	29,0	>100,0	10
CMC-544	58,5	34,5	35,8	27,0	>100,0	10
Rituximab	50,5	41,0	26,4	30,0	>100,0	10
Tá dược lỏng	31,0	27,0	9,7	27,0	56,0	9

CMC MD = CMC liều trung bình, 80µg/kg

CMC HD = CMC liều cao, 160µg/kg

Ritux MD = Rituximab liều trung bình, 10mg/kg

Ritux HD = Rituximab liều cao, 20mg/kg

Nghiên cứu kết hợp khác với CMC-544 và rituximab (Rituxan™) đã được thực hiện. Các nhóm điều trị sau đây được sử dụng: CMC-544 ở 40, 80 và 160µg/kg; rituximab (Rituxan™) ở 5, 10 và 20mg/kg; và CMC-544 ở 40µg/kg cộng với rituximab (Rituxan™) 5mg/kg, CMC-544 ở 80µg/kg cộng với rituximab (Rituxan™) 10mg/kg và CMC-544 ở 160µg/kg cộng với rituximab (Rituxan™) 20mg/kg. Tất cả các liều rituximab (Rituxan™) làm tăng không đáng kể thời gian sống sót trung bình đến thời gian nằm trong khoảng từ 33 đến 40 ngày (tất cả các liều đều có $p < 0,05$ so với thời gian sống sót trung bình 25,8 được điều trị bằng tá dược lỏng, Fig.26, Bảng 10). CMC-544 liều cao, 160µg/kg, làm tăng thời gian sống sót trung bình đến 85 ngày, phù hợp với các kết quả được báo cáo trong 2 nghiên cứu trước. Việc kết hợp CMC-544 với rituximab (Rituxan™) không làm tăng đáng kể thời gian sống sót (Fig.27, Bảng 10). Hai liều CMC-544 thấp hơn (80 và 40µg/kg) đều làm tăng đáng kể ($p < 0,05$) thời gian sống sót trung bình so với CMC-544 liều cao. Đối với các liều CMC-544 40µg/kg và 80µg/kg, có tới 90% và 80% số chuột, theo thứ tự, vẫn sống sót tới ngày 125. Các liều CMC-544 thấp hơn có hiệu quả cao hơn so với liều cao 160µg/kg.

Rituximab (RituxanTM), khi kết hợp với CMC-544, không có tác dụng rõ rệt tới hoạt tính của CMC-544 theo mô hình tế bào B lan toả ở chuột nhắt SCID ở các liều được thử (xem trên). Liều CMC-544, khi được đồng cung cấp với rituximab (RituxanTM), có dẫn đến sự tăng cường hoặc ức chế hoạt tính chống ung thư không cũng đã được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình dị ghép u lympho B RL dưới da ở chuột nhắt trần Balb/c. Theo mô hình u lympho B dưới da, các khối u ở giai đoạn có khối lượng trung bình 300mg mà sau giai đoạn này 2 thuốc chữa bệnh cần nghiên cứu đã được cung cấp qua đường trong màng bụng. CMC-544 được sử dụng ở 20 hoặc 80µg/kg Q4D×3 có hoặc không có rituximab (RituxanTM) (20mg/kg Q4D×3). Việc đồng cung cấp rituximab (RituxanTM) không làm tăng cường hoặc ức chế đáng kể ($p>0,05$) hiệu quả chữa bệnh của CMC-544 (Fig.28). Rituximab (RituxanTM), được cung cấp đơn độc, ức chế sự tăng sinh u lympho B RL (ức chế 57% sự tăng sinh khối u ở ngày 20, $p<0,05$ so với mẫu được điều trị bằng tá dược lỏng) trong nghiên cứu này, tương tự mức ức chế được quan sát với liều CMC-544 thấp hơn.

Chế độ hoá trị liệu CHOP ((cyclophosphamit, doxorubixin, vincristin và prednizon) là chế độ điều trị được sử dụng phổ biến nhất đối với các bệnh nhân u lympho không Hodgkin. Tác dụng chống ung thư của CHOP được so sánh với CMC-544 trong các mảnh dị ghép u lympho B RL đã được thiết lập. Các thành phần riêng rẽ của chế độ CHOP được sử dụng ở các liều dung nạp cực đại tương ứng của chúng được đánh giá ở các chuột nhắt trần (số liệu không được báo cáo) và có thành phần như sau: cyclophosphamit (C), 40mg/kg qua đường trong màng bụng; doxorubixin (H), 3,3mg/kg qua đường trong màng bụng; vincristin (O), 0,5mg/kg qua đường trong màng bụng; và prednizon (P), 0,2mg/kg qua đường miệng. CHO được cung cấp theo chế độ Q4D×3 còn P được cung cấp qua đường miệng theo chế độ 2D×5. CMC-544 được cung cấp qua đường trong màng bụng theo chế độ Q4D×3 ở liều đương lượng calicheamixin 160µg/kg. Việc điều trị bằng CHOP ban đầu gây ức chế đáng kể sự tăng sinh u lympho B RL (Fig.29). tuy nhiên, sau 3 tuần, các khối u lại tái tăng sinh với tỷ lệ tăng sinh tương tự nhóm được điều trị bằng tá dược lỏng. Trái lại, tác dụng chống ung thư của CMC-544 là hoàn toàn và kéo dài trong suốt khoảng thời gian thí nghiệm. Các kết quả này cho thấy rằng CMC-544, ở liều thấp hơn đáng kể so với liều không gây chết tối đa ở chuột nhắt trần, có hiệu quả cao hơn so với liệu pháp kết hợp CHOP.

Các nghiên cứu này cho thấy rằng rituximab (RituxanTM), khi kết hợp với CMC-544, làm tăng đáng kể hoạt tính gây độc tế bào của CMC-544 quan sát được ở các tế bào u lympho B Ramos. Sự tương tác hiệp lực ở các tế bào Ramos đối với rituximab (RituxanTM) và các glucocorticoid cũng vừa được báo cáo. Ngoài ra, sự ức chế sinh trưởng hiệp lực ở 4 trong số 8 dòng tế bào bổ sung đã được quan sát với rituximab (RituxanTM) khi được cung cấp kết hợp với dexametazon 10 μ M.

Rituximab (RituxanTM) đơn độc, có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 đến 10 μ g/ml, gây ức chế sự tăng sinh tế bào Ramos một cách có ý nghĩa, mặc dù nhỏ (tối đa 18%). Ngoài ra, nó hoạt động ở 6 trong số 8 dòng tế bào B u lympho không Hodgkin khi được ủ ở 10 μ g/ml (ủ trong 48 giờ). Ghetie và các đồng tác giả đã cho thấy rằng rituximab (RituxanTM) 10 μ g/ml làm tăng mức chết không theo chương trình đến 6,2% (so với 3,5% ở các tế bào được điều trị bằng tá dược lỏng) sau 24 giờ ủ với các tế bào Ramos. Trong các nghiên cứu hiện tại, rituximab (RituxanTM) ở các liều 20 và 200 μ g/ml không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tế bào Ramos khi được cung cấp đơn độc. Ở chuột nhắt, không có bằng chứng về bất kỳ sự tương tác nào giữa CMC-544 và rituximab (RituxanTM) theo mô hình lan toả hoặc mô hình dị ghép dưới da. Các hỗn hợp thuốc được thử không ngăn cản các tác dụng của nhau hoặc tăng cường chúng. Việc làm giảm các liều của mỗi thuốc trong mô hình lan toả có làm thay đổi quan sát này hay không thì cần phải được xác định.

Mô hình u lympho tế bào B lan toả với các tế bào Ramos đã được mô tả bởi Flavell và các đồng tác giả. Thời gian sống sót trung vị đối với các chuột nhắt được điều trị bằng tá dược lỏng được báo cáo là nằm trong khoảng từ 34 đến 36 ngày. Các chuột nhắt đã tiến triển bệnh liệt chi dưới và tiến triển thành suy yếu, chết ngay sau đó. Việc phân tích mô học các cơ quan này chỉ ra rằng các cơ quan liên quan phổ biến nhất là tuyến thượng thận, lách và khoang dưới màng nhện. Sự thâm nhập vào khoang dưới màng nhện thường lan rộng vào não. Rituximab (RituxanTM) có hiệu nghiệm khi được cung cấp trong giai đoạn sớm của quá trình tiến triển của bệnh đối với các chuột nhắt SCID lan toả (Fig.23) nhưng ít có hiệu nghiệm khi được cung cấp ở ngày thứ 9 trong giai đoạn đã được thiết lập của mô hình này (Fig.24). Rituximab (RituxanTM), thuộc isotyp IgG1, có thể hoạt động thông qua các cơ chế tác động của cơ thể chủ là chuột nhắt. Các cơ chế này bao gồm khả năng gây độc tế bào qua trung gian bổ thể

và/hoặc khả năng gây độc tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể thông qua việc thu hút các tế bào giết tự nhiên xuất hiện ở các chuột SCID. Các tế bào u Ramos đã được tiêm có khả năng nhạy hơn trước hết đối với các cơ chế miễn dịch của cơ thể chủ được hoạt hoá bởi rituximab (Rituxan™) trước khi các tế bào này có cơ hội thâm nhập vào các cơ quan bị nhiễm. Kháng thể G5/44 không được liên hợp (phân tử đích trong CMC-544) chưa được thử theo mô hình khối u lan toả ở các chuột nhắt SCID nhưng không ảnh hưởng khi được cung cấp trong các mảnh dị ghép dưới da. G5/44, thuộc isotyp IgG4, đã không thể hy vọng là hoạt hoá các cơ chế tác động của cơ thể chủ và, do đó, không thể tạo ra hoạt tính chống ung thư.

G5/44 được liên hợp với calicheamixin (CMC-544) biểu hiện kiểu trái ngược so với rituximab (Rituxan™), tạo ra các kết quả tốt hơn khi được cung cấp trong giai đoạn đã được thiết lập của bệnh. Lý do mà CMC-544 có hiệu nghiệm cao hơn trong giai đoạn đã được thiết lập còn chưa rõ ràng, song giai đoạn đã được thiết lập này thể hiện trạng thái lâm sàng rõ ràng hơn. CMA-676, thể liên hợp đối chứng không liên kết phù hợp isotyp, không có bất kỳ tác dụng đáng kể nào đối với thời gian sống sót trung bình. Các kết quả theo mô hình SCID lan toả chứng tỏ rằng các liều này của CMC-544 cần được làm giảm xuống để xác định được liều có hiệu quả tối đa (MED). Liều 160µg/kg có hoạt tính thấp hơn so với các liều thấp hơn là 80 và 40µg/kg. Chưa rõ tại sao kết quả lại như vậy nhưng liều 160µg/kg có thể là tốt hơn cả MED. Các nghiên cứu thêm sẽ được thực hiện để giải quyết vấn đề này.

Mohammad và các đồng tác giả đã sử dụng liệu pháp CHOP (xyclophosphamit (C), 40mg/kg qua đường trong tĩnh mạch; doxorubixin (H), 3,3mg/kg qua đường trong tĩnh mạch; vincristin (O), 0,5mg/kg qua đường trong tĩnh mạch; và prednizon (P), 0,2mg/kg qua đường miệng theo mô hình các mảnh dị ghép dưới da với dòng tế bào u lympho tế bào lớn khuếch tán (DLCL). Các liều được sử dụng cho liệu pháp CHOP này được xác định là liều dung nạp tối đa của chúng. Liệu pháp, trong đó CHO được cung cấp một lần qua đường trong tĩnh mạch và P được cung cấp hằng ngày trong 5 ngày, được đánh giá là “hoạt động”, tạo ra T/C là 25,8%. Không có khối u nào được chữa trị được ghi nhận. Các kết quả theo mô hình được mô tả bởi Mohammad và các đồng tác giả tương tự các kết quả ghi nhận được với liệu pháp CHOP (được cung cấp qua đường trong màng bụng, Q4D×3) theo mô hình RL được mô tả ở đây. Không có nghiên cứu nào về CHOP tạo ra hiệu quả chữa trị lâu dài như CMC-544.

Bảng 10: Các số đo mô tả thời gian sống sót đối với nghiên cứu kết hợp

Điều trị	Thời gian sống sót trung bình	Thời gian sống sót trung vị	Độ lệch chuẩn	Thời gian sống sót tối thiểu	Thời gian sống sót tối đa	Số động vật
CMC-544 40µg/kg	118,90	125,00	19,29	64,00	125,00	10
CMC LD + Ritux LD	125,00	125,00	0,00	125,00	125,00	10
CMC-544 80µg/kg	118,22	125,00	17,86	71,00	125,00	9
CMC MD + Ritux MD	125,00	0,00	125,00	125,00	125,00	10
CMC-544 160µg/kg	85,22	82,00	40,37	35,00	125,00	9
CMC HD + Ritux HD	91,30	100,00	36,31	44,00	125,00	10
Rituximab 5mg/kg	40,70	36,50	9,57	34,00	64,00	10
Rituximab 10mg/kg	33,80	34,00	3,26	29,00	41,00	10
Rituximab 20mg/kg	40,50	34,00	15,45	31,00	82,00	10
Tá dược lỏng	25,80	25,00	3,12	22,00	34,00	10

CMC LD = CMC-544 liều thấp, 40µg/kg

CMC MD = CMC-544 liều trung bình, 80µg/kg

CMC HD = CMC-544 liều cao, 160µg/kg

Ritux LD = Rituximab liều thấp, 5mg/kg

Ritux MD = Rituximab liều trung bình, 10mg/kg

Ritux HD = Rituximab liều cao, 20mg/kg

Ví dụ 9: Các chế phẩm CMC-544 ổn định

Các chế phẩm CMC-544 ổn định để cung cấp trong cơ thể được điều chế bằng cách bổ sung các chất pha loãng, các tá dược, các chất mang và các chất ổn định. Sau quá trình sắc ký HIC, các phân đoạn sắc ký được thử nghiệm bằng SEC-HPLC và phân tích UV nhiều bước sóng. Các phân đoạn thích hợp được gom lại dựa trên phân tích này, cung cấp thông tin về hàm lượng kết tụ, nồng độ protein và mức tải calicheamixin. Các tá dược, các chất ổn định, các tác nhân tạo khối và các tác nhân đệm đã được bổ sung vào để làm ổn định dung dịch. Do CMC-544 có thể bị phân giải

thông qua một số con đường phân giải nên các khả năng không ổn định cơ học cần được xem xét trong quá trình phát triển các chế phẩm này. Một trong số các điểm chính cần được xem xét là tốc độ thủy phân calicheamixin ra khỏi kháng thể phải được làm giảm thiểu trong khi sự hợp nhất cơ học và hoá học của kháng thể kháng CD22 này phải được duy trì. Ngoài ra, quá trình kết tủa thể liên hợp calicheamixin-kháng thể, có thể xảy ra trong các điều kiện độ pH và nồng độ nhất định, cần được làm giảm thiểu.

Trong quá trình phát triển chế phẩm thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể-kháng thể, độ pH là quan trọng vì nó làm giảm thiểu quá trình phân giải và khả năng không ổn định cơ học. Độ pH=8,0 được chọn để làm giảm thiểu quá trình thủy phân calicheamixin và duy trì độ hoà tan hoàn toàn của thể liên hợp. Các số liệu bổ sung, thu được bằng cách sử dụng SDS-PAGE và ELISA liên kết với kháng nguyên, đã chỉ ra rằng tính hợp nhất và đặc hiệu cao về cấu trúc của kháng thể sẽ được duy trì ở độ pH=8,0. Do đó, trometamin đã được chọn làm tác nhân đệm để duy trì độ pH=8,0. Tác nhân đệm khác có thể bao gồm natri dibazơ hoặc kali phosphat. Nồng độ của tác nhân đệm này có thể nằm trong khoảng từ 5 đến 50mM. Độ pH ưu tiên nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5 được khuyến cáo sử dụng để có độ ổn định/độ hoà tan tối ưu. Đặc trưng về độ pH đối với sản phẩm cuối cùng là nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0.

Mặc dù độ ổn định của các dung dịch liên hợp được đệm là đủ đối với thời gian ngắn, song độ ổn định trong thời gian dài lại kém. Quy trình làm đông khô được sử dụng để cải thiện thời gian sử dụng của các thể liên hợp này. Các vấn đề liên quan đến việc làm đông khô dung dịch protein đã được biết rõ và sự mất cấu trúc bậc 2, bậc 3 và bậc 4 có thể xảy ra trong các quy trình làm lạnh và làm khô. Sacarozơ được đưa vào chế phẩm này để ổn định tính vô định hình của thể liên hợp và duy trì tính hợp nhất cấu trúc của kháng thể trong quá trình làm lạnh và làm khô. Nồng độ sacarozơ nằm trong khoảng từ 1,5 đến 5,0% (khối lượng/thể tích) đã được sử dụng. Ngoài ra, tác nhân tạo polyme khối, ví dụ Dextran 40 hoặc hydroxyetyl tinh bột, có thể được đưa vào để tăng cường độ cảm quan và độ chắc cơ học của các bánh đã được làm đông khô ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,5% khối lượng. Các nguyên liệu này hình thành các bánh đã được làm đông khô ở nồng độ tương đối thấp và có thể được sử dụng để làm giảm thiểu toàn bộ hàm lượng chất rắn của chế phẩm đông khô, nhờ đó

cho phép quá trình làm đông khô nhanh hơn. Các nghiên cứu về chế phẩm đã sử dụng Dextran 40 ở nồng độ 0,9% khối lượng.

Polysorbat 80 được đưa vào chế phẩm để tăng cường độ hoà tan của thể liên hợp. Nồng độ ưu tiên 0,01% được sử dụng với giới hạn có thể nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,05%. Tween cũng được bổ sung vào chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,91 đến 0,05% thể tích.

Chất điện phân cũng có thể có trong chế phẩm và có thể được sử dụng để cải thiện hiệu quả của quy trình tinh chế cuối cùng. Natri clorua thường được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01M đến 0,1M. Các chất điện phân khác như natri sulfat cũng có thể được sử dụng để thay thế natri clorua vì nó có thể được làm đông khô dễ dàng hơn. tốt nhất là, dung dịch CMC-544 cuối cùng bao gồm sacaroza 1,5% (theo khối lượng), Dextran 40 0,9% (theo khối lượng), Tween 80 0,01%, natri clorua 50mM, polysorbat 80 0,01% (theo khối lượng) và trometamin 20mM.

Công thức điển hình đối với dung dịch này trước khi làm đông khô như sau: CMC-544 0,5mg/ml, sacaroza 1,5% khối lượng, Dextran 40 0,9% khối lượng, natri clorua 0,05M, Tween có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,05% thể tích, polysorbat 80 0,01% khối lượng, trometamin 0,02M, độ pH=8,0, và nước. Dung dịch này được chia đều vào các lọ hồ phách nhỏ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ +5°C đến +10°C (tối ưu ở +5°C). dung dịch này được làm lạnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -35°C đến -50°C (tối ưu ở -45°C); dung dịch đã được làm lạnh được cho qua bước làm khô ở nhiệt độ thấp với áp suất làm khô ban đầu nằm trong khoảng từ 20 đến 80 micron (2,67-10,67Pa), tối ưu ở 60 micron (8Pa); sản phẩm đông khô được giữ ở nhiệt độ bảo quản nằm trong khoảng từ -10°C đến -40°C (tối ưu ở -30°C) trong khoảng thời gian từ 24 đến 72 giờ (tối ưu là trong 60 giờ); và cuối cùng, sản phẩm đông khô được cho qua bước làm khô thứ hai với áp suất làm khô nằm trong khoảng từ 20 đến 80 micron (2,67-10,67Pa), tối ưu ở 60 micron (8Pa) ở nhiệt độ bảo quản nằm trong khoảng từ +10°C đến +35°C (tối ưu ở +25°C) trong khoảng thời gian từ 15 đến 30 giờ (tối ưu là trong 24 giờ). Phép thử tăng áp suất được sử dụng để xác định điểm kết thúc quá trình làm khô ban đầu. Vào lúc kết thúc chu kỳ làm đông khô, các lọ nhỏ được nạp nitơ và đóng nút.

Bảng 11 chỉ ra những khác biệt trong quy trình điều chế được sử dụng cho CMC-544 và quy trình điều chế được sử dụng cho CMA-676. Sự khác biệt đáng kể giữa quy trình điều chế CMA-676 và quy trình điều chế được sử dụng cho CMC-544 bao gồm việc làm giảm nồng độ protein trong chế phẩm mới (0,5mg/ml), việc sử dụng trometamin làm đệm và sự có mặt của Tween 80 0,01%. Các kết quả này trong CMC-544 hoàn nguyên trong chế phẩm mới là rõ ràng so với độ đục được quan sát trong chế phẩm CMA-676 hoàn nguyên (Bảng 12 và Bảng 13).

Bảng 11: So sánh quy trình điều chế CMA-676 và quy trình điều chế được sử dụng cho CMC-544

	Quy trình điều chế CMA-676	quy trình điều chế CMC-544
Nồng độ protein	1,0mg/ml	0,5mg/ml
Chế phẩm	Sacaroza 1,5%, Dextran 40 0,9%, natri clorua 100mM, đệm phosphat 5mM	Sacaroza 1,5%, Dextran 40 0,9%, Tween 80 0,01%, polysorbat 80 0,01%, natri clorua 50mM, trometamin 20mM

Bảng 12: Các quan sát về độ ổn định và hoá lý của các chế phẩm CMA-676 và CMC-544 ở 5°C

	Chế phẩm CMA-676		Chế phẩm CMC-544	
Thời gian	Ban đầu	2 tuần	Ban đầu	2 tuần
Quan sát cơ học	Hơi đục	Hơi đục	Rõ ràng	Rõ ràng
độ pH	7,5	7,5	7,8	7,8
Protein tổng số (mg/ml)	1,07	1,07	0,52	0,52
Calicheamixin tổng số (µg/mg protein)	67	67	57	57
Calicheamixin không được liên hợp (µg/mg protein)	1,21	2,82	0,97	1,13
% kết tụ	3,03	2,81	1,59	1,70

Bảng 13: Các quan sát về độ ổn định và hoá lý của các chế phẩm CMA-676 và CMC-544 được làm đông khô và bảo quản ở 25°C

	Chế phẩm CMA-676	Chế phẩm CMC-544
--	------------------	------------------

Thời gian	Ban đầu	4 tuần	Ban đầu	4 tuần
Quan sát cơ học đối với các thể liên hợp hoàn nguyên	Hoi đục	Hoi đục	Rõ ràng	Rõ ràng
độ pH	7,5	7,5	7,8	7,8
Protein tổng số (mg/ml)	1,03	1,03	0,51	0,51
Calicheamixin tổng số ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	67	67	57	57
Calicheamixin không được liên hợp ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	1,13	1,03	1,03	0,94
% kết tụ	2,63	2,96	1,49	2,09

Tài liệu tham khảo

1. G. Kohler and Milstein, C., Nature, 256:495 (1975).
2. T. G. Hose and Blair, A.H. CRC Critical Rev. Drug Carrier Systems 3:263 (1987).
3. U.S. Patent No. 5,877,296
4. U.S. Patent No. 5,773,001
5. U.S. Patent No. 5,714,586
6. U.S. Patent No. 5,712,374
7. U.S. Patent. No. 5,053,394
8. J. Tramontano; et al., J. Mol. Recognit. 7:9 (1994).
9. H. McConnell and Hoess, J., J. Mol. Biol. 250:460 (1995).
10. Nord et al., Nat Biotechnol. 15:772 (1997).
11. Nord et al., Protein Eng. 8:601 (1995).
12. Ku and Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92:6552 (1995).
13. Markand et al., Biochemistry 35:8045 (1996).
14. Markand et al., Biochemistry 35:8098 (1996).
15. Rottgen and Collins, Gene 164:243 (1995).
16. Wang et al, J. Biol. Chem., 270:12250 (1995).
17. I.D. Bernstein et al., J. Clin. Invest. 79:1153 (1987).

18. I.D. Bernstein et al., J. Immunol. 128:867-881 (1992).
19. Kabat et al. Sequencing of Proteins of Immunological Interest, 1:310-334 (1994).
20. PCT publication No. WO 91/09967.
21. Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403 (1995).
22. Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368 (1996).
23. Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, (1997).
24. Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, (1996).
25. Cramer et al., Nature, 391, 288-291, (1998).
26. U.S. Patent No. 4,671,958
27. U.S. Patent No. 4,970,198
28. U.S. Patent No. 5,037,651
29. U.S. Patent No. 5, 079, 233
30. U.S. Patent No. 5,877,296
31. PCT publication No. WO 98/20734
32. Trail P and Bianchi A., Current Opin. Immunol., 11:584-588, (1999).
33. Dubowchik G, and Walker M., Pharmacol. & Therapeutics, 83:67-123 (1999).
34. Bross P.F., Beitz J., Chen G., Chen X.H., Duffy E., Keiffer-Bross P., Beitz J., Chen G., Chen X., Duffy E., Kieffer L., Roy S., Sridhara R., Rahman A., Williams G., Pazdur R., Clin. Cancer Res., 7:1490-1496 (2001).
35. Berger M., Leopold L., Dowell J., Korth-Bradley J., Sherman M., Invest. New Drugs; 20: 395-406 (2002).
36. Slevers E., Larson R., Stadmauer E., Estey E., Lowenberg B., Dombret H., Karanes C., Theobald M., Bennet J., Sherman M., et al., J. Clin. Oncol.; 19:3244-3254 (2001).
37. Larson R., Boogaerts M., Estey E., Karanes C., Stadmauer E., Sievers E., Mineur P., Bennett J., Berger M., Eten C. et al. Leukemia; 16:1627-1636 (2002).

38. Hamann P., Hinman L., Beyer C., Kindh D., Upeslakis J., Flowers D., Bernstein I., Choice of Linker. *Bioconj. Chem.*; 13:40-46 (2002).
39. Hamann P., Hinman L., Hollander I., Beyer C., Lindh D., Holcomb R., Hallet W., Tsou H., Upeslakis J., Shochat D., et al., *Bioconj. Chem.*; 13:47-58 (2002).
40. Lee M., Dunne T., Chang C., Siegal M., Morton G., Ellestad G., McGahren W., Borders D., *J. Am. Chem. Soc.* 1992; 114:985-987 (1992).
41. Zein N., Sinha A., McGahren W., Ellestad G., *Science*; 240:1198-1201 (1988).
42. Thorson J., Sievers E., Ahlert J., Shepard E., Whitwam R., Onwueme K., Ruppen M., *Current Pharmaceut. Design*; 6:1841-1879 (2000).
43. Andrews R., Singer J., Bernstein I., *J. Exp. Med.*; 169:1721-1731 (1989).
44. Kreitman R.J., *Current Pharmaceut. Biotech.*; 2:313-325 (2001).
45. Pastan I., Kreitman R.J., *Current Opin. Investig. Drugs*, 3(7):1089-1091 (2002).
46. Kreitman R.J., *Curr. Opin. Mol. Ther.* ; 5:44-551 (2003).
47. Crocker P.R. and Varki A. *Siglecs, Trends in Immunol.*; 22:337-342 (2001).
48. Hursey M., Newton D.L., Hansen H.J., Ruby D., Goldenberg D.M., Rybak S.M., *Leukemia and Lymphoma*; 43:953-959 (2002).
49. Nitschke L., Floyd H., and Crocker P.R., *Scand. J. Immunol.*; 53:227-234 (2001).
50. Moyron-Quiroz J.E., Partida-Sanchez S., Donis-Hernandez R., Sandoval-Montes C. and Santos-Argumedo L., *Scand. J. Immunol.*; 55:343-351 (2002).
51. Tedder T.F., Tuscano J., Sato S., Kehrl J.H., *Ann. Rev. Immunol.*; 15:481-504 (1997).
52. Hanna R., Ong G.L., Mattes M.J., *Cancer Res.*; 56:3062-3068 (1996).
53. Shan D. and Press O.W., *J. Immunol.* 1995; 154:4466-4475 (1995).
54. Dowell J.A., Korth-Bradley J., Liu H., King S.P., Berger M.S., *J. Clin. Pharmacol.*; 41:1206-1214 (2001).
55. Glibaldi M., Perrier D., *Pharmacokinetics*, 2nd ed., Marcel-Dekker Inc., NY (1982).
56. Van Horssen P.J., Preijers, F.W., Van Oosterhout, Y.V., Eling W.M. and De Witte, T., *Leukemia & Lymphoma*; 39(5-6):591-599 (2000).

57. Hinman L.M., Hamann P.R., Wallace R., Menendez A.T., Durr F.E., Upeslakis J., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993).
58. Kreitman R.J., Wilson W.H., Bergeron K., Raggio M., Stetler-Stevenson M., Fitzgerald D.J., Pastan I., N. Engl. J. Med.; 345:241-247 (2001).
59. Leonard J.P. and Link B.K., Sem. Oncol. 29:81-86 (2002).
60. Schindler J., Sausville E., Messmann R., Uhr J.W. & Vitetta, E.S., Clin.Cancer Res., 7,255-258 (2001).
61. Vincent T. DeVita, Samuelo Hellman, Steven A. Rosenberg, Eds., Cancer Principles and Practice of Oncology, 6th Edition, Publishers: Lippincott, Williams and Wilkins (2001).
62. Edward Chu and Vincent T. DeVita, Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual, Publishers: Jones and Bartlett (2002).

Phần mô tả bổ sung

1. Thở liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 có công thức, $\text{Pr}(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$ trong đó: Pr là kháng thể kháng CD22; X là liên kết thủy phân được chứa sản phẩm của nhóm phản ứng bất kỳ mà có thể phản ứng với kháng thể; W là gốc calicheamixin; m là mức tải trung bình cho sản phẩm liên hợp được tinh chế sao cho calicheamixin chiếm 4-10% khối lượng của thể liên hợp; và $(-\text{X}-\text{S}-\text{S}-\text{W})_m$ là dẫn xuất calicheamixin, trong đó phân tử kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa:

(a) SEQ ID NO: 1 cho CDR-H1,

(b) trình tự GINPGNNYATYRRKFQG của gH7 trong Fig. 6 hoặc SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:16 cho CDR-H2, và

(c) SEQ ID NO:3 cho CDR-H3;

và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa:

(d) SEQ ID NO:4 cho CDR-L1,

(e) SEQ ID NO:5 cho CDR-L2, và

(f) SEQ ID NO:6 cho CDR-L3.

2. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 1, trong đó kháng thể này là kháng thể kháng CD22 ghép CDR.
3. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 2, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chứa các vùng khung nhận của người và các CDR cho không phải của người.
4. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 3, trong đó các vùng khung nhận của người của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể là dựa trên trình tự liên ứng nhóm phụ I của người và chứa các gốc cho không phải của người ở các vị trí 1, 28, 48, 71 và 93.
5. Thẻ liên hợp xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 4, trong đó kháng thể này còn chứa các gốc cho không phải của người ở các vị trí 67 và 69.
6. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 2, trong đó kháng thể ghép CDR chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa vùng khung nhận của người dựa trên trình tự liên ứng nhóm phụ I của người và còn chứa các gốc cho không phải của người ở các vị trí 2, 4, 37, 38, 45 và 60.
7. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 6, trong đó kháng thể ghép CDR còn chứa gốc cho không phải của người ở vị trí 3.
8. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 2, trong đó kháng thể ghép CDR chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 5/44-gL1 (SEQ ID NO: 19) và vùng biến đổi của chuỗi nặng 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).
10. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 2, trong đó kháng thể ghép CDR chứa chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 28 và/hoặc chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 30.
11. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 2, trong đó kháng thể ghép CDR là kháng thể biến thể thu được bằng quy trình thuần thực ái lực và có tính đặc hiệu với CD22 người được nâng cao.
12. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 2, trong đó kháng thể chứa chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin thu được từ việc

biểu hiện SEQ ID NO: 29 trong tế bào động vật có vú và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin thu được từ việc biểu hiện SEQ ID NO: 31 trong tế bào động vật có vú.

13. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dẫn xuất calicheamixin là dẫn xuất gama calicheamixin hoặc dẫn xuất N-axetyl gama calicheamixin.

14. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 13, trong đó dẫn xuất calicheamixin được chức hóa bằng 3-mercapto-3-metyl butanoyl hydrazit.

15. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thành phần liên kết thủy phân được là chất liên kết hai chức có thể giải phóng dẫn xuất calicheamixin khỏi thẻ liên hợp sau khi liên kết và đi vào các tế bào đích.

16. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục 15, trong đó thành phần liên kết hai chức là axit 4-(4-axetylphenoxy) butanoic (AcBut).

17. Chế phẩm chứa thẻ liên hợp calicheamixin/kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó chế phẩm này có phân đoạn thẻ liên hợp (LCF) thấp, nhỏ hơn 10%.

18. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 16 hoặc chế phẩm theo mục 17 để sử dụng trong điều trị rối loạn tăng sinh.

19. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 18, trong đó rối loạn tăng sinh là u ác tính tế bào B.

20. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 19, trong đó u ác tính tế bào B là bệnh bạch cầu.

21. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 20, trong đó bệnh bạch cầu biểu hiện kháng nguyên bề mặt tế bào CD22.

22. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 20, trong đó bệnh bạch cầu là bệnh bạch cầu lympho bào cấp.
23. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 19, trong đó u ác tính tế bào B là u lympho.
24. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 23, trong đó u lympho biểu hiện kháng nguyên bề mặt tế bào CD22.
25. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 23 hoặc 24, trong đó u lympho là u lympho không Hodgkin.
26. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 25, trong đó thẻ liên hợp hoặc chế phẩm này được sử dụng cùng với một hoặc nhiều tác nhân có hoạt tính sinh học.
27. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 26, trong đó tác nhân có hoạt tính sinh học được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể, yếu tố sinh trưởng, hormon, xytokin, kháng hormon, xanthin, interleukin, interferon, và dược chất độc tế bào.
28. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 27, trong đó tác nhân có hoạt tính sinh học là kháng thể.
29. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 28, trong đó kháng thể này là được định hướng chống lại kháng nguyên bề mặt tế bào được biểu hiện trên các u ác tính tế bào B.
30. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 29, trong đó kháng thể này được định hướng chống lại các kháng nguyên bề mặt tế bào được biểu hiện trên các u ác tính tế bào B được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng CD19, kháng thể kháng CD20 và kháng thể kháng CD33.
31. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 30, trong đó kháng thể kháng CD20 là rituximab.

32. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 27, trong đó tác nhân độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, aclarubicin, zorubicin, mitoxantrone, epirubicin, carubicin, nogalamycin, menogaril, pitarubicin, valrubicin, cytarabine, gemcitabine, trifluridine, ancitabine, enocitabine, azacitidine, doxifluridine, pentostatin, broxuridine, capecitabine, cladribine, decitabine, floxuridine, fludarabine, gougertin, puromycin, tegafur, tiazofurin, adriamycin, cisplatin, carboplatin, cyclophosphamide, dacarbazine, vinblastine, vincristine, mitoxantrone, bleomycin, mechlorethamine, prednisone, procarbazine methotrexate, fluorouracils, etoposide, taxol, các dạng tương tự taxal, và mitomycin.

33. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 27, trong đó thẻ liên hợp này được sử dụng cùng với, trước, hoặc sau khi sử dụng một hoặc nhiều tổ hợp các tác nhân độc tế bào dưới dạng một phần của chế độ điều trị, trong đó tổ hợp các tác nhân độc tế bào được chọn từ:

- A. CHOPP (cyclophosphamid, doxorubicin, vincristine, prednisone, và procarbazine);
- B. CHOP (cyclophosphamid, doxorubicin, vincristine, và prednisone);
- C. COP (cyclophosphamid, vincristine, và prednisone);
- D. CAP-BOP (cyclophosphamid, doxorubicin, procarbazine, bleomycin, vincristine, và prednisone);
- E. m-BACOD (methotrexate, bleomycin, doxorubicin, cyclophosphamid, vincristine, dexamethasone, và leucovorin);
- F. ProMACE-MOPP (prednisone, methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamid, etoposide, leucovorin, mechlorethamine, vincristine, prednisone, và procarbazine);
- G. ProMACE-CytaBOM (prednisone, methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamid, etoposide, leucovorin, cytarabine, bleomycin, và vincristine);
- H. MACOP-B (methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamid, vincristine, prednisone, bleomycin, và leucovorin);
- I. MOPP (mechlorethamine, vincristine, prednisone, và procarbazine);
- J. ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastine, và dacarbazine);

- K. MOPP (mechloethamine, vincristine, prednisone, và procarbazine) xen kẽ bằng ABV (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, và vinblastine);
- L. MOPP (mechloethamine, vincristine, prednisone, và procarbazine) xen kẽ bằng ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastine, và dacarbazine);
- M. CHIVPP (chlorambucil, vinblastine, procarbazine, và prednisone);
- N. IMVP-16 (ifosfamide, methotrexate, và etoposide);
- O. MIME (methyl-gag, ifosfamide, methotrexate, và etoposide);
- P. DHAP (dexamethasone, high-dose cytarabine, và cisplatin);
- Q. ESHAP (etoposide, methylpredisolone, high-dose cytarabine, và cisplatin);
- R. CEPP(B) (xyclophosphamit, etoposide, procarbazine, prednisone, và bleomycin); S. CAMP (lomustine, mitoxantrone, cytarabine, và prednisone);
- T. CVP-1 (xyclophosphamit, vincristine, và prednisone);
- U. ESHOP (etoposide, methylpredisolone, cytarabine liều cao, vincristine và cisplatin);
- V. EPOCH (etoposide, vincristine, và doxorubicin trong 96 giờ với liều lớn xyclophosphamit và prednisone dùng đường miệng);
- W. ICE (ifosfamide, xyclophosphamit, và etoposide);
- X. CEPP(B) (xyclophosphamit, etoposide, procarbazine, prednisone, và bleomycin);
- Y. CHOP-B. (xyclophosphamit, doxorubicin, vincristine, prednisone, và bleomycin); và
- Z. P/DOCE (epirubicin hoặc doxorubicin, vincristine, xyclophosphamit, và prednisone).
34. Thể liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 27, trong đó thể liên hợp được sử dụng cùng với kháng thể được định hướng chống lại kháng nguyên bề mặt tế bào trên các u ác tính tế bào B, và tùy ý bao gồm một hoặc nhiều tổ hợp của các tác nhân độc tế bào làm một phần của chế độ điều trị, trong đó tổ hợp của các tác nhân độc tế bào được chọn từ:
- A. CHOPP (xyclophosphamit, doxorubicin, vincristine, prednisone, và procarbazine);

- B. CHOP (xyclophosphamit, doxorubicin, vincristine, và prednisone);
- C. COP (xyclophosphamit, vincristine, và prednisone);
- D. CAP-BOP (xyclophosphamit, doxorubicin, procarbazine, bleomycin, vincristine, và prednisone);
- E. m-BACOD (methotrexate, bleomycin, doxorubicin, xyclophosphamit, vincristine, dexamethasone, và leucovorin);
- F. ProMACE-MOPP (prednisone, methotrexate, doxorubicin, xyclophosphamit, etoposide, leucovorin, mechloethamine, vincristine, prednisone, và procarbazine);
- G. ProMACE-CytaBOM (prednisone, methotrexate, doxorubicin, xyclophosphamit, etoposide, leucovorin, cytarabine, bleomycin, và vincristine);
- H. MACOP-B (methotrexate, doxorubicin, xyclophosphamit, vincristine, prednisone, bleomycin, và leucovorin);
- I. MOPP (mechloethamine, vincristine, prednisone, và procarbazine);
- J. ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastine, và dacarbazine);
- K. MOPP (mechloethamine, vincristine, prednisone, và procarbazine) xen kẽ bằng ABV (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, và vinblastine);
- L. MOPP (mechloethamine, vincristine, prednisone, và procarbazine) xen kẽ bằng ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastine, và dacarbazine);
- M. CHIVPP (chlorambucil, vinblastine, procarbazine, và prednisone);
- N. IMVP-16 (ifosfamide, methotrexate, và etoposide);
- O. MIME (methyl-gag, ifosfamide, methotrexate, và etoposide);
- P. DHAP (dexamethasone, high-dose cytarabine, và cisplatin);
- Q. ESHAP (etoposide, methylpredisolone, high-dose cytarabine, và cisplatin);
- R. CEPP(B) (xyclophosphamit, etoposide, procarbazine, prednisone, và bleomycin); S. CAMP (lomustine, mitoxantrone, cytarabine, và prednisone);
- T. CVP-1 (xyclophosphamit, vincristine, và prednisone);
- U. ESHOP (etoposide, methylpredisolone, cytarabine liều cao, vincristine và cisplatin);

V. EPOCH (etoposide, vincristine, và doxorubicin trong 96 giờ với liều lớn xyclophosphamit và prednisone dùng đường miệng);

W. ICE (ifosfamide, xyclophosphamit, và etoposide);

X. CEPP(B) (xyclophosphamit, etoposide, procarbazine, prednisone, và bleomycin);

Y. CHOP-B. (xyclophosphamit, doxorubicin, vincristine, prednisone, và bleomycin);
và

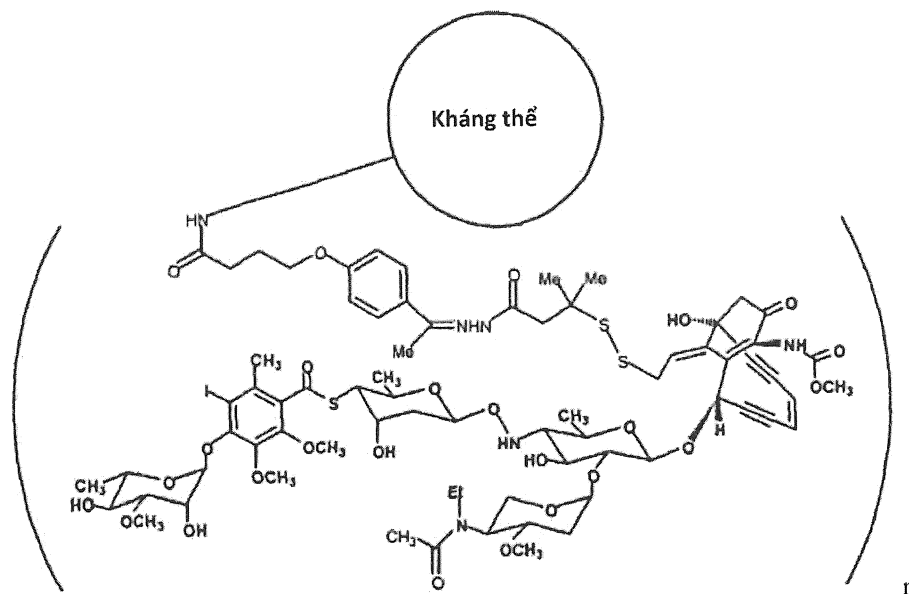
Z. P/DOCE (epirubicin hoặc doxorubicin, vincristine, xyclophosphamit, và prednisone).

35. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 18 đến 34, trong đó thẻ liên hợp được sử dụng với liều hữu hiệu từ 0,1 mg/m³ đến 50 mg/m³.

36. Thẻ liên hợp dẫn xuất calicheamixin dạng đơn thể/kháng thể kháng CD22 hoặc chế phẩm để sử dụng theo mục 35, trong đó thẻ liên hợp được sử dụng với liều hữu hiệu từ 0,4 mg/m³ đến 30 mg/m³.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa thể liên hợp thuốc, trong đó thể liên hợp thuốc này chứa các dẫn xuất calicheamicin và kháng thể kháng CD22 và có công thức:



trong đó kháng thể này chứa SEQ ID NO: 1 cho CDR-H1, các gốc 50-66 của SEQ ID NO: 27 cho CDR-H2, SEQ ID NO: 3 cho CDR-H3, SEQ ID NO: 4 cho CDR-L1, SEQ ID NO: 5 cho CDR-L2 và SEQ ID NO: 6 cho CDR-L3.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó n là (i) 1, 2, 3, 4, 5, hoặc (ii) 3 đến 9, hoặc (iii) trong đó tải lượng thuốc là 4-10% khối lượng thuốc gây độc tế bào.

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này chứa nhỏ hơn 10% khối lượng kháng thể không liên hợp.

4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng CD22 chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 19 và vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 27.

5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng CD22 chứa chuỗi nhẹ bao gồm các gốc 21 đến 239 của SEQ ID NO: 28 và chuỗi nặng bao gồm các gốc 20 đến 466 của SEQ ID NO: 30, và trong đó kháng thể này được biểu hiện trong tế bào động vật có vú.

6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng CD22 chứa chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin thu được từ việc biểu hiện SEQ ID NO: 29 trong tế bào động vật có vú và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin thu được từ việc biểu hiện SEQ ID NO: 31 trong tế bào động vật có vú.

7. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng CD22 chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa vùng khung chuỗi nặng chứa các gốc thể cho ở các vị trí 1, 28, 48, 72 và 97 của SEQ ID NO: 8 lần lượt được chiếm chỗ bởi Glu, Arg, Ile, Ala, và Thr, trong đó phần còn lại của vùng khung chuỗi nặng được chiếm chỗ bởi các gốc tương ứng của khung nhận của người nêu trong SEQ ID NO: 21 hoặc 22.

8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng CD22 chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa vùng khung chuỗi nặng chứa các gốc thể cho ở các vị trí 1, 28, 48, 68, 70, 72 và 97 của SEQ ID NO: 8 lần lượt được chiếm chỗ bởi Glu, Arg, Ile, Ala, Leu, Ala, và Thr, trong đó phần còn lại của vùng khung chuỗi nặng được chiếm chỗ bởi các gốc tương ứng của khung nhận của người nêu trong SEQ ID NO: 21 hoặc 22.

9. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc 7, trong đó kháng thể kháng CD22 chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa vùng khung chuỗi nhẹ chứa các gốc thể cho ở các vị trí 2, 4, 42, 43, 50, và 65 của SEQ ID NO: 7 lần lượt được chiếm chỗ bởi Val, Val, Leu, His, Gln, và Asp, trong đó phần còn lại của vùng khung chuỗi nhẹ được chiếm chỗ bởi các gốc tương ứng của khung nhận của người nêu trong SEQ ID NO: 17 hoặc 18.

10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng CD22 chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa vùng khung chuỗi nhẹ chứa các gốc thể cho ở các vị trí 2, 3, 4, 42, 43, 50, và 65 của SEQ ID NO: 7 lần lượt được chiếm chỗ bởi Val, Val, Val, Leu, His, Gln, và Asp, trong đó phần còn lại của vùng khung chuỗi nhẹ được chiếm chỗ bởi các gốc tương ứng của khung nhận của người nêu trong SEQ ID NO: 17 hoặc 18.

11. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này được đông khô.

12. Dược phẩm chứa chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó dược phẩm này được đông khô.

TRÌNH TỰ CỦA CÁC CDR CỦA KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG 5/44
CỦA CHUỘT NHẮT

H1	NYWIIH	(SEQ ID NO:1)
H2	GINPGNNYTTYKRNLKG	(SEQ ID NO:2)
H3	EGYGNYGAWFAY	(SEQ ID NO:3)
L1	RSSQSLANSYGNTFLS	(SEQ ID NO:4)
L2	GISNRFS	(SEQ ID NO:5)
L3	LQGTHQPYT	(SEQ ID NO:6)

FIG. 1

TRÌNH TỰ ADN/PROTEIN CỦA 5/44 VL

	10		20		30		40		50									
GAT	GTT	GTG	GTG	ACT	CAA	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCT	GTC	AGC	TTT	GGA	GAT	CAA	GTT
CTA	CAA	CAC	CAC	TGA	GTT	TGA	GGT	GAG	AGG	GAC	GGA	CAG	TCG	AAA	CCT	CTA	GTT	CAA
D	V	V	V	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	F	G	D	Q	V>
60			70				80				90				100			110
TCT	ATC	TCT	TGC	AGG	TCT	AGT	CAG	AGT	CTT	GCA	AAC	AGT	TAT	GGG	AAC	ACC	TTT	TTG
AGA	TAG	AGA	ACG	TCC	AGA	TCA	GTC	TCA	GAA	CGT	TTG	TCA	ATA	CCC	TTG	TGG	AAA	AAC
S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	A	N	S	Y	G	N	T	F	L>
	120			130			140				150				160			170
TCT	TGG	TAC	CTG	CAC	AAG	CCT	GGC	CAG	TCT	CCA	CAG	CTC	CTC	ATC	TAT	GGG	ATT	TCC
AGA	ACC	ATG	GAC	GTG	TTC	GGA	CCG	GTC	AGA	GGT	GTC	GAG	GAG	TAG	ATA	CCC	TAA	AGG
S	W	Y	L	H	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	G	I	S>
	180			190			200				210				220			
AAC	AGA	TTT	TCT	GGG	GTG	CCA	GAC	AGG	TTC	ACT	GGC	AGT	GGT	TCA	GGG	ACA	GAT	TTC
TTG	TCT	AAA	AGA	CCC	CAC	GGT	CTG	TCC	AAG	TGA	CCG	TCA	CCA	AGT	CCC	TGT	CTA	AAG
N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F>
230			240				250				260				270			280
ACA	CTC	AAG	ATC	AGC	ACA	ATA	AAG	CCT	GAG	GAC	TTG	GGA	ATG	TAT	TAC	TGC	TTA	CAA
TGT	GAG	TTC	TAG	TCG	TGT	TAT	TTC	GGA	CTC	CTG	AAC	CCT	TAC	ATA	ATG	ACG	AAT	GTT
T	L	K	I	S	T	I	K	P	E	D	L	G	M	Y	Y	C	L	Q>
	290			300			310				320				330			
GGT	ACA	CAT	CAG	CCG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA	CGT	
CCA	TGT	GTA	GTC	GGC	ATG	TGC	AAG	CCT	CCC	CCC	TGG	TTC	GAC	CTT	TAT	TTT	GCA	
G	T	H	Q	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R>	

FIG. 2

TRÌNH TỰ ADN/PROTEIN CỦA 5/44 VH

```

      10      20      30      40      50
GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGG ACT GTA CTG GCA AGG CCT GGG GCT TCC GTG AAG
CTC CAG GTT GAC GTC GTC AGA CCC TGA CAT GAC CGT TCC GGA CCC CGA AGG CAC TTC
E   V   Q   L   Q   Q   S   G   T   V   L   A   R   P   G   A   S   V   K>

      60      70      80      90      100      110
ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATT CAC TGG GTA AAA
TAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TCC AAA TGG TTG ATG ACC TAA GTG ACC CAT TTT
M   S   C   K   A   S   G   Y   R   F   T   N   Y   W   I   H   W   V   K>

      120      130      140      150      160      170
CAG AGG CCT GGG CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GGT ATT AAT CCT GGA AAT AAT TAT
GTC TCC GGA CCC GTC CCA GAT CTT ACC TAA CCA CCA TAA TTA GGA CCT TTA TTA ATA
Q   R   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   G   I   N   P   G   N   N   Y>

      180      190      200      210      220
ACT ACG TAT AAG AGG AAC TTG AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC
TGA TGC ATA TTC TCC TTG AAC TTC CCG TTC CGG TGT GAC TGA CGT CAG TGT AGG CGG
T   T   Y   K   R   N   L   K   G   K   A   T   L   T   A   V   T   S   A>

      230      240      250      260      270      280
AGC ACT GCC TAC ATG GAC CTC AGC AGC CTG ACA AGT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC
TCG TGA CGG ATG TAC CTG GAG TCG TCG GAC TGT TCA CTC CTG AGA CGC CAG ATA ATG
S   T   A   Y   M   D   L   S   S   L   T   S   E   D   S   A   V   Y   Y>

      290      300      310      320      330      340
TGT ACA AGA GAG GGC TAT GGT AAC TAC GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGG
ACA TGT TCT CTC CCG ATA CCA TTG ATG CCC CGG ACC AAA CGA ATG ACC CCG GTC CCC
C   T   R   E   G   Y   G   N   Y   G   A   W   F   A   Y   W   G   Q   G>

      350      360
ACT CTG GTC ACC GTC TCC TCA
TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT
T   L   V   T   V   S   S>

```

FIG. 3

LOẠI BỎ VỊ TRÍ GLYCOSYL HÓA VÀ LYSIN PHẢN ỨNG: PHƯƠNG
PHÁP PCR ĐỂ GÂY ĐỘT BIẾN CDR-H2 TRONG VECTO CH

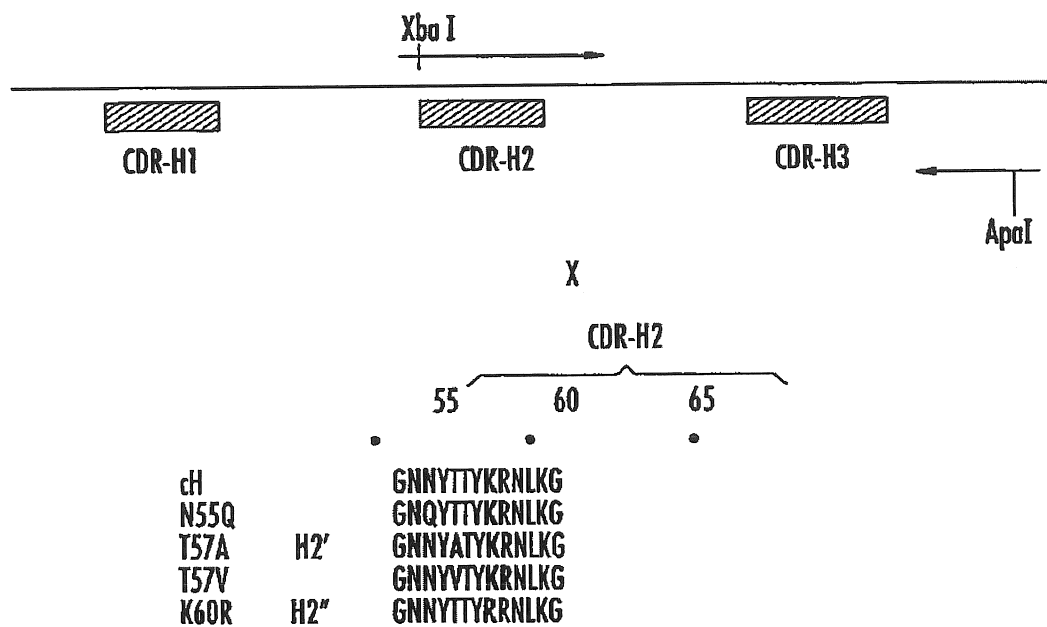


FIG. 4

THIẾT KẾ GHÉP TRÌNH TỰ CHUỖI NHẹ 5/44

	10	20	30	40	50
V _L	DVVVTQTPLSLPVSF	GDQVSISC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGQSPQLLIY	
DPK9	DIQMTQSPSSLSASV	GDRTITC		WYQOKPGKAPKLLIY	
gL1	DVQVTQSPSSLSASV	GDRTITC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGKAPQLLIY	
gL2	DVVVTQSPSSLSASV	GDRTITC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGKAPQLLIY	
	60	70	80	90	100
V _L	GISNRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYC	LQGTHQPYT		
DPK9		GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC			
gL1	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	LQGTHQPYT		
gL2	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	LQGTHQPYT		
	110				
V _L	FGGGTKLEIKR				
JK1	FGQGTKVEIKR				
gL1	FGQGTKVEIKR				
gL1	FGQGTKVEIKR				

FIG.5

THIẾT KẾ GHÉP TRÌNH TỰ CHUỖI NẶNG 5/44

	10	20	30	40	50
V _H	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYRFT	NYWIIH	WVKQRPGQGLEWIG	GINP	
DP7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT		WVRQAPGQGLEWMG		
gH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYRFT	NYWIIH	WVRQAPGQGLEWIG	GINP	
gH4,5,6,7	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYRFT	NYWIIH	WVRQAPGQGLEWIG	GINP	
	60	70	80	90	100
V _H	GNNYTTYKRNLKG	KATLTAVTSASTAYMDLSSLTSEDSAVYYCTR	EGYGNYG		
DP7	KFQG	RVTMT R DTSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCAR			
gH1	GNNYTTYKRNLKG	RATLTADTSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
gH4	GNNYATYRRNLKG	RATLTADTSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
gH5	GNNYATYRRNLKG	RVTMTADTSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
gH6	GNNYATYRRKFQG	RATLTADTSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
gH7	GNNYATYRRKFQG	RVTMTADTSTSTVYME L SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG		
	110				
JH4	WGQGT L TVTVSS				
V _H	AWFAY	WGQGT L TVTVSS			
gH1	AWFAY	WGQGT L TVTVSS			
gH4,5,6,7	AWFAY	WGQGT L TVTVSS			

FIG. 6

BẢN ĐỒ VECTƠ PMRR14

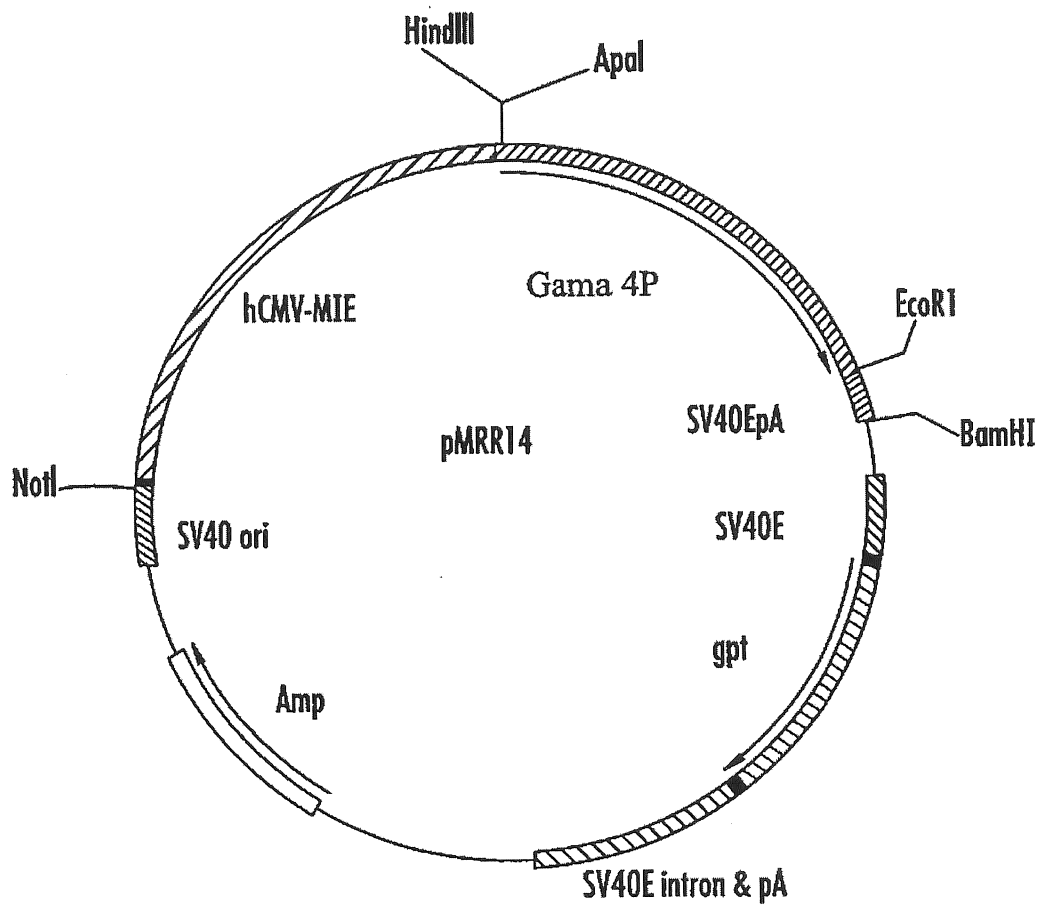


FIG. 7

BẢN ĐỒ VECTƠ PMRR10.1

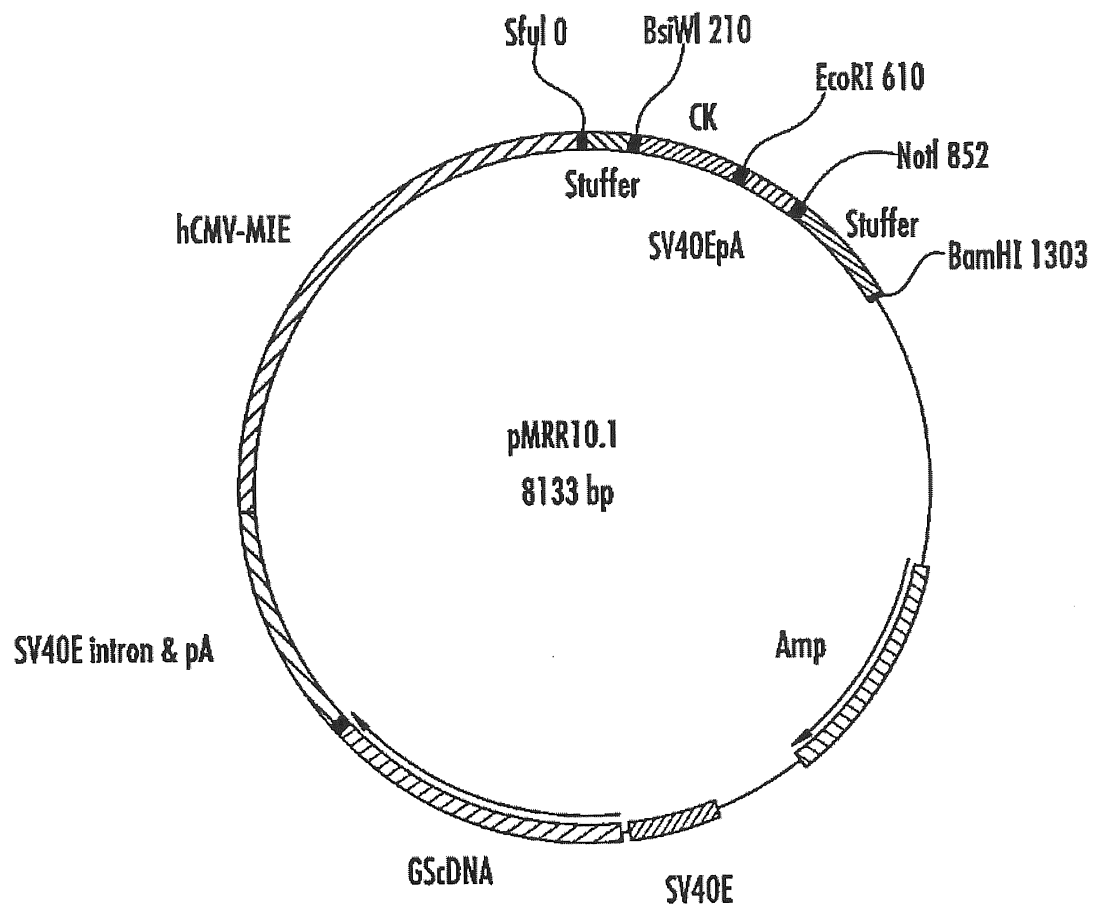


FIG. 8

THỬ NGHIỆM BIACORE CỦA 5/44 DẠNG KHẢM VÀ CÁC THỂ ĐỘT BIẾN



5/44	$K_a \cdot 10^5$	$K_d \cdot 10^4$	$K_d \cdot 10^0$	$\sim K_d \text{ nM}$
<u>cltH</u>	2,9	1,14	3,93	0,4
N55Q	5,81	1,9	3,27	0,3
T57A	7,8	0,51	0,66	0,07
K60R	4,95	1,01	2,04	0,2

FIG. 9

CÁC OLIGONUCLEOTIT ĐỐI VỚI CÁC THẺ TỎ HỢP GEN GH1 VÀ GL1 CỦA 5/44

CHUỖI NẶNG

544gH1 T1

AGTGTGAGGTGCAATTGGTCCAGTCAGGAGCAGAGGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTC
AAAGTTTCGTGTAAGGCTAGCGGCTACAGGTTTAC

544gH1 T2

GTGGCATTAAATCCCGGAATCAGTACACTACATATAAAAGAAATCTAAAGGGCAGAGCA
ACGCTGACCGCGGACACCTCCACAAGCACTGTCTACA

544gH1 T3

AGAGAAGGCTACGGTAATTACGGAGCCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGTACCCTAGT
CACAGTCTCCTCAGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

544 gH1 B1

GGACCAATTGCACCTCACACTGCACTCCCTTGAGAATGAGTGCCAGGAACACGAGAGAG
AATCCGAAGTCCATGGTGGCGGCAAGCTTTTATTC

544 gH1 B2

GATTCCCGGGATTAATGCCACCGATCCATTCCAGGCCTTGTCCTGGAGCCTGCCTGACCC
AATGAATCCAATAATTTGTGAACCTGTAGCCGCTAGC

544gH1 B3

CGTAATTACCGTAGCCTTCTCTAGTACAATAGTACACTGCCGGTGTCCTCGGATCTCAGAG
ATGACAGCTCCATGTAGACAGTGCTTGTGGAGG

544gH1 F1

GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

544gH1 R1

TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

FIG. 10

CHUỖI NHE

544 gL1 T1

GCTTCCCGGGGTGACGTTCAAGTGACCCAGAGCCCATCCAGCCTGAGCGCATCTGTAGG
AGACCGGGTCACCATCACTTGTAGATCC

544 gL1 T2

TATCTGCACAAACCAGGTAAAGCCCCACAATTGCTCATCTACGGAATCTCTAACAGATTT
AGTGGTGTACCAGACAGGTTCAGCGGTTCC

544gL1 T3

AGATTCGCCACTTATTACTGTTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACATTCGGTCAGGG
TACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC

544gL1 B1

GAACGTCACCCCGGAAGCAGGAATCCAGAACAACAGAAGCACCAACAGCCTAACAGG
CAACTTCATGGTGGCGGCTTCGAATCATCC

544gL1 B2

CTTTACCTGGTTTGTGCAGATACCAAGACAAAAAGGTGTTCCATAACTGTTTGCAAGAC
TCTGACTGGATCTACAAGTGATGGTGAC

544gL1 B3

AACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGAGACGAGATCGTGAGGGTGAAATCA
GTACCACTTCCGGAACCGCTGAACCTGTCTG

544gL1 F1

GGATGATTCGAAGCCGCCAC

544gL1 R1

GCACGCCGTACGTTTGATTTC

FIG. 10 (tiếp tục)

BẢN ĐỒ PLASMIT CỦA VECTƠ TRUNG GIAN PCR2.1 (544GH1)

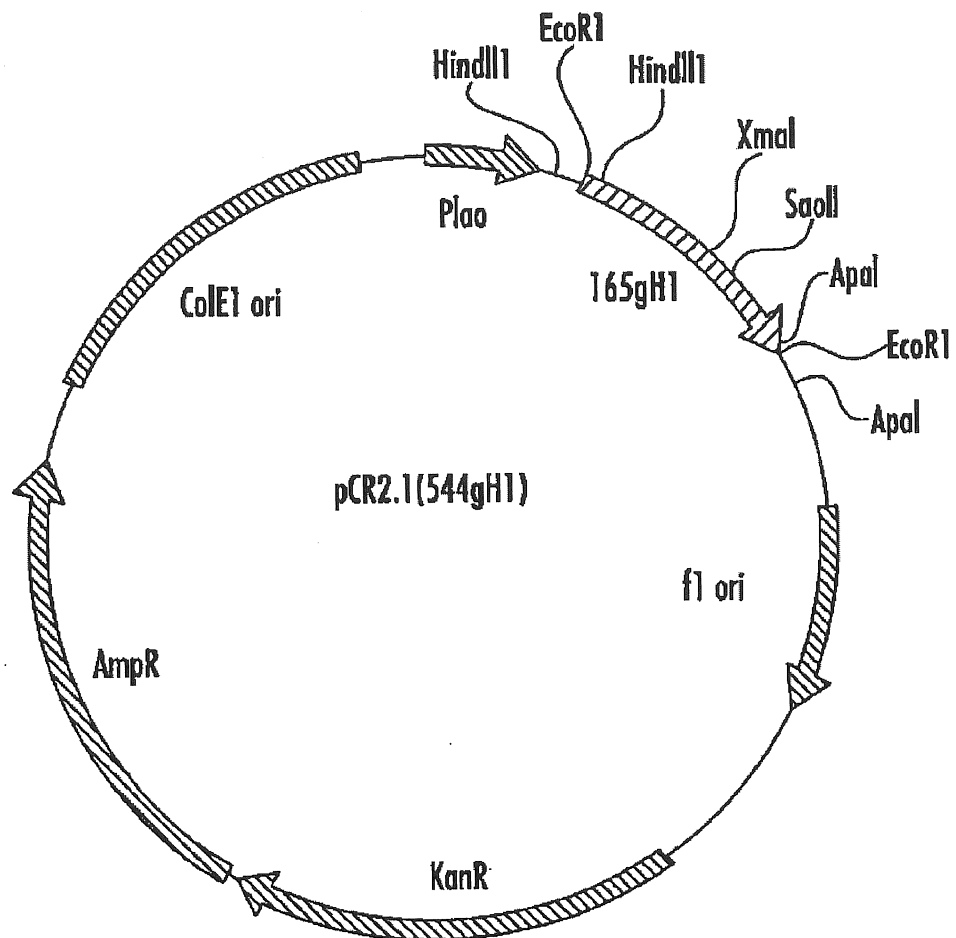


FIG. 11

BẢN ĐỒ PLASMIT CỦA VECTƠ TRUNG GIAN PCR2.1 (544gL1)

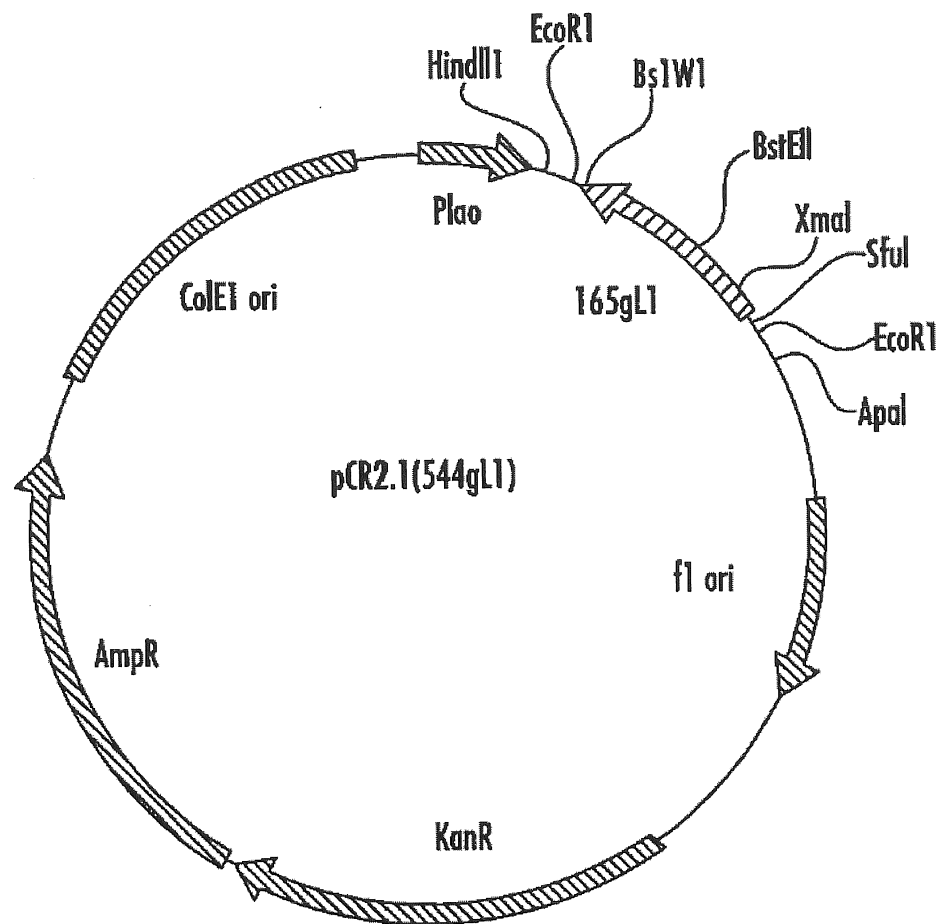


FIG. 12

CÁC CASET OLIGONUCLEOTIT ĐƯỢC SỬ DỤNG ĐỂ TẠO RA CÁC MẢNH
GHÉP KHÁC

qH4

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG						
P G N N Y A T Y R R N L K G R A T L T A						

qH5

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R N L K G R V T M T A						

qH6

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R A T L T A						

qH7

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A						

qL2

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	60	<u>BstEII</u>
C CGG GGT GAC GTT GTC GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG							
CCA CTG CAA CAG CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC CAG TG							
S R G D V V V T Q S P S S L S A S V G D R V T							

FIG. 13

THỬ NGHIỆM CẠNH TRANH, GẮN KẾT CẠNH TRANH CỦA KHÁNG THỂ
5/44 CHUỘT NHẤT ĐƯỢC ĐÁNH DẤU HUỖNH QUANG VỚI CÁC BIẾN DỊ
ĐƯỢC GHEP

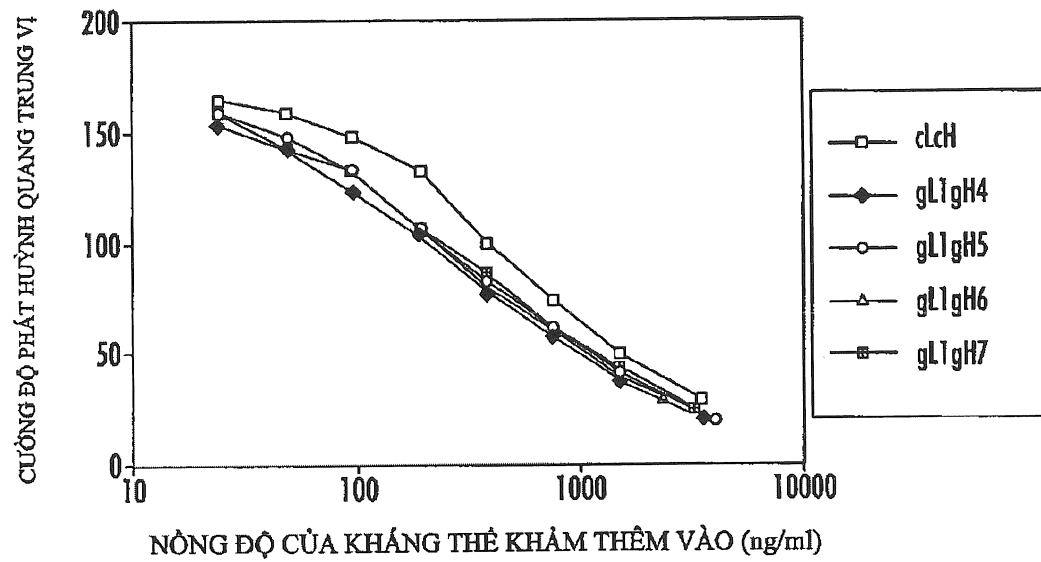


FIG. 14

THỬ NGHIỆM CẠNH TRANH, GẮN KẾT CẠNH TRANH CỦA
KHÁNG THỂ 5/44 CHUỘT NHẮT ĐƯỢC ĐÁNH DẤU HUỖNH
QUANG VỚI CÁC BIẾN DỊ ĐƯỢC GHIẾP

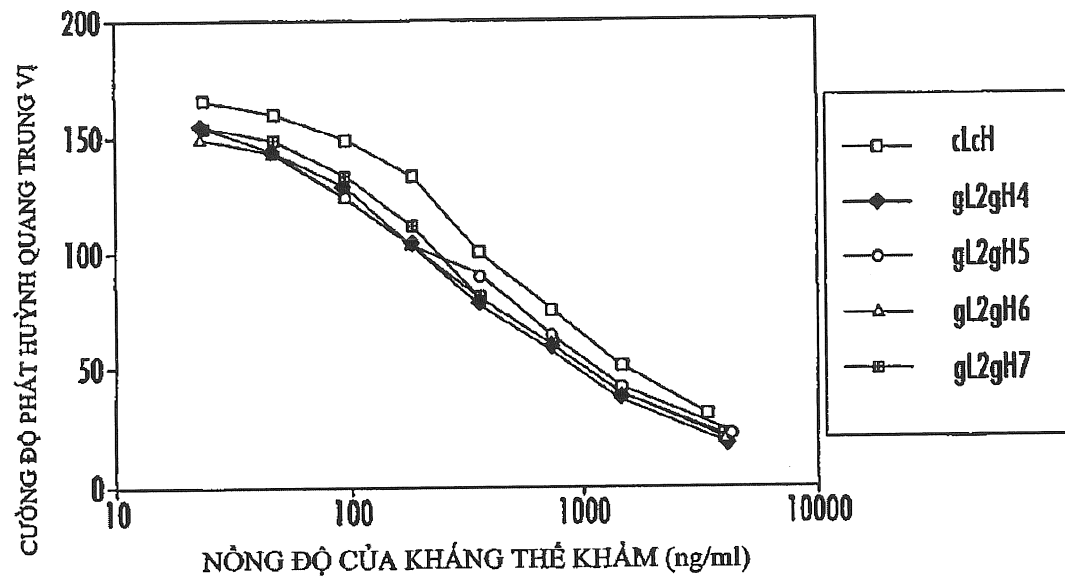


FIG. 15

TRÌNH TỰ ADN ĐẦY ĐỦ CỦA CHUỖI NẶNG VÀ NHẸ ĐƯỢC GHEP

A) CHUỖI NẶNG

```

      10      20      30      40      50      60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M D F G F S L V F L A L I L K>

      70      80      90      100      110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
      G V Q C E V Q L V Q S G A E V K K P G>

120      130      140      150      160      170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
      A S V K V S C K A S G Y R F T N Y W I>

      180      190      200      210      220      230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
      H W V R Q A P G Q G L E W I G G I N P>

      240      250      260      270      280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
      G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A>

290      300      310      320      330      340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
D T S T S T V Y M E L S S L R S E D T>

      350      360      370      380      390      400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
      A V Y Y C T R E G Y G N Y G A W F A Y>

      410      420      430      440      450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
      W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V>

460      470      480      490      500      510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
      F P L A P C S R S T S E S T A A L G C>

      520      530      540      550      560      570
CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG
GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC
      L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L>

      580      590      600      610      620      630
ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC
TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG
      T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S I>

```

FIG. 16

```

        640          650          660          670          680
AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC
TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG
S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N>

690          700          710          720          730          740
GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG CAC AAG AGA GTT G GTGAGAGGCC
CAT CTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCGG
V D H K P S N T K V D K R V>

        750          760          770          780          790          800          810
AGCACAGGGA GGGAGGGTGT CTGCTGGAAG CCAGGCTCAG CCCTCCTGCC TGGACGCACC CCGGCTGTGC
TCGTGTCCCT CCCTCCACAC GACGACCTTC GTCCGAGTC GGGAGGACGG ACCTGCCTGG GCGCGACACG

        820          830          840          850          860          870          880
AGCCCCAGCC CAGGGCAGCA AGGCATGCCC CATCTGTCTC CTCACCCGGA GGCCTCTGAC CACCCCACTC
TCGGGGTCCG GTCCCGTCGT TCCGTACGGG GTAGACAGAG GAGTGGGCCT CCGGAGACTG GTGGGGTGAG

        890          900          910          920          930          940          950
ATGCCCAGGG AGAGGGTCTT CTGGATTITT CCACCAGGCT CCGGGCAGCC ACAGGGCTGA TGCCCTTACC
TACGGGTCCC TCTCCAGAA GACCTAAAAA GGTGGTCCGA GGCCCGTCGG TGTCCGACCT ACGGGGATGG

        960          970          980          990          1000          1010          1020
CCAGGCCCTG CGCATAACAG GGCAGGTGCT GCGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG GAGGACCCTG
GGTCGGGGAC GCGTATGTCC CGGTCCACGA CGCGAGTCTG GACGGTTCTC GGTATAGGCC CTCCTGGGAC

        1030          1040          1050          1060          1070          1080          1090
CCCCTGACCT AAGCCCACCC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCCTCAGCTC AGACACCTTC TCTCCTCCCA
GGGGACTGGA TTCGGGTGGG GTTTCGGTT TGAGAGGTGA GGGAGTCGAG TCTGTGGAAG AGAGGAGGGT

        1100          1110          1120          1130          1140          1150
GATCTGAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA
CTAGACTCAT TGAGGGTTAG AAGAGAGACG T CTC AGG TTT ATA CCA GGG GGT ACG GGT GGT
E S K Y G P P C P P>

1160          1170          1180          1190          1200          1210          1220
TGC CCA GGT AAGCCAACCC AGGCCTCGCC CTCCAGCTCA AGGCGGGACA GGTGCCCTAG AGTAGCCTGC
ACG GGT CCA TTCGGTTGGG TCCGGAGGGG GAGGTGAGT TCCGCCCTGT CCACGGGATC TCATCGGACG
C P>

        1230          1240          1250          1260          1270          1280
ATCCAGGGAC AGGCCCCAGC CGGGTGCTGA CGCATCCACC TCCATCTCTT CCTCA GCA CCT GAG TTC
TAGGTCCCTG TCCGGGGTGC GCCCAGACT GCGTAGGTGG AGGTAGAGAA GGAGT CGT GGA CTC AAG
A P E F>

1290          1300          1310          1320          1330          1340
CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
L G G P S V F L F P P K P K D T L M D>

        1350          1360          1370          1380          1390          1400
TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E>

```

FIG. 16 (tiếp tục)

1410 GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
 CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC
 V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P>
 1460 1470 1480 1490 1500 1510
 CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
 GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
 R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H>
 1520 1530 1540 1550 1560 1570
 CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
 GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P>
 1580 1590 1600 1610 1620 1630
 TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGG GACCCACGGG GTGCGAGGGC
 AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCACC CTGGGTGCC CACGCTCCCG
 S S I E K T I S K A K>
 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 CACATGGACA GAGGTACGCT CGGCCACCC TCTGCCTGG GAGTGACCGC TGTGCCAACC TCTGTCCCTA
 GTGTACCTGT CTCCAGTCGA GCCGGGTGGG AGACGGGACC CTCACTGGCG ACACGGTTGG AGACAGGGAT
 1710 1720 1730 1740 1750
 CA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG
 GT CCC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC
 G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M>
 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC
 TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG
 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I>
 1820 1830 1840 1850 1860 1870
 GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC
 CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG
 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P>
 1880 1890 1900 1910 1920
 GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC
 CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG
 V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S>
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
 TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG
 R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N>
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA GTGC CAGGGCCGGC
 GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC CCA TTT ACT CACG GTCCCGGGCG
 H Y T Q K S L S L S L G K *>
 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110
 AAGCCCCGC TCCCCGGGCT CTCGGGGTGC CGCGAGGATG CTTGGCACGT ACCCGTCTA CATACTTCCC
 TTCGGGGCG AGGGGCCGA GAGCCCCAGC GCGCTCTAC GAACCGTGCA TGGGGCAGAT GTATGAAGGG

FIG. 16 (tiếp tục)

2120	2130	2140	2150	2160
AGGCACCCAG	CATGGAAATA	AAGCACCCAC	CACTGCCCTG	GCTCGAATTC
TCCGTGGGTC	GTACCTTTAT	TTCGTGGGTG	GTGACGGGAC	CGAGCTTAAG

FIG. 16 (tiếp tục)

B) CHUỖI NHE

```

      10      20      30      40      50      60
TTCGAAGCCG CCACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG CTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT
AAGCTTCGGC GGTGG TAC TTC AAC GGA CAA TCC TCC AAC CAC GAA GAC AAC AAG ACC TAA
      M      K      L      P      V      R      L      L      V      L      L      L      F      W      I>

      70      80      90      100      110
CCT GCT TCC CGG GGT GAC GTT CAA GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT
GGA CGA AGG GCC CCA CTG CAA GTT CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA
      P      A      S      R      G      D      V      Q      V      T      Q      S      P      S      S      L      S      A      S>

120      130      140      150      160      170
GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACT TGT AGA TCC AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT
CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGA ACA TCT AGG TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA
      V      G      D      R      V      T      I      T      C      R      S      S      Q      S      L      A      N      S      Y>

180      190      200      210      220      230
GGG AAC ACC TTT TTG TCT TGG TAT CTG CAC AAA CCA GGT AAA GCC CCA CAA TTG CTC
CCC TTG TGG AAA AAC AGA ACC ATA GAC GTG TTT GGT CCA TTT CGG GGT GTT AAC GAG
      G      N      T      F      L      S      W      Y      L      H      K      P      G      K      A      P      Q      L      L>

240      250      260      270      280
ATC TAC GGA ATC TCT AAC AGA TTT AGT GGT GTA CCA GAC AGG TTC AGC GGT TCC GGA
TAG ATG CCT TAG AGA TTG TCT AAA TCA CCA CAT GGT CTG TCC AAG TCG CCA AGG CCT
      I      Y      G      I      S      N      R      F      S      G      V      P      D      R      F      S      G      S      G>

290      300      310      320      330      340
AGT GGT ACT GAT TTC ACC CTC ACG ATC TCG TCT CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT
TCA CCA TGA CTA AAG TGG GAG TGC TAG AGC AGA GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA
      S      G      T      D      F      T      L      T      I      S      S      L      Q      P      E      D      F      A      T>

350      360      370      380      390      400
TAT TAC TGT TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA
ATA ATG ACA AAT GTT CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT
      Y      Y      C      L      Q      G      T      H      Q      P      Y      T      F      G      Q      G      T      K      V>

410      420      430      440      450
GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC
      E      I      K      R      T      V      A      A      P      S      V      F      I      F      P      P      S      D      E>

460      470      480      490      500      510
CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT
      Q      L      K      S      G      T      A      S      V      V      C      L      L      N      N      F      Y      P      R>

520      530      540      550      560      570
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG
CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC
      E      A      K      V      Q      W      K      V      D      N      A      L      Q      S      G      N      S      Q      E>

580      590      600      610      620      630
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CAG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC
      S      V      T      E      Q      D      S      K      D      S      T      Y      S      L      S      S      T      L      T>

      640      650      660      670      680

```

FIG. 16 (tiếp tục)

```

CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC
  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q>

690          700          710          720          730          740
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG AGGGA
CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TCCCT
  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R  G  E  C  *>

          750          760          770          780
GAAGTGCCCC CACCTGCTCC TCAGTTCCAG CCTGGGAATT C
CTTCACGGGG GTGGACGAGG AGTCAAGGTC GGACCCTTAA G

```

FIG. 16 (tiếp tục)

CẤU TRÚC CỦA THỂ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ - NAC-GAMA CALICHEMIXIN DMH

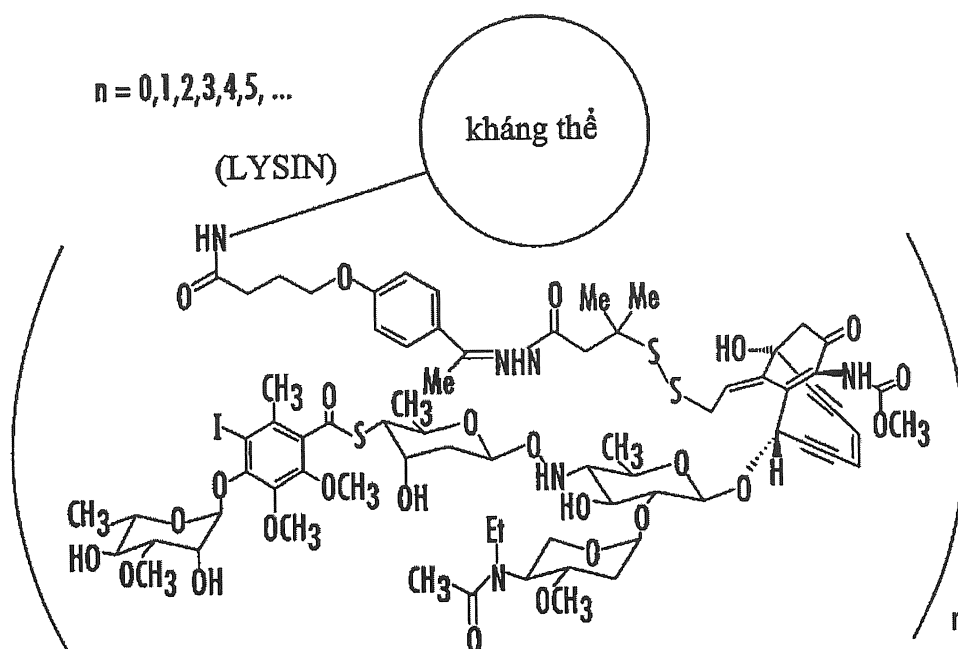


FIG. 17

TÁC DỤNG CỦA CMC-544 LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG U LYMPHÔ TẾ BÀO B RAMOS

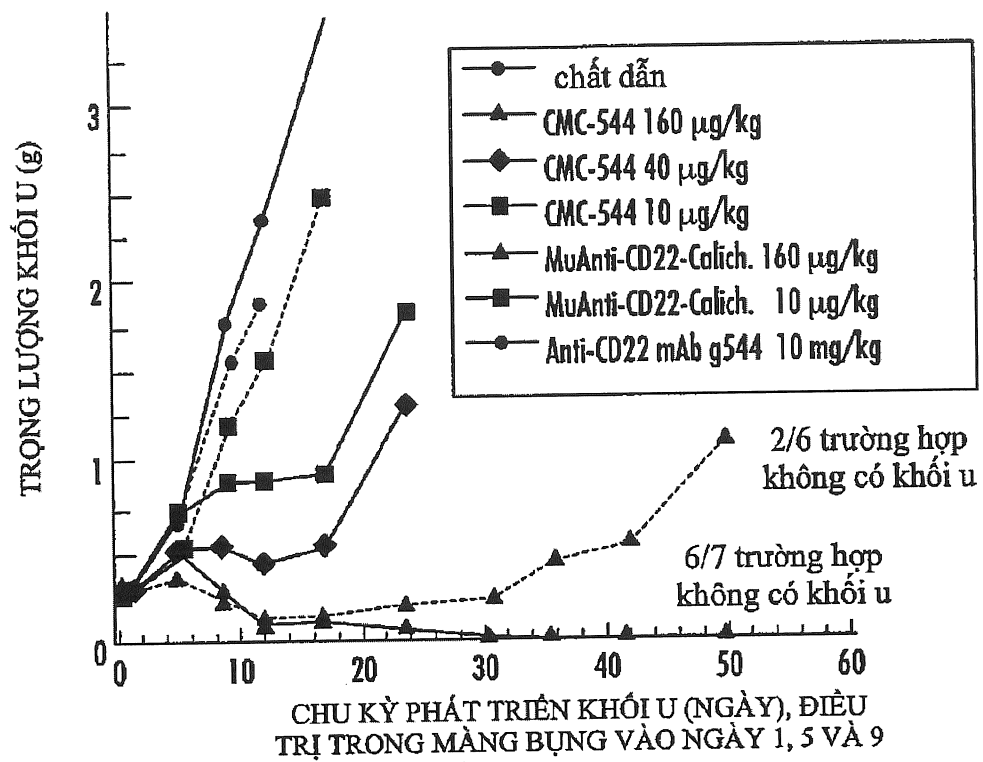


FIG. 18

TÁC DỤNG CỦA CMC-544 LÊN U LYMPHÔ TẾ BÀO B LỚN

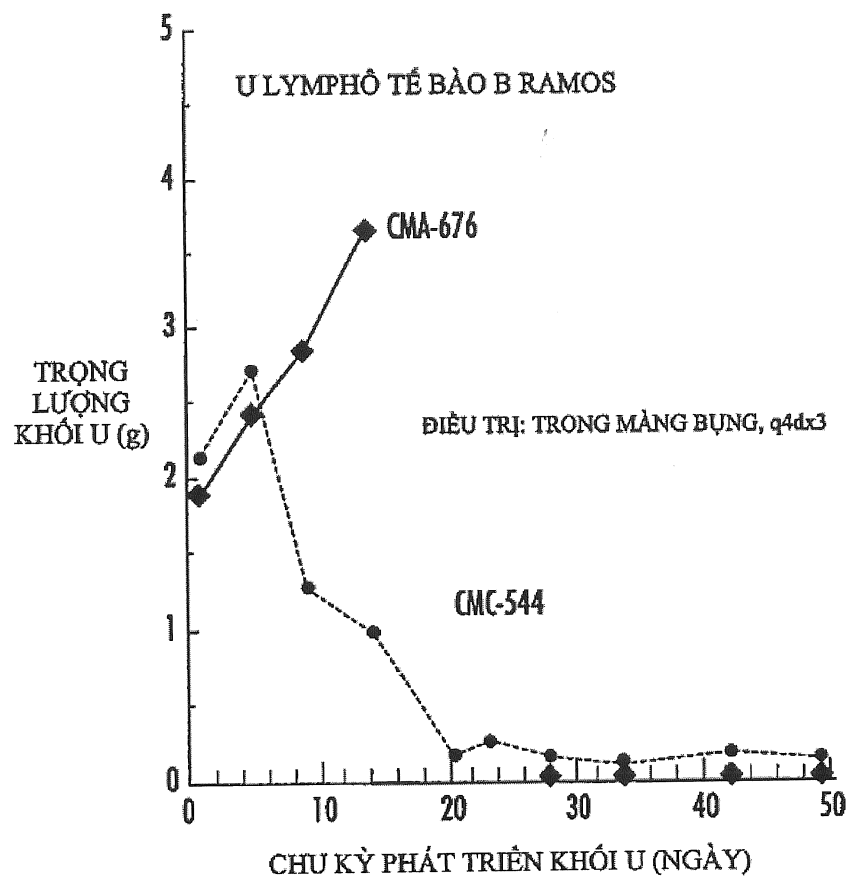


FIG. 19

TÁC DỤNG CỦA CMC-544 ĐƯỢC TẠO RA BẰNG QUY TRÌNH LIÊN
HỢP CMA VÀ CMC LÊN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA U LYMPHO RF

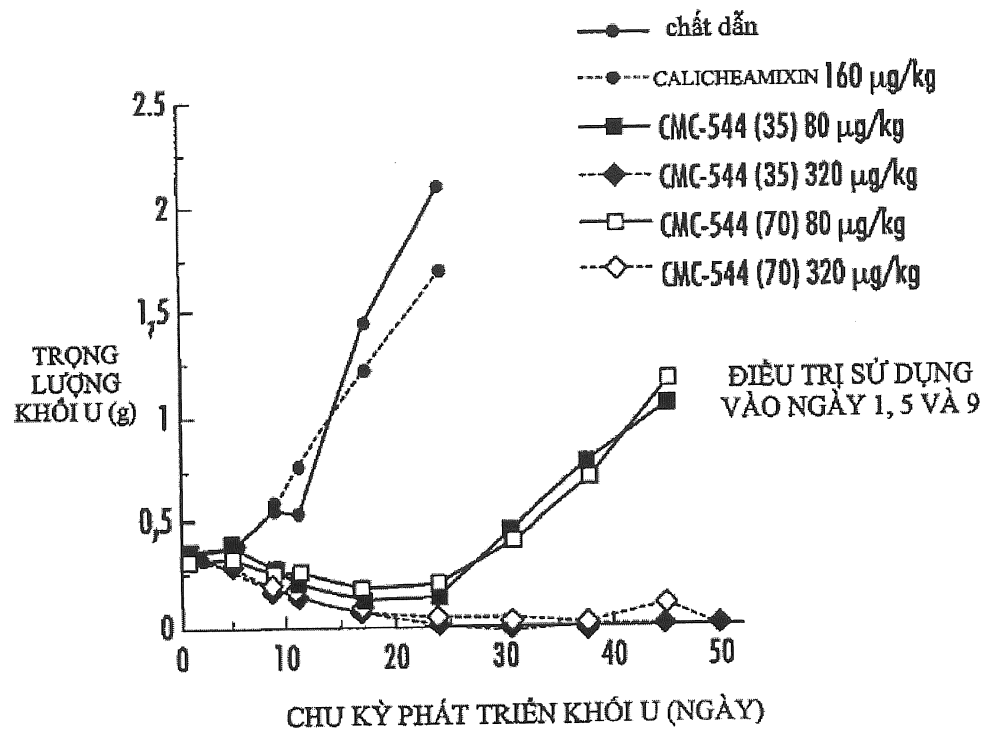


FIG. 20

U LYMPHÔ RL LỚN ĐƯỢC ĐIỀU TRỊ BẰNG RITUXIMAB
(RITUXAN®) NHẠY VỚI CMC-544

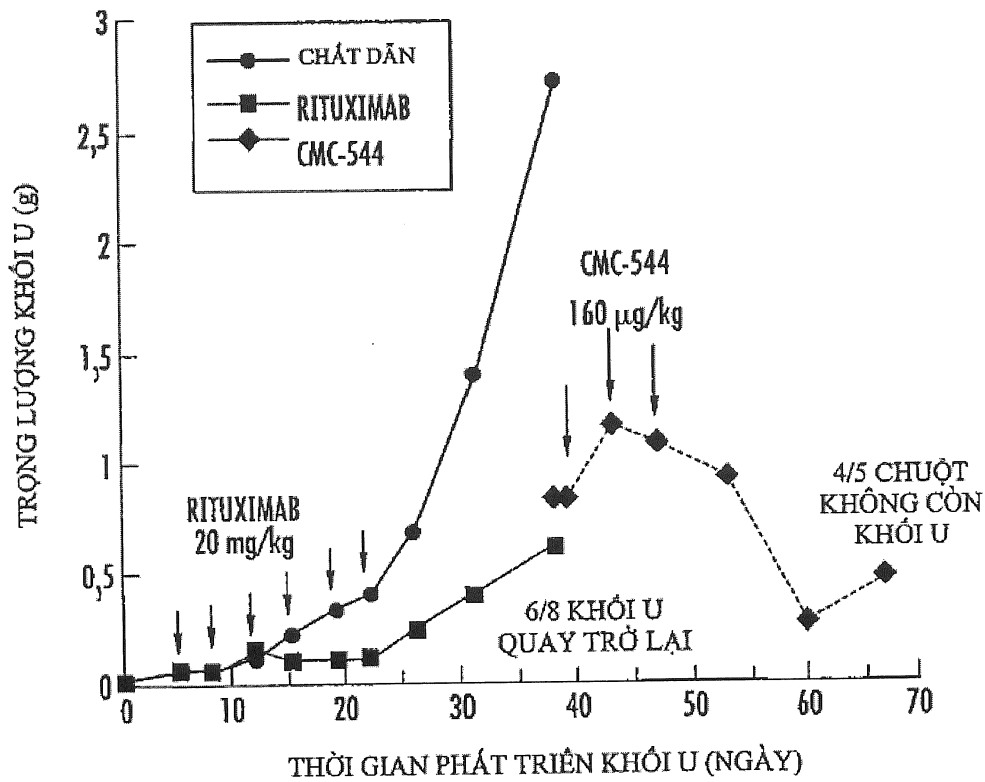


FIG. 21

TÁC DỤNG CỦA RITUXIMAB (RITUXAN®) LÊN HOẠT
TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA CMC-544

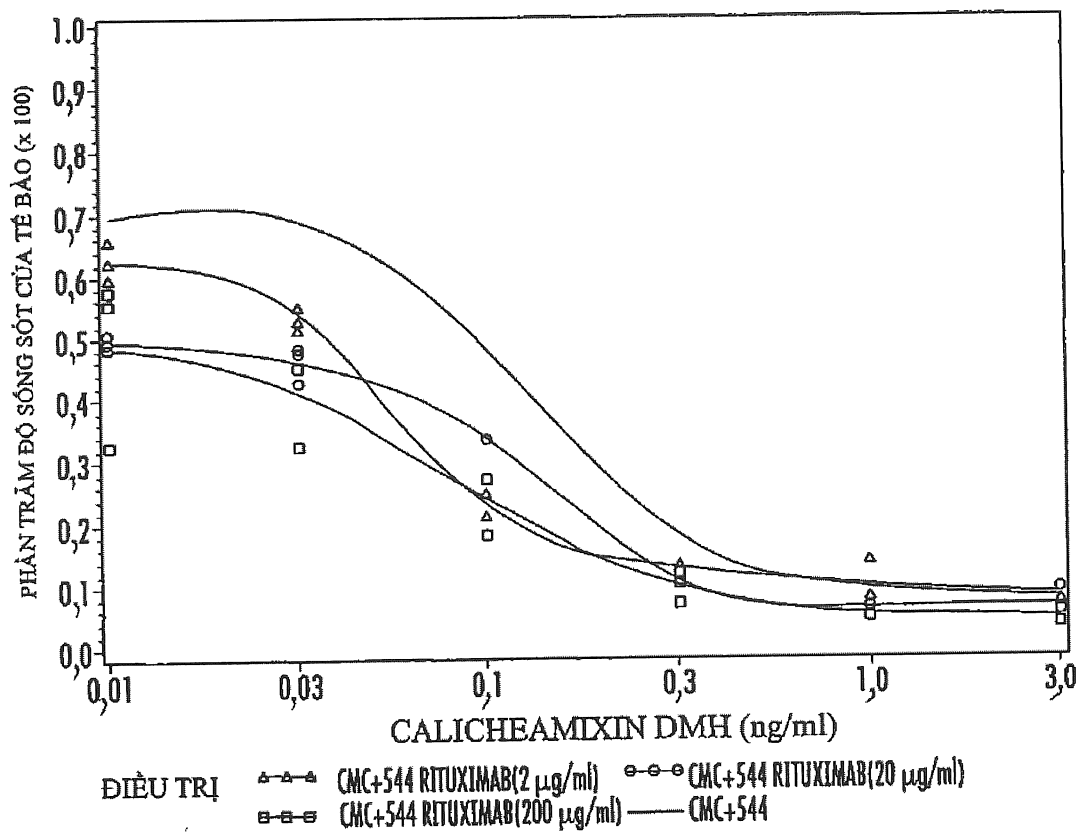


FIG. 22

TÁC DỤNG CỦA CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN®) VÀ CMA-676
LÊN SỰ SỐNG SỐT CỦA CHUỘT NHẤT SCID CÓ U LYMPHÔ B
RAMOS LAN TỎA SỚM

SỬ DỤNG TRONG TĨNH MẠCH TẾ
BÀO U LYMPHO B RAMOS Ở
CHUỘT NHẤT SCID VÀO NGÀY 0

ĐIỀU TRỊ TRONG MÀNG BỤNG
VÀO CÁC NGÀY 3, 7, 11
Q4Dx3

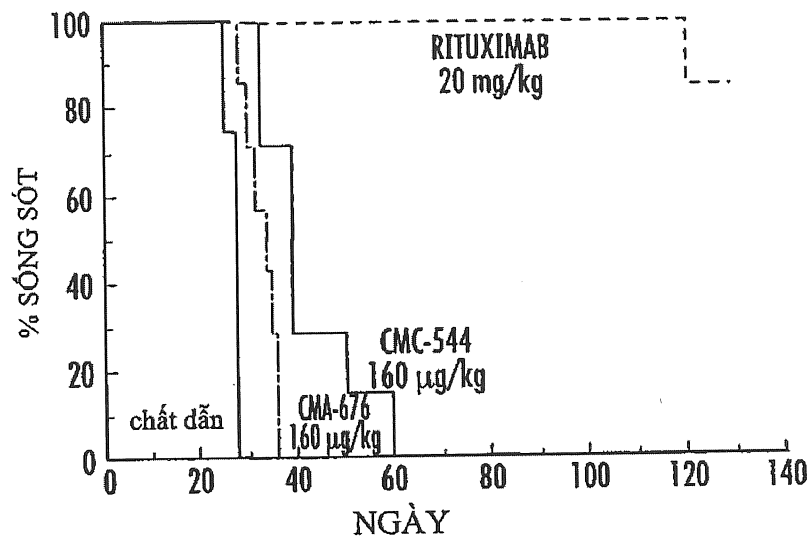


FIG. 23

TÁC DỤNG CỦA CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN®) VÀ CMA-676 LÊN SỰ SỐNG
SỐT CỦA CHUỘT NHẤT SCID CÓ U LYMPHÔ B RAMOS LAN TỎA MUỘN

SỬ DỤNG TRONG TĨNH MẠCH TẾ
BÀO U LYMPHO B RAMOS Ở
CHUỘT NHẤT SCID VÀO NGÀY 0

ĐIỀU TRỊ TRONG MÀNG BỤNG
VÀO CÁC NGÀY 9, 13, 17
Q4Dx3

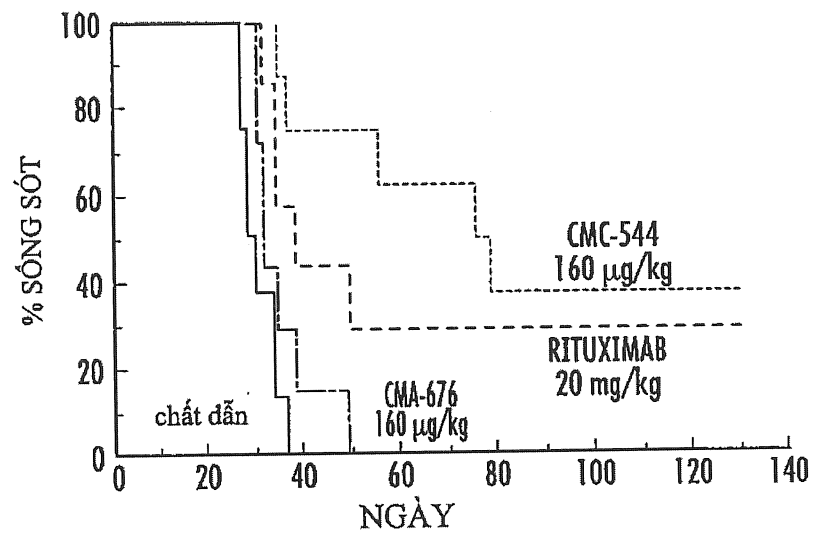


FIG. 24

TÁC DỤNG CỦA CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN®) VÀ CMA-676 LÊN SỰ SỐNG
SỐT CỦA CHUỘT NHẤT SCID CÓ U LYMPHO B RAMOS LAN TỎA MUỘN

SỬ DỤNG TRONG TĨNH MẠCH TẾ
BÀO U LYMPHO B RAMOS Ở
CHUỘT NHẤT SCID VÀO NGÀY 0

ĐIỀU TRỊ TRONG MÀNG BỤNG
VÀO CÁC NGÀY 9, 13, 17
Q4Dx3

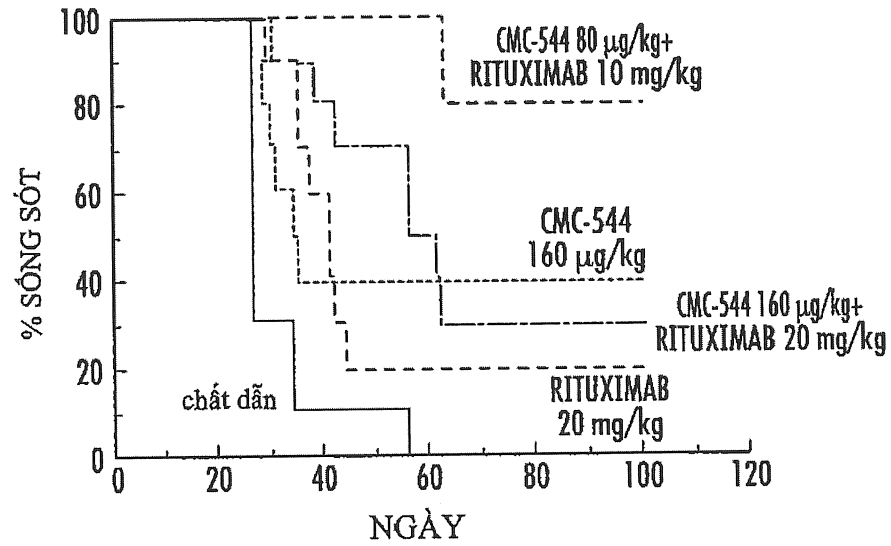


FIG. 25

TÁC DỤNG CỦA CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN®) VÀ CMA-676 LÊN SỰ SỐNG
SỐT CỦA CHUỘT NHẤT SCID CÓ U LYMPHÔ B RAMOS LAN TỎA MUỘN

SỬ DỤNG TRONG TĨNH MẠCH TẾ
BÀO U LYMPHO B RAMOS Ở
CHUỘT NHẤT SCID VÀO NGÀY 0

ĐIỀU TRỊ TRONG MÀNG BỤNG
VÀO CÁC NGÀY 9, 13, 17
Q4Dx3

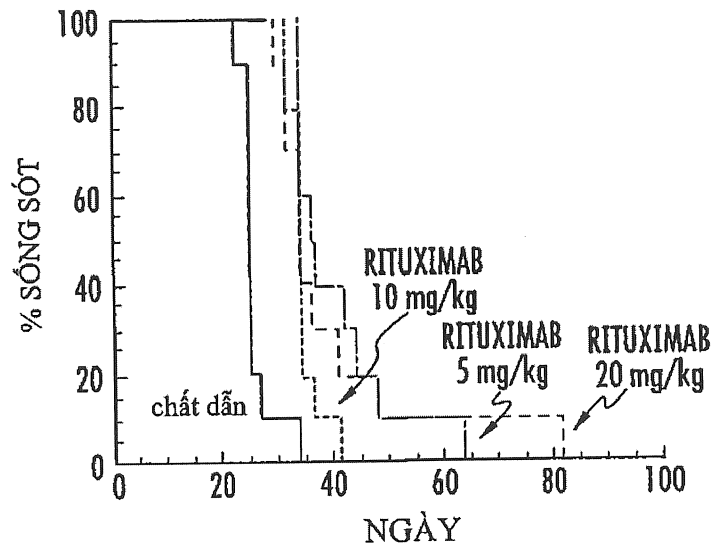


FIG. 26

TÁC DỤNG CỦA CMC-544, RITUXIMAB (RITUXAN®) VÀ CMA-676 LÊN SỰ SỐNG
SỐT CỦA CHUỘT NHẤT SCID CÓ U LYMPHÔ B RAMOS LAN TỎA MUỖN

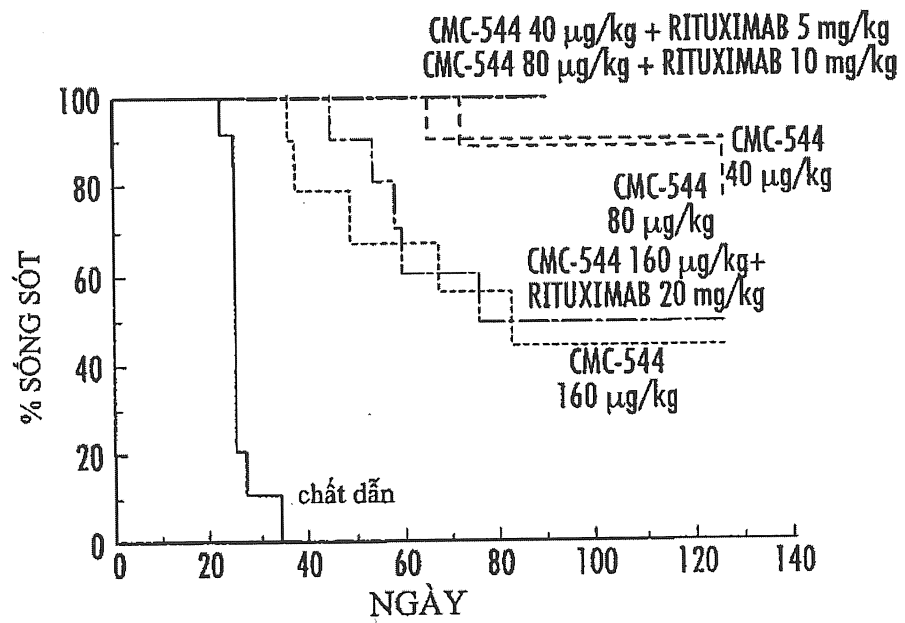


FIG. 27

HOẠT TÍNH KHÁNG U CỦA CMC-544 KHI CÙNG VỚI VÀ KHÔNG CÙNG VỚI RITUXIMAB (RITUXAN®) TRÊN U LYMPHÔ RL KHÔNG HODGKINS

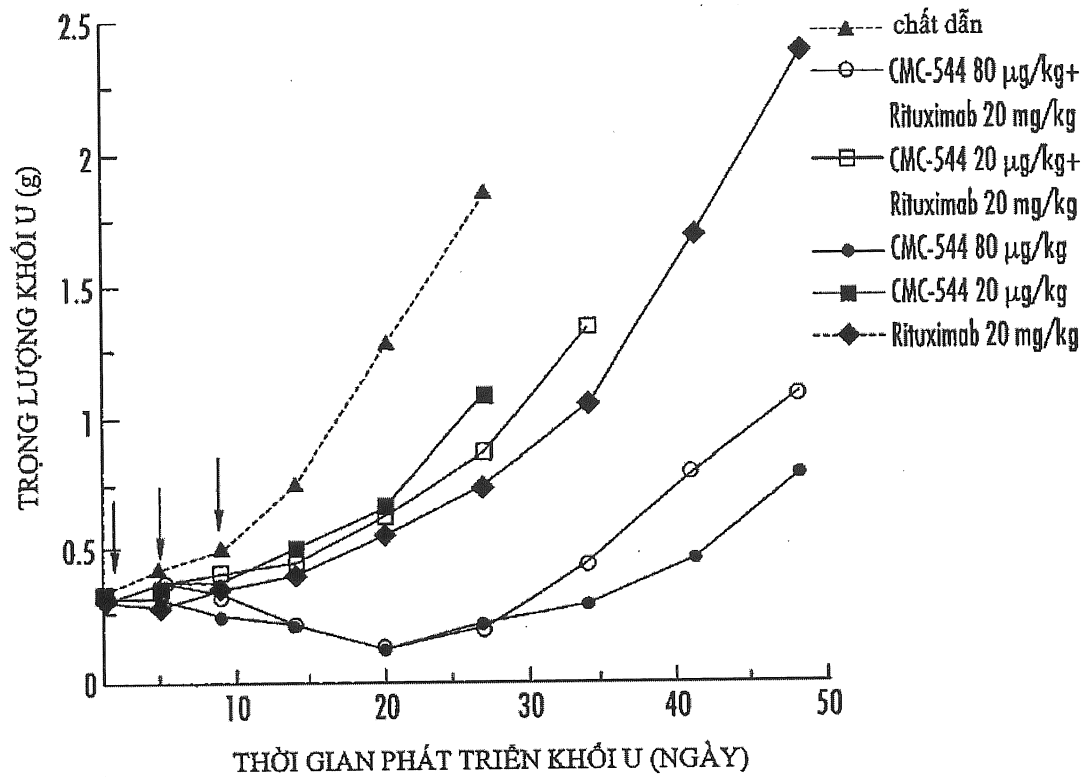


FIG. 28

HOẠT TÍNH KHÁNG U CỦA CMC-544 VÀ CHOP LÊN U LYMPHÔ
RL KHÔNG HODGKINS

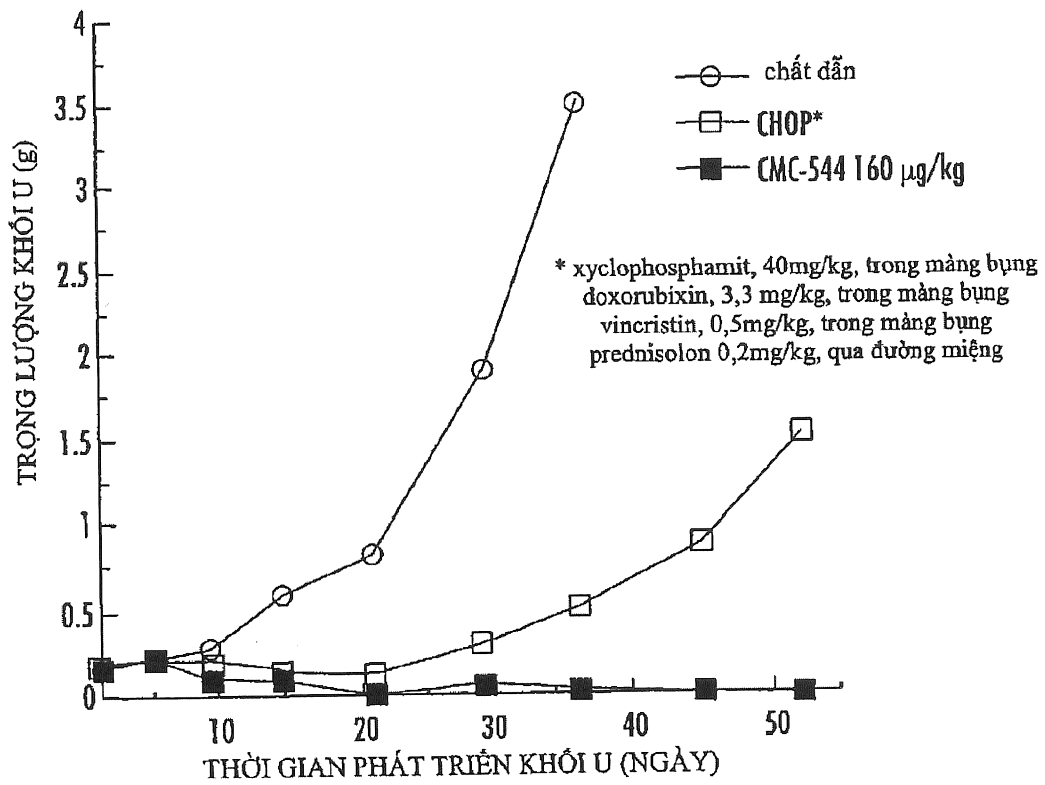


FIG. 29

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CÔNG TY WYETH HOLDING CORPORATION.; KUNZ, ARTHUR VÀ CÁC ĐỒNG TÁC GIẢ
 <120> CHẾ PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP THUỐC CHỨA DẪN XUẤT CALICHEAMIXIN
 VÀ KHÁNG THỂ KHÁNG CD22 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY
 <160> 51
 <170> Seqwin99, version 1.02
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt
 <220>
 <223> 5/44g CDR-H1
 <220>
 <221>
 <400> 1
 Asn Tyr Trp Ile His
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt
 <220>
 <223> CDR-H2gLI T3 của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt
 <220>
 <221>
 <400> 2
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt
 <220>
 <223> CDR-H3 của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt
 <220>
 <221>
 <400> 3
 Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt
 <220>
 <223> CDR-L1 của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt

<220>

<221>

<400> 4
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> CDR-L2 của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt

<220>

<221>

<400> 5
 Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> CDR-L3 của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt

<220>

<221>

<400> 6
 Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Chuột nhắt

<220>

<223> vùng VL của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt

<220>

<221>

<400> 7
 Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
 20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> vùng VH của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt

<220>
 <223> vùng VH của kháng thể đơn dòng 5/44 của chuột nhắt

<220>
 <221>

<400> 8
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CH

<220>
 <221>

<400> 9
 Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> N55Q

<220>
 <221>

<400> 10
 Gly Asn Gln Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> T57A

<220>
 <221>

<400> 11
 Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> T57V

<220>
 <221>

<400> 12
 Gly Asn Asn Tyr Val Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR-H2' (T57)A H'

<220>
 <221>

<400> 13
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> K60R

<220>
 <221>

<400> 14
 Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

<210> 15
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR-H2 (K60R)R H''

<220>
 <221>

<400> 15
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR-H2 (T57A K60R) H'''

<220>
 <221>

<400> 16
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 17
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <223> DPK9

<220>
 <221>

<400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 65 70

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <223> JK1

<220>
<221>

<400> 18
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 19
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> gL1

<220>
<221>

<400> 19
Asp Val Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
20 25 30
Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95
Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 20
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> gL2

<220>
<221>

<400> 20
Asp Val Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
20 25 30
Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 21
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <223> DP7

<220>
 <221>

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Trp Val
 20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Phe Gln Gly
 35 40 45

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 65 70 75 80

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <223> JH4

<220>
 <221>

<400> 22
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 23
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gH1

<220>
 <221>

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

<210> 24
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gH4

<220>
 <221>

<400> 24
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gH5

<220>

<221>

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> gH6

<220>

<221>

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> gH7

<220>
<221>

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 239
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đầy đủ của chuỗi nhẹ được ghép

<220>
<221>

<400> 28
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15
Ala Ser Arg Gly Asp Val Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys
50 55 60
Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 29
 <211> 781
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đầy đủ của chuỗi nhẹ được ghép

<220>
 <221>

<400> 29
 ttcgaagccg ccaccatgaa gttgcctggt aggcctgttg tgcttctggt gttctggatt 60
 cctgcttccc ggggtgacgt tcaagtgaac cagagcccat ccagcctgag cgcattctgta 120
 ggagaccggg tcaccatcac ttgtagatcc agtcagagtc ttgcaaacag ttatgggaac 180
 acctttttgt cttggtatct gcacaaacca ggtaaaagccc cacaattgct catctacgga 240
 atctctaaca gatttagtggt tgtaccagac aggttcagcg gttccggaag tggtagctgat 300
 ttcaccctca cgatctcgtc tctccagcca gaagatttcg ccacttatta ctgtttacaa 360
 ggtaacacac agccgtacac attcgggtcag gttactaaag tagaaatcaa acgtacggta 420
 gcggcccccatt ctgtcttcat cttcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc 480
 tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg 540
 gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac 600
 agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa 660
 gtctacgcct gcgaagtcac ccattcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac 720
 aggggagagt gttagagggg gaagtgcctc cactgtctcc tcagttccag cctgggaatt 780
 c 781

<210> 30
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đầy đủ của chuỗi nặng được ghép

<220>
 <221>

<400> 30
 Met Asp Phe Gly Phe Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg
 65 70 75 80
 Arg Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Gly Lys
 465

<210> 31
 <211> 2160
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN đầy đủ của chuỗi nặng được ghép

<220>
 <221>

<400> 31
 aagcttgccg ccaccatgga cttcggattc tctctcgtgt tcctggcact cattctcaag 60
 ggagtgcagt gtgaggtgca attggtccag tcaggagcag aggttaagaa gcctgggtgct 120
 tccgtcaaag ttctcgtgtaa ggctagcggc tacaggttca caaattattg gattcattgg 180
 gtcaggcagg ctccgggaca aggcctggaa tggatcgggt gcattaatcc cggaataaac 240
 tacgtacat ataggagaaa attccagggc agagtacga tgaccgcgga cacctccaca 300
 agcactgtct acatggagct gtcattctctg agatccgagg acaccgcagt gtactattgt 360
 actagagaag gctacggtaa ttacggagcc tggttcgcct actggggcca gggtacccta 420
 gtcacagctt cctcagcttc taaaaagggc ccatccgtct tccccctggc gccctgtctc 480
 aggagcacct ccgagagcac agccgcctcg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
 ccggtgacgg tgctcgtgaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600
 gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
 ttgggacaga agacctacac ctgcaacgta gatcacaaag ccagcaacac caaggtagac 720
 aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggaggggtg ctgctggaag ccaggctcag 780
 cctctctgcc tggacgcacc ccggtgtgac agccccagcc cagggcagca aggcattgcc 840
 catctgtctc ctcacccgga ggcctctgac caccctcctc atgcccaggg agagggtctt 900
 ctggattttt ccaccaggct ccgggcagcc acaggctgga tgccccctac ccaggccctg 960
 cgcatacagg ggcagggtgct gcgctcagac ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg 1020
 cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa actctccact ccttcagctc agacaccttc 1080
 tctctctcca gatctgagta actcccaatc ttctctctgc agagtcctca tatgttcccc 1140
 catgcccacc atgcccagggt aagccaaccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca 1200
 ggtgcccctag agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgtgta cgcattccacc 1260
 tccatctctt cctcagcacc tgagtctctg gggggaccat cagtcttctt gttcccccca 1320
 aaacccaagg acactctcat gatctcccgg accctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 1380
 gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 1440
 aatgccaaga caaagccgcy ggaaggagcag ttcaacagca acaagtgcaa ggtctccaac 1500
 ctccaccgtc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt ccaaggtgg gacccacggg 1560
 aaaggcctcc cgtctctcat cgagaaaacc atctccaaag ccaaggtgg gacccacggg 1620
 gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct cggcccaccc tctgcccctg gagtgaaccg 1680
 tgtgccaacc tctgtcccta cagggcagcc ccgagagcca cagggtgtaca cctgcccccc 1740
 atcccaggag gagatgacca agaaccaggc cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 1800
 ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 1860
 cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctct tacagcaggc taaccgtgga 1920
 caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt ctcattgtcc gtgatgcatg aggtcttgca 1980
 caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaatgagtgc cagggccggc 2040
 aagcccccg cccccggct ctcggggctc cgcgaggatg cttggcacgt accccgtcta 2100
 catacttccc aggcacccag catggaaata aagcaccac cactgcccct gctcgaattc 2160

<210> 32
 <211> 94
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544gH1 T1

<220>

<221>

<400> 32
agtggtgaggt gcaattgggtc cagtcaggag cagagggttaa gaagcctggt gcttccgtca 60
aagtttcgtg taaggctagc ggctacaggt tcac 94

<210> 33

<211> 96

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544gH1 T2

<220>

<221>

<400> 33
gtggcattaa tcccgggaat cagtacacta catataaaag aaatctaaag ggcagagcaa 60
cgtgaccgc ggacacctcc acaagcactg tctaca 96

<210> 34

<211> 95

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544gH1 T3

<220>

<221>

<400> 34
agagaaggct acggtaatta cggagcctgg ttcgcctact ggggccaggg taccctagtc 60
acgtctcct cagcttctac aaagggccca agaaa 95

<210> 35

<211> 94

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544 gH1 B1

<220>

<221>

<400> 35
ggaccaattg cacctcacac tgcactccct tgagaatgag tgccaggaac acgagagaga 60
atccgaagtc catggtggcg gcaagctttt attc 94

<210> 36

<211> 97

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544gH1 B2

<220>

<221>

<400> 36
gattcccggtg attaatgcca ccgatccatt ccaggccttg tcccggagcc tgcctgacct 60
aatgaatcca ataatttgtg aacctgtagc cgctagc 97

<210> 37
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 544gH1B3

<220>
 <221>

<400> 37
 cgtaattacc gtacgttct ctagtacaat agtacactgc ggtgtcctcg gatctcagag 60
 atgacagctc catgtagaca gtgcttgtgg agg 93

<210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 544gH1 F1

<220>
 <221>

<400> 38
 gaataaaagc ttgccgccac c 21

<210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 544gH1 R1

<220>
 <221>

<400> 39
 ttctctgggc cctttgtaga ag 22

<210> 40
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 544gL1 T1

<220>
 <221>

<400> 40
 gcttccccggg gtgacgttca agtgacccag agcccatcca gcctgagcgc atctgtagga 60
 gaccgggtca ccatacattg tagatcc 87

<210> 41
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 544gL1 T2

<220>

<221>

<400> 41
 tatctgcaca aaccaggtaa agccccacaa ttgctcatct acggaatctc taacagattt 60
 agtgggtgtac cagacagggt cagcgggtcc 90

<210> 42

<211> 91

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544gL1 T3

<220>

<221>

<400> 42
 agatttcgcc acttattact gtttacaagg tacacatcag ccgtacacat tcggtcaggg 60
 tactaaagta gaaatcaaac gtacggcggtg c 91

<210> 43

<211> 88

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544gL1 B1

<220>

<221>

<400> 43
 gaacgtcacc ccgggaagca ggaatccaga acaacagaag caccaacagc ctaacaggca 60
 acttcattggt ggcggcttcg aatcatcc 88

<210> 44

<211> 88

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544gL1 B2

<220>

<221>

<400> 44
 ctttacctgg ttgtgcaga taccaagaca aaaagggtgtt cccataactg ttgcaagac 60
 tctgactgga tctacaagtg atggtgac 88

<210> 45

<211> 90

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 544gL1B3

<220>

<221>

<400> 45
 aacagtaata agtggcgaaa ttttctggct ggagagacga gatcgtgagg gtgaaatcag 60
 taccacttcc ggaaccgctg aacctgtctg 90

<210> 46

<211> 20

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự trong đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 50

gccgccacc

9

<210> 51

<211> 101

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi oligonucleotit 5'

<400> 51

gcgcgcaagc ttgccgccac catggacttc ggattcttc tcgtgttcct ggcactcatt 60
ctcaaggag tgcagtgtga ggtgcagctc gtcgagtctg g 101

1