



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

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

(11)



1-0035325

(51)⁸ C12N 5/09; A61P 35/00; C07K 16/44

(13) B

(21) 1-2017-03114

(22) 11/03/2016

(86) PCT/CN2016/076135 11/03/2016

(87) WO2016/127954 18/08/2016

(30) 201510080631.3 14/02/2015 CN

(45) 25/04/2023 421

(43) 26/02/2018 359A

(73) 1. BIOTECH PHARMACEUTICAL CO. LTD (CN)

ZHOU, Zhaoyue No.2 Rongjing East Road, Beijing Economic-Technological Development Area, Daxing District Beijing 100176, China

2. CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR (CU)

216 Street and 15 Ave., Atabey, Playa, La Habana, Cuba

(72) CHEA, MeyLen (CU); PALACIOS, Julio (CU); ARIAS, Miguel (CU); CALVO, Loany (CU); González, Tamara (CU); Pérez, Rolando (CU); BAI, Zhi (CN); LIU, Yuemao (CN); XIAO, Kaiheng (CN); CHEN, Xiao (CN); HE, Zhenhua (CN); CAI, Yangliu (CU); YANG, Zhenhua (CN); BAI, Xianhong (CN).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP THU DÒNG TẾ BÀO VÔ TÍNH SẢN XUẤT CÓ ĐỘ ỔN ĐỊNH TỪ DÒNG TẾ BÀO U TỬY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp thu dòng tế bào vô tính biểu hiện ổn định, có hiệu suất cao từ dòng tế bào u tửy trong môi trường nuôi cấy không chứa protein. Phương pháp này được sử dụng để tạo ra kháng thể tái tổ hợp trong công nghiệp, và bao gồm ba giai đoạn: (1) làm thích nghi với môi trường nuôi cấy không chứa protein, tế bào nuôi cấy ổn định ở mật độ thấp, và làm giảm từ từ thành phần bổ sung giàu chất béo vào môi trường nuôi cấy hóa học; (2) làm thích nghi với môi trường nuôi cấy không chứa protein; nuôi cấy tế bào ở mật độ cao, và sử dụng hệ thống lên men chảy tràn ở quy mô phòng thí nghiệm; và (3) sàng lọc dòng tế bào vô tính biểu hiện ổn định, có hiệu suất cao từ các tế bào sau khi kết thúc quá trình lên men. Dòng tế bào vô tính này có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể tái tổ hợp đã được làm giống như kháng thể của người kháng NeuGcGM3 14F7.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là phương pháp chọn lọc có hiệu quả các dòng tế bào sản xuất có độ ổn định cao để sử dụng trong quá trình lên men chảy tràn nhằm tạo ra các kháng thể trị liệu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng thể trị liệu là mặt hàng dược phẩm sinh học chủ yếu trên thị trường (Walsh G, 2014, Nature Biotechnology 2014, 32: 992 – 1000). Một số kháng thể trị liệu đã được phê duyệt để dùng trong điều trị ung thư, các bệnh tự miễn và các bệnh mãn tính khác và hàng chục kháng thể tái tổ hợp đang trong các giai đoạn phát triển lâm sàng khác nhau (Biologic Medicines in Development, Phrma Report 2013, www.phrma.org). Thông thường, bệnh nhân tiếp nhận hàng trăm miligam kháng thể trị liệu trong mỗi liều dùng, do đó nhu cầu về phương pháp tạo ra kháng thể này với hiệu suất cao trên thế giới hiện đang rất lớn.

Một số phương pháp đã được theo đuổi nhằm làm tăng hiệu suất các dòng tế bào công nghiệp, ví dụ, hệ thống khuếch đại gen, sự tối ưu hóa môi trường nuôi cấy tế bào và các phương pháp nhằm chọn lọc các dòng tế bào sản xuất có độ ổn định cao. Biến đổi gen và thích nghi về di truyền biểu sinh của các dòng tế bào u tùy tái tổ hợp nhằm tạo ra các kháng thể trị liệu hiện đang là một lĩnh vực nghiên cứu rất cạnh tranh (Barnes et al., 2000, Cytotechnology 32:109-123; Barnes et al., 2007, Biotechnol Bioeng 96:337-349).

Các quy trình sản xuất trên cơ sở lên men chảy tràn cho phép nuôi cấy tế bào mật độ cao và nồng độ kháng thể tiềm năng cao trong thu hoạch sản phẩm lên men. Tuy nhiên, việc nuôi cấy tế bào mật độ cao đòi hỏi các dòng tế bào vô tính sản xuất phải có độ ổn định cao để thực sự tối ưu hóa quá trình sản xuất kháng thể. Môi trường không chứa protein đã được phát triển để sản xuất dược phẩm sinh học, ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào PFHMII (tham khảo từ Hyclone).

Các dòng tế bào vô tính NS0 tạo ra kháng thể tái kết hợp đã được điều chỉnh thành công để sinh trưởng trong môi trường không chứa protein (WO 2004/038010 A1). Tuy nhiên, việc thích nghi với môi trường không chứa huyết thanh và quá trình

lên men lâu dài tiếp theo trong môi trường không chứa huyết thanh thường đi kèm với việc mất hiệu suất tế bào (Barnes và cộng sự, 2003, *Biotechnol Bioeng* 81: 631-639, Barnes và cộng sự 2004, *Biotechnol Bioeng* 85: 115-121). Các dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao thích nghi để sinh trưởng trong môi trường không chứa protein có thể được thu hồi từ các dòng tế bào u tủy tái tổ hợp không ổn định để sử dụng trong công nghiệp (CN104152415A).

Nhưng trên thực tế, đối với một số dòng tế bào u tủy tái tổ hợp, quá trình thích nghi từ môi trường không chứa huyết thanh đến môi trường không chứa protein là không thể hoặc mất thời gian dài và đi kèm với việc mất khả năng sản xuất kháng thể do sự xuất hiện của quần thể tế bào không sản xuất. Việc sáng tạo ra quy trình chọn lọc các dòng tế bào vô tính có tiềm năng trong công nghiệp bảo đảm khắc phục được các nhược điểm nêu trên.

Dược phẩm sinh học, đặc biệt là các kháng thể trị liệu, là các phân tử glycoprotein phức. Sự thay đổi bất kỳ trong quy trình sản xuất có thể tạo ra các thay đổi trong thuộc tính của sản phẩm. Khái niệm về phép so sánh đã được đưa ra để đánh giá các thay đổi như vậy trong thuộc tính của sản phẩm (Demonstration of comparability of human biological products, including therapeutic biotechnology-derived products, Trung tâm Đánh giá và Nghiên cứu Sinh học (Center for Biologics Evaluation and Research - CBER), Trung tâm Đánh giá và Nghiên cứu thuốc (Center for Drug Evaluation and Research - CDER) tháng 4/1996.

www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122879.htm; EU Guideline on Comparability of Medicinal Products containing Biotechnology-derived Proteins as Active Substances: Quality issues (CPMP December 2003). www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/320700en.pdf; ICH Q5E: Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process. EU: được thông qua bởi CMPM, 1/12/2004, CPMP/ICH/5721/03, ngày đi vào vận hành: tháng 06 năm 2005; MHLW: được thông qua 26/4/2005, Thông báo PFSB/ELD số 0426001; FDA: được công bố trong Đăng bạ liên bang, tập 70, số 125, 30/6/2005; 37861-2 [www.ich.org/fileadmin/Public Web Site/ICH Products /Guidelines/Quality/Q5E/Step4 /Q5E Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public/Web/Site/ICH/Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4/Q5E_Guideline.pdf)). Thay đổi dòng tế bào được xem là một trong các cải biến quan trọng trong quy trình sản xuất. Do đó, mặc dù việc chọn lọc các dòng tế bào có tiềm năng trong công nghiệp là hoàn toàn cần thiết cho sự phát triển của quy trình sản xuất nhưng một điều rõ ràng là không phải dòng tế bào bất kỳ trong số các dòng tế bào được chọn có đặc tính ổn định theo yêu cầu và tốc độ sản xuất cao sẽ là phù hợp vì các thay đổi trong globulin miễn dịch đã tiết ra có thể ảnh hưởng đến tính chất sinh học. Định nghĩa về thuộc tính nhận diện của mỗi kháng thể cụ thể là điều kiện tiên quyết cho các nghiên cứu về phép so sánh

tiếp theo bất kỳ liên quan đến sự cải biến của quy trình sản xuất, ví dụ, quy mô sản xuất hoặc địa điểm sản xuất.

14F7 là kháng thể đơn dòng (mAb) đặc hiệu cho kháng nguyên liên quan đến khối u N-glycolyl-GM3 gangliosit [GM3(Neu5Gc)] (Patent số ZL 99800261,5; Carr et al., 2000, Hybridoma 19, 241-247). Kháng nguyên này đã từng được phát hiện trong ung thư vú (Marquina et al., 1996, Cancer Res 56, 5165-5171; Oliva et al., 2006, Breast Cancer Res Treat 96, 115-121), khối u ác tính (Osorio et al., 2008, Cancer Biol Ther 7, 488-495), ung thư phổi tế bào không nhỏ (van Crujsen et al., 2009, BMC Cancer 9, 180; Hayashi et al., 2013, Cancer Sci 104, 43-47), khối u Wilms (Scursoni et al., 2010, Pediatr Dev Pathol 13, 18-23), khối u thần kinh ngoại bì (Scursoni et al., 2011, Clin Dev Immunol 245181), xa-côm và ung thư biểu mô tuyến giáp (Blanco et al., 2013, Journal of Biomarkers, 602417) và khối u ác tính ở hệ tiêu hóa (Blanco et al., 2011, ISRN Gastroenterol 645641) và hệ sinh dục niệu (Blanco et al., 2011, ISRN Pathology, 953803). 14F7 mAb có thể tiêu diệt các tế bào khối u biểu hiện gangliosit theo cách độc lập bổ thể (Carr et al., 2002, Hybrid Hybridomics 21, 463-468; Roque-Navarro et al., 2008, Mol Cancer Ther 7, 2033-2041). Phiên bản đã được làm giống như kháng thể của người của kháng thể này, thu được bằng cách cải biến các epitop của tế bào T tiềm năng của người (Đơn yêu cầu cấp patent số 200480017457,8; Mateo et al., 2000, Hybridoma 19, 463-471) và đặt tên là 14F7h, giữ lại được các đặc tính của kháng thể của chuột và thể khảm (Fernandez-Marrero et al., 2011, Immunobiology 216, 1239-1247). 14F7hmAb đã được làm giống như kháng thể của người có tiềm năng trong việc điều trị các khối u biểu hiện GM3(NeuGc).

Tuy nhiên, các dòng tế bào u tủy tái tổ hợp NS0 biểu hiện kháng thể 14F7h đã mất khả năng sống sót trong môi trường nuôi cấy tế bào mật độ cao vì các tế bào này biểu hiện kháng nguyên GM3 (Neu5Gc) và đã bị tiêu diệt bởi kháng thể gây độc tế bào đã được tiết ra. Do đó, các kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người tái tổ hợp 14F7h đã được biểu hiện ở dòng tế bào u tủy NS0 của chuột thiếu hụt chất liên hợp glucit đã được glycol hóa ở vị trí N, do sự bất hoạt phiên mã gen (knock-down) của enzym hydroxylaza của axit CMP-N-axetylneuraminic (Fernandez-Marrero và cộng sự, 2011, Immunobiology 216, 1239-1247). Dòng tế bào như vậy đã cho thấy rất khó thích nghi để sinh trưởng trong môi trường không chứa huyết thanh.

Trong sáng chế này, các tác giả sáng chế đã thiết lập phương pháp tiếp cận mới để phát triển các dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao để sử dụng được trong quy trình lên men chảy tràn. Theo phương pháp này, các dòng tế bào vô tính thu hồi được từ dòng tế bào u tủy NS0 tái tổ hợp tạo ra kháng thể đơn dòng

kháng GM3 (NeuGc). Thuộc tính nhận diện kháng thể trị liệu mà xác định kiểu hình phân tử cho được phẩm sinh học này cũng được đề cập trong sáng chế này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình này bao gồm các dòng tế bào u tủy tái tổ hợp mà trong đó quá trình thích nghi từ môi trường không chứa huyết thanh đến môi trường không chứa protein là không thể hoặc mất thời gian dài và đi kèm với việc mất khả năng sản xuất kháng thể do sự xuất hiện của quần thể tế bào không sản xuất. Bước sáng tạo quan trọng theo sáng chế là quá trình thích nghi để sinh trưởng trong môi trường không chứa protein ở mật độ tế bào cao ($8-10 \times 10^6$ tế bào/ml) làm tăng tần suất của các dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao.

Phương pháp theo sáng chế bao gồm quy trình 3 giai đoạn:

1. Làm thích nghi với môi trường không chứa protein bằng cách làm giảm từng bước thành phần bổ sung giàu lipid với môi trường đã được xác định về mặt hóa học trong môi trường nuôi cấy tế bào ổn định có mật độ thấp
2. Làm thích nghi với môi trường không chứa protein trong môi trường nuôi cấy có mật độ cao bằng cách sử dụng hệ thống lên men chảy tràn ở quy mô phòng thí nghiệm
3. Chọn lọc dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao từ các tế bào ở thời điểm cuối quá trình lên men

Giai đoạn thứ nhất được thực hiện bằng cách già đông dòng tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào không chứa protein (PFHMII) được bổ sung 3-4 g/L chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) (được làm giàu cholesterol, lipid và các chất dinh dưỡng khác). Nồng độ tế bào tối đa (Xv) dao động trong khoảng $0,9 - 1,2 \times 10^6$ tế bào/ml. Việc lây chuyển theo chuỗi được thực hiện cho đến khi Xv đạt đến trị số không đổi. Nồng độ tế bào ban đầu sau mỗi lần lây chuyển được điều chỉnh đến $0,4 - 0,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Sau bảy lần lây chuyển chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) chất bổ sung được giảm đến 1-2 g/L, và sau bốn lần lây chuyển chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) khác nữa chất bổ sung được loại bỏ hoàn toàn. Sau đó, các tế bào này được để sinh trưởng trong môi trường không chứa protein mà không có chất bổ sung bất kỳ trong hơn 60 ngày. Xv đạt được trị số nằm trong khoảng từ $1,5 - 1,8 \times 10^6$ tế bào/ml với khoảng 95% tế bào sống sót.

Đối với giai đoạn thứ hai, các tế bào sinh trưởng trong hơn 60 ngày trong môi trường nuôi cấy tế bào PFHMII được gieo mầm trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5 lít. Bằng cách sử dụng dụng cụ chảy tràn bên ngoài nồng độ tế bào đã sinh trưởng trong khoảng từ $0,5 \times 10^6$ đến 10×10^6 tế bào/ml. Quy trình lên men kéo dài trong 24 ngày. Từ ngày thứ 0 đến 16 tế bào sống sót được duy trì trên 90%

nhưng sau ngày thứ 16 tế bào sống sót giảm xuống dưới 80%. Nồng độ kháng thể trung bình trong quá trình thu hoạch tế bào là 30 – 40 mg/ml. Các tế bào ở cuối giai đoạn lên men (lớn hơn 500 giờ sinh trưởng trong môi trường không chứa protein) được làm đông lạnh và cất giữ trong nitơ lỏng (Ngân hàng tế bào sản xuất cuối - end production cell bank, EPCB).

Theo phương án thực hiện khác của sáng chế, dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao từ các tế bào ở thời điểm cuối quá trình lên men được chọn lọc. Các tế bào đã được giải đông từ EPCB được đưa vào tách dòng vô tính tế bào bằng phương pháp pha loãng giới hạn (Freshney R., 2010, Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications (6th ed.). Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell. pp. 208–211). Kháng thể đã tiết trong dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào được đo bằng phương pháp ELISA bằng cách sử dụng kháng thể kháng idiotyp MAb kháng 14F7h 4G9 làm kháng nguyên bắt giữ. Dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào được pha loãng với tỷ lệ 1/500. Các dòng vô tính thu được trị số hấp thụ trên trị số trung bình được chọn lọc để xác định đặc điểm tiếp nhờ đếm tế bào theo dòng chảy (Thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy - FACS). Việc nhuộm globulin miễn dịch nội bào được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể IgG kháng người được liên hợp với FITC và được đo bằng FACS (Pluschke et al., 2011, BMC Proceedings 5, Suppl 8:P97). Mật độ huỳnh quang trung bình (Mean Fluorescence Intensity - MFI) và phần trăm của tế bào dương tính được xác định cho mỗi dòng vô tính đã được phân lập. Bất ngờ là, lớn hơn 80% dòng vô tính đã được đánh giá có phân nhóm nhỏ sản xuất kháng thể chiếm ưu thế.

Các dòng vô tính có hơn 95% phân nhóm nhỏ sản xuất kháng thể và MFI cao hơn được chọn lọc để nghiên cứu động học trong bình xoay và thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L để đánh giá nồng độ tế bào (X_v), tế bào sống sót (%), tốc độ sinh trưởng riêng (μ) và nồng độ IgG trong dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào. Đã phát hiện được nồng độ tế bào nằm trong khoảng $4 - 5 \times 10^6$ tế bào/ml. Tế bào sống sót trong pha sinh trưởng theo luật số mũ là khoảng 85%. Tốc độ sinh trưởng riêng dao động trong khoảng từ $0,015 - 0,025 \text{ h}^{-1}$. Đã phát hiện được nồng độ IgG nằm trong khoảng từ 70 – 120 mg/L.

Theo phương án thực hiện khác của sáng chế, độ ổn định lâu dài của dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao được đánh giá bằng cách thực hiện nghiên cứu động học sau 30, 60 và 90 ngày trong môi trường nuôi cấy tế bào liên tục. Tốc độ sinh trưởng riêng (μ) và tốc độ sản xuất riêng (qp) được xác định.

Theo phương án thực hiện khác nữa của sáng chế, thuộc tính nhận diện của globulin miễn dịch đã được tiết ra bởi dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao đã được chọn lọc được xác định. Phần mô tả về các thuộc tính nhận diện này xác định có điều khiển kiểu hình phân tử của kháng thể trị liệu 14F7h này:

Thuộc tính nhận diện	Tính chất phân tử	Phương pháp phân tích
Cấu trúc bậc một	Khối lượng phân tử Lập bản đồ peptit	MS RP-HPLC
Cấu trúc có mức trật tự cao	Cấu trúc bậc hai Cấu trúc bậc ba	Far UV CD Huỳnh quang nội tại
Glycosyl hóa	Tạo profin	NP-HPLC
Tính không đồng nhất	Thay đổi Kết tụ	WCX SEC-HPLC
Chức năng	Nhận diện kháng nguyên	Đếm tế bào theo dòng chảy

Theo phương án thực hiện khác nữa của sáng chế, hoạt tính kháng khối u *in vitro* và *in vivo* của kháng thể tái tổ hợp 14F7h được đánh giá

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Sự làm thích nghi tế bào với môi trường PFHM-II ở các nồng độ chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) 5 khác nhau.

Fig. 2: Quy trình lên men vận hành trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L bằng cách sử dụng các tế bào đã được làm làm thích nghi với môi trường PFHM-II mà không có chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) 5.

Fig. 3: Trị số hấp thụ từ ELISA nhận diện. Đường màu đen là trị số trung bình của kết quả. 1 µg/mL T1h và hR3 đã được tinh chế được sử dụng làm các mẫu kiểm chứng âm tính. Các dòng vô tính đã được chọn lọc 35D8, 35D6, 31E7, 31C7, 23E9, 23C2, 73F4, 73E5, 72G5, 72F6, 72D3 (màu xám), các dòng vô tính đã được loại bỏ 35F7, 33E8, 23E4, 22D8, 21E6, 21C5, 73C4, 72D9, 71F2, 62E7, 61E3 (màu đen).

Fig. 4: Các tế bào đã được chọn lọc được phân tích bằng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy và phần trăm của phân nhóm tế bào sản xuất cao được xác định. Dòng tế bào u tủy NS0 được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính và dòng tế bào u tủy NS0 tái tổ hợp biểu hiện kháng thể hR3 được sử dụng làm mẫu kiểm chứng dương tính. Các dòng vô tính đã được chọn lọc 31E7, 23E9, 33E8, 35D6, 23C2, 72F6, 73F4, 72G5 (màu xám), các dòng vô tính đã được loại bỏ 72D3, 73E5 (màu đen).

Fig. 5: Trị số MFI của phân nhóm tế bào sản xuất cao được xác định. Dòng tế bào u tủy biểu hiện các kháng thể hR3 và T1h được sử dụng làm mẫu kiểm chứng dương tính (màu xám nhạt). Các dòng vô tính đã được chọn lọc 31E7, 35D6, 72G5 (màu xám); các dòng vô tính đã được loại bỏ 23E9, 33E8, 72D3, 73E5, 23C2, 72F6, 73F4 (màu đen).

Fig. 6: Đường cong sinh trưởng của dòng vô tính đã được đánh giá, tế bào sống sót và tích phân của các tế bào sống sót từ nghiên cứu động học trong các chai lăn và thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L được vẽ đồ thị (trục y) theo thời gian (trục x).

Fig. 7: Phép phân tích so sánh về tốc độ sinh trưởng riêng tối đa và nồng độ IgG tối đa giữa các dòng vô tính đã được chọn lọc sinh trưởng trong các chai lăn và thiết bị lên men dung tích 5L.

Fig. 8: Nhận diện NeuGcGM3 gangliosit bởi kháng thể 14F7h được tạo ra bởi các dòng vô tính đã được chọn lọc khác nhau. Phần dịch nổi được lấy từ thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L. Kháng thể kháng EGFR được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính, kháng thể 14F7h được tạo ra bởi tế bào bố mẹ được sử dụng làm mẫu kiểm chứng dương tính.

Fig. 9: Nồng độ IgG nội bào được đo bằng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy ở các bước khác nhau của quy trình đã chọn.

Fig. 10: Nghiên cứu động học so sánh giữa các tế bào bố mẹ và dòng vô tính 31E7 được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L. Xv: nồng độ tế bào sống sót; SXv: tích phân của các tế bào sống sót; IgG: nồng độ kháng thể tối đa.

Fig. 11: Nghiên cứu động học để đánh giá độ ổn định của dòng vô tính 31E7 được thực hiện ở 30, 60 và 90 ngày sau khi giã đông tế bào. Nồng độ tế bào (Xv), tế bào sống sót (%), tích phân của các tế bào sống sót (SXv), nồng độ IgG, tốc độ sinh trưởng tối đa (μ) và tốc độ sản xuất riêng (QP) được đo.

Fig. 12: Thành phần IgG nội bào được đo bằng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy ở các mẫu từ nghiên cứu về độ ổn định của dòng vô tính 31E7.

Fig. 13: Phổ khối đã được tách vạch phổ của chuỗi nhẹ 14F7h ở các trạng thái nguyên thể (bảng phía trên) và khử glycosyl hóa (bảng phía dưới; bằng cách sử dụng PNGase F) của nó cho các mẫu được khử/alkyl hóa. Các điều kiện LC-MS thông thường được sử dụng với cột C8 để tách/khử muối mẫu và hệ dung dịch đệm axetonitril/axit formic để vận hành. Các hình vẽ được cài xen tương ứng với mức phóng đại của vùng đỉnh chính.

Fig. 14: Phổ khối đã được tách vạch phổ của chuỗi nặng ở các trạng thái nguyên thể (bảng phía trên) và khử glycosyl hóa (bảng phía dưới; bằng cách sử dụng PNGase F) của nó cho các mẫu được khử/alkyl hóa. Các điều kiện LC-MS thông thường

được sử dụng với vật C8 để tách/khử muối mẫu và hệ dung dịch đệm axetonitril/axit formic để vận hành. Các hình vẽ được cài xen tương ứng với mức phóng đại của vùng đỉnh chính.

Fig. 15: Phổ khối đã được tách vạch phổ của toàn bộ phân tử 14F7h ở các trạng thái nguyên thể (bảng phía trên) và khử glycosyl hóa (bảng phía dưới; bằng cách sử dụng PNGase F) của nó cho các mẫu được khử/alkyl hóa. Các điều kiện LC-MS thông thường được sử dụng với vật C8 để tách/khử muối mẫu và hệ dung dịch đệm axetonitril/axit formic để vận hành. Các hình vẽ được cài xen tương ứng với mức phóng đại của vùng đỉnh chính.

Fig. 16: Profin lập bản đồ peptit của 14F7h thu được sau khi phân cắt bằng trypsin và tách HPLC pha đảo bằng cách sử dụng cột C4 và hệ dung dịch đệm axetonitril/TFA thông thường.

Fig. 17: Phân tích quang phổ lưỡng sắc tròn của 14F7 ở vùng Far UV (205-260nm) thu được ở 25°C bằng cách sử dụng cuvet có độ dài đường dẫn 2mm. Phổ thu được với nồng độ mẫu là 0,6mg/mL.

Fig. 18: Phát xạ huỳnh quang của tryptophan, bằng cách sử dụng thiết bị Varioskan Flash, giá trị đọc nằm trong khoảng từ 310 đến 390nm và thu được sau khi kích thích phân tử 14F7h ở 280nm. Dạng đĩa có 96 giếng được sử dụng, với 200uL cho mỗi giếng và nồng độ mẫu là 0,2mg/mL.

Fig. 19: Glycosyl hóa tạo profin của glycan được dán nhãn 2-AB được phân lập từ 14F7h và được tách bằng cách sử dụng HPLC pha thường kết hợp với phát hiện huỳnh quang (Ex: 330nm / Em:420nm). Các đường kẻ nét đứt thể hiện độ phóng đại của các đỉnh nhỏ.

Fig. 20: Các thông số glycosyl hóa từ các mẫu 14F7h khác nhau (N=3) được sử dụng để nghiên cứu các khoảng biến thiên để tạo profin glycosyl hóa.

Fig. 21: Profin trao đổi cation yếu của 14F7h bằng cách sử dụng cột Propac-WCX10, thu được ở 280nm. 30ug mẫu được bơm.

Fig. 22: Profin SEC-HPLC của 14F7 bằng cách sử dụng cột TSK-G3000sxl, thu được ở 280nm.

Fig. 23: Đường cong liều lượng-đáp ứng theo thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy (% dương tính và loga của nồng độ 14F7h (ug/mL)) bằng cách sử dụng các tế bào đích L1210 cho các mẫu khác nhau của kháng thể được thử nghiệm vào các ngày khác nhau.

Fig. 24: Hiệu quả gây độc tế bào được gây ra bởi 14F7h mAb trong các tế bào u tủy của chuột X63. (A) Các đặc tính gắn kết của 14F7h mAb. Các tế bào X63 đã được nhuộm bằng 10 µg/mL kháng thể tiếp theo là kháng thể IgG kháng người của thỏ được liên hợp FITC. Herceptin mAb (Her-2 kháng người) được sử dụng làm mẫu

kiểm chứng âm tính. (B) Các tế bào X63 được xử lý bằng 100 $\mu\text{g/mL}$ 14F7h mAb. Tế bào sống sót sau 6 h cấy ở 37°C được đánh giá bằng mức hấp thụ propiđi iodua (PI) và phân tích đếm tế bào theo dòng chảy. Độ gây độc tế bào được biểu thị dưới dạng phần trăm của tế bào được nhuộm PI. Herceptin mAb được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính.

Fig. 25: Fig. 25: Hiệu quả kháng khối u *in vivo* của 14F7h mAb trên mô hình u tủy của chuột. (A) Phác đồ dùng mAb. Các tế bào u tủy của chuột X63 ($0,2 \times 10^6$) được cấy dưới da ở ngày 0 vào chuột BALB/c và các kháng thể được dùng trong tĩnh mạch (300 μg) ở ngày 2 đến 5. (B) Đường cong Kaplan-Meier của chuột sống sót không có khối u lên đến ngày 106. T1h mAb đã được làm giống như kháng thể của người (CD6 kháng người) được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng thử nghiệm log-rank.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được dự định minh họa sáng chế chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Các phần mô tả chi tiết về các phương pháp trong tình trạng kỹ thuật không được cung cấp.

Ví dụ 1: Làm thích nghi với môi trường không chứa protein bằng cách làm giảm từng bước thành phần bổ sung giàu lipid với môi trường đã được xác định về mặt hóa học trong môi trường nuôi cấy tế bào ổn định có mật độ thấp.

Dòng tế bào 14F7htb58 đã được làm thích nghi để sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy tế bào PFHMII mà không có chất bổ sung chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) 5. Quy trình làm giảm chất bổ sung chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) 5 được thực hiện trong bình hình chữ T 75cm², trong thiết bị lắc khuấy (80 vòng/phút) ở 36,5°C và 5% CO₂. Mỗi 48-72 giờ nồng độ của các tế bào sống sót và phần trăm của tế bào sống sót được xác định. Nồng độ tế bào được điều chỉnh đến 0,4-0,5 x 10⁶ tế bào/ml trong mỗi lần lây chuyển môi trường nuôi cấy.

Các tế bào 14F7htb58 đông lạnh được giải đông trong PFHMII có bổ sung 3,5g/L chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) 5. Sau khi giải đông tế bào sống sót là 75%, và sau đó nó được tăng lên đến hơn 90% (Fig. 1). Trong quá trình làm thích nghi, việc lây chuyển môi trường nuôi cấy theo chuỗi được thực hiện để duy trì nồng độ tối đa của các tế bào sống sót trong khoảng từ 0,9-1,8 x 10⁶ tế bào/ml, với tỷ lệ phần trăm của tế bào sống sót cao hơn 90%. Sau 11 lần lây chuyển môi trường nuôi cấy nồng độ của chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) 5 được giảm đến 0, với 95% tế bào sống sót và 1,2-1,8 x 10⁶ tế bào/ml. Quá trình làm thích nghi với môi

trường nuôi cấy tế bào PFHMII mà không có lipid và cholesterol mất khoảng 60 ngày.

Ví dụ 2: Làm thích nghi với môi trường không chứa protein trong môi trường nuôi cấy có mật độ cao bằng cách sử dụng hệ thống lên men chảy tràn ở quy mô phòng thí nghiệm.

Các tế bào 14F7htb58 đã được làm thích nghi để sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy tế bào không chứa protetrong PFHMII được cấy trong thiết bị lên men dung tích 5L ở nồng độ là $0,4-0,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Các thông số vận hành của thiết bị lên men là: pH 6,9-7,0; 105 RPM; 40% oxy hòa tan; 36,5-37,0 °C; thể tích làm việc 3,5L. Tế bào sống sót và nồng độ tế bào được theo dõi hằng ngày bằng phương pháp loại trừ Trypan Blue (Sigma) bằng cách sử dụng buồng Neubauer. Việc vận hành thiết bị lên men theo kiểu chảy tràn được thực hiện sau khi nồng độ tế bào đạt đến trị số là $2,5 \times 10^6$ tế bào/ml. Hộp làm bằng sợi rỗng được dùng cho kiểu chảy tràn và tỷ lệ pha loãng 0,3-0,7 VVD được sử dụng.

Trong quá trình lên men tế bào sống sót được giữ trên 90% lên đến 384 giờ, và sau đó nó được giảm đến 80%. Nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 30-40 mg/L. Nồng độ tế bào tối đa đạt đến 9×10^6 tế bào/ml khi tỷ lệ pha loãng 0,7 VVD được sử dụng (Fig. 2). Các tế bào được lấy ra ở thời điểm cuối quy trình lên men và được gieo mầm trong các chai lặn ở nồng độ là $0,8 \times 10^6$ tế bào/ml, sau 72 giờ trong môi trường nuôi cấy, các tế bào được làm đông lạnh ở 12×10^6 tế bào/lọ (End Production Cell Bank, EPC). Sau khi giải đông tế bào sống sót là 90% và sau 96 giờ trong môi trường nuôi cấy tế bào sống sót là 97%.

Ví dụ 3: Chọn lọc dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao từ các tế bào ở thời điểm cuối quá trình lên men.

Các tế bào đã được giải đông từ EPC được tách dòng vô tính thành tế bào đơn cho mỗi giếng trong đĩa 96 giếng bằng cách sử dụng phương pháp pha loãng giới hạn và Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM-F12 1:1 có bổ sung 5 – 10% huyết thanh bào thai bò. Các đĩa môi trường nuôi cấy được cấy ở 36,5°C trong môi trường khí quyển 5% CO₂. Hiệu suất tách dòng vô tính là thấp hơn 2%. Hai mươi ngày sau khi tách dòng vô tính tế bào phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy được lấy ra để đánh giá nồng độ IgG bằng ELISA dạng bánh kẹp sandwich (sandwich-type ELISA). Kháng thể kháng idiotyp 4G9 (3 ug/ml) được sử dụng làm kháng nguyên bắt giữ và kháng thể dê chuỗi nặng kháng người được bắt cặp với kiềm phosphatase làm đầu dò. Tất cả các mẫu được pha loãng 1/500, và trị số trung bình của khả năng hấp thụ dịch nổi bề mặt được xác định. Các dòng vô tính có trị số hấp thụ cao hơn

trị số trung bình được chọn lọc (23C2, 23E9, 31C7, 31E7, 35D6, 35D8, 72D3, 72F6, 72G5, 73E5, 73F4) (Fig. 3). Các dòng vô tính đã được chọn lọc được mở rộng lên các đĩa 24 giếng trong môi trường nuôi cấy tế bào DMEM-F12 1:1 có bổ sung 5 – 10% huyết thanh bào thai bò. Việc mở rộng tiếp tế bào trong các bình nuôi cấy hình chữ T được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào PFHMII, trong thiết bị lắc khuấy (80 vòng/phút) ở 36,5°C và 5% CO₂.

Hàm lượng IgG nội bào được xác định bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy (FACS) trong các dòng vô tính đã được chọn. Kháng thể IgG kháng người được bắt cặp với FITC (florescein iso-thioxyanat) (Sigma) được pha loãng 1:200 được sử dụng làm đầu dò. Để xác định tỷ lệ phần trăm dân số nhân 4x10⁵ tế bào/mẫu được phân tích. Các dòng vô tính có hơn 95% phân nhóm tế bào sản xuất cao được chọn lọc (Fig. 4). Một tiêu chí chọn lọc khác là cường độ huỳnh quang trung bình đã được bình thường hóa (FMI) và dòng vô tính 35D6, 72G5 và 31E7 được chọn lọc (Fig. 5).

Các dòng vô tính như vậy được mở rộng trong các chai lắc và nghiên cứu động học cũng được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L (36,5-37°C, 100-105 RPM, pH < 7 và oxy hòa tan cao hơn 40%). Dòng vô tính 31E7 có nồng độ tế bào cao nhất các chai lắc và thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L, với trị số lần lượt là 5x10⁶ tế bào/ml và 4x10⁶ tế bào/ml. Tích phân của các tế bào sống sót thu được các kết quả tương tự, các trị số là 4,5 x 10⁸ tế bào/ml*h trong các chai lắc và 2,5 x 10⁸ tế bào/ml*h trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L, các trị số này cao hơn 1,3-1,4 lần trị số thu được đối với các tế bào bố mẹ (Fig. 6). Tế bào sống sót cao hơn 85% trong pha sinh trưởng theo hàm mũ cho tất cả các dòng vô tính đã được đánh giá (Fig. 6). Dòng vô tính 31E7 có tốc độ sinh trưởng riêng cao nhất (> 0,025 h⁻¹) trong cả các chai lắc lẫn thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L. Đã phát hiện được nồng độ kháng thể nằm trong khoảng 50 – 70 mg/L cho tất cả các dòng vô tính trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L tuy nhiên dòng vô tính 31E7 có nồng độ kháng thể cao nhất trong các chai lắc (Các Fig. 7A và 7B).

Các mẫu được lấy từ nghiên cứu động học được thực hiện trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5L để đánh giá hoạt tính sinh học của kháng thể đã tiết. ELISA dạng bánh kẹp sandwich (sandwich-type ELISA) được thực hiện. Các đĩa Polysorp được phủ bằng dung dịch NeuGcGM3 gangliosit trong metanol (10 µg/ml). Đối với kháng thể thứ cấp, sử dụng kháng thể dê chuỗi nặng kháng người được bắt cặp với kiềm phosphatase. Tất cả các mẫu được điều chỉnh đến nồng độ kháng thể 1 µg/ml và được pha loãng với tỷ lệ 1/10 trong thử nghiệm ELISA. Tất cả các mẫu đã được thử nghiệm có nhận diện kháng nguyên gangliosit, trong khi các dòng vô tính 31E7

và 35D6 có các trị số nằm trong khoảng từ 70 – 80% đối với mẫu kiểm chứng dương tính (Fig. 8).

Hàm lượng IgG nội bào phát triển theo quá trình làm thích nghi kiểu hình và tách dòng vô tính. Các tế bào bố mẹ 14F7htB58 sinh trưởng trong PFHMII cộng với chất kích hoạt tế bào (Cell Boost) 5 có kiểu phân bố hai mắt do sự tồn tại của phân nhóm tế bào không sản xuất. Sau khi làm thích nghi để sinh trưởng ở các mật độ cao trong môi trường PFHMII các tế bào 14F7htb58 được làm giàu trong phân nhóm tế bào sản xuất (kiểu phân bố một mắt), tuy nhiên đối với dòng vô tính 31E7 một đỉnh duy nhất hẹp hơn thu được cho thấy phân nhóm tế bào đồng nhất hơn (Fig. 9). Thực tế, dòng vô tính 31E7 có nồng độ tế bào tối đa cao hơn, tích phân của các tế bào sống sót và tốc độ sản xuất kháng thể cao hơn so với các tế bào bố mẹ (Fig. 10)

Ví dụ 4: Các nghiên cứu về độ ổn định lâu dài của các dòng tế bào vô tính sản xuất cao.

Độ ổn định của việc sản xuất kháng thể bởi dòng vô tính 31E7 được đánh giá trong 90 ngày trong môi trường nuôi cấy tế bào. Nghiên cứu động học trong các chai lần được thực hiện ở 30, 60 và 90 ngày sau khi già đông tế bào. Các mẫu được lấy ra để thực hiện nghiên cứu đếm tế bào theo dòng chảy. Đã phát hiện được không có sự sai khác giữa các tế bào có thời gian khác nhau trong môi trường nuôi cấy tế bào. Nồng độ tế bào tối đa thay đổi trong khoảng từ $3,5 - 4,5 \times 10^6$ tế bào/ml, tế bào sống sót lớn hơn 90% và nồng độ kháng thể dao động trong khoảng từ 50 – 80 mg/L (Fig. 10). Tốc độ sinh trưởng riêng (μ) duy trì cao hơn $0,025 \text{ h}^{-1}$ trong khi tốc độ sản xuất riêng (QP) lớn hơn $0,18 \text{ pg/tế bào} \cdot \text{h}$ (Fig. 11). Sau 90 ngày trong môi trường nuôi cấy tế bào dòng vô tính 31E7 có một đỉnh hẹp duy nhất ở cùng đại diện FMI của quần thể tế bào sản xuất cao đồng nhất (Fig. 12).

Ví dụ 5: Thuộc tính nhận diện của globulin miễn dịch đã được tiết ra bởi dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định cao 31E7.

Một vài thuộc tính nhận diện được xác định bao hàm cả các đặc tính phân tử cơ bản mà sau đó cho phép đánh giá chất lượng của phân tử và theo dõi tính nhất quán của sản phẩm cũng như độ ổn định của dòng tế bào. Cấu trúc bậc một được nghiên cứu bằng cách xác định khối lượng của toàn bộ phân tử, và các mạch riêng rẽ của nó, nhờ phân tích LC-ESI-MS về cấu trúc nguyên thể và disulfua khử/alkyl hóa mẫu (glycosyl hóa và khử glycosyl hóa). Xem Bảng 1 về tóm tắt kết quả và các Fig. 13, 14, 15. Ngoài ra, việc lập bản đồ peptit phân tử được sử dụng để theo dõi

cấu trúc trình tự thứ nhất của nó và loại trừ tiếp sự cắt trình tự cải biến sau phiên mã hoặc các thay đổi trình tự bất kỳ có khả năng xảy ra (Fig. 16).

Bảng 1. Khối lượng của phân tử hoàn chỉnh và các mạch của nó có và không có glycosyl hóa.

Dạng	Khối lượng (Da)			
	Số PNGaza F	PNGaza F		
		Quan sát được	Theo lý thuyết	% sai khác
Toàn bộ phân tử	149863,41	146983,31	147009,30 ^a	0,018
Chuỗi nặng	52217,63	50770,69 ^b	50784,12 ^c	0,026
Chuỗi nhẹ	23665,93	23664,91 ^b	23664,25 ^d	-0,0028

a: Tính đến thiếu hụt K trong vùng đầu tận C của cả hai chuỗi nặng

b: Giảm bằng dithiothreitol và alkyl hóa bằng Axit iodoaxetic

c: Tính đến thiếu hụt K trong vùng đầu tận C và cải biến bằng axit iodoaxetic

d: Tính đến cải biến bằng axit iodoaxetic

Các cấu trúc có trật tự cao hơn được thử nghiệm ở hai mức bằng cách sử dụng phổ Far UV CD để phân tích các cấu trúc bậc hai (thu được profin như được thể hiện trong Fig. 17) và các đặc tính huỳnh quang nội tại cho phép phát hiện các sự khác biệt về cấu hình và độ ổn định protein (Weichel *et al*, 2008, BioProcess International, June). Fig. 18 thể hiện kết quả thu được đối với thử nghiệm sau này. Trong trường hợp này, mức phát xạ tối đa hu được ở 333 nm và trị số của tỷ lệ hấp thụ_{330nm/350nm} là 1,23.

Glycosyl hóa, là cải biến sau phiên mã chính xảy ra ở phân tử kháng thể IgG1 của người, được nghiên cứu nhờ việc tạo profin HPLC pha thường. Fig. 19 thể hiện kết quả thu được đối với ba mẫu khác nhau, và các thông số glycosyl hóa của chúng được thể hiện trong Bảng 2 (Montesino *et al*, 2012, Biologicals 40:288-298). Trạng thái và sự phân tán của các thông số glycosyl hóa này được thể hiện trong Fig. 20.

Bảng 2: Các thông số glycosyl hóa từ các mẫu khác nhau (N=3) of 14F7h được sử dụng để nghiên cứu các khoảng biến thiên để tạo profin glycosyl hóa.

Mẫu	G0F%	G1F%	G2F%	G0F/G1F	Tỷ lệ G1F	Fuc%	Sial%
1	31,31	41,83	10,78	0,75	3,28	98,15	8,81
2	29,52	45,15	13,04	0,65	3,18	98,50	7,41
3	38,47	39,05	8,99	0,99	2,67	98,53	5,50
Trị số trung bình	33,1 ± 11,7	42,0 ± 7,5	10,9 ± 5,1	0,8 ± 0,3	3,0 ± 0,9	98,4 ± 0,6	7,2 ± 4,2

G0F%, G1F%, G2F%: % của agalactoza, monogalactoza và glycan đã được khử galactosyl hóa, fucosyl hóa, Fuc%: % của glycan đã được fucosyl hóa, Sial%: % của glycan đã được sialyl hóa.

Tính không đồng nhất của phân tử được xác định bằng hai phương pháp trực giao. Ở địa điểm thứ nhất, sự trao đổi cation yếu (Weak Cation Exchange - WCX) được sử dụng để phát hiện các dạng tích điện khác nhau, cho phép phát hiện sự cắt, sự khử amit hóa, một số biến thể glycosyl hóa của sản phẩm, v.v. Đối với kháng thể, các kết quả của phương pháp này chủ yếu theo dõi sự cắt lysin đầu tận C, các cải biến chung phát hiện được trong phân tử hIgG1 (Dionex Application Note 127, http://www.dionex-france.com/library/literature/application_notes_updates/AN127_LPN1047.pdf). Các profin thu được đối với các mẫu khác nhau được thể hiện trong Fig. 21 và Bảng 3 thể hiện kết quả về sự tích hợp hóa của chúng. Ngoài ra, phương pháp sắc ký loại trừ kích cỡ (Size Exclusion Chromatography - SEC) được sử dụng để theo dõi trạng thái kết tụ của phân tử. Fig. 22 thể hiện các profin thu được từ các mẫu khác nhau và Bảng 4 thể hiện các kết quả phân tích chúng.

Bảng 3. Kết quả về sự tích hợp hóa WCX-HPLC (Tỷ lệ phần trăm đỉnh chính) đối với các mẫu 14F7h khác nhau.

Mẫu	Pic chính %
1	96,2
2	95,0
3	95,7
4	96,5
5	96,6
Trị số trung bình	96,0 ± 1,8

Bảng 4: Kết quả về sự tích hợp hóa SEC-HPLC (Tỷ lệ phần trăm đỉnh chính) đối với các mẫu 14F7h khác nhau.

Mẫu	SE-HPLC
	Pic chính %
1	99,9
2	99,9
3	99,9
4	99,8
5	99,7
Trị số trung bình	99,8 ± 0,3

Cuối cùng, chức năng của phân tử chủ yếu được đánh giá bằng cách nghiên cứu khả năng nhận diện kháng nguyên của nó trên các tế bào đích đo được bằng

thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy. Fig. 23 thể hiện đường cong liều lượng-đáp ứng thu được bằng cách sử dụng các mẫu khác nhau, và Bảng 5 thể hiện EC₅₀ tính toán được từ các mẫu đó.

Bảng 5. Kết quả EC₅₀ đối với các thử nghiệm khác nhau về đường cong liều lượng-đáp ứng theo thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy (% dương tính và loga của nồng độ 14F7h (ug/mL)) bằng cách sử dụng các tế bào đích L1210 cho các mẫu kháng thể khác nhau được thử nghiệm vào các ngày khác nhau.

Thử nghiệm	Mẫu	EC ₅₀ (µg/mL)
1	1	0,1633
	2	0,2121
2	1	0,2524
3	2	0,2409
4	2	0,3554
Trị số trung bình		0,245 ± 0,180

Ví dụ 6: Đánh giá hiệu quả kháng khối u *in vitro* và *in vivo*.

Sự biểu hiện kháng nguyên bởi các tế bào u tủy của chuột X63 được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. 100% tế bào u tủy của chuột X63 được nhuộm bằng 14F7h mAb (Fig. 24A). Các tế bào X63 này được cấy 10 µg/mL kháng thể tiếp theo là kháng thể IgG kháng người của thỏ được liên hợp FITC. Herceptin mAb (Her-2 kháng người) được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính.

Hiệu quả gây độc tế bào *in vitro* được gây ra bởi 14F7h mAb ở các tế bào u tủy của chuột X63 được đánh giá. Các tế bào X63 được xử lý bằng 100 µg/mL 14F7h mAb. Tế bào sống sót sau 6 h cấy ở 37°C được đánh giá bằng mức hấp thụ propidi iodua (PI) và phân tích đếm tế bào theo dòng chảy. Độ gây độc tế bào được biểu thị dưới dạng phần trăm tế bào được nhuộm PI. Hơn 50% tế bào khối u bị chết sau khi xử lý (Fig. 24B). Herceptin mAb được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính.

Để đánh giá hiệu quả kháng khối u *in vivo* của 14F7h mAb trên mô hình u tủy của chuột X63, 0,2 x 10⁶ tế bào khối u X63 được cấy dưới da ở ngày 0 vào chuột BALB/c và các kháng thể được dùng trong tĩnh mạch (300 µg) ở ngày 2 đến 5 (Fig. 25A). Đường cong Kaplan-Meier của chuột sống sót không có khối u lên đến ngày 106 được thể hiện trong Fig. 25B. Thu được mức ý nghĩa thống kê tăng ở chuột sống sót không có khối u là 60% chuột được xử lý bằng 14F7h mAb vẫn còn sống sau thời gian theo dõi. T1h mAb (CD6 kháng người) đã được làm giống như kháng thể của người được sử dụng làm mẫu kiểm chứng âm tính. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng thử nghiệm log-rank.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp thu dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định từ dòng tế bào u tủy trong môi trường không chứa protein tạo ra kháng thể tái tổ hợp nhằm mục đích công nghiệp bao gồm ba giai đoạn:

I. đặt dòng tế bào u tủy trong môi trường có thành phần bổ sung giàu lipid, không chứa protein và thực hiện giảm từng bước thành phần bổ sung giàu lipid này cho đến khi thành phần bổ sung giàu lipid này được loại bỏ, trong đó việc giảm từng bước bao gồm thành phần bổ sung giàu lipid trước tiên là ở nồng độ khoảng + 3,5 g/L cho đến khi Xv đạt đến trị số không đổi, sau đó thành phần bổ sung giàu lipid là ở nồng độ khoảng + 1 g/L cho đến khi Xv đạt đến trị số không đổi, và sau đó cho dòng tế bào này sinh trưởng, trong đó mật độ tế bào nằm trong khoảng từ $1,5$ đến $1,8 \times 10^6$ tế bào/ml, nhờ đó tạo ra dòng tế bào u tủy thích nghi với môi trường không chứa protein,

II. đặt dòng tế bào u tủy thích nghi với môi trường không chứa protein này vào hệ thống lên men chảy tràn, trong đó mật độ tế bào nằm trong khoảng từ 5 đến 10×10^6 tế bào/ml, và

III. chọn lọc dòng tế bào vô tính sản xuất có độ ổn định từ các dòng tế bào ở thời điểm cuối quá trình lên men của giai đoạn II.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trong giai đoạn I dòng tế bào u tủy được sinh trưởng trong môi trường không chứa protein mà không cần thành phần bổ sung bất kỳ trong thời gian 60 ngày.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó giai đoạn II bao gồm các bước sau:

I. giữ dòng tế bào u tủy thích nghi với môi trường không chứa protein trong hệ thống lên men chảy tràn trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 5 L trong thời gian hơn 21 ngày, trong đó môi trường này được thích nghi với mật độ tế bào nằm trong khoảng từ 5 đến 10×10^6 tế bào/ml, và

II. đông lạnh dòng tế bào u tủy sau khi lên men và cất giữ trong nitơ lỏng.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó giai đoạn III bao gồm các bước sau:

I. đưa dòng tế bào u tủy của Giai đoạn II vào tách dòng vô tính tế bào bằng phương pháp pha loãng giới hạn,

II. phát hiện các dòng vô tính tiết kháng thể,

III. định lượng quần thể phụ của tế bào sản xuất kháng thể trong các dòng vô tính đã được chọn, và

IV. chọn lọc dòng vô tính bằng tốc độ sinh trưởng riêng và khả năng sản xuất riêng.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dòng tế bào u tủy là dòng tế bào NS0 chứa trình tự mã hóa kháng thể kháng NeuGcGM3 14F7h tái tổ hợp đã được làm giống như kháng thể của người.

Fig. 1

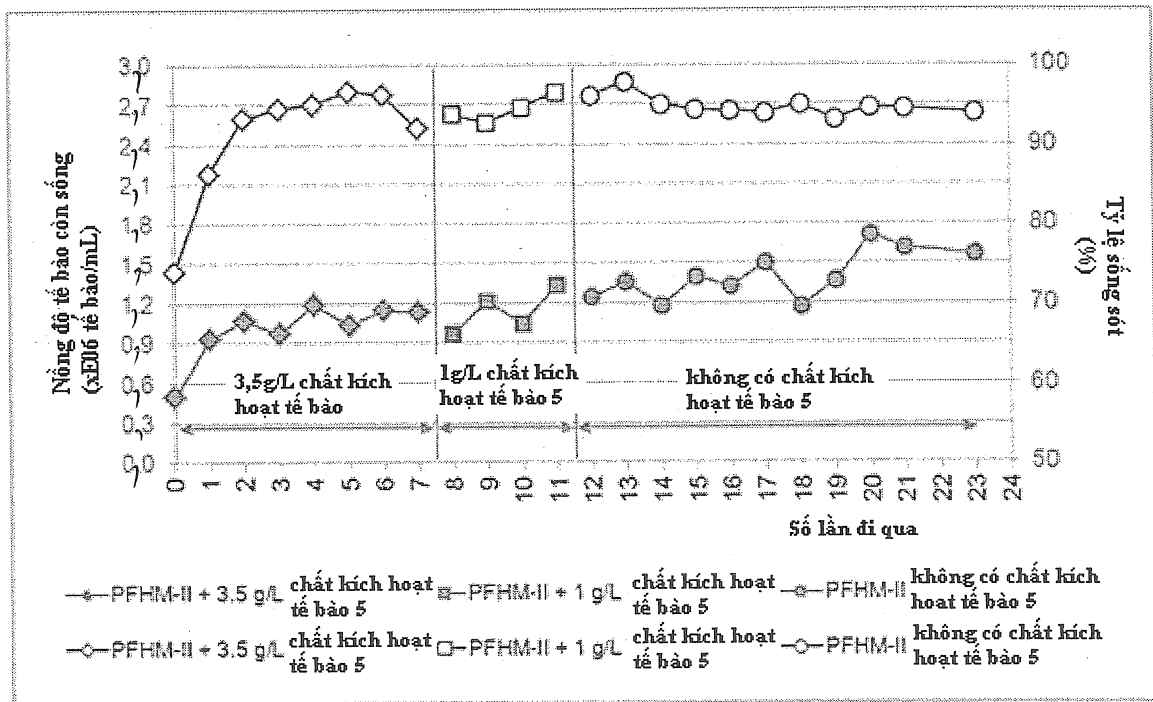


Fig. 2

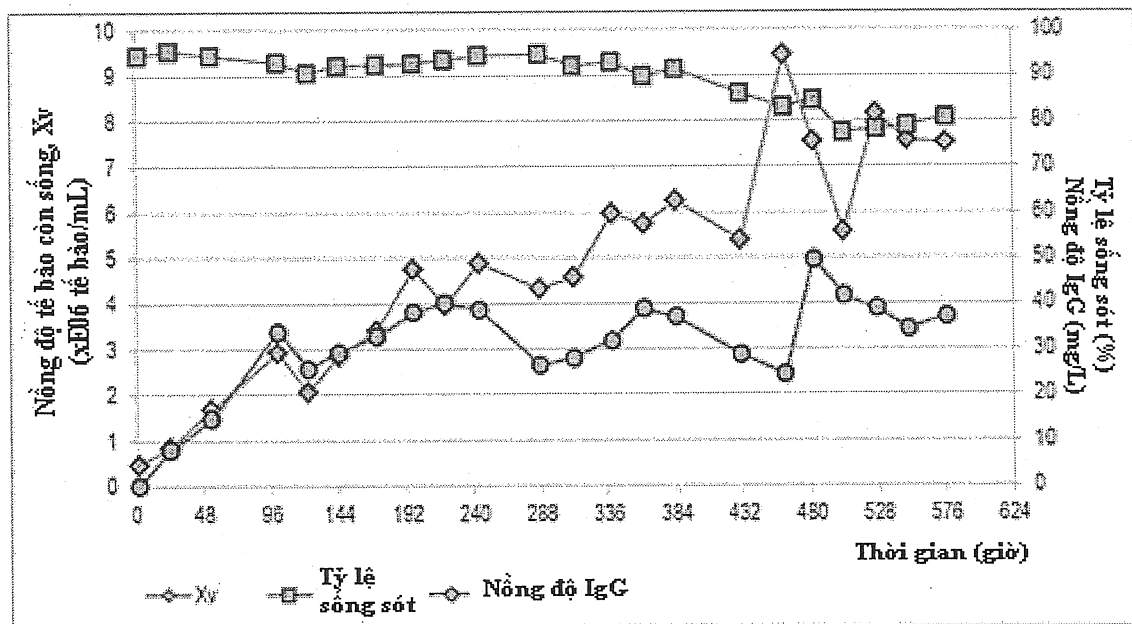


Fig. 3

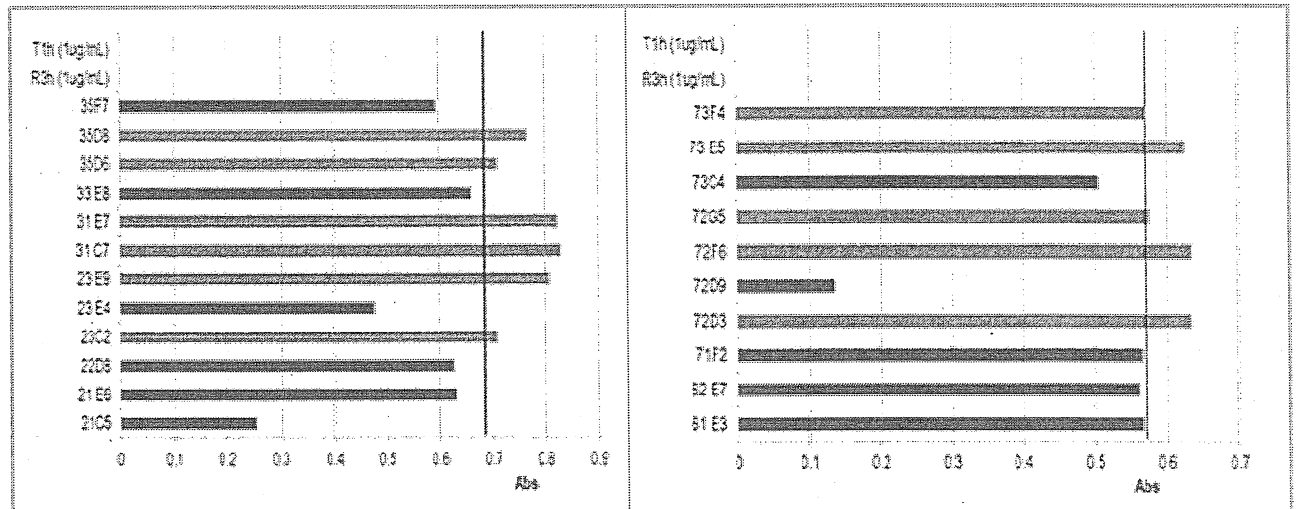


Fig. 4

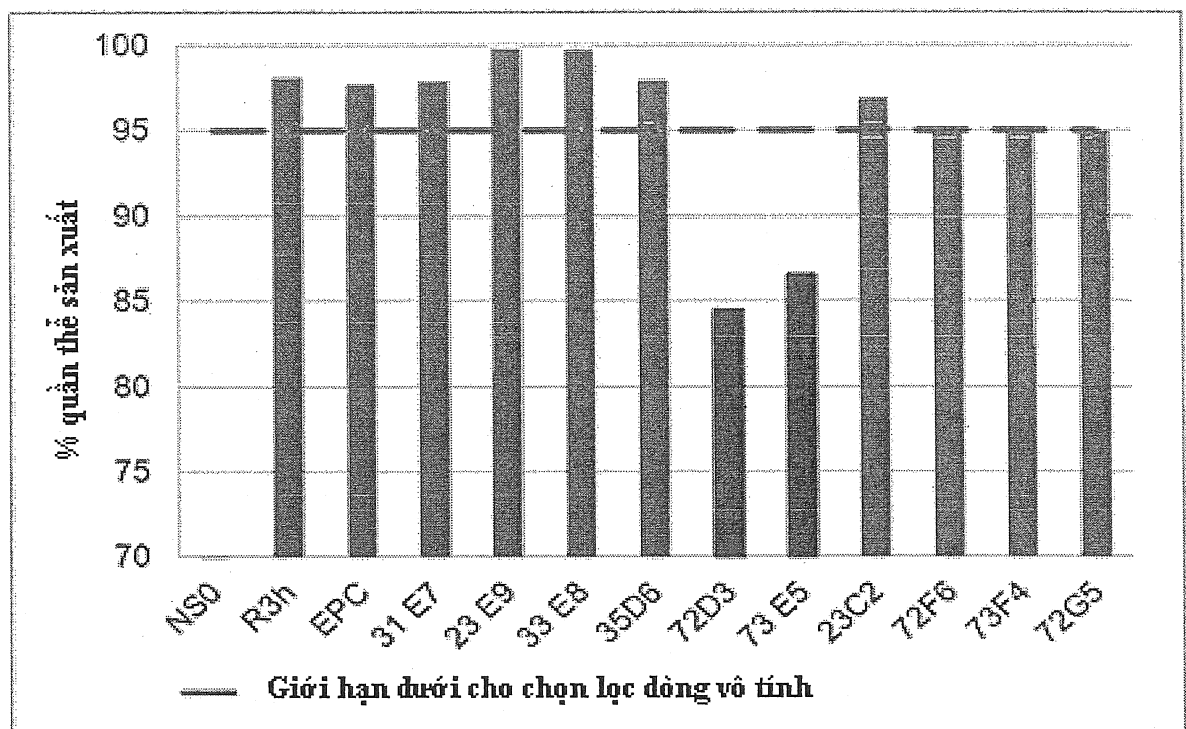


Fig. 5

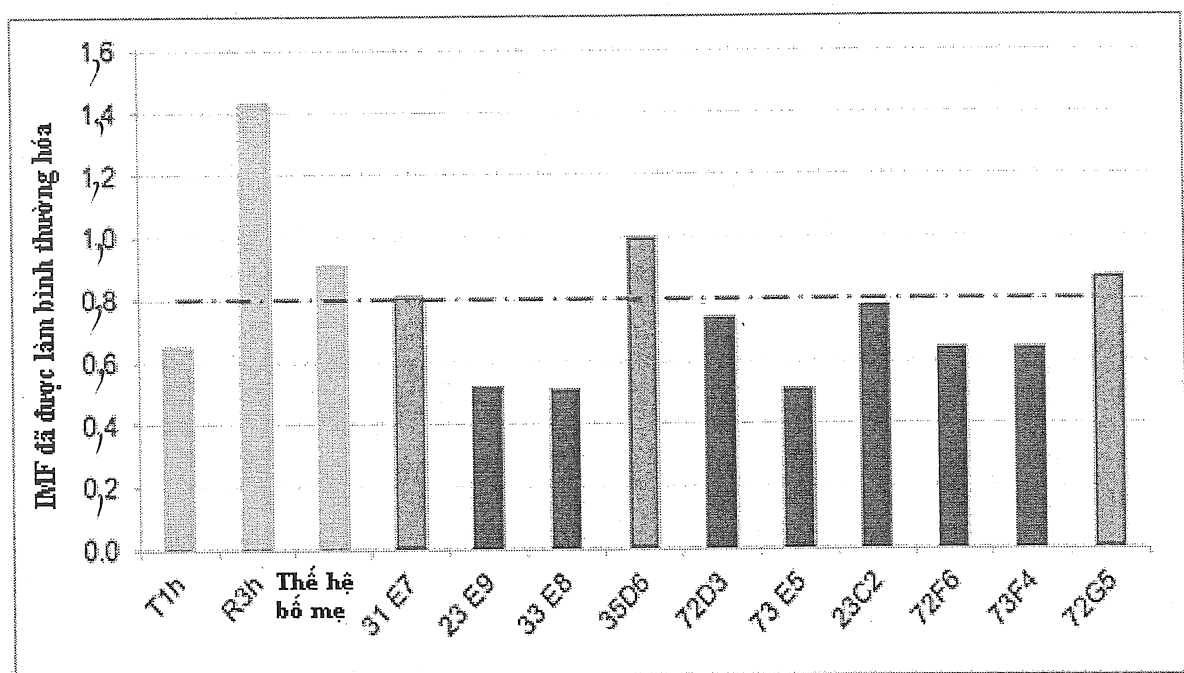


Fig. 6

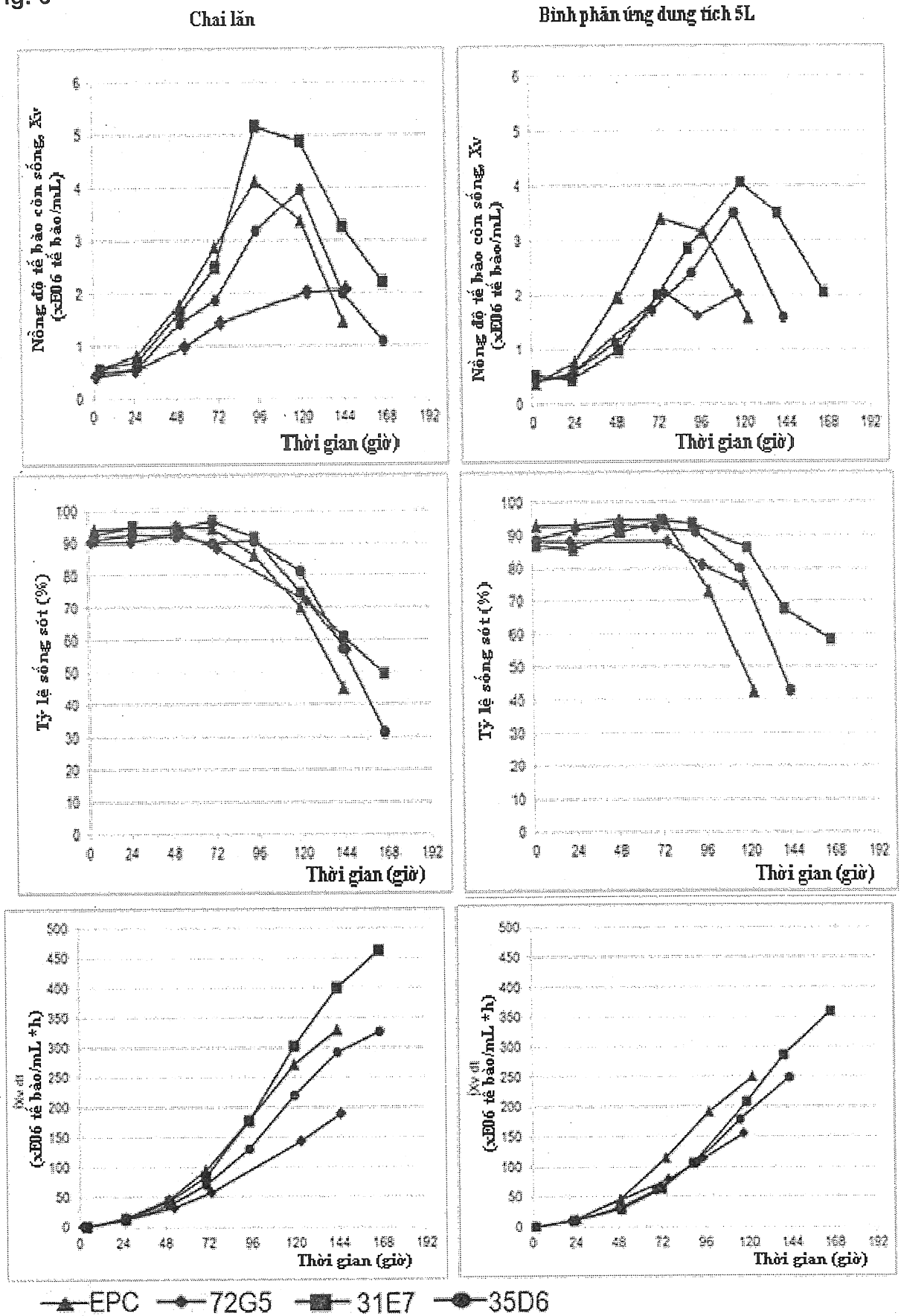


Fig. 7

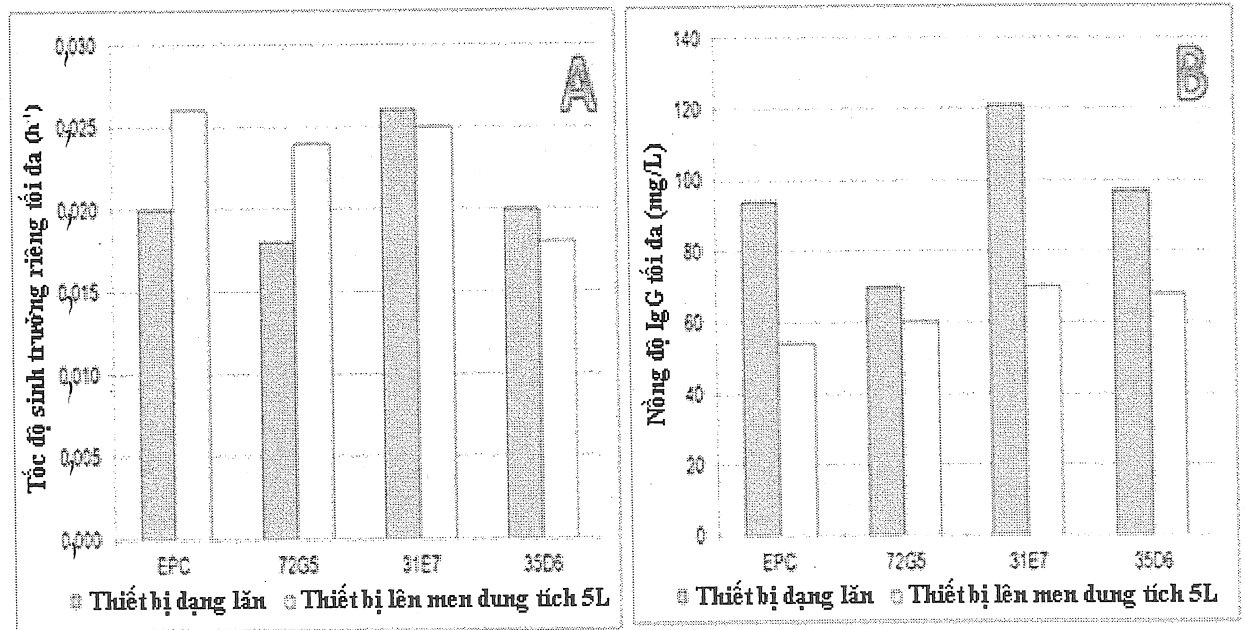


Fig. 8

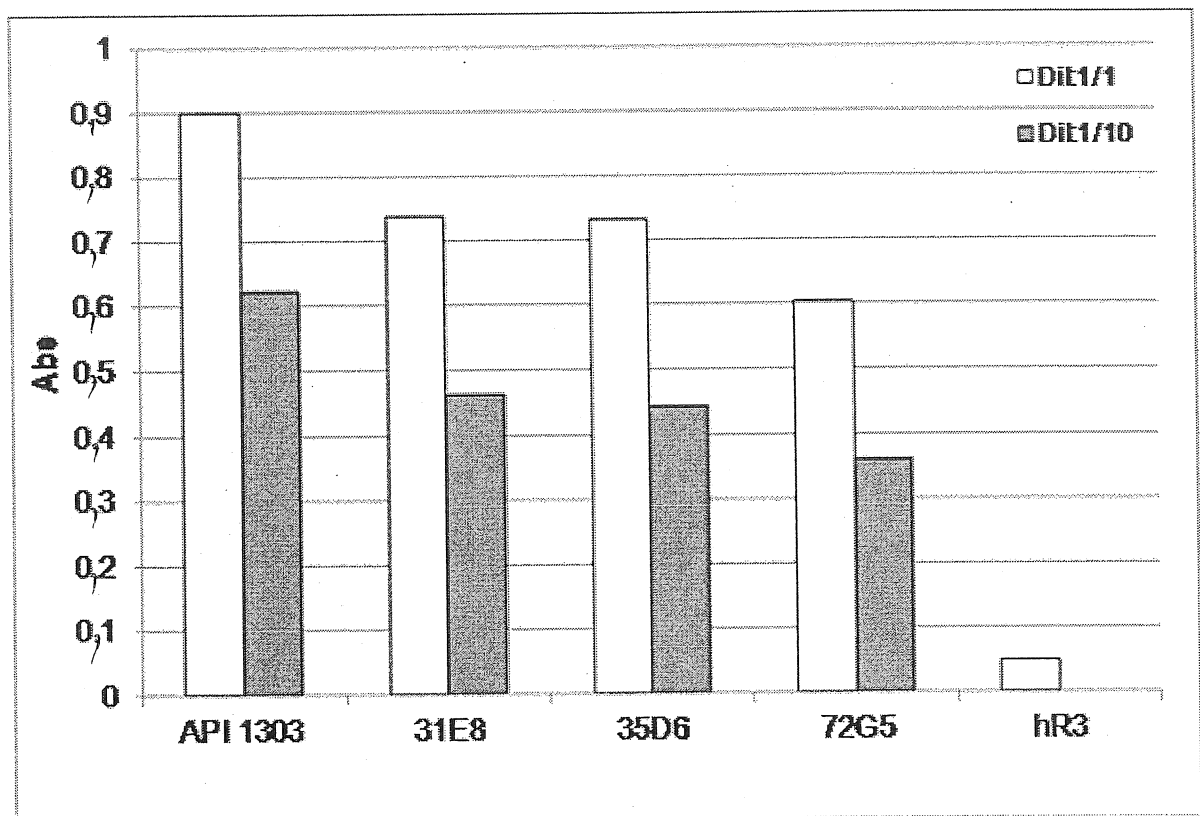


Fig. 9

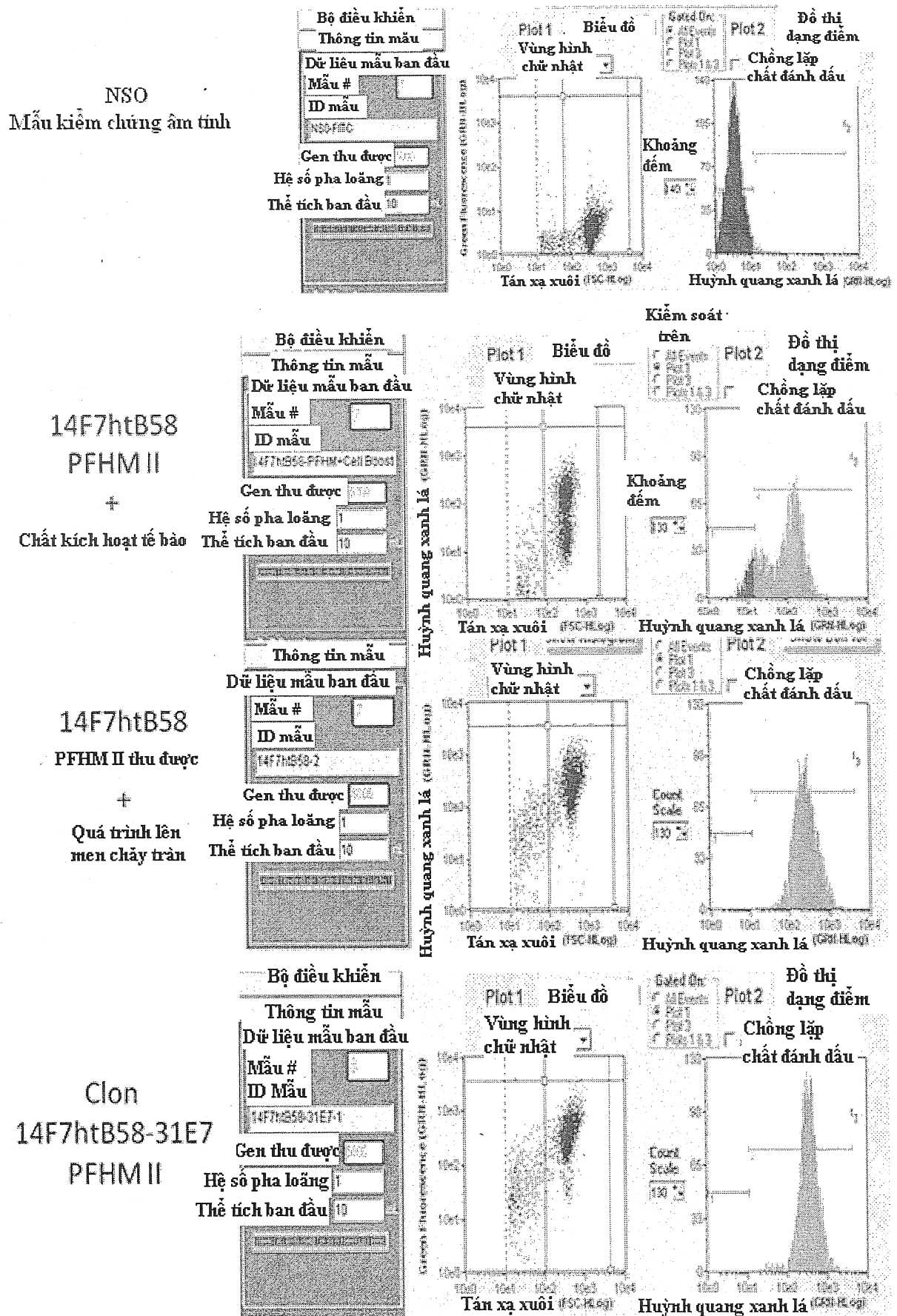


Fig. 10

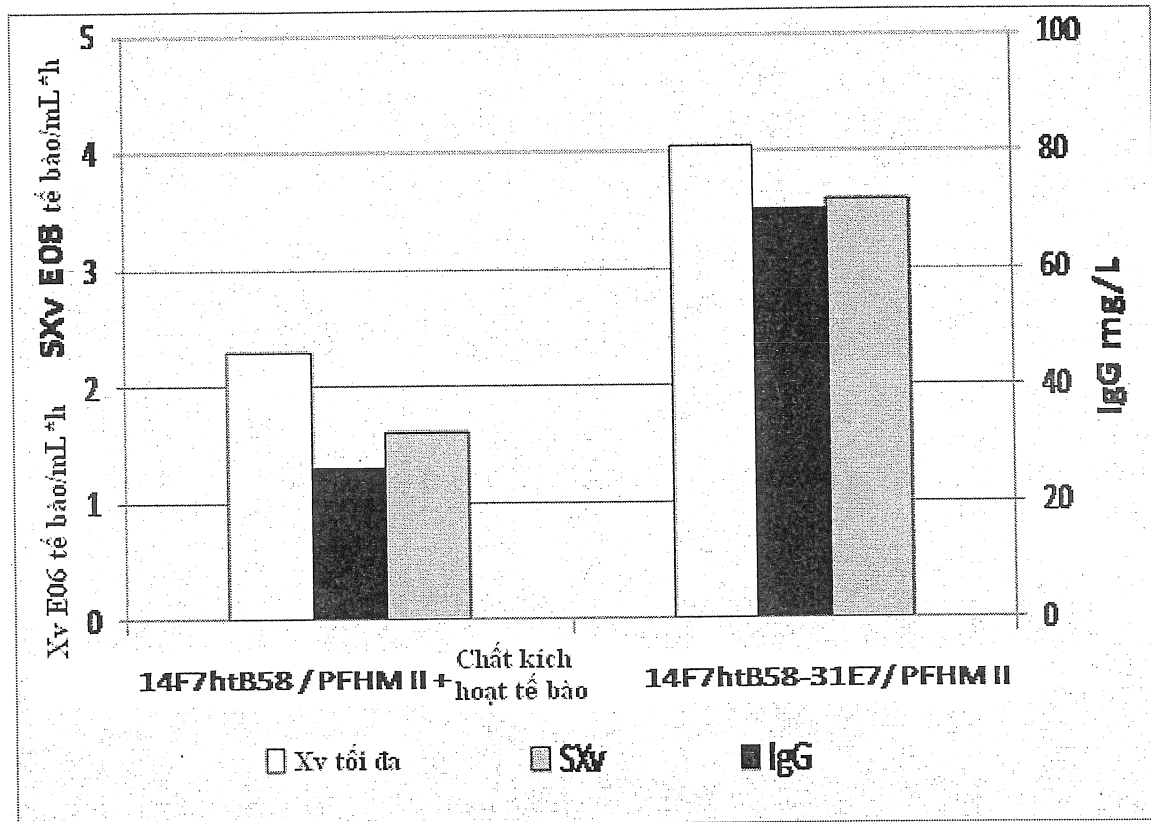


Fig. 11

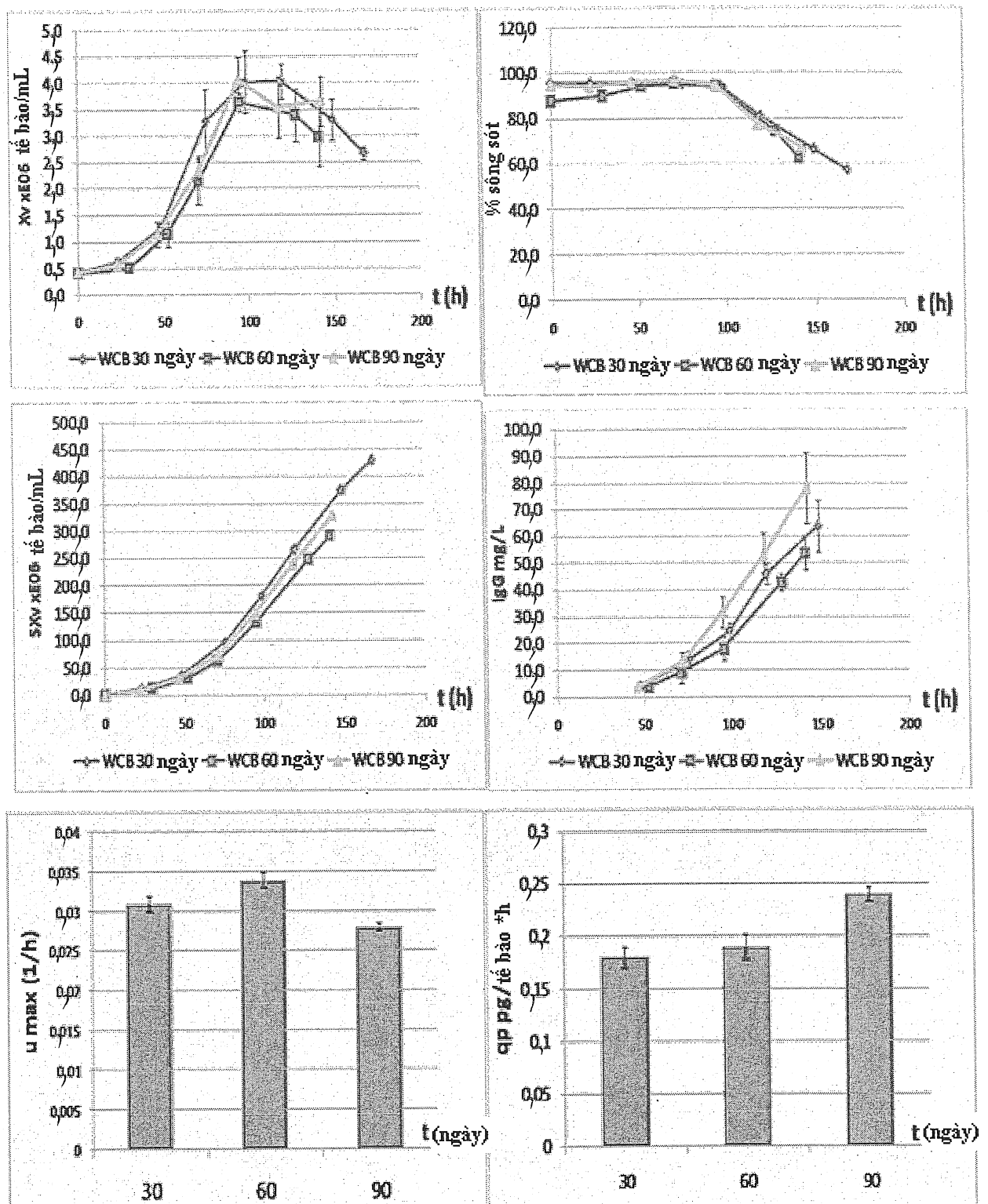


Fig. 12

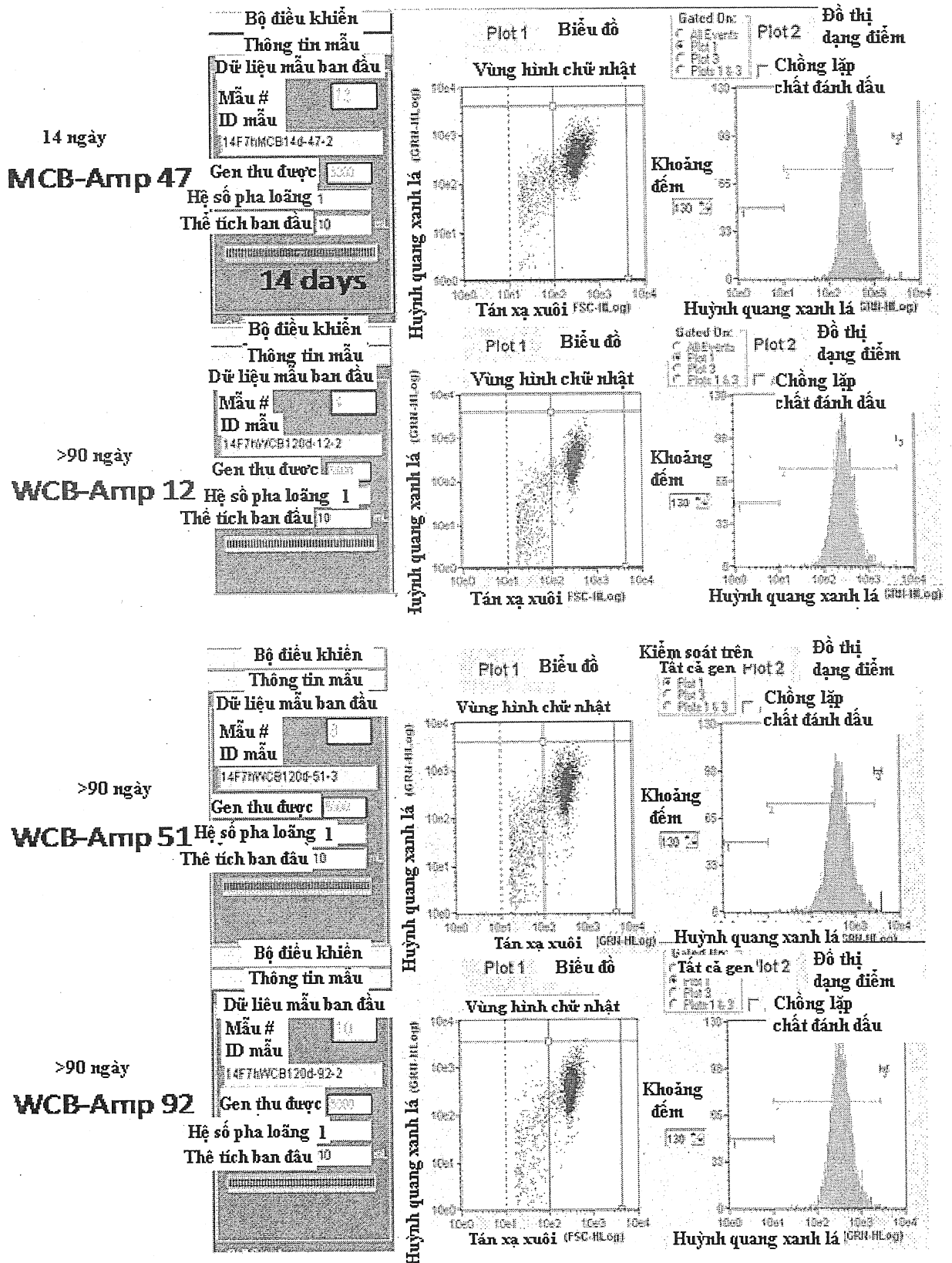


Fig. 13

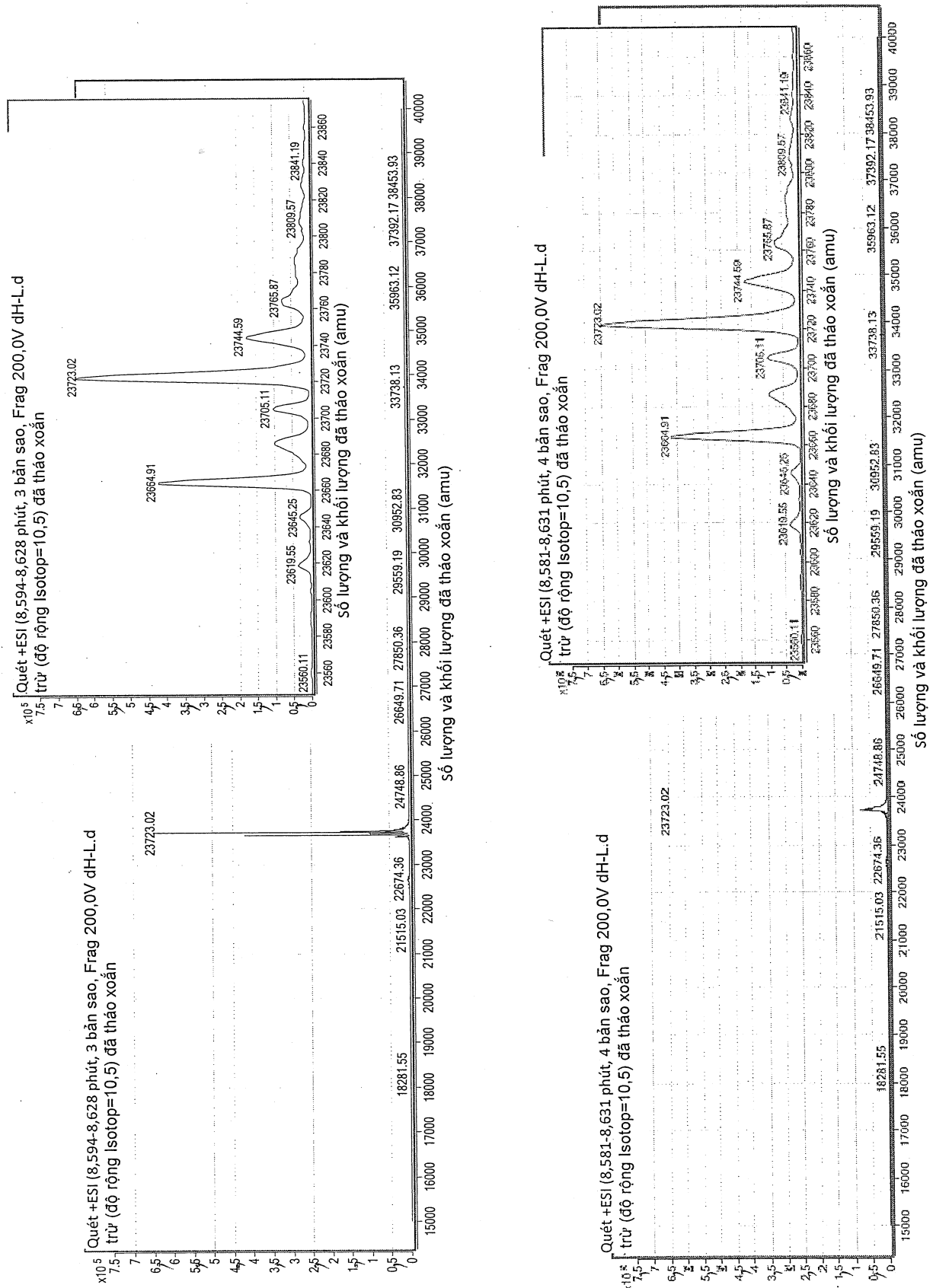


Fig. 14

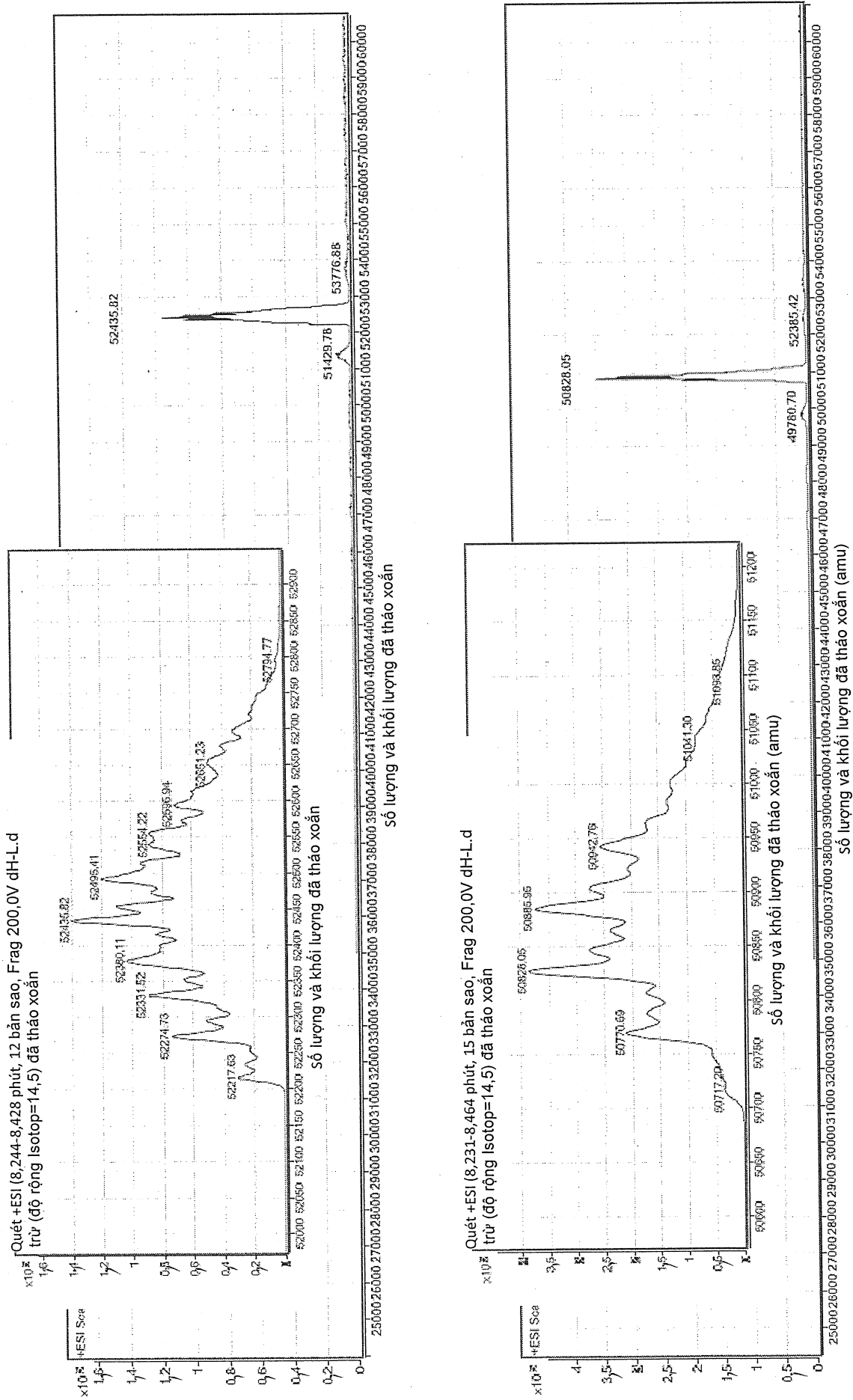
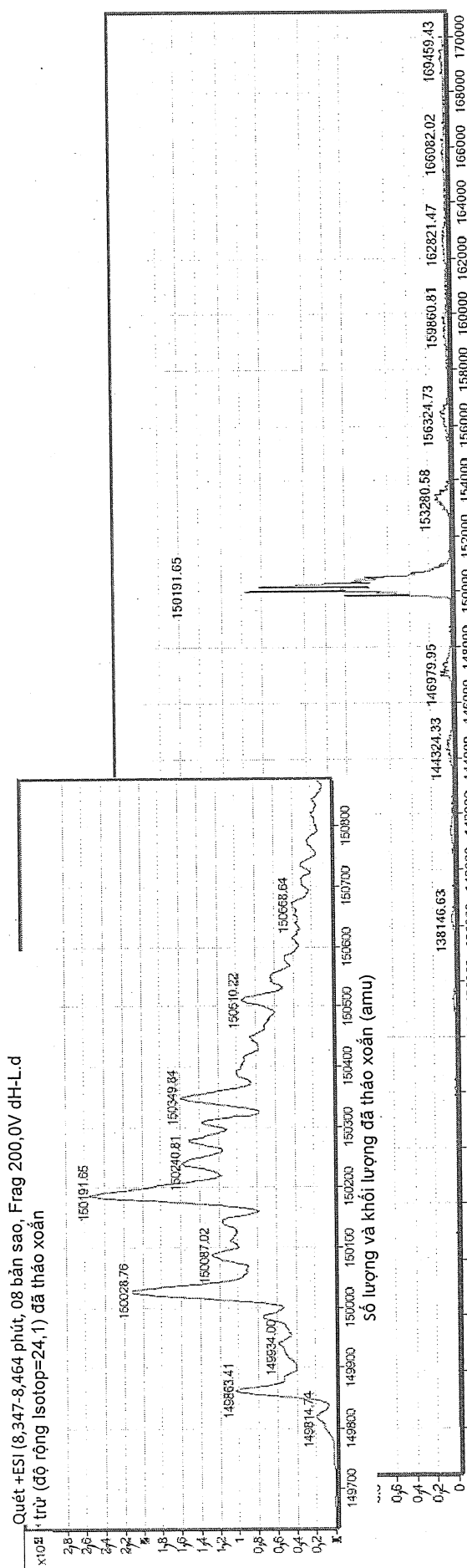
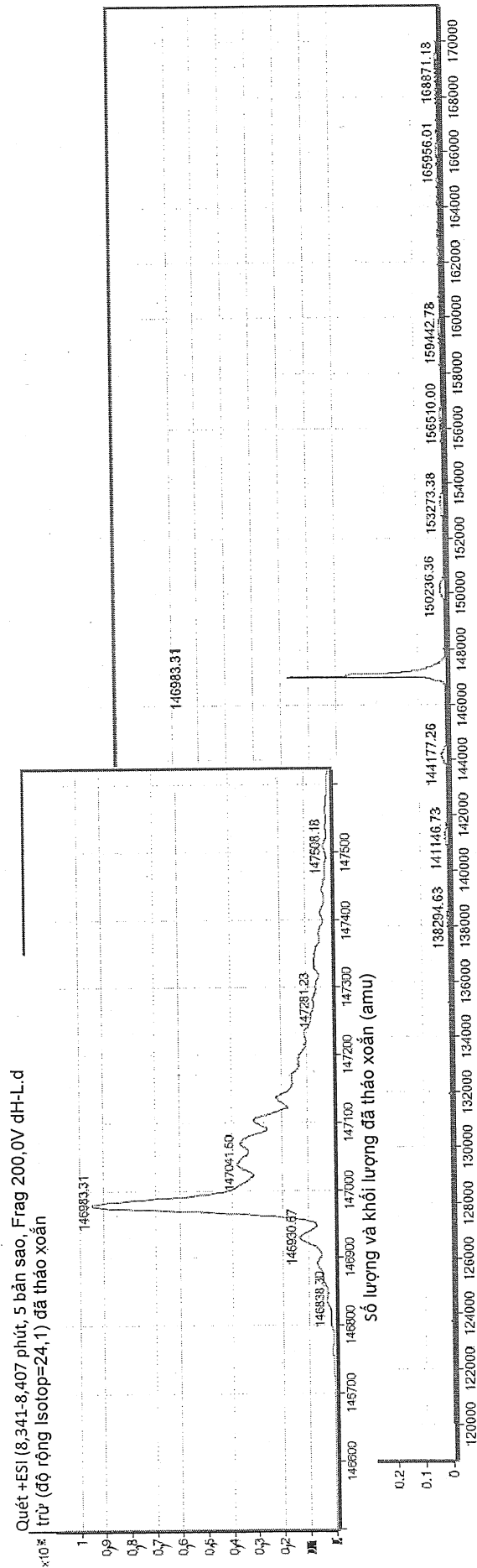


Fig. 15



số lượng và khối lượng đã tháo xoắn (amu)



số lượng và khối lượng đã tháo xoắn (amu)

Fig. 16

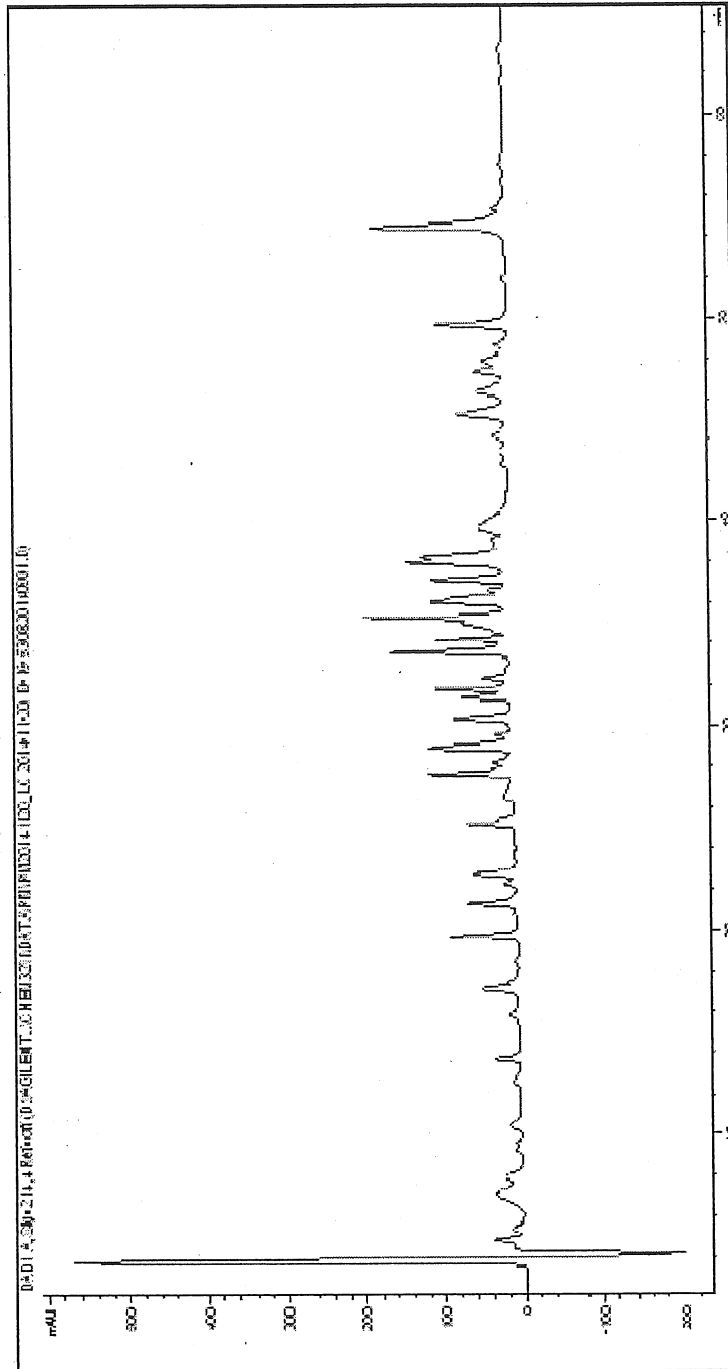


Fig. 17

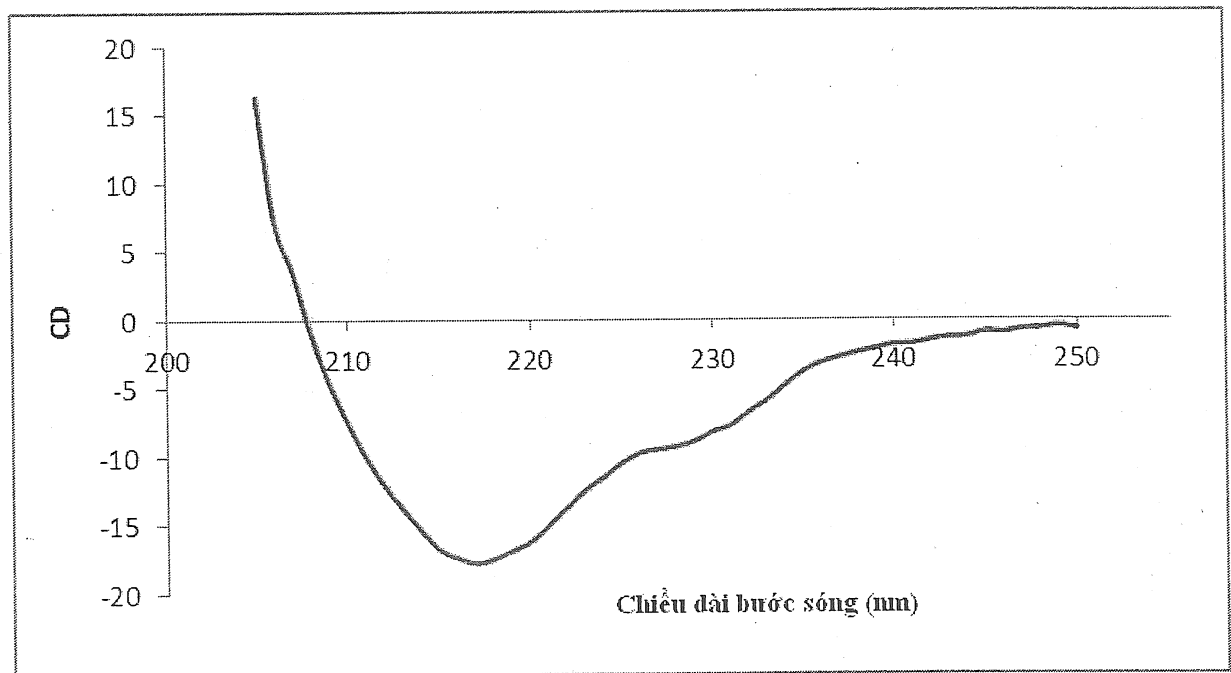


Fig. 18

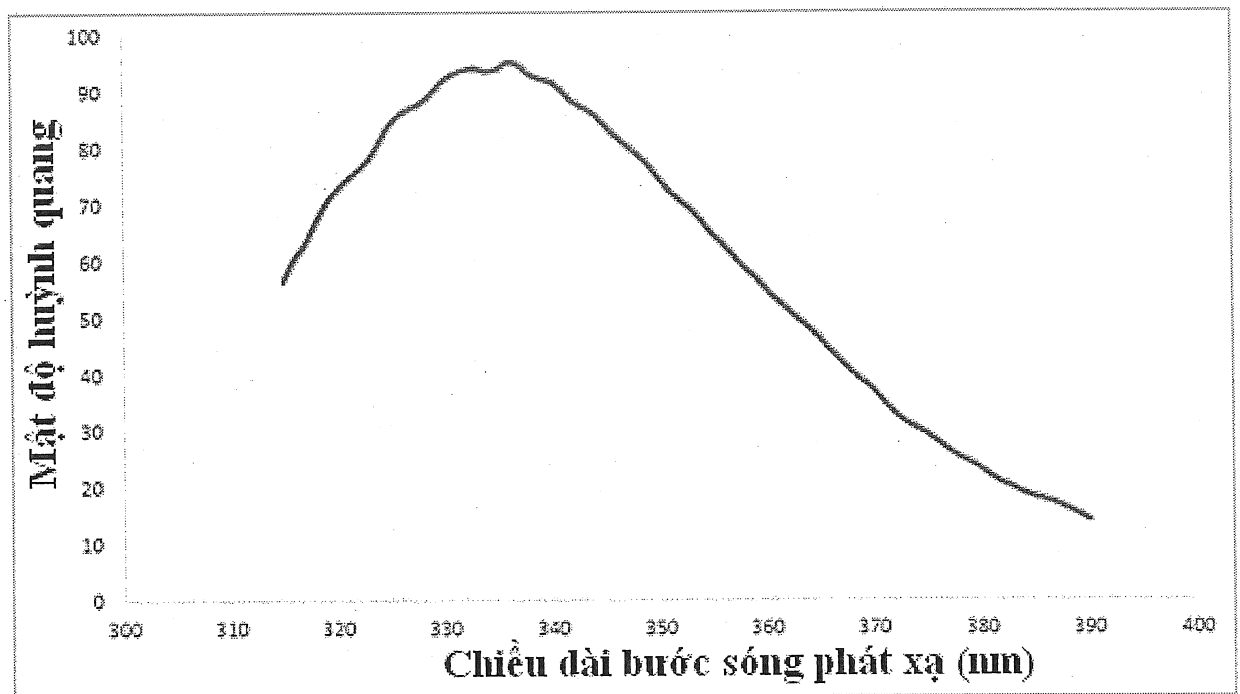


Fig. 19

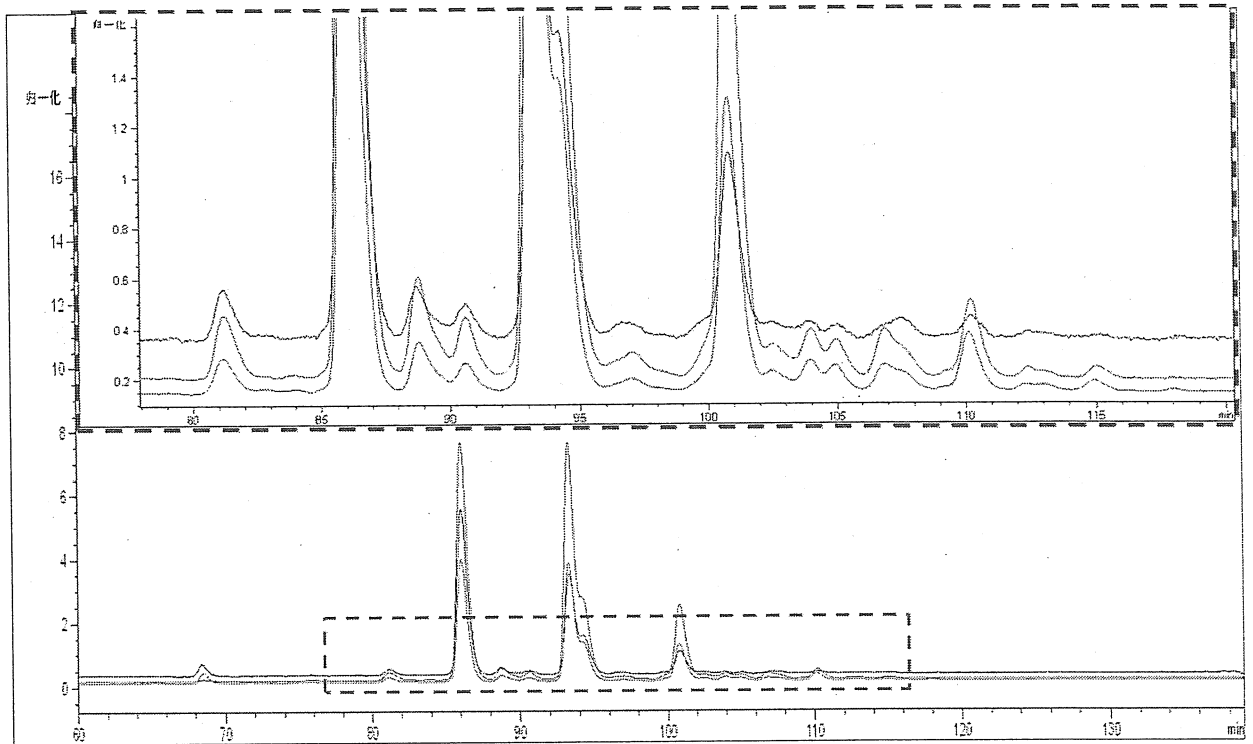


Fig. 20

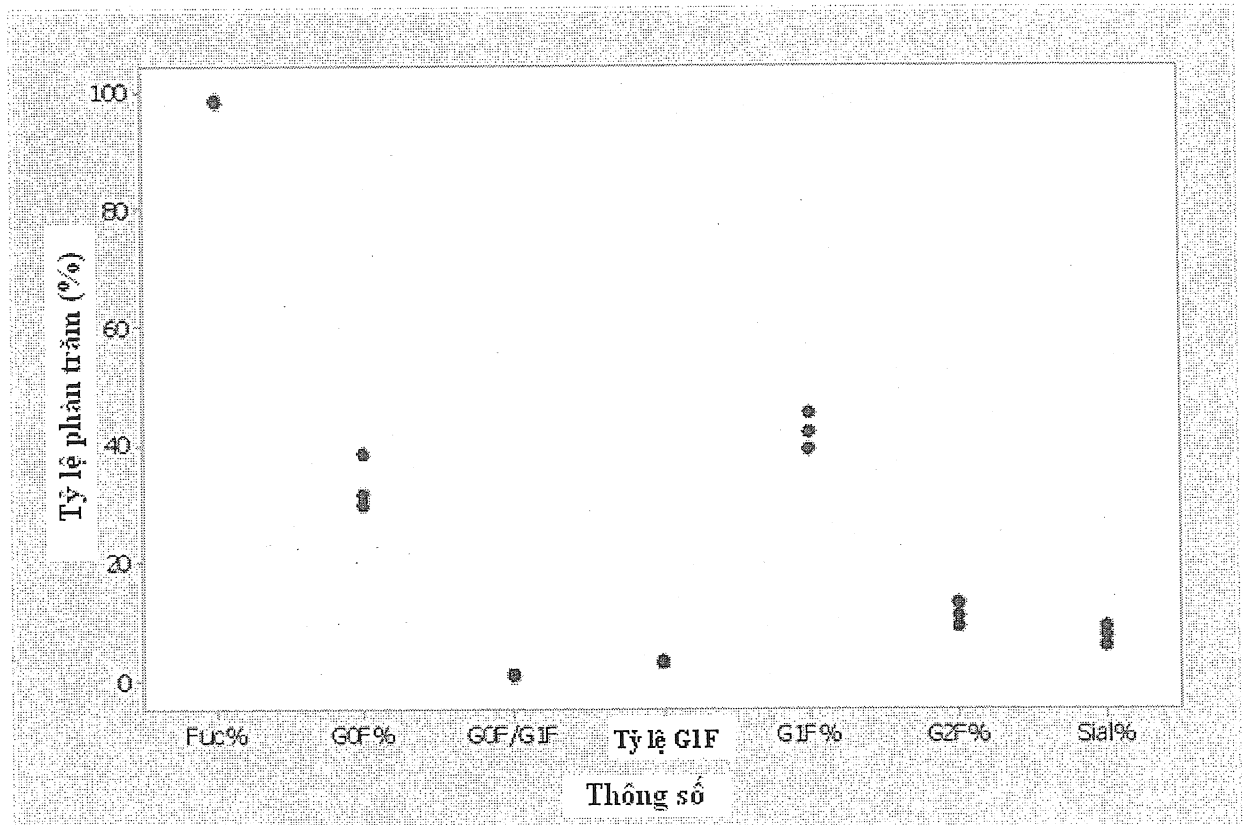


Fig. 21

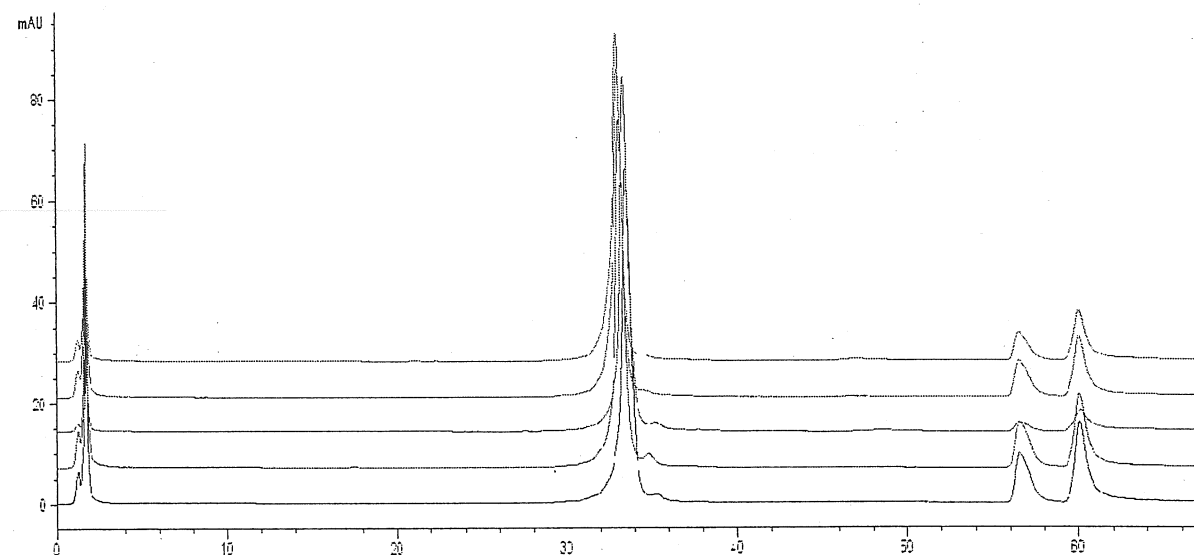


Fig. 22

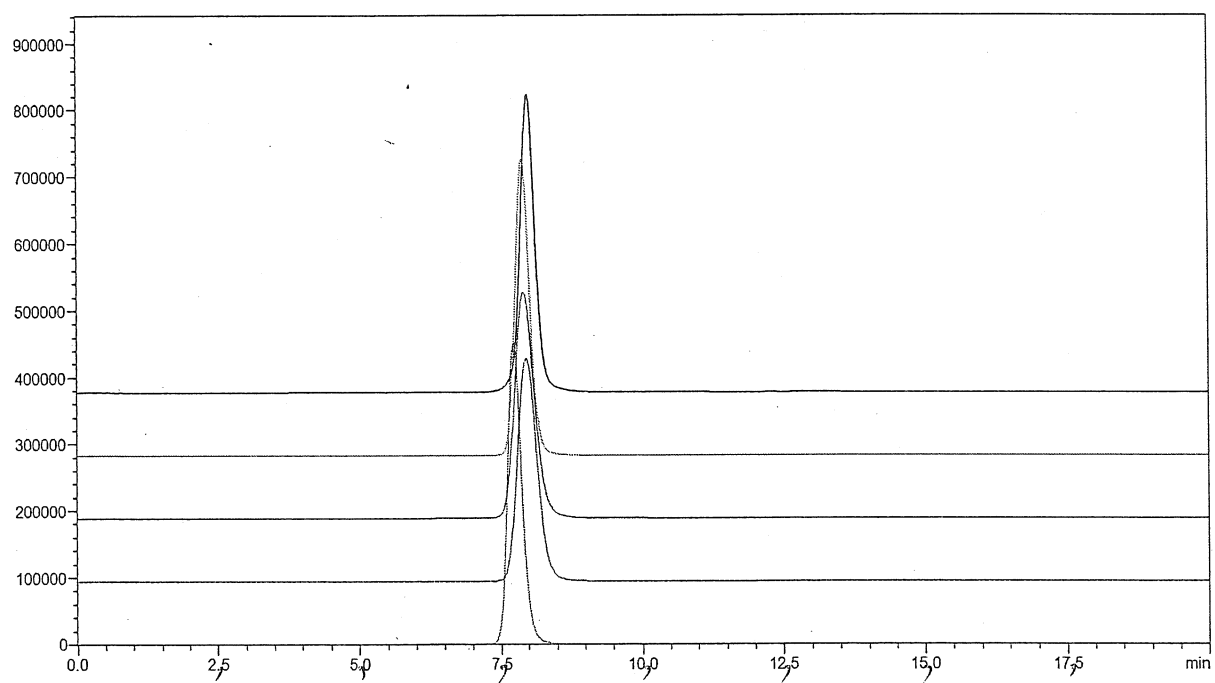


Fig. 23

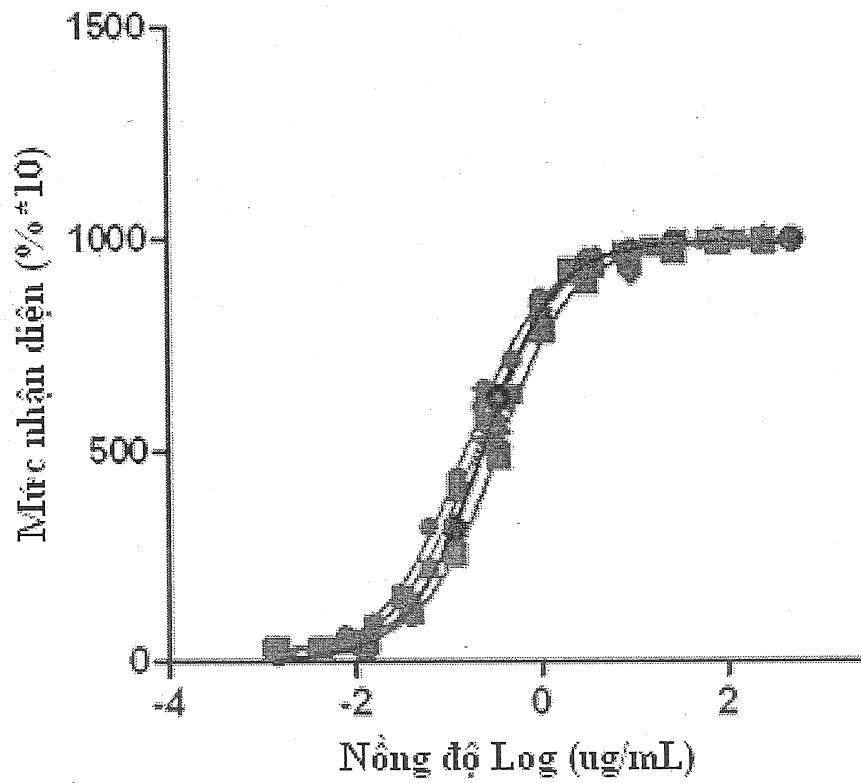
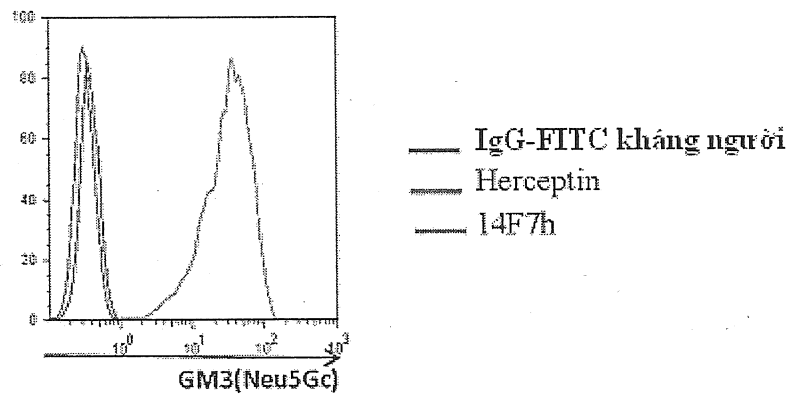


Fig. 24

A



B

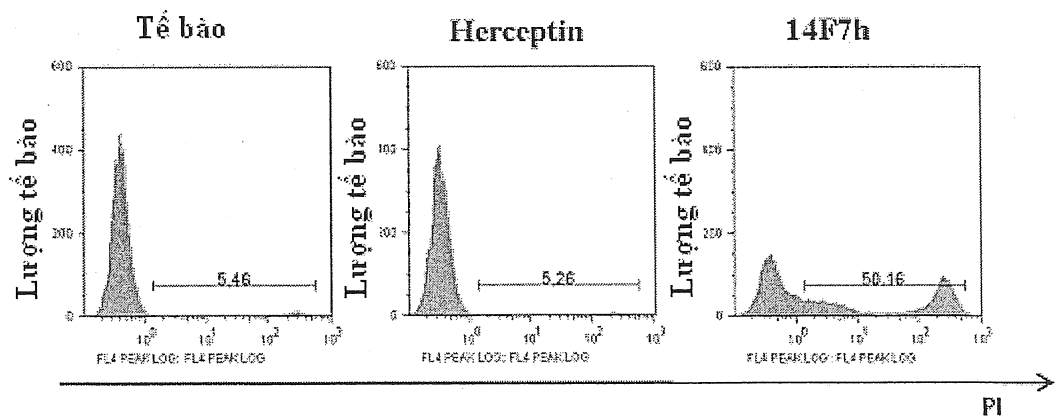
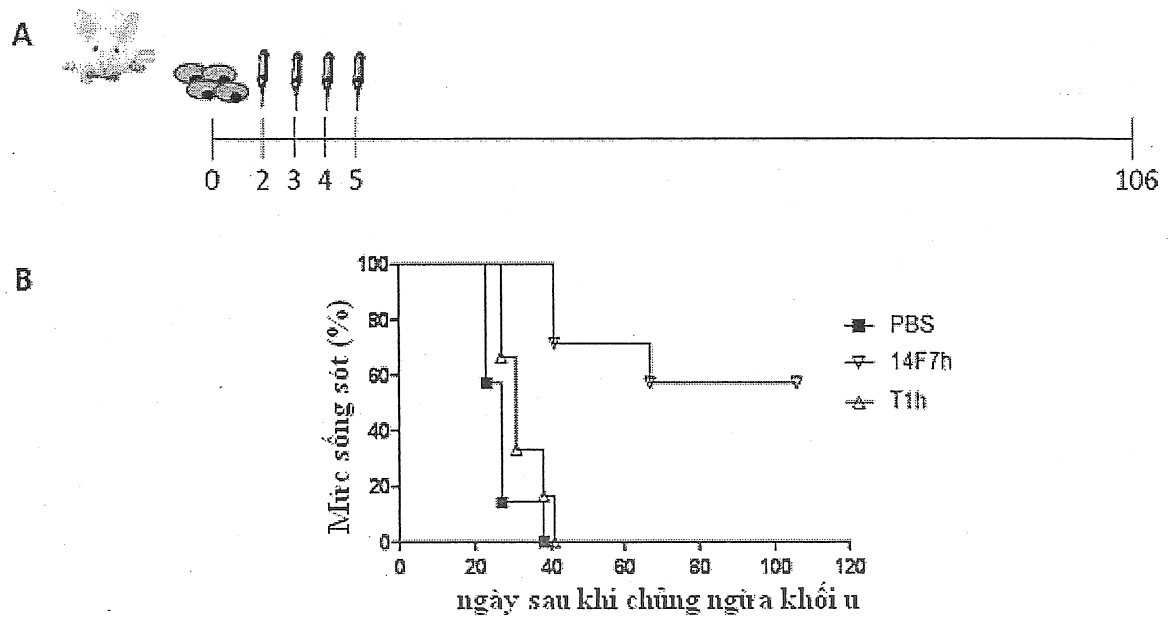


Fig. 25



Nhóm		14F7h		PBS		T1h	
		Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	14F7h			14,126	,000	11,006	,001
	PBS	14,126	,000			3,070	,080
	T1h	11,006	,001	3,070	,080		