



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

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

(11)



1-0035846

(51)⁷ C07K 14/02; A61K 39/395; A61P 31/20; (13) B
C12N 15/51; C07K 16/08; C12N 15/13;
A61K 39/29

(21) 1-2017-02360

(22) 27/11/2015

(86) PCT/KR2015/012820 27/11/2015

(87) WO/2016/085284 02/06/2016

(30) 10-2014-0167937 28/11/2014 KR

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/10/2017 355A

(73) CELLTRION INC. (KR)

19, Academy-ro 51, Yeonsu-gu, Incheon 22014, Republic of Korea

(72) YOON, Joon Sun (KR); LEE, Hwa Jin (KR); YI, Kye Sook (KR); KIM, Cheol Min (KR); LIM, Byung Pil (KR); CHANG, Shin Jae (KR); HONG, Seung Suh (KR).

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

(54) EPITOP CỦA KHÁNG NGUYÊN BỀ MẶT VIRUT VIÊM GAN B, PHÂN TỬ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI EPITOP NÀY ĐỂ TRUNG HÒA VIRUT VIÊM GAN B VÀ CHẾ PHẨM CHỨA EPITOP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến epitop đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và phân tử liên kết liên kết với kháng nguyên này để trung hòa virus viêm gan B. Vì epitop được đề xuất bởi sáng chế được sản sinh ra bằng cách tạo ra cấu trúc ba chiều và không chứa quyết định kháng nguyên, mà từ đó đột biến trốn thoát được tạo ra kháng lại việc sử dụng các vaccin hiện hành hoặc HBIG, chế phẩm chứa kháng thể liên kết với epitop này hoặc chế phẩm vaccin chứa epitop này có khả năng gây ra sự giảm hiệu lực do đột biến trốn thoát rất thấp. Do đó, kháng thể hoặc chế phẩm vaccin này có thể được sử dụng rất hiệu quả để phòng ngừa và/hoặc điều trị HBV. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mã hóa epitop được đề cập trên đây, vector biểu hiện chứa polynucleotit này, virus tái tổ hợp được biến nạp bằng vector biểu hiện này và quy trình sản sinh epitop bao gồm bước ủ virus tái tổ hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến epitop của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và phân tử liên kết trung hòa virus viêm gan B liên kết đặc hiệu vào đó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus viêm gan B (HBV) là virus ADN trong họ *Hepadnaviridae* gây bệnh viêm gan cấp tính và mạn tính, và được xem là nguyên nhân chính dẫn đến bệnh xơ gan và ung thư gan. HBV được phân loại thành 10 typ huyết thanh theo đáp ứng của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg) với huyết thanh chuẩn và theo sự khác biệt về trình tự axit amin của HBsAg, hoặc thành 8 kiểu gen theo sự khác biệt về trình tự bazơ của gen. Có khoảng 240 triệu bệnh nhân bị nhiễm HBV mạn tính trên toàn thế giới vào năm 2012, và hơn một nửa triệu người tử vong hàng năm do bệnh gây ra bởi viêm gan B. Tỷ lệ nhiễm HBV mạn tính ở người Hàn Quốc và Trung Quốc trưởng thành là rất cao, khoảng 5-8% và 80% bệnh nhân là người trưởng thành mắc bệnh viêm gan mạn tính, 65% bệnh nhân mắc bệnh xơ gan, và 70% bệnh nhân mắc bệnh ung thư biểu mô tế bào gan đi kèm theo nhiễm HBV. Bệnh viêm gan B mạn tính có thể được phòng ngừa bằng cách phát triển và mở rộng các loại vắc xin, nhưng nó vẫn là nguyên nhân quan trọng nhất của bệnh gan mạn tính, và các chi phí xã hội do bệnh gan đang tiếp tục gia tăng. Do đó, sự phát triển loại thuốc chống virus mới có thể phòng ngừa và điều trị bệnh viêm gan B mạn tính được đòi hỏi cấp thiết.

Các thuốc hữu ích hiện nay để điều trị bệnh viêm gan B mạn tính bao gồm interferon (peginterferon), lamivudin, adefovir dipivoxil, entecavir, và tenofovir, và tất cả các thuốc sử dụng bằng đường miệng không phải interferon là các chất tương tự nucleosit/nucleotit. Các thuốc này ức chế hoạt tính của transcriptaza đảo của HBV để ngăn chặn sự sao chép ADN của virus, cuối cùng làm giảm số lượng ADN HBV trong huyết thanh, bình thường hóa lượng ALT và làm giảm sự xơ hóa gan.

Tuy nhiên, các chất tương tự nucleosit gây kháng thuốc khi sử dụng kéo dài, do đó làm mất tác dụng của thuốc, dẫn đến bệnh viêm gan nặng hơn. Trong trường

hợp của tenofovir được phát triển gần đây nhất, sự kháng thuốc vẫn chưa được báo cáo, nhưng lamivudine, mà đã được sử dụng rộng rãi nhất trên toàn thế giới, được biết là thể hiện tỉ lệ mắc kháng thuốc là từ 70 đến 80% sau 5 năm. Ngoài ra, vì các thuốc sử dụng bằng đường miệng này không trực tiếp ngăn chặn sự nhiễm HBV, để phòng ngừa sự lây truyền theo chiều dọc từ mẹ sang thai nhi và sự tái nhiễm ở bệnh nhân cấy gan, chế phẩm globulin miễn dịch viêm gan B thu được từ huyết tương người (HBIG) được sử dụng cùng với thuốc sử dụng bằng đường miệng này.

HBIG hiện nay được điều chế bằng cách tách kháng thể từ máu của người có kháng thể kháng viêm gan B bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh chế cải tiến và loại bỏ nguồn gây nhiễm tiềm tàng bằng cách sử dụng kỹ thuật bất hoạt virus. Tuy nhiên, huyết tương nguyên liệu rất khó thu được, do đó đòi hỏi chi phí nhập khẩu quá cao và không thể đáp ứng nhu cầu. Ngoài ra, mặc dù phải mất rất nhiều tiền bạc và thời gian để loại bỏ virus có nguồn gốc từ huyết tương, khả năng tồn tại nguồn lây nhiễm tiềm tàng vẫn còn, và không thuận tiện cho người sử dụng do hiệu quả thấp, và có thể phải gánh gánh nặng kinh tế đáng kể.

Ngoài ra, hầu hết kháng thể được tạo ra bằng cách chủng ngừa vacxin viêm gan B thông thường đã được biết là nhận biết quyết định- α nằm ở các axit amin từ 124-147 của HBsAg. Quyết định- α đóng vai trò là epitop trung hòa chính của HBV, nhưng một số đột biến ở quyết định- α xuất hiện ở một số bệnh nhân đã được báo cáo là làm thoát các kháng thể được tạo ra bằng cách chủng ngừa vacxin viêm gan B. Do đó, có nhu cầu ngày càng gia tăng về việc phát triển các kháng thể hoặc vacxin mới để phòng ngừa và điều trị bệnh viêm gan B, mà có thể đáp ứng với các đột biến trốn thoát được sinh ra do các vacxin hiện nay hoặc HBIG.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế quan tâm đến các vấn đề gặp phải trong lĩnh vực liên quan, và các tác giả sáng chế đã phát triển epitop bao gồm các axit amin ở các vị trí 110, 118, 120 và/hoặc 147 của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg), và cũng xác nhận là nó có các đặc điểm cấu trúc ba chiều.

Theo đó, sáng chế đề xuất epitop của HBsAg.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phân tử liên kết trung hòa HBV liên kết đặc hiệu với epitop này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa phân tử liên kết này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vectơ biểu hiện chứa polynucleotit này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất tế bào chủ sản sinh phân tử liên kết trung hòa

HBV bằng cách gây nhiễm với vectơ biểu hiện.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán bệnh viêm gan B, chứa phân tử liên kết.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa epitop này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vectơ biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa epitop này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp hoặc virus, được biến nạp bằng vectơ biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa epitop này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất quy trình sản sinh epitop, bao gồm bước ủ vi sinh vật tái tổ hợp hoặc virus này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm vacxin HBV chứa epitop hoặc polynucleotit mã hóa epitop này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm phát hiện HBV chứa epitop hoặc polynucleotit mã hóa epitop này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện cấu trúc đột biến, trong đó HBsAg kiểu hoang (226 a.a) được chia thành ba vùng, cụ thể là các trình tự axit amin 1~100 (Vùng 1), 101~160 (Vùng 2), và 161~226 (Vùng 3), và trong đó các vùng tương ứng bị làm mất, để xác định vị trí liên kết của kháng thể theo sáng chế;

FIG. 2 thể hiện các kết quả của phép đo cường độ liên kết của kháng thể theo sáng chế với HBsAg kiểu hoang và ba loại HBsAg đột biến, trong đó mỗi vùng 1, 2, 3 bị làm mất, bằng ELISA sử dụng thể thực khuẩn;

FIG. 3 thể hiện các cấu trúc của bốn loại HBsAg đột biến trong đó 15 axit amin bị làm mất lần lượt, để xác định epitop của kháng thể theo sáng chế;

FIG. 4 thể hiện các kết quả của phép đo cường độ liên kết của kháng thể theo sáng chế với bốn loại HBsAg đột biến, trong đó 15 axit amin được làm mất lần lượt, nhờ ELISA sử dụng thể thực khuẩn;

FIG. 5 thể hiện các vị trí của epitop và các liên kết disulfit trên các mẫu HBsAg;

FIG. 6a và 6b thể hiện các kết quả của thử nghiệm thẩm tách Tây để nhận diện các đặc điểm của epitop của kháng thể theo sáng chế;

FIG. 7 thể hiện các kết quả của ELISA về khả năng phản ứng của các kháng thể 1, 2 theo sáng chế theo một phương án của sáng chế với nhiều kháng nguyên đột biến khác nhau của quyết định- α ;

Các FIG. 8a đến 8d thể hiện các kết quả của các thử nghiệm trung hòa *in-vitro* của các kháng thể 1, 2 theo sáng chế theo một phương án của sáng chế đối với bốn kiểu gen HBV A, B, C, D, trong đó lượng virus nội bào được đo từ lượng ADN HBV được gia tăng, sử dụng PCR thời gian thực;

Các FIG. 9a đến 9d thể hiện các kết quả của các thử nghiệm trung hòa *in-vitro* của các kháng thể 1, 2 theo sáng chế theo một phương án của sáng chế đối với bốn kiểu gen HBV A, B, C, D, trong đó lượng virus đã được gia tăng và được tiết ra ngoài tế bào được đo từ lượng HBsAg bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch hóa phát quang (CLIA);

FIG. 10 thể hiện các kết quả của ELISA “bánh kẹp” về hoạt tính liên kết của các kháng thể 1, 2 theo sáng chế với 15 mẫu huyết thanh kháng nguyên bề mặt HBV (thu được từ các bệnh nhân có bảy kiểu gen HBV A, B, C, D, E, F, H); và

FIG. 11 thể hiện các kết quả của ELISA “bánh kẹp” về hoạt tính liên kết của các kháng thể 1, 2 theo sáng chế với virus kháng thuốc (lamivudin, adefovir, clevudin, entecavir).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, epitop của kháng thể người liên kết đặc hiệu với HBsAg (xem PCT/KR2014/004612, sau đây được gọi là “kháng thể theo sáng chế”) đã được phát hiện là bao gồm các axit amin ở các vị trí 110, 118, 120 và/hoặc 147 của HBsAg. Ngoài ra, trình tự hoặc một phần của nó, chứa bốn axit amin này, được tạo ra ở dạng có cấu trúc ba chiều, nhờ đó tạo ra epitop mà kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với nó, mà do đó đạt cực đại trong sáng chế.

Theo đó, sáng chế đề xuất epitop là phân tử chứa từ 3 đến 38 đơn vị lặp lại được chọn từ các axit amin ở các vị trí từ 106 đến 151 của HBsAg.

Trong một phương án của sáng chế, epitop này có thể bao gồm các axit amin ở các vị trí 110, 118, 120 và/hoặc 147 của HBsAg. Epitop chứa các axit amin ở các vị trí trên đây có thể được sử dụng ở dạng được liên kết với chất mang để duy trì cấu trúc ba chiều của nó hoặc để đảm bảo hiệu quả của nó khi sử dụng cho chế phẩm vacxin hoặc tương tự. Trong sáng chế, chất mang bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó tương thích sinh học và thích hợp để thực hiện các hiệu quả của sáng chế, và tốt hơn, nếu được chọn từ, nhưng không giới hạn ở, peptit, albumin huyết thanh, globulin miễn dịch, hemoxyanin, và polysaccarit.

Trong một phương án của sáng chế, epitop này có thể là các axit amin ở các vị trí 106-110, 107-111, 108-112, 109-113, 110-114, 114-118, 115-119, 119-123,

120-124, 143-147, 144-148, 145-149, 146-150, 147-151, 110-118, 118-120, 116-120, 117-121, 118-122, 120-147, 110-120, 118-147 hoặc 110-147 của HBsAg.

Trong sáng chế, trình tự axit amin kiểu hoang đầy đủ HBsAg thuộc kiểu gen HBV C (typ phụ *adr*) có thể được thể hiện bằng SEQ ID NO:3, và thông tin trình tự này cũng có thể được xác nhận trong Ngân hàng gen số GQ872210.1.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phân tử liên kết trung hòa HBV liên kết đặc hiệu với epitop bao gồm ít nhất một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin ở các vị trí 110, 118 và 120 của HBsAg. Ngoài ra, epitop này có thể chứa thêm axit amin ở vị trí 147 của HBsAg.

Trong một phương án của sáng chế, phân tử liên kết trung hòa HBV liên kết đặc hiệu với epitop này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 1×10^{-9} M. Trong một phương án khác, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 9×10^{-10} M. Vẫn trong một phương án khác, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 8×10^{-10} M. Vẫn trong một phương án khác, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 7×10^{-10} M. Vẫn trong một phương án khác, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 6×10^{-10} M. Trong một phương án khác nữa, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 5×10^{-10} M. Vẫn trong một phương án khác nữa, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 4×10^{-10} M. Vẫn trong một phương án khác nữa, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 3×10^{-10} M. Vẫn trong một phương án khác nữa, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 2×10^{-10} M. Vẫn trong một phương án khác nữa, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 1×10^{-10} M. Vẫn trong một phương án khác nữa, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 1×10^{-11} M. Vẫn trong một phương án khác nữa, phân tử liên kết này có thể có ái lực liên kết nhỏ hơn 1×10^{-12} M.

Theo sáng chế, phân tử liên kết trung hòa HBV có thể liên kết với ít nhất một phân tử được chọn từ nhóm bao gồm HBsAg typ phụ *adw*, *adr*, *ayw*, và *ayr*, và do đó có thể có hoạt tính trung hòa kháng HBV.

Theo sáng chế, phân tử liên kết này có thể liên kết với HBV kiểu gen A, B, C, D, E, F, G và H để nhờ đó có hoạt tính trung hòa.

Ngoài ra, phân tử liên kết theo sáng chế có thể liên kết với HBV kháng lamivudin, adefovir, clevudin hoặc entecavir và do đó có thể có hoạt tính trung hòa.

Trong một phương án của sáng chế, phân tử liên kết này có thể liên kết với kháng nguyên đột biến ở vị trí axit amin 101, 112, 126, 129, 133, 143, 173, 175,

184, 185 hoặc 196 của HBsAg để nhờ đó có hoạt tính trung hòa kháng HBV, nhưng sáng chế không bị giới hạn vào đó.

Trong một phương án của sáng chế, kháng nguyên đột biến này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Q101R, K112R, T126N, I126S, Q129H, M133H, P143K, L173F, L175S, A184V, I185M hoặc W196L.

Trong một phương án của sáng chế, phân tử liên kết này có thể là kháng thể hoặc một đoạn của nó. Kháng thể này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đoạn Fab, đoạn Fv, kháng thể kép, kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể người. Một phương án điển hình của sáng chế đề xuất kháng thể người hoàn chỉnh liên kết với HBsAg. Ở đây, kháng thể này được sử dụng theo nghĩa rộng nhất có thể, và các ví dụ về nó có thể bao gồm kháng thể đơn dòng nguyên vẹn, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ hai hoặc nhiều kháng thể nguyên vẹn (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), và đoạn kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn. Kháng thể này là protein được sản sinh bởi hệ miễn dịch có thể nhận biết kháng nguyên đặc hiệu và liên kết với nó. Về mặt cấu trúc, kháng thể này thường được tạo cấu hình để có protein hình chữ Y được tạo thành từ bốn chuỗi axit amin (hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ). Mỗi kháng thể có hai vùng, đó là, vùng biến đổi và vùng không biến đổi. Vùng biến đổi, nằm ở các đầu của các nhánh chữ Y, liên kết với kháng nguyên đích và tương tác với chúng. Vùng biến đổi này bao gồm vùng quyết định bổ sung (CDR) nhận biết vị trí liên kết đặc hiệu trên kháng nguyên đặc hiệu và liên kết vào đó. Vùng không biến đổi, nằm ở đuôi của chữ Y, được nhận biết bởi hệ miễn dịch và tương tác với nó. Kháng nguyên đích này có nhiều vị trí liên kết được gọi là các epitop, được nhận biết bởi CDR trên các kháng thể. Các kháng thể tương ứng liên kết đặc hiệu với các epitop khác nhau có các cấu trúc khác nhau. Do đó, một kháng nguyên duy nhất có thể có ít nhất một kháng thể tương ứng với nó.

Ngoài ra, sáng chế bao gồm biến thể chức năng của kháng thể này. Các biến thể của các kháng thể này được xem là biến thể chức năng của kháng thể theo sáng chế, miễn là chúng cạnh tranh với kháng thể theo sáng chế để liên kết đặc hiệu với HBV hoặc typ phụ kháng nguyên bề mặt của nó (HBsAg). Biến thể chức năng này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dẫn xuất mà các trình tự có cấu hình bậc một của chúng gần như là giống nhau, và các ví dụ về chúng bao gồm các cải biến *in-vitro* hoặc *in-vivo*, hóa học và/hoặc hóa sinh, và chúng không được phát hiện trong kháng thể mẹ đơn dòng của sáng chế. Ví dụ về các cải biến này có thể bao gồm axetyl hóa, axyl hóa, liên kết đồng hóa trị các nucleotit hoặc các dẫn xuất

nucleotit, liên kết đồng hóa trị các lipit hoặc dẫn xuất lipit, liên kết chéo, liên kết disulfit, glycosyl hóa, hydroxyl hóa metyl hóa, oxy hóa, Peg hóa, phân giải protein và phosphoryl hóa. Biến thể chức năng này có thể chọn lọc kháng thể có trình tự axit amin tạo thành từ việc thế, gắn xen, làm mất đoạn ít nhất một axit amin hoặc tổ hợp của chúng, so với trình tự axit amin của kháng thể mẹ. Ngoài ra, biến thể chức năng này có thể bao gồm dạng bị cắt của trình tự axit amin nằm trong một hoặc cả hai đầu cùng amino và đầu cùng carboxyl. Biến thể chức năng theo sáng chế có thể có ái lực liên kết giống hoặc khác với hoặc cao hơn hoặc thấp hơn so với của kháng thể mẹ theo sáng chế, nhưng có thể vẫn liên kết với HBV hoặc typ phụ kháng nguyên bề mặt của nó (HBsAg). Ví dụ, trình tự axit amin của vùng biến đổi, bao gồm nhưng không giới hạn ở, cấu trúc khung hoặc vùng siêu biến, cụ thể là CDR3, có thể được cải biến. Thông thường, vùng chuỗi nhẹ hoặc nặng bao gồm ba vùng siêu biến có ba CDR và các vùng bảo thủ hơn, cụ thể là vùng khung (FR). Vùng siêu biến này bao gồm gốc axit amin từ CDR và gốc axit amin từ vùng siêu biến. Biến thể chức năng, nằm trong phạm vi của sáng chế, có thể có sự tương đồng trình tự axit amin là khoảng 50%~99%, khoảng 60%~99%, khoảng 80%~99%, khoảng 90%~99%, khoảng 95%~99%, hoặc khoảng 97%~99% với kháng thể mẹ theo sáng chế. Để sắp xếp tối ưu các trình tự axit amin cần được so sánh và cũng để xác định các gốc axit amin tương tự hoặc giống nhau, trong số các thuật toán vi tính, Gap hoặc Bestfit, đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này, có thể được sử dụng. Biến thể chức năng có thể thu được bằng cách đưa kháng thể mẹ hoặc một phần của nó vào quy trình sinh học phân tử đã biết bao gồm PCR hoặc gây đột biến gen/gây đột biến gen một phần bằng cách sử dụng oligome nucleotit, hoặc vào quy trình tổng hợp hữu cơ, nhưng sáng chế không bị giới hạn vào đó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa phân tử liên kết trên đây. Ví dụ, sáng chế bao gồm phân tử axit nucleic đã phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng kháng HBsAg.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa polynucleotit trên đây. Vector biểu hiện này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bất kỳ một trong số các vector được chọn từ nhóm bao gồm vector biểu hiện sẵn có từ Celltrion, như vector MarEx và vector pCDNA được bán rộng rãi, vector F, R1, RP1, Col, pBR322, ToL, và Ti; và cosmid; thể thực khuẩn, như lambda, lambdoid, M13, Mu, p1 P22, Q μ , T-even, T2, T3, T7, v.v...; và các virus thực vật, và vector biểu hiện bất kỳ đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng

trong sáng chế, và vector biểu hiện này có thể được chọn tùy theo đặc điểm của tế bào chủ đích. Việc đưa vector này vào tế bào chủ có thể được thực hiện bằng cách chuyển nhiễm canxi phosphat, gây nhiễm virus, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-dextran, chuyển nhiễm lipofectamin, hoặc điện di, nhưng sáng chế không bị giới hạn vào đó, và người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này có thể làm theo quy trình đưa vào thích hợp với vector biểu hiện và tế bào chủ này. Vector biểu hiện này có thể chứa ít nhất một gen đánh dấu lựa chọn, nhưng không bị giới hạn vào đó, và việc lựa chọn là có thể, tùy thuộc vào có hay không việc sản phẩm thu được bằng cách sử dụng vector không chứa gen đánh dấu lựa chọn. Gen lựa chọn này được chọn tùy thuộc vào tế bào chủ đích, được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình bất kỳ đã biết với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này, và do đó sáng chế không bị giới hạn vào đó. Ngoài ra, để dễ dàng tinh chế phân tử axit nucleic theo sáng chế, trình tự nhãn có thể được chèn vào vector biểu hiện và do đó được dung hợp. Nhãn này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhãn hexahistidin, nhãn hemagglutinin, nhãn myc hoặc nhãn flag, và nhãn bất kỳ có thể là hữu ích trong sáng chế miễn là nó tạo thuận lợi cho việc tinh chế như được biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này.

Ngoài ra, trong một phương án khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ sản sinh phân tử liên kết có hoạt tính trung hòa kháng HBV bằng cách chuyển nhiễm với vector biểu hiện. Trong sáng chế, tế bào chủ này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật có vú, thực vật, côn trùng, nấm hoặc tế bào hoặc có nguồn gốc từ tế bào. Tế bào động vật có vú này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào CHO, tế bào F2N, tế bào CSO, tế bào BHK, tế bào Bowes melanoma, tế bào HeLa, tế bào 911, tế bào AT1080, tế bào A549, tế bào HEK 293 hoặc tế bào HEK293T, và các tế bào bất kỳ có thể được sử dụng miễn là chúng hữu ích để làm tế bào chủ cho động vật có vú như đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán bệnh viêm gan B, chứa phân tử liên kết trên đây. Chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm thêm, để làm được chất kháng virus, interferon, kháng thể đơn dòng kháng HBV, kháng thể đa dòng kháng HBV, chất tương tự nucleosit, chất ức chế ADN polymeraza, chế phẩm siARN hoặc vacxin điều trị, ngoài phân tử liên kết này.

Theo sáng chế, chế phẩm chứa phân tử liên kết này có thể được cung cấp ở dạng bào chế, như dung dịch tiêm vô khuẩn, chế phẩm đông khô, dung dịch xylanh

đã nạp sẵn, chế phẩm dùng bằng đường miệng, thuốc bôi ngoài hoặc thuốc đạn bằng cách quy trình điển hình tương ứng, nhưng sáng chế không bị giới hạn vào đó.

Ngoài ra, trong một phương án khác theo sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh viêm gan B, bao gồm bước sử dụng chế phẩm trên đây với lượng hữu hiệu điều trị cho đối tượng bị nhiễm HBV. Trong phương pháp điều trị theo sáng chế, dược chất đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng cùng. Trong phương pháp điều trị theo sáng chế, việc sử dụng có thể được thực hiện bằng đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, đường sử dụng có thể là sử dụng trong tĩnh mạch, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Trong một phương án của sáng chế, phương pháp điều trị này có thể bao gồm thêm bước sử dụng thuốc kháng virus. Thuốc kháng virus này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, interferon, chất tương tự nucleosit/nucleotit, kháng thể đơn dòng kháng HBV, kháng thể đa dòng kháng HBV, chất ức chế ADN polymeraza, chế phẩm siARN hoặc vacxin điều trị. Chất tương tự nucleosit/nucleotit có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lamivudine, entecavir, clevudine hoặc adefovir dipivoxil.

Ngoài ra, trong một phương án khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp phòng ngừa bệnh viêm gan B, bao gồm bước sử dụng chế phẩm trên đây với lượng hữu hiệu điều trị cho đối tượng. Trong phương pháp phòng bệnh theo sáng chế, chất phòng bệnh đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng cùng. Trong phương pháp phòng bệnh theo sáng chế, việc sử dụng có thể được thực hiện theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, đường sử dụng có thể là sử dụng trong tĩnh mạch, nhưng không bị giới hạn vào đó.

Chế phẩm theo sáng chế được sử dụng cho động vật có vú bao gồm người, nhờ đó phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm HBV và bệnh bị gây ra bởi sự nhiễm HBV. Ở đây, lượng phân tử liên kết này (ví dụ kháng thể) được sử dụng phụ thuộc vào đối tượng được điều trị, mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng, tốc độ sử dụng và sự kê đơn của bác sỹ. Dưới dạng thành phần hoạt chất, phân tử liên kết này có thể được sử dụng một lần hoặc chia làm nhiều lần sử dụng vào nhiều thời điểm mỗi ngày với liều từ 0,001 đến 10mg/kg (thể trọng) hoặc 0,005 đến 1mg/kg (thể trọng) cho động vật có vú qua các đường ngoài đường tiêu hóa. Trong một số trường hợp, liều nhỏ hơn khoảng đã đề cập trên đây có thể là thích hợp hơn và liều

lớn hơn có thể được sử dụng mà không gây ra tác dụng phụ và có thể được phân phối trong nhiều lượng nhỏ vào nhiều thời điểm trong một ngày.

Ngoài ra, trong một phương án khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp chẩn đoán bệnh nhiễm HBV ở bệnh nhân, bao gồm i) cho chế phẩm trên đây tiếp xúc với mẫu; và ii) phát hiện phản ứng của chế phẩm này và mẫu. Trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế, phân tử liên kết (ví dụ, kháng thể đơn dòng) theo sáng chế có thể kết hợp với nguyên liệu đánh dấu để phát hiện chẩn đoán, khi cần, mà đã được biết người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này.

Trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế, mẫu này có thể, nhưng không giới hạn ở, bất kỳ một trong các mẫu được chọn từ nhóm bao gồm đờm, nước bọt, máu, mô hôi, tế bào phổi, dịch nhầy của mô phổi, mô đường hô hấp và nước dãi của đối tượng, và mẫu này có thể được chuẩn bị bằng cách sử dụng quy trình thường được biết với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này.

Ngoài ra, trong một phương án khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp cung cấp thông tin để chẩn đoán bệnh nhiễm HBV của bệnh nhân, bao gồm i) cho chế phẩm trên đây tiếp xúc với mẫu; và ii) phát hiện phản ứng của chế phẩm này và mẫu.

Ngoài ra, trong một phương án khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến kit để chẩn đoán HBV, bao gồm i) chế phẩm trên đây; và ii) bình. Trong kit chẩn đoán theo sáng chế, bình 2) chứa chất mang rắn. Phân tử liên kết theo sáng chế có thể được gắn vào chất mang rắn, và chất mang rắn này có thể là xốp hoặc không xốp, hoặc phẳng hoặc không phẳng.

Ngoài ra, trong một phương án khác theo sáng chế, sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện sự có mặt của HBV, bao gồm bước cho chế phẩm tiếp xúc với mẫu thu được từ bệnh nhân.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa epitop này. Polynucleotit mã hóa epitop bao gồm vị trí axit amin trên đây theo sáng chế có thể được sử dụng một mình ở dạng vacxin gen. Ở đây, polynucleotit này có thể được sử dụng một mình mà không kèm theo vector bất kỳ, và có thể được gắn vào vector virus hoặc không phải virus và sau đó chuyển vào cơ thể. Vector virus hoặc không virus không bị giới hạn, miễn là nó đã được biết là hữu ích trong lĩnh vực của sáng chế. Cụ thể làm ví dụ về vector virus có thể bao gồm adenovirus, virus liên hợp adeno, lentivirus, retrovirus, v.v..., và vector không virus có thể bao gồm polyme cation hóa, polyme không ion hóa, liposom, lipid, phospholipid, polyme ưa nước, polyme kỵ nước, và ít nhất một hỗn hợp được chọn từ chúng, nhưng sáng chế không bị

giới hạn vào đó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vectơ biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa epitop này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp hoặc virus, được biến nạp bằng vectơ biểu hiện. Trong một phương án, vi sinh vật tái tổ hợp hoặc virus có thể là *E. coli* tái tổ hợp, nấm men tái tổ hợp hoặc thể thực khuẩn.

Trong một phương án của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp biểu hiện, trên bề mặt của vi sinh vật hoặc virus, epitop chứa axit amin ở các vị trí 110, 118, 120 và/hoặc 147 của HBsAg. Ở đây, vectơ tái tổ hợp có trình tự mã hóa gen khởi đầu cảm ứng được hoặc protein tín hiệu và vi sinh vật bất kỳ hoặc virus chứa vectơ tái tổ hợp có thể được sử dụng. Cụ thể là, vi sinh vật thích hợp hoặc virus có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *E. coli* tái tổ hợp, nấm men tái tổ hợp hoặc thể thực khuẩn tái tổ hợp. Để biểu hiện epitop bao gồm các vị trí axit amin trên đây trên bề mặt của vi sinh vật hoặc virus, kỹ thuật biểu hiện đã được biết rõ trong lĩnh vực của sáng chế có thể được sử dụng. Cụ thể là, phương pháp biểu hiện theo sáng chế có thể được thực hiện theo cách, trong đó trình tự polynucleotit mã hóa epitop bao gồm các vị trí axit amin trên đây có thể liên kết với trình tự mã hóa gen khởi đầu hoặc protein tín hiệu mà gây ra sự biểu hiện trên bề mặt của tế bào vi sinh vật hoặc virus, hoặc trong đó một số gen mã hóa protein mà thường được biểu hiện trên bề mặt có thể bị mất và sau đó trình tự polynucleotit mã hóa epitop chứa các vị trí axit amin trên đây có thể được gắn xen vào đó, nhưng sáng chế không bị giới hạn vào đó. Khi sử dụng phương pháp biểu hiện theo sáng chế, epitop chứa các vị trí axit amin trên đây được biểu hiện trên bề mặt của vi sinh vật hoặc virus có thể được phân lập và được tinh chế và do đó có thể được sử dụng cho các mục đích của sáng chế, và ngoài ra, cũng có thể sàng lọc và thu được kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop bao gồm các vị trí axit amin trên đây ở trạng thái được biểu hiện trên bề mặt.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất quy trình sản sinh epitop, bao gồm bước ủ vi sinh vật tái tổ hợp hoặc virus.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin HBV bao gồm epitop trên đây hoặc polynucleotit mã hóa epitop này. Chế phẩm vaccin HBV này có thể chứa thêm tá dược được dùng. Tá dược này có tác dụng tăng cường sự tạo thành kháng thể khi được tiêm vào cơ thể, và tá dược bất kỳ có thể được sử dụng miễn là nó có thể đạt được các tác dụng theo sáng chế, và ví dụ về chúng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối nhôm (Al(OH)_3 , AlPO_4), squalen, sorbitan, polysorbitat 80,

CpG, liposom, cholesterol, MPL (monophosphoryl lipit A), và GLA (glucopyranosyl lipit A).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm phát hiện HBV, bao gồm epitop trên đây, hoặc polynucleotit mã hóa epitop này.

Các tác dụng có lợi

Theo sáng chế, epitop của HBsAg không bao gồm các gốc chính trong quyết định-*a* mà tạo ra đột biến trốn thoát khi sử dụng vacxin hiện hành hoặc HBIG, và do đó chế phẩm chứa kháng thể liên kết với nó hoặc chế phẩm vacxin chứa epitop trên đây có khả năng bị giảm hiệu lực do đột biến trốn thoát là rất thấp. Do đó, chế phẩm kháng thể hoặc vacxin này có thể là rất hữu ích trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị HBV.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn nhờ các ví dụ sau đây, các ví dụ này được đưa ra để minh họa, nhưng không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các tài liệu được trích dẫn ở đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn trong đơn này.

Ví dụ 1: Nhận diện vị trí liên kết của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng kháng nguyên có đột biến mất đoạn

Để xác định vị trí liên kết của kháng thể theo sáng chế với HBsAg, HBsAg kiểu hoang và nhiều đột biến mất đoạn khác nhau của HBsAg được tạo ra và khả năng liên kết của chúng được đo bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) sử dụng các thể thực khuẩn.

Ở đây, việc thử nghiệm được thực hiện trong hai bước. Cụ thể là, HBsAg (226 a.a) được chia thành ba vùng, cụ thể là các trình tự axit amin 1~100, 101~160, và 161~226, và các vectơ biểu hiện chứa các đột biến trong đó các vùng tương ứng được làm mất và chứa các typ hoang được tạo ra (FIG. 1) và mỗi protein được biểu hiện trên bề mặt thể thực khuẩn và sau đó cường độ liên kết của chúng với kháng thể theo sáng chế được đo.

Ví dụ 1-1. Tạo ra các vectơ biểu hiện chứa HBsAg kiểu hoang và ba loại HBsAg đột biến

Để biểu hiện, trên bề mặt thể thực khuẩn, HBsAg kiểu hoang và ba phần được chia ra của nó, gọi là các protein đột biến mất đoạn, việc tách dòng được thực hiện bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện thể thực khuẩn. Phương pháp thử nghiệm

chi tiết là như sau. Để tách dòng HBsAg kiểu hoang và các đột biến có vị trí mất đoạn, việc khuếch đại gen được thực hiện với chúng bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), sử dụng vector HBV chứa trình tự bazơ gen HBsAg của HBV kiểu gen C làm khuôn (Khoa dược lý, Konkuk University School of Medicine), sau đó xử lý bằng enzym giới hạn *Sfi* I và sau đó gắn xen vào vector biểu hiện thể thực khuẩn đã được xử lý bằng cùng một enzym giới hạn. Plasmit đã tạo ra được chiết bằng cách sử dụng kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Đức, Cat# 27106), và cuối cùng trình tự bazơ của kháng thể được nhận diện bằng cách phân tích trình tự bazơ sử dụng ADN đã chiết. Tên của các dòng hoàn chỉnh và các vị trí HBsAg được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

[Bảng 1] Thông tin dòng để nhận diện vị trí liên kết của kháng thể theo sáng chế

Tên dòng	Mô tả dòng	Vị trí HBsAg (axit amin)
HBsAg đầy đủ	Kiểu hoang	1~226
Vùng 2 + 3	Các axit amin 1~100 được làm mất	101~226
Vùng 1 + 3	Các axit amin 101~160 được làm mất	1~100 & 161~226
Vùng 1 + 2	Các axit amin 161~226 được làm mất	1~160

Trong ví dụ này, trình tự axit amin đầy đủ của HBsAg kiểu hoang của HBV kiểu gen C (typ phụ *adr*) được thể hiện bằng SEQ ID NO:3, và thông tin trình tự có thể được xác nhận trong Ngân hàng gen số GQ872210.1.

Ví dụ 1-2. Đánh giá cường độ liên kết của kháng thể theo sáng chế với HBsAg kiểu hoang và ba loại HBsAg đột biến

Để thực hiện thử nghiệm liên kết với tất cả hoặc một số HbsAg đã tách dòng, mỗi vector được gắn xen vào *E. coli* biểu hiện (ER2738, Lucigen, USA, Cat# 60522-2) bằng điện di, và *E. coli* kháng kháng sinh (ampixilin) bắt đầu phát triển có chọn lọc từ ngày tiếp theo. Sau khi phát triển trong khoảng 10 giờ, *E. coli* được gây nhiễm bằng thể thực khuẩn và loại kháng sinh khác (kanamycin) được sử dụng để nuôi chọn lọc *E. coli* đã được gây nhiễm. Để chiết thể thực khuẩn vào ngày tiếp theo, *E. coli* được tách ra bằng cách sử dụng kỹ thuật ly tâm, và dịch nổi được xử lý bằng polyetylen glycol (PEG) và được để yên trong bể đá trong 30 phút, sau đó thể thực khuẩn này được tách lại sử dụng kỹ thuật ly tâm. Thể thực khuẩn đã tách ra được dung giải, và dịch nổi được lọc, nhờ đó chiết được thể thực khuẩn tinh khiết có toàn bộ hoặc một số HbsAg trên bề mặt của chúng.

Để đánh giá định lượng cường độ liên kết của kháng thể theo sáng chế với HBsAg kiểu hoang và đột biến được biểu hiện trên bề mặt thể thực khuẩn, ELISA được thực hiện. Cụ thể là, kháng thể Fc kháng người (Jackson ImmunoResearch, USA, Cat# 109-006-098) được trộn với đệm phủ (Sigma, USA, Cat# c3041) và đĩa 96 giếng được phủ bằng đệm này ở 4°C trong một ngày, sau đó liên kết kháng thể theo sáng chế với nó. Sau đó, thể thực khuẩn đã chiết được gắn với kháng thể theo sáng chế và, sử dụng kháng thể protein M13 thể thực khuẩn liên hợp enzym HRP (GE healthcare, USA, 27-9421-01) và sau đó là axit 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonic) (ABTS, KPL, USA, Cat# 50-62-00), các lượng thể thực khuẩn chứa HBsAg kiểu hoang và đột biến đã liên kết với kháng thể theo sáng chế được đo. Ở đây, để đo các lượng của tất cả các thể thực khuẩn thuộc từng nhóm thử nghiệm riêng biệt mà trên đó HBsAg được biểu hiện trên bề mặt của chúng, kháng thể kháng HA (Genescript, USA, Cat# A00168-100) được phủ lên đĩa 96 giếng ở 4°C trong một ngày, thể thực khuẩn đã chiết được gắn với kháng thể, và phép đo được thực hiện theo cách giống như trên đây.

Kết quả là, chỉ trong mẫu thể thực khuẩn vùng 1 + 3, trong đó HBsAg mà các vị trí axit amin 101 đến 160 được làm mất được biểu hiện trên bề mặt của nó có cường độ liên kết đặc biệt thấp với kháng thể theo sáng chế được quan sát thấy (FIG. 2). Điều này có nghĩa là vị trí liên kết chính của kháng thể theo sáng chế nằm trong Vùng 2.

Ví dụ 2: Nhận diện epitop của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng kháng nguyên đột biến mất đoạn nối tiếp

Để nhận diện epitop dựa trên vị trí liên kết chính của kháng thể theo sáng chế như được xác định trong ví dụ 1, các đột biến mất đoạn nối tiếp, trong đó 15 axit amin được làm mất lần lượt từ vị trí axit amin khởi đầu 101 của Vùng 2, được tạo ra và sau đó được bộc lộ với bề mặt của thể thực khuẩn, sau đó đo cường độ liên kết của chúng với kháng thể theo sáng chế bằng ELISA.

Ví dụ 2-1. Tạo ra các vectơ biểu hiện của bốn loại HBsAg đột biến

Các đột biến trong đó mỗi axit amin trong số 15 axit amin được làm mất đoạn dựa trên các dòng Vùng 2 + 3 được tạo ra. Tên của các dòng hoàn chỉnh và các vị trí HBsAg được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây (FIG. 3). Quy trình tách dòng chi tiết trùng với Ví dụ 1-1 và do đó phần mô tả của chúng được loại bỏ.

[Bảng 2] Thông tin dòng để nhận diện epitop của kháng thể theo sáng chế

Tên dòng	Mô tả dòng	Vị trí HBsAg (axit amin)
Vùng 2+3	Mất đoạn axit amin 1~100	101~226
Vùng 2+3 Del 1	Mất đoạn axit amin 1~115	116~226
Vùng 2+3 Del 2	Mất đoạn axit amin 1~130	131~226
Vùng n 2+3 Del 3	Mất đoạn axit amin 1~145	146~226
Vùng 2+3 Del 4	Mất đoạn axit amin 1~160	161~226

Ví dụ 2-2. Đo cường độ liên kết của kháng thể theo sáng chế và bốn loại HBsAg đột biến

ELISA được thực hiện bằng cách chiết các thể thực khuẩn trong đó bốn đột biến mất đoạn nối tiếp được bộc lộ lên bề mặt theo cách giống như trong Ví dụ 1-2.

Kết quả là, cường độ liên kết với kháng thể theo sáng chế bị giảm đáng kể trong Vùng 2+3 del 1, có nghĩa là quyết định kháng nguyên chính (epitop) của kháng thể theo sáng chế có mặt ở các vị trí axit amin từ 101 đến 115 (FIG. 4).

Ví dụ 3. Nhận diện epitop của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng một kháng nguyên đột biến axit amin duy nhất

Để nhận diện chính xác hơn epitop của kháng thể theo sáng chế, việc gây đột biến ngẫu nhiên được đưa vào HBsAg (typ phụ *adr*) sử dụng công nghệ tạo đột biến bằng súng (shotgun) của Integral Molecular, USA (J Am Chem Soc. 2009; 131(20): 6952~6954), nhờ đó khả năng liên kết của kháng thể theo sáng chế với mỗi kháng nguyên đột biến được đo. Các đặc trưng của thư viện kháng nguyên đột biến được sử dụng để thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây. Mỗi dòng của thư viện đã tạo ra được biểu hiện trong các tế bào HEK-293T được ủ trên đĩa 384 giếng.

[Bảng 3] Các đặc trưng của thư viện gây đột biến ngẫu nhiên HBsAg được sử dụng cho thử nghiệm nhận diện epitop

Tổng số lượng dòng của thư viện	456
Số lượng gốc HBsAg được gây đột biến (tổng số là 226)	226 (100%)
Số lượng dòng được gây đột biến trong một gốc	367

Số lượng dòng được gây đột biến trong hai gốc	78
Số lượng dòng được gây đột biến trong ba hoặc nhiều gốc	11

Ví dụ 3-1: Xác nhận epitop của kháng thể

Khả năng liên kết của kháng thể theo sáng chế với kháng nguyên đột biến được đo ba lần bằng FACS miễn dịch huỳnh quang, và việc chuẩn hóa được thực hiện dựa vào hoạt tính phản ứng với HBsAg kiểu hoang. Ngoài ra, các kết quả về khả năng liên kết sử dụng orb43805, mà là kháng thể đơn dòng chuột kháng HBsAg, làm kháng thể đối chứng, được sử dụng để xác nhận độ tin cậy của kết quả thử nghiệm và để thiết lập các tiêu chuẩn để lựa chọn epitop. Cụ thể là, gốc đột biến, xuất hiện trong dòng mà trong đó hoạt tính liên kết với kháng thể theo sáng chế nhỏ hơn 15% (<15% WT) được so sánh với HBsAg kiểu hoang trong khi hoạt tính liên kết với orb43805 làm kháng thể đối chứng là 55% hoặc cao hơn (>55% WT) được so sánh với hoạt tính liên kết với HBsAg kiểu hoang, được chọn làm gốc giới hạn cần thiết cho sự liên kết của kháng thể theo sáng chế.

Dựa trên các kết quả thử nghiệm, các gốc giới hạn cho kháng thể theo sáng chế có nguồn gốc từ tổng số bốn kháng nguyên đột biến, và do đó, epitop của kháng thể theo sáng chế được xác nhận là có các axit amin ở các vị trí 110, 118, 120 và 147 của HBsAg. Các kết quả thử nghiệm chi tiết được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

[Bảng 4] Các gốc giới hạn của HBsAg với kháng thể theo sáng chế

Đột biến	Hoạt tính phản ứng (% WT)	
	Kháng thể theo sáng chế	orb43805
L110P	7,9	75,7
T118A	8,3	56,3
P120L	5,7	61,4
C147R	9	98,6

Trong số chúng, axit amin ở vị trí 110 nằm trong vị trí liên kết được nhận diện bằng thử nghiệm của Ví dụ 2 và do đó có thể được kết luận là epitop giới hạn cho kháng thể theo sáng chế. Các axit amin ở các vị trí 118, 120 và 147 không có mặt ở vị trí liên kết được nhận diện bằng thử nghiệm theo ví dụ 2. Tuy nhiên trong trường hợp thử nghiệm đột biến mất đoạn, các thay đổi về cấu hình xảy ra do việc loại bỏ nhiều axit amin, và do đó khả năng một số epitop có thể không được nhận

diện là cao.

Cụ thể là, HBsAg duy trì được cấu trúc ba chiều bằng các liên kết disulfid như C107-C138, C139-C147 và v.v... Khi sự liên kết này bị phá hủy do đột biến mất đoạn của Ví dụ 2, cấu trúc ban đầu bị phá vỡ do đó tác động đến liên kết của kháng thể. Trong ví dụ này, gốc epitop, mà không được phát hiện ra trong thử nghiệm gây đột biến mất đoạn của ví dụ 2, được nhận diện bằng cách thử nghiệm một đột biến duy nhất (FIG. 5). Vì axit amin ở vị trí 147 là gốc để tạo ra liên kết disulfid quan trọng đối với việc duy trì cấu trúc ba chiều của HBsAg, nó có thể tham gia vào sự liên kết với kháng thể theo sáng chế nhờ đó epitop cấu hình ở các vị trí 110, 118 và 120 thường được tạo ra.

Ví dụ 4: Nhận diện các đặc trưng của epitop của kháng thể theo sáng chế

Để xác nhận epitop cấu hình có được tạo ra từ vị trí liên kết đã được chứng minh bằng ví dụ 1, 2 và 3 hay không, phân tích thẩm tách Tây được thực hiện. Ở đây, việc sử dụng cả gel điện di gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit (SDS-PAGE) tương ứng với các điều kiện biến tính protein và gel Native-PAGE tương ứng với các điều kiện không biến tính, sự khác biệt về cường độ liên kết của kháng thể theo sáng chế phụ thuộc vào cấu trúc của HBsAg được đo. Cụ thể là, sự tạo thành epitop cấu hình được quan sát thấy khi không tuyến tính hóa và khi tuyến tính hóa bằng cách loại bỏ liên kết disulfid quan trọng đối với việc tạo thành cấu trúc bậc ba của HBsAg, khi có mặt hoặc vắng mặt chất khử trong các điều kiện biến tính protein.

4-1. Thử nghiệm thẩm tách Tây sử dụng Native-PAGE

Để đánh giá xem kháng thể theo sáng chế có thể nhận biết được hay không epitop cấu hình của HbsAg đã được tạo ra một cách tự nhiên, thử nghiệm thẩm tách Tây được thực hiện bằng cách sử dụng gel NativePAGE không có SDS. Cụ thể là, dung dịch chứa HBsAg được trộn với dung dịch nạp mẫu NativePAGE™ (Invitrogen, USA, Cat# BN2003) và chất phụ gia mẫu NativePAGE™ 5% G-250 (Invitrogen, USA, Cat# BN2004), và sau đó nạp lên NativePAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris Protein Gel (Invitrogen, USA, Cat# BN1003BOX). Sau khi gel được chạy trong khoảng 2 giờ, protein của gel được chuyển lên màng PVDF (Invitrogen, USA, Cat# LC2002) bằng cách sử dụng dung dịch đệm chuyển NuPAGE® (Invitrogen, USA, Cat# NP0006). Màng được phong bế bằng dung dịch đệm nước muối đệm phosphat (PBS)-Tween20 chứa 5% sữa tách bơ trong 1 giờ, sau đó kháng thể sơ cấp được bổ sung vào đệm PBS-Tween20

chứa 3% sữa tách bơ và màng này được làm lạnh qua đêm với nó. Ở đây, với đối chứng dương cho kháng thể theo sáng chế, chất chuẩn của Tổ chức y tế Thế giới (WHO) (Tiêu chuẩn quốc tế WHO cho globulin miễn dịch kháng HBs, người (mã: 07/164)) được sử dụng, và với đối chứng âm, kháng thể kháng HER2, mà là kháng thể được làm tương thích với người kháng thụ thể tăng trưởng biểu bì người 2 (HER2), được sử dụng. Màng được rửa đủ bằng dung dịch đệm PBS-Tween20, và để làm kháng thể thứ cấp, Fc kháng người được liên hợp peroxidaza của cây cải ngựa (HRP) (Thermo Scientific, USA, Cat# 31413) được trộn với đệm PBS-Tween20 chứa 3% sữa tách bơ và sau đó được xử lý trong 1 giờ. Màng này được rửa đủ bằng dung dịch đệm PBS-Tween20 và sau đó được xử lý bằng cơ chất hóa phát quang tăng cường (ECL), sau đó sự liên kết của HBsAg và mỗi kháng thể thử nghiệm được quan sát bằng cách sử dụng ChemiDoc (Bio-Rad, USA).

Dựa vào kết quả thử nghiệm, HBsAg, cấu trúc bậc ba tự nhiên của nó được duy trì, thể hiện cường độ liên kết rất cao với kháng thể theo sáng chế (FIG. 6a). Tính đặc hiệu của liên kết này được xác nhận dựa trên các kết quả thử nghiệm của chất chuẩn WHO là đối chứng dương và kháng thể kháng HER2 là đối chứng âm. Chuẩn WHO là kháng thể đa dòng được tinh chế từ máu người, và bao gồm tất cả các kháng thể có thể nhận diện các epitop tuyến tính và cấu hình của HBsAg, và sự liên kết của nó được xác nhận trong thử nghiệm này, và kháng thể kháng HER2 đóng vai trò là kháng thể không đặc hiệu không liên kết.

Trong khi đó, khối lượng phân tử của HBsAg được biết là khoảng 23 kd và khối lượng phân tử của HBsAg đã liên kết với kháng thể trong thử nghiệm này là rất lớn, trong đó sự tạo thành HBsAg tự nhiên ở dạng đặc hiệu (hạt dưới virus có kích thước 22nm) bằng cách liên hợp tự phát đã được biết rõ, có thể được kết luận là hiện tượng tự nhiên (Ira Berkower và đồng tác giả, *J Virol.*, Mar 2011; 85(5): 2439-2448).

4-2. Thử nghiệm thẩm tách Tây sử dụng SDS-PAGE

Để thử nghiệm rõ ràng hơn, các đặc trưng về cấu hình của epitop với kháng thể theo sáng chế, thẩm tách Tây được thực hiện bằng cách sử dụng gel SDS-PAGE và chất khử. Các quy trình thử nghiệm chung là giống như trong ví dụ 4-1, và được mô tả tóm tắt dưới đây.

Trước hết, dung dịch HBsAg được trộn với dung dịch nạp mẫu SDS-PAGE, được phản ứng ở 95°C trong 5 phút, và sau đó được nạp lên 4-20% gel Mini-PROTEAN TGX Precast và gel này được chạy. Ở đây, hai loại mẫu nạp được điều chế, một trong số đó được bổ sung thêm chất khử (chất khử mẫu NuPAGE (10x),

Life Technologies, USA) để nhờ đó gây ra sự biến tính protein hoàn toàn, và mẫu còn lại không chứa chất khử để duy trì liên kết disulfit của HBsAg để nhờ đó gây ra sự biến tính không hoàn toàn. Sau khi chạy, HBsAg được chuyển sang màng nitroxenluloza (NC), được phong bế và làm lạnh với kháng thể sơ cấp qua đêm. Ví dụ về kháng thể sơ cấp bao gồm kháng thể theo sáng chế, chất chuẩn WHO, HBIg (Hepabig, Green Cross, Korea), và kháng thể kháng HER2. Các quy trình tiếp theo là giống như trên đây, và phân mô tả chúng được loại bỏ.

Kết quả là, kháng thể theo sáng chế không liên kết với HBsAg đã được tuyến tính hóa hoàn toàn không chứa liên kết disulfit, và liên kết hiệu quả với HbsAg, trong đó sự biến tính một phần xảy ra. Chuẩn WHO và HBIg đóng vai trò đối chứng dương là các kháng thể đa dòng như đã mô tả trong ví dụ 4-1, và bao gồm kháng thể có thể nhận biết epitop tuyến tính và do đó được liên kết với HBsAg, mà đã được tuyến tính hóa hoàn toàn trong các điều kiện khử. Kháng thể kháng HER2 không liên kết bất kể cấu trúc của HBsAg. Cấu trúc bậc ba của HBsAg, tầm quan trọng của liên kết disulfit được tạo ra trong protein hoặc giữa các protein đã được biết đến rộng rãi (Mangold CM et al., Arch Virol., 1997;142(11):2257-67).

Do đó, việc duy trì cấu trúc bậc ba của HbsAg nhờ liên kết disulfit là thiết yếu đối với sự liên kết của kháng thể theo sáng chế, và do đó kháng thể theo sáng chế có thể được kết luận là nhận biết được epitop cấu hình của HBsAg.

Ví dụ 5: Đánh giá hoạt tính liên kết của kháng thể theo sáng chế với nhiều loại đột biến khác nhau của quyết định- α

Để đánh giá hoạt tính liên kết của kháng thể theo sáng chế với bốn kháng nguyên đột biến của quyết định- α , ELISA được thực hiện. Các kháng nguyên, mà đã được gây đột biến ở các vị trí axit amin 126, 129, 133, và 143, được tìm thấy trong các đột biến trốn thoát được tạo ra do vacxin hoặc globulin miễn dịch viêm gan B (HBIg) đã được báo cáo ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mãn tính và cũng gây ra các vấn đề bao gồm khó đo kháng nguyên bề mặt khi chẩn đoán (Horvat và đồng tác giả, Lab medicine, vol. 42(8): 488-496, 2011). Các protein tái tổ hợp của các kháng nguyên này được mua từ ProSpec Bio.

FIG. 7 thể hiện hoạt tính phản ứng của các kháng thể 1, 2 theo sáng chế với kháng nguyên đột biến của quyết định- α , và các kết quả dương (+) và âm (-) phụ thuộc vào sự có mặt hoặc vắng mặt của hoạt tính phản ứng được tóm tắt trong Bảng 5 dưới đây.

[Bảng 5] Các kết quả ELISA về hoạt tính liên kết của kháng thể 1, 2 theo sáng chế với HBsAg đột biến của quyết định-*a*

HBsAg	Kháng thể theo sáng chế 1	Kháng thể theo sáng chế 2
adw T126N	+	+
adw Q129H	+	+
adw M133H	+	+
adw T143K	+	+

Theo kết quả thử nghiệm, kháng thể 1, 2 theo sáng chế có khả năng liên kết với nhiều loại HBsAg đột biến khác nhau của quyết định-*a*. Vì kháng thể theo sáng chế có thể nhận biết epitop ở các vị trí 110, 118, 120 và/hoặc 147 của HBsAg, nó có thể không bị ảnh hưởng bởi quyết định-*a* có tỉ lệ đột biến cao (các axit amin 124-147).

Axit amin ở vị trí 147 là gốc quan trọng đối với việc tạo ra cấu hình, và đột biến của gốc này đã được biết là có ảnh hưởng nghiêm trọng đến khả năng gây nhiễm, và do đó tỉ lệ đột biến thực sự được mong đợi là rất thấp.

Do đó, chế phẩm vaccin chứa epitop ở các vị trí 110, 118, 120 và/hoặc 147 hoặc kháng thể liên kết với epitop trên đây có khả năng bị giảm hiệu lực thấp do các đột biến trốn thoát, và là hữu ích trong việc phòng ngừa và điều trị HBV.

Ví dụ 6: Kiểm tra hoạt tính trung hòa *in-vitro* kháng HBV

Để kiểm tra hoạt tính trung hòa của kháng thể theo sáng chế kháng lại nhiều kiểu gen khác nhau của HBV, thử nghiệm trung hòa *in-vitro* được thực hiện.

Thử nghiệm trung hòa *in-vitro* đối với HBV là phương pháp đánh giá hoạt tính trung hòa của kháng thể bằng cách đo lượng virus nội bào và ngoại bào ở giai đoạn hiệu quả nhất của quá trình tăng sinh virus, để đánh giá mức độ ức chế sự gây nhiễm tế bào gan người bởi virus tùy theo các điều kiện điều trị của mỗi kháng thể. Lượng virus nội bào được đo từ lượng ADN HBV đã được tăng sinh, và lượng virus đã tăng sinh và tiết ra ngoài tế bào được đo từ lượng HBsAg và ADN HBV trong môi trường này. Ở đây, ADN HBV được định lượng bằng PCR thời gian thực sử dụng đầu dò TaqMan và HBsAg được định lượng bằng thử nghiệm miễn dịch hóa phát quang (CLIA).

6-1. Thử nghiệm trung hòa *in-vitro* lần thứ nhất

Các tế bào gan người cần thiết để gây nhiễm HBV được tạo ra bằng quy

trình truyền dịch collagenaza hai bước từ chuột khảm uPA/SCID có mô gan được làm tương thích với người một ngày trước khi chủng ngừa virus. Các tế bào gan đã tách ra được sử dụng ở nồng độ 4×10^5 mỗi giếng trên đĩa 24 giếng được phủ bằng collagen typ 1. Với môi trường nuôi cấy, 500 μ l DMEM (Gibco, USA, 11965), chứa 10% FBS (Atlas Biologicals, USA, F0500A), 1x penixilin/streptomycin (Gibco, USA, 15140) và 20mM HEPES (Gibco, USA, 15630), được sử dụng cho mỗi giếng. Các tế bào gan đã tạo ra được ủ trong máy ủ tế bào đã được làm ẩm 5% CO₂ ở 37°C trong 24 giờ.

Sự gây nhiễm virus được thực hiện theo cách trong đó bốn kiểu gen của HBV, được gọi là A (số truy cập ngân hàng gen: AB246345.1), B (Số truy cập ngân hàng gen: AB246341), C (Số truy cập ngân hàng gen: AB246338.1), và D (Số truy cập ngân hàng gen: AB246347), mỗi kiểu gen này được sản sinh ra từ chuột khảm có mô gan được làm tương thích với người, được trộn với kháng thể theo sáng chế và sau đó được sử dụng ở nồng độ virus là 2×10^6 mỗi giếng. Mô tả chi tiết về quy trình này là như sau.

A. Điều chế hỗn hợp chủng ngừa virus

Virus và mỗi kháng thể được trộn để thể tích cuối cùng là 100 μ l bằng cách sử dụng môi trường dHCGM (DMEM+10% FBS, 44mM NaHCO₃, 15 μ g/ml l-prolin, 0,25 μ g/ml insulin, 50nM dexamethason, 5ng/ml EGF, 0,1mM Asc-2p, 2% DMSO), và sau đó được phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Ở đây, nồng độ virus là 2×10^6 , và kháng thể theo sáng chế được pha loãng ở bốn nồng độ là 10, 1, 0,1, và 0,01 μ g/ml.

B. Chủng ngừa virus

125 μ l môi trường dHCGM và 25 μ l 40% PEG (Sigma, USA, P1458) được trộn và được bổ sung thêm hỗn hợp virus/kháng thể được tạo ra trong bước A trên đây, nhờ đó thu được 250 μ l hỗn hợp chủng ngừa cuối cùng. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ khỏi các tế bào đã tạo ra và hỗn hợp chủng ngừa được đưa vào, sau đó ủ trong 24 giờ.

C. Thay đổi môi trường và nuôi cấy, và điều chế mẫu phân tích

Sau khi chủng ngừa virus, các tế bào gan được ủ trong tổng số 12 ngày, và việc rửa tế bào và thay đổi môi trường được thực hiện vào ngày thứ 1, thứ 2 và thứ 7. Môi trường nuôi cấy này được loại bỏ, việc rửa được thực hiện với 500 μ l DMEM+10% FBS, và cùng một lượng môi trường dHCGM mới được đưa vào. Với việc thay đổi môi trường vào ngày thứ 7, môi trường nuôi cấy này được thu

gom với các lượng tương ứng là 300µl và 30µl để định lượng HBsAg ngoại bào và ADN HBV được tiết ra từ các tế bào này và được bảo quản ở -20°C đến khi phân tích.

Sau khi kết thúc việc ủ trong 12 ngày, tất cả các tế bào và môi trường được sử dụng cho phân tích định lượng virus nội bào/ngoại bào. Môi trường nuôi cấy được thu gom riêng để đo HBsAg và ADN HBV theo cách giống như trước đây, và các tế bào được thu gom theo cách trong đó mỗi giếng được rửa một lần bằng 500µl DMEM+10% FBS và sau đó được dung giải bằng 500µl dung dịch SMITEST (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.). Việc chiết ADN HBV được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.).

D. Phân tích mẫu

Việc định lượng ADN HBV được thực hiện bằng PCR thời gian thực bằng cách sử dụng đoạn dò TaqMan, các chất phản ứng TaqMan PCR Core Reagents (Life Technologies, USA), và hệ thống phát hiện trình tự ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, USA). Ngoài ra, HBsAg được định lượng bằng ARCHITECT (Abbott, USA) là hệ thống tự động được hỗ trợ CLIA.

[Bảng 6] Trình tự đoạn môi/đoạn dò cho PCR thời gian thực để định lượng HBV

Đoạn môi/đoạn dò	Trình tự	SEQ ID NO:
Đoạn môi xuôi	CACATCAGGATTCCTAGGACC	4
Đoạn môi ngược	AGGTTGGTGAGTGATTGGAG	5
Đoạn dò TaqMan	CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC(Nhuộm: FAM đối với 5', TAMRA đối với 3')	6

[Bảng 7] Chương trình PCR thời gian thực

Chương trình	Chu trình
50°C 2 phút	1
95°C 10 phút	1
95°C 20 giây → 60°C 1 phút	53
Ngưỡng	0,1

Các kết quả thử nghiệm cho các kháng thể 1, 2 theo sáng chế được thể hiện

trong các FIG. 8a đến 8d và 9a đến 9d tùy thuộc vào kiểu gen virus trong mỗi hạng mục đo.

Các lượng ADN HBV nội bào phụ thuộc vào nồng độ điều trị của mỗi kháng thể được so sánh và phân tích. Cụ thể là, các kháng thể 1, 2 theo sáng chế mà được chọn dựa trên cường độ liên kết với HBsAg typ phụ *adr* của kiểu gen C, có thể được phát hiện ra là có hoạt tính trung hòa mạnh kháng lại kiểu gen C. Trong trường hợp mà trong đó lượng ADN HBV bị giảm ít nhất là 400 lần ở HBIg đóng vai trò là đối chứng dương so với kháng thể kháng HER2 đóng vai trò là đối chứng âm, cùng một mức giảm ADN virus cũng được thể hiện trong mẫu được xử lý bằng 1µg/ml kháng thể theo sáng chế 2, tương ứng với 1/10 lượng điều trị của nó. Như với kháng thể 1 theo sáng chế, lượng ADN HBV bị giảm 100 lần ngay cả ở nồng độ điều trị thấp là 0,1µg/ml, do đó giữ được hoạt tính trung hòa khá cao. Ngoài ra, hoạt tính trung hòa của kháng thể 1, 2 theo sáng chế kháng lại các kiểu gen A và B là cao gấp nhiều hơn 2 lần hoạt tính trung hòa tối đa so với khi HBIg được sử dụng làm đối chứng dương, và hoạt tính trung hòa kháng kiểu gen D được duy trì cao ngay cả ở nồng độ thấp là 0,1µg/ml (kháng thể theo sáng chế 1) hoặc 1µg/ml (kháng thể theo sáng chế 2) (FIG. 8a đến 8d).

Hoạt tính trung hòa của kháng thể 1, 2 theo sáng chế kháng lại bốn kiểu gen A, B, C và D được phát hiện ra là rất giống với các kết quả định lượng HBsAg ngoại bào được đo trong môi trường nuôi cấy (FIG. 9a đến 9d).

Kết luận, dựa vào các kết quả đo hoạt tính trung hòa *in-vitro* kháng lại bốn kiểu gen A, B, C, và D của HBV, các kháng thể 1, 2 theo sáng chế biểu hiện hoạt tính trung hòa cao kháng lại tất cả các virus được sử dụng.

Ví dụ 7: Đo các đặc trưng liên kết với các kiểu gen kháng nguyên bề mặt virus khác nhau thu được từ các bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mãn tính

Để đánh giá các kháng thể 1, 2 theo sáng chế có thể biểu hiện hoạt tính trung hòa bằng cách liên kết với nhiều loại kiểu gen virus khác nhau đang phổ biến trên toàn thế giới trong các ứng dụng thực tế hay không, ELISA “bánh kẹp” được thực hiện bằng cách sử dụng panen tham chiếu của Tổ chức y tế Thế giới (WHO) (Panen tham chiếu quốc tế WHO lần thứ nhất đối với các kiểu gen HBV cho thử nghiệm HBsAg, mã PEI 6100/09) chứa nhiều kiểu gen kháng nguyên bề mặt virus khác nhau thu được từ huyết thanh bệnh nhân. Thông tin chi tiết về chuẩn tương ứng được thể hiện trong bảng 8 dưới đây, và phương pháp thử nghiệm là như sau.

Hai kháng thể có nồng độ là 2µg/ml được chia thành các lượng 100µl vào

mỗi giếng của vi phiên 96 giếng (Nunc, Denmark, 449824) đã phủ bằng kháng thể IgG Fc γ (gamma) kháng người (Jackson ImmunoResearch, U.S.A, 109-006-098) và sau đó được hấp thu vào đó. Sau khi rửa, đĩa này được xử lý bằng nước muối đệm phosphat (Teknova, USA, D5120) chứa 3% albumin huyết thanh bò (BSA) và nhờ đó được phong bế. Sau khi rửa lại, 15 mẫu huyết thanh của panen kiểu gen HBsAg được chia thành các lượng 100 μ l và được ủ ở 37°C trong 90 phút. Ở đây, mỗi mẫu huyết thanh được pha loãng thích hợp bằng nước muối đệm phosphat (Teknova, USA, D5120) chứa 1% BSA để có độ hấp thụ là khoảng 0,8 đến 1,2 ở 450/620nm. Để phát hiện HBsAg đã gắn vào kháng thể, kháng thể kháng nguyên bề mặt kháng HBV thô được gắn nhãn peroxidaza (Thermo Scientific, U.S.A., PA1-73087) được xử lý ở 37°C trong 60 phút. Sự hiện màu, kết thúc phản ứng, và đo độ hấp thụ được thực hiện theo cách giống như trong ví dụ 5. Khả năng phản ứng của hai kháng thể với mỗi kiểu gen kháng nguyên bề mặt HBV được lập đồ thị và được phân tích bằng cách sử dụng Excel (Microsoft, U.S.A.) (FIG. 10).

Dựa vào các kết quả phân tích, cả hai kháng thể 1, 2 theo sáng chế đều liên kết hiệu quả với 15 mẫu HBsAg. Như đã mô tả trên đây, các mẫu kháng nguyên bề mặt này là huyết thanh được bào chế thực sự từ máu của bệnh nhân, và được phủ bảy kiểu gen từ A đến H ngoại trừ kiểu gen G, trong tổng số 8 kiểu gen HBV. Ngoài ra, các kiểu gen A, B, C, D, và F có nhiều kiểu gen phụ khác nhau bao gồm hai đến 3 mẫu kiểu gen phụ và typ phụ (typ huyết thanh) mà chiếm ưu thế đối với mỗi kiểu gen, có nghĩa là panen kiểu gen HBV của WHO được sử dụng cho thử nghiệm gần như thể hiện các kiểu gen HBV phổ biến nhất trên toàn thế giới. Panen này không bao gồm kiểu gen G, nhưng kiểu gen G không có kiểu gen phụ mà đã được báo cáo đến nay và được mô tả là typ phụ (typ huyết thanh) adw2, và do đó hoạt tính liên kết của các kháng thể 1, 2 theo sáng chế với kiểu gen G có thể dự đoán được dựa vào các kết quả thử nghiệm của 5 mẫu adw2 nằm trong panen này.

Do đó, các kháng thể 1, 2 theo sáng chế thể hiện hoạt tính liên kết tốt hơn đối với tất cả 15 mẫu, nghĩa là hai kháng thể này có thể liên kết với tất cả các kiểu gen HBV trên toàn thế giới để biểu hiện hoạt tính trung hòa tương ứng.

[Bảng 8] Thông tin chi tiết về panen kháng nguyên bề mặt HBV trong huyết thanh thu được từ bệnh nhân (Panen tham chiếu quốc tế WHO lần thứ nhất đối với các kiểu gen HBV cho các thử nghiệm HBsAg, mã PEI 6100/09)

Mẫu #	Nguồn gốc	Kiểu gen	Kiểu gen phụ	Kiểu phụ
-------	-----------	----------	--------------	----------

1	Nam Phi	A	A1	adw2
2	Braxin		A1	adw2
3	Đức		A2	adw2
4	Nhật	B	B1	adw2
5	Nhật	C	B2	adw2
6	Nhật		C2	adr
7	Nhật		C2	adr
8	Nga	D	C2	adr
9	Đức		D1	ayw2
10	Nga		D2	ayw3
11	Nam Phi	E	D3	ayw2
12	Tây Phi		N/A	ayw4
13	Braxin	F	F2	adw4
14	Braxin	H	F2	adw4
15	Đức		N/A	adw4

Ví dụ 8: Đánh giá các đặc trưng liên kết với các virus kháng thuốc khác nhau

Các đặc trưng liên kết giữa các kháng thể 1, 2 theo sáng chế và các đột biến kháng chất ức chế HBV polymeraza hữu ích rộng rãi đối với các bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mãn tính, ví dụ lamivudine (LMV), adefovir (ADV), clevudine (CLV), và entecavir (ETV), được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA “bánh kẹp” tương tự như trong Ví dụ 7. Tất cả các virus đột biến kháng bao gồm virus kiểu hoang được sử dụng trong thử nghiệm là các virus được tách dòng tại Khoa dược lý, Konkuk University School of Medicine, sử dụng ADN HBV thu được từ máu của bệnh nhân có sự đề kháng với việc điều trị bằng thuốc tương ứng, và là các chủng, mà sự kháng thuốc của chúng đã được xác nhận bằng thực nghiệm bằng cách tải nạp sử dụng dòng tế bào Huh7 hoặc dòng tế bào HepG2 (Ahn và đồng tác giả, Journal of Virology, 88(12): 6805-6818, 2014). Tất cả các virus đều là kiểu gen C, và các dấu hiệu của từng virus được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây.

Do đó mỗi vector biểu hiện HBV đã tạo ra được tải nạp vào dòng tế bào Huh7 được nuôi trong bình thót cổ T75 (BD BioScience, 353136) bằng cách sử dụng Lipofectamine2000 (Life technologies, 11698019), và được ủ trong 3 ngày để sản sinh ra virus. Các virus đã sản sinh ra được tập trung lại bằng cách sử dụng Centricon (Millipore, U.S.A.), và lượng virus của mỗi mẫu được so sánh với lượng

HBsAg bằng cách sử dụng kit Monolisa HBsAg Ultra (BioRad, 72346) ELISA và sau đó pha loãng thích hợp để có được các trị số tương tự và được sử dụng cho thử nghiệm.

Dựa vào các kết quả thử nghiệm, cả hai kháng thể 1, 2 theo sáng chế đều được chỉ ra là có hoạt tính liên kết với virus kháng lamivudin (LMV), adefovir (ADV), clevudin (CLV), và entecavir (ETV) ở cùng một mức nồng độ như trong virus kiểu hoang (FIG. 11). Ở đây, hoạt tính liên kết với virus kháng ADV có vẻ là khá thấp, được cho là do chính việc tạo ra mẫu tương ứng thấp hơn một chút so với các mẫu còn lại.

Điều này có nghĩa là các kháng thể 1, 2 theo sáng chế có thể có hoạt tính liên kết và hoạt tính trung hòa không chỉ với một loại virus kháng thuốc được sử dụng cho thử nghiệm này mà còn với hầu hết các virus kháng các thuốc tương ứng. Đó là vì đột biến gây ra sự kháng thuốc cho HBV liên quan đến đột biến axit amin đặc hiệu của vùng chức năng transcriptaza đảo (RT) của HBV polymeraza, như được thể hiện trong bảng 9, và đột biến này xảy ra rất đặc trưng cho mỗi thuốc. Đột biến polymeraza đặc hiệu này bao gồm đột biến đặc hiệu của HBsAg dựa trên các đặc trưng của HBV chung gen. Ví dụ, đột biến rtM204I của polymeraza gây ra đột biến W196L của HBsAg, và đột biến rtA181V gây ra đột biến L173F của HBsAg. Các kháng thể 1, 2 theo sáng chế có thể được phát hiện ra là liên kết hiệu quả bất kể đột biến kháng nguyên bề mặt do đột biến kháng thuốc.

Ngoài ra, các virus kháng thuốc riêng biệt được sử dụng trong thử nghiệm này có nhiều đột biến kháng nguyên bề mặt xuất hiện không đặc hiệu, ngoài các đột biến kháng nguyên bề mặt đặc hiệu kháng thuốc đã đề cập trên đây (Bảng 9). Kết quả này thể hiện là các kháng thể 1, 2 theo sáng chế có hoạt tính liên kết và trung hòa với các virus trong đó các vị trí Q101R, K112R, I126S, L175S, A184V, I185M của HBsAg được gây đột biến.

[Bảng 9] Thông tin virus kháng thuốc được sử dụng cho thử nghiệm

Chủng	Vị trí đột biến của HBV polymeraza (vùng RT)	Vị trí đột biến của HBsAg
Kiểu hoang (kiểu gen C)	N/A	N/A
Virus kháng LMV	L80I, M204I	W196L
Virus kháng ADV	A181V	I126S, L173F, L175S

Virut kháng CLV	M204I	Q101R, I126S, A184V, W196L
Virut kháng ETV	L180M, M204V	Q101R, K112R, I185M

Ví dụ 9: Đo ái lực liên kết kháng nguyên-kháng thể

Để đo ái lực liên kết kháng nguyên-kháng thể của kháng thể theo sáng chế, cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được thực hiện. Cụ thể là, ái lực liên kết của HBsAg tái tổ hợp (typ phụ *adr*, ProSpec Bio) và kháng thể theo sáng chế được xác định bằng phân tích SPR bằng Biacore T200 (GE Healthcare) sử dụng đệm phân tích HBS-EP (10mM HEPES [độ pH=7,4], 150mM NaCl, 3mM EDTA và 0,005% chất hoạt động bề mặt P20) ở 25°C. 50µg/ml HBsAg protein đã pha loãng trong 10mM natri axetat (độ pH=5,0) được cố định trực tiếp bằng khoảng 500 RU vào chip cảm biến sinh học cho nghiên cứu CM5 sử dụng kit tạo cặp amin theo hướng dẫn và quy trình của nhà sản xuất. Phần không phản ứng trên bề mặt của cảm biến sinh học được phong bế bằng etanolamin. Để phân tích phản ứng, phần mềm kiểm soát Biacore T200 và phần mềm đánh giá Biacore T200 được sử dụng. Kháng thể theo sáng chế được pha loãng trong đệm HBS-EP. Trong quá trình thử nghiệm, bề mặt cảm biến sinh học không có HBsAg cố định được sử dụng làm đối chứng trong tất cả các phép đo. Hằng số tốc độ liên kết và phân ly K_a (M⁻¹s⁻¹) và K_d (s⁻¹) được xác định ở tốc độ dòng là 30µl/phút. Hằng số tốc độ thu được với các dung dịch pha loãng nối tiếp 3 lần bằng cách đo sự liên kết phản ứng ở nồng độ kháng thể từ 2,46 đến 200nM và sử dụng đệm làm đối chứng. Sau đó, hằng số phân ly cân bằng $KD(M)$ cho phản ứng giữa kháng thể và kháng nguyên đích được tính toán từ hằng số tốc độ phản ứng bằng cách sử dụng Phương trình sau đây: $KD = K_d/K_a$. Sự liên kết được ghi lại bằng cách tính toán dưới dạng hàm số theo thời gian và hằng số tốc độ phản ứng.

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng 10 dưới đây, từ đó xác nhận ái lực liên kết của kháng thể theo sáng chế với HBsAg.

[Bảng 10] Đo ái lực liên kết bằng cách sử dụng HbsAg tái tổ hợp

Mẫu	$k_{a1}(1/Ms)$	$k_{d1}(1/s)$	KD	AVR KD
Kháng thể theo sáng chế	9,04E+04	6,33E-05	7,00E-10	7,45E-10
	8,12E+04	6,42E-05	7,90E-10	

Yêu cầu bảo hộ

1. Phân tử liên kết để trung hòa virus viêm gan B (HBV), liên kết đặc hiệu với epitop cấu dạng bao gồm các axit amin ở các vị trí 110, 118, 120 và 147 của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg) có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1,

trong đó epitop này là từ 4 đến 38 aa được chọn từ trong số các axit amin ở các vị trí từ 106 đến 151 của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg).

2. Phân tử liên kết theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết có ái lực liên kết là nhỏ hơn 1×10^{-9} M.

3. Phân tử liên kết theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết là kháng thể hoặc đoạn của nó.

4. Phân tử liên kết theo điểm 3, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng người.

5. Polynucleotit mã hóa phân tử liên kết theo điểm 1.

6. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm 5.

7. Tế bào chủ, được biến nạp vector biểu hiện theo điểm 6.

8. Phương pháp sản xuất phân tử liên kết, bao gồm ủ tế bào chủ theo điểm 7.

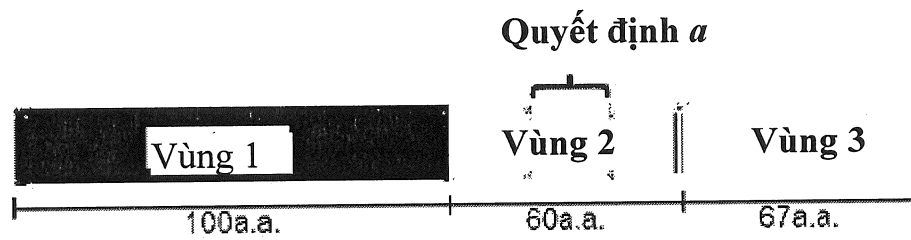


FIG. 1

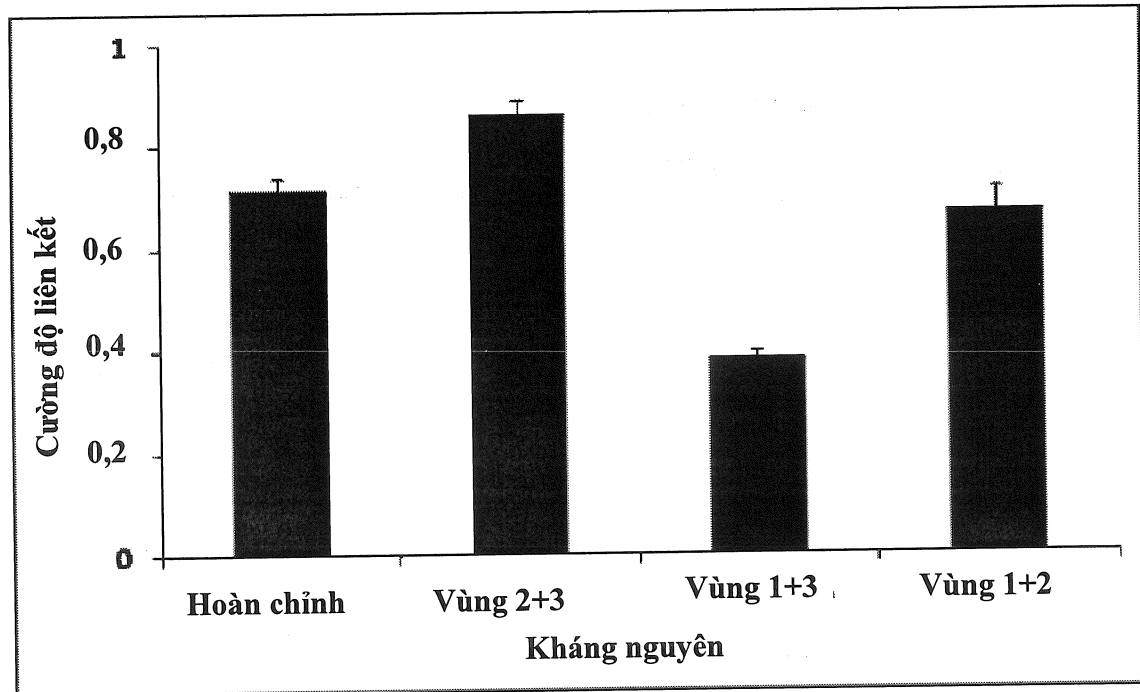


FIG. 2

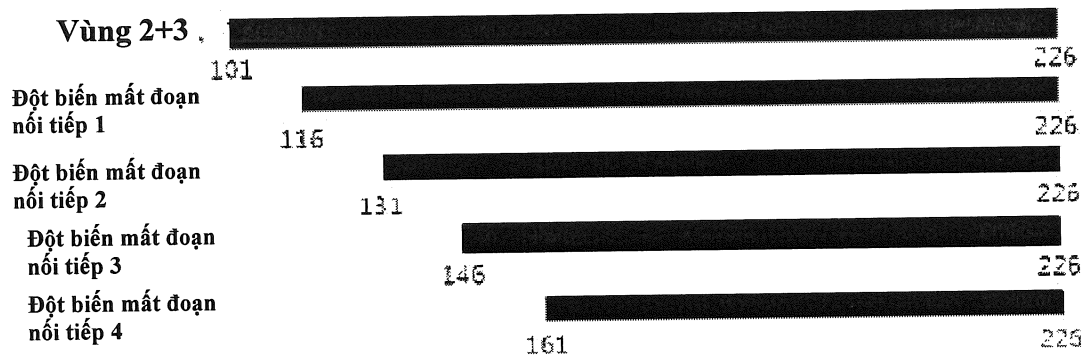


FIG. 3

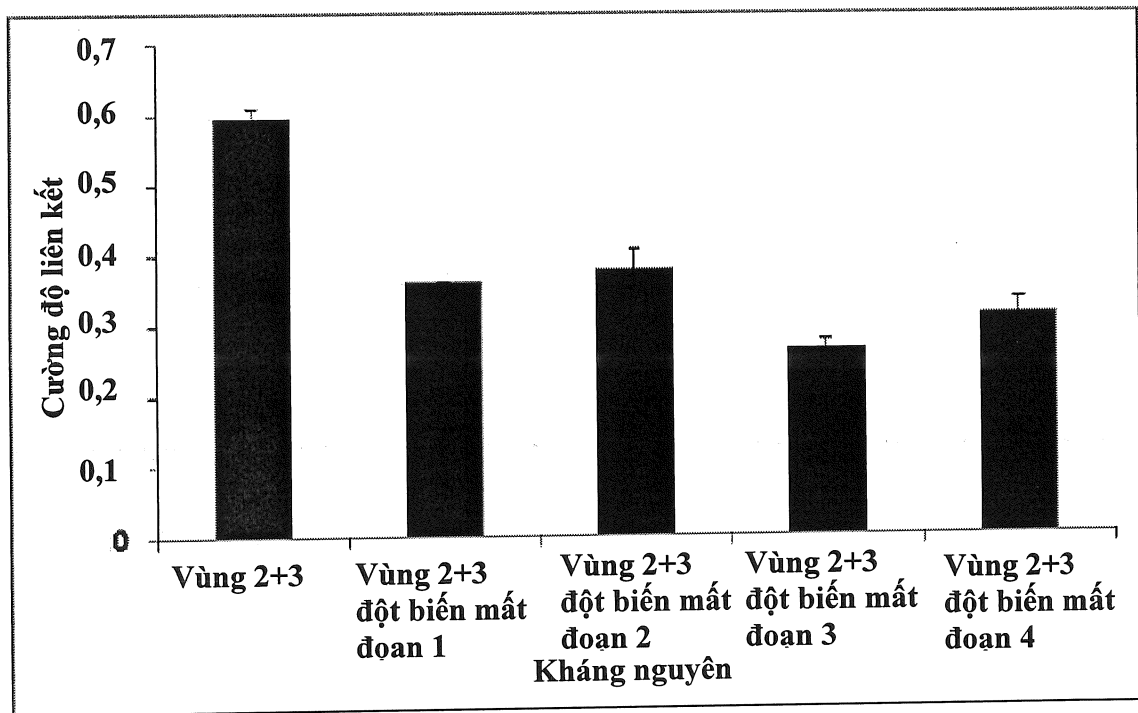


FIG. 4

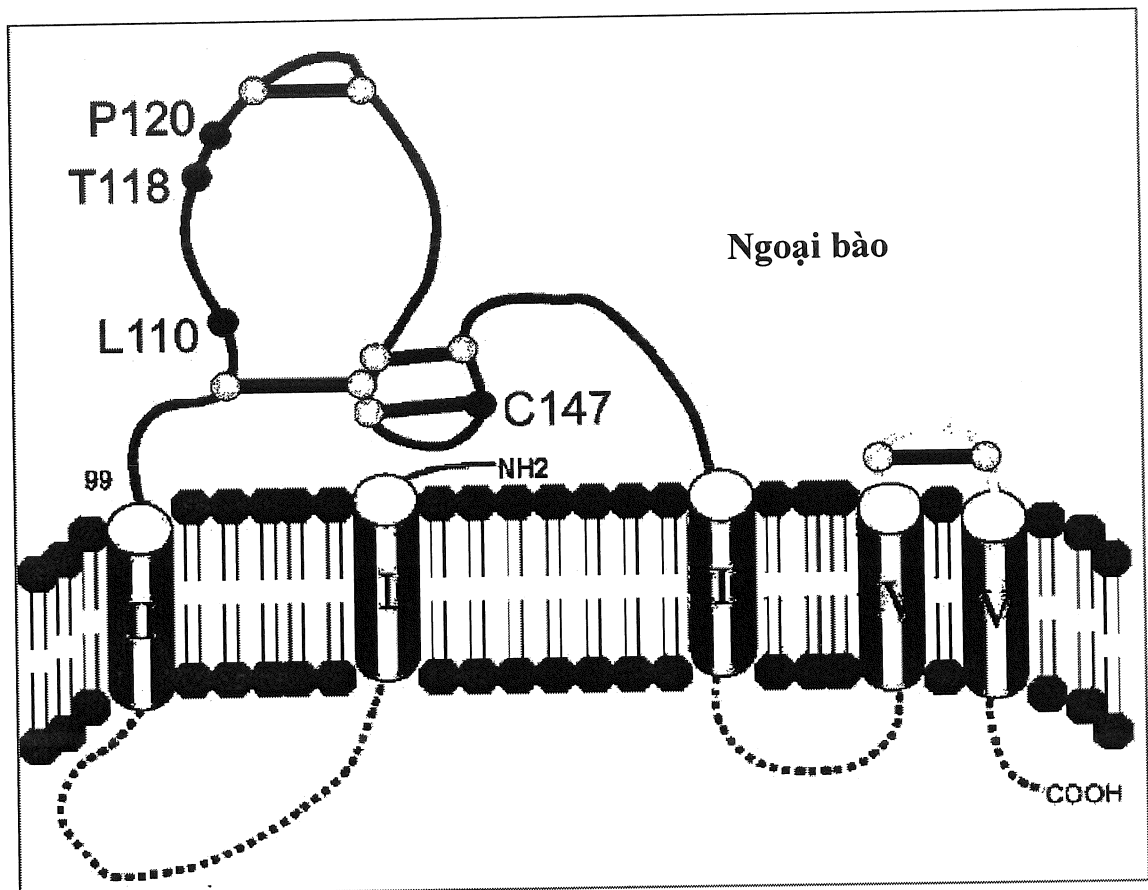


FIG. 5

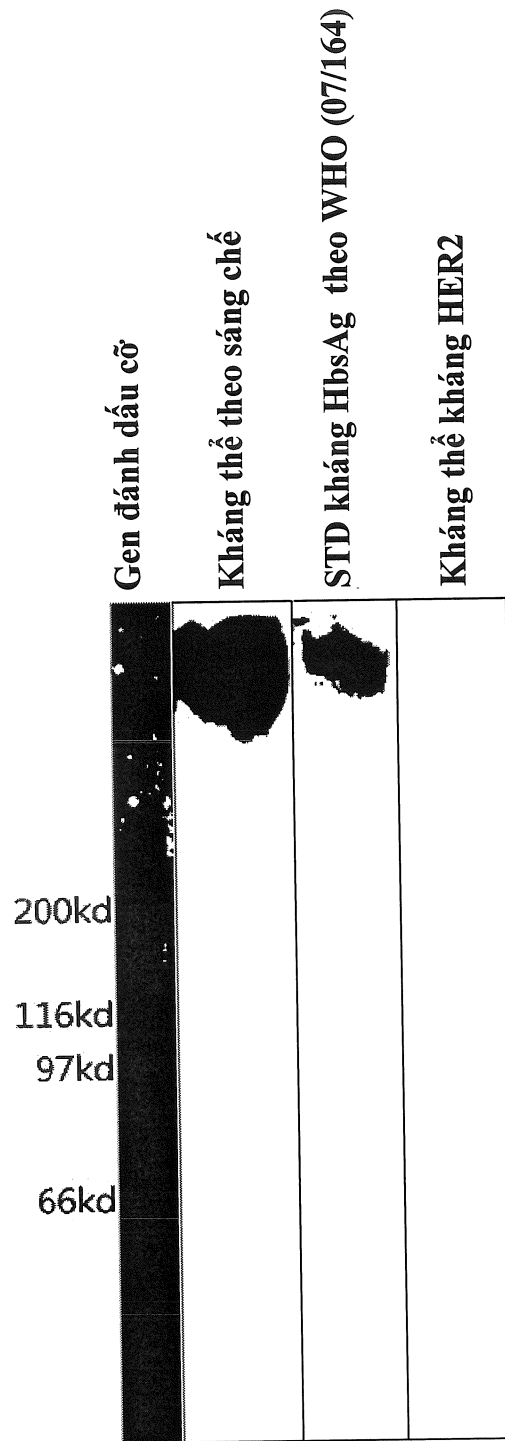


FIG. 6a

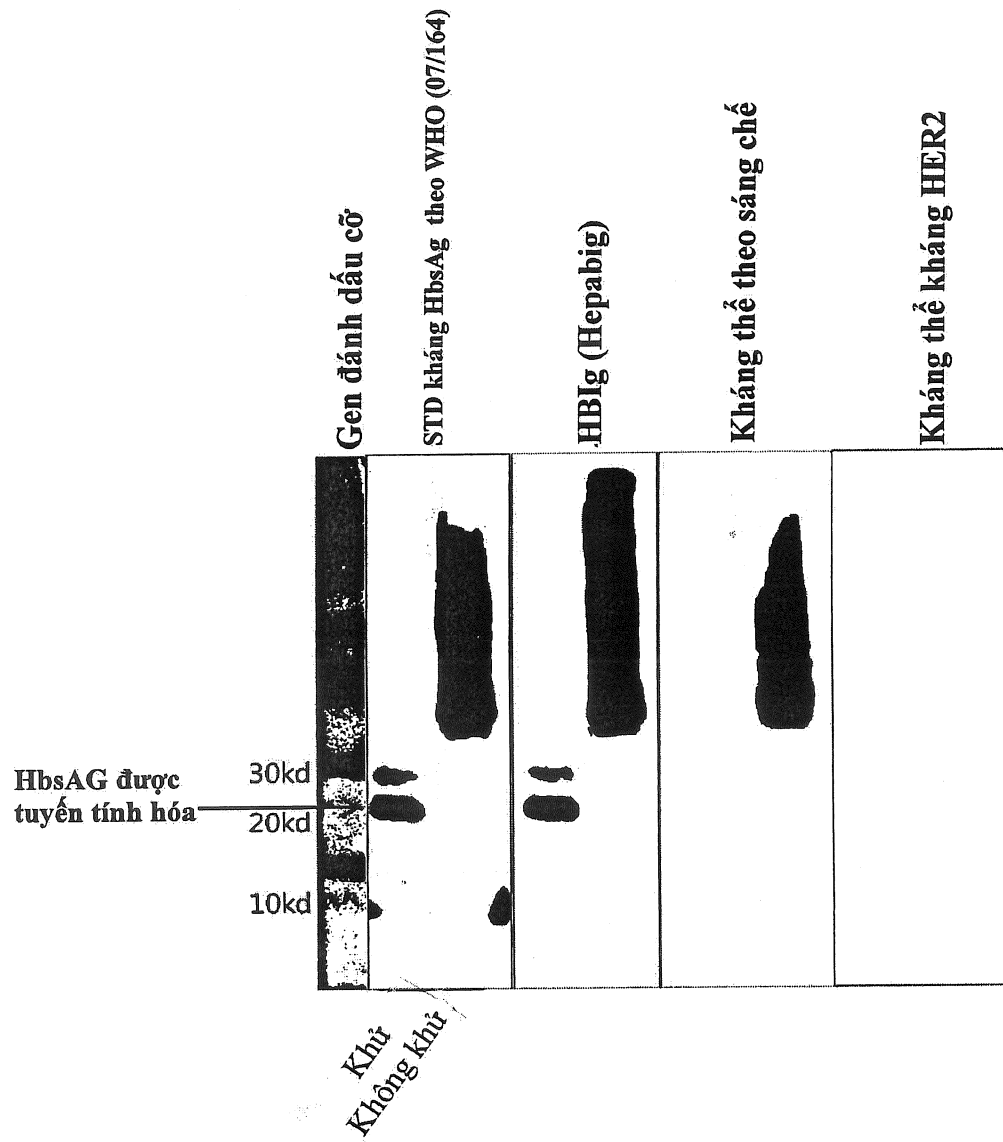
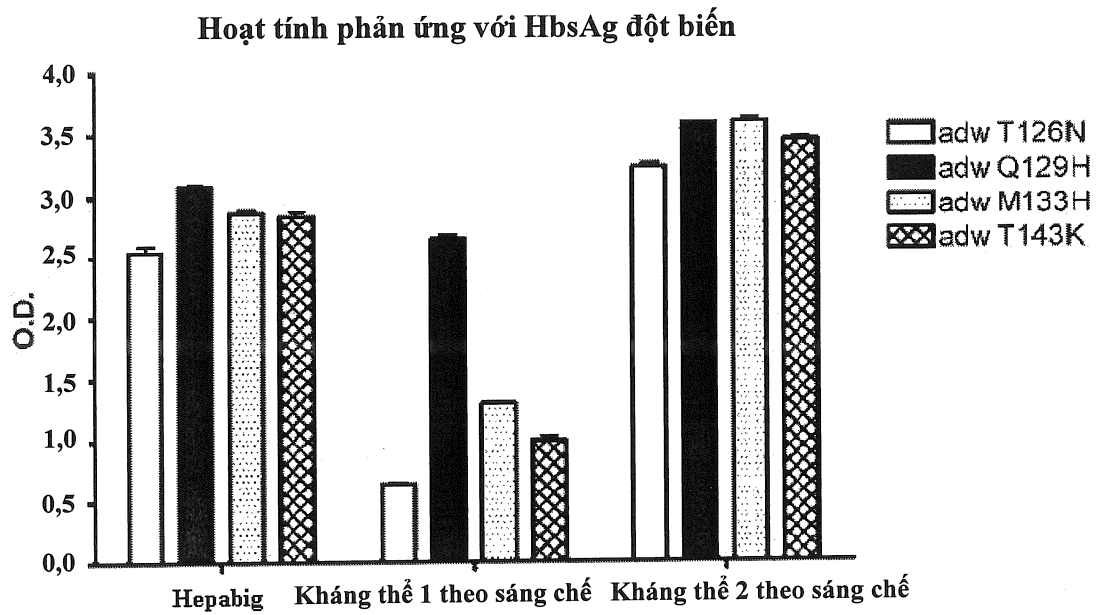


FIG. 6b



Kháng thể

FIG. 7

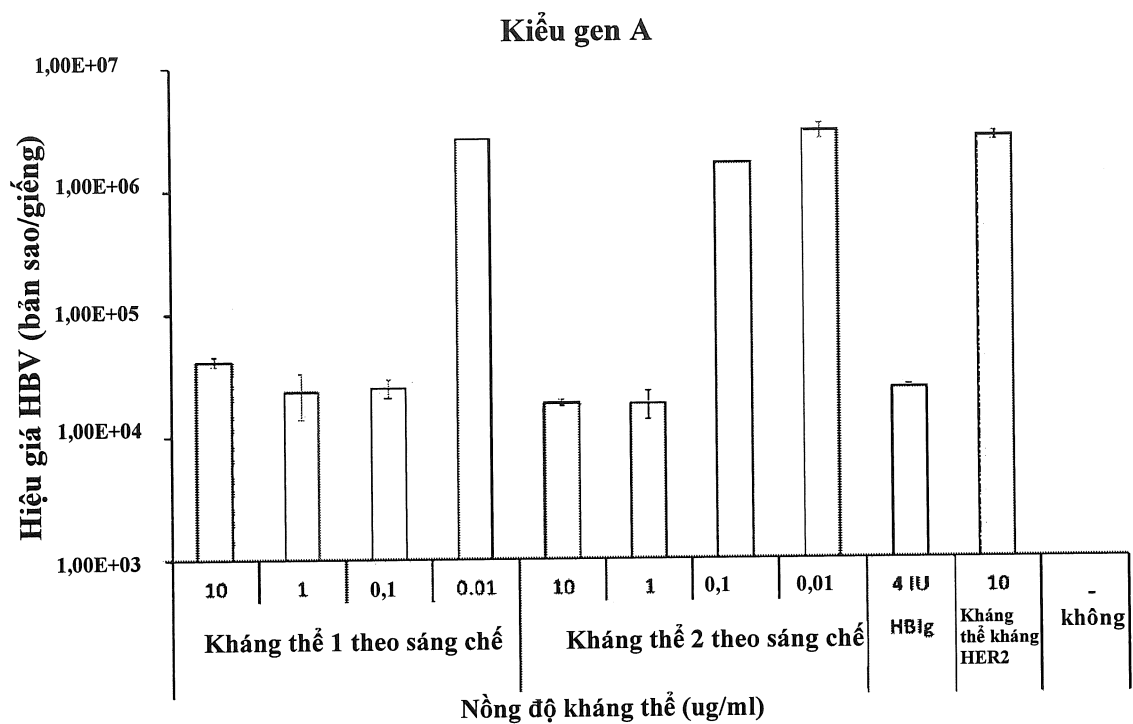


FIG. 8a

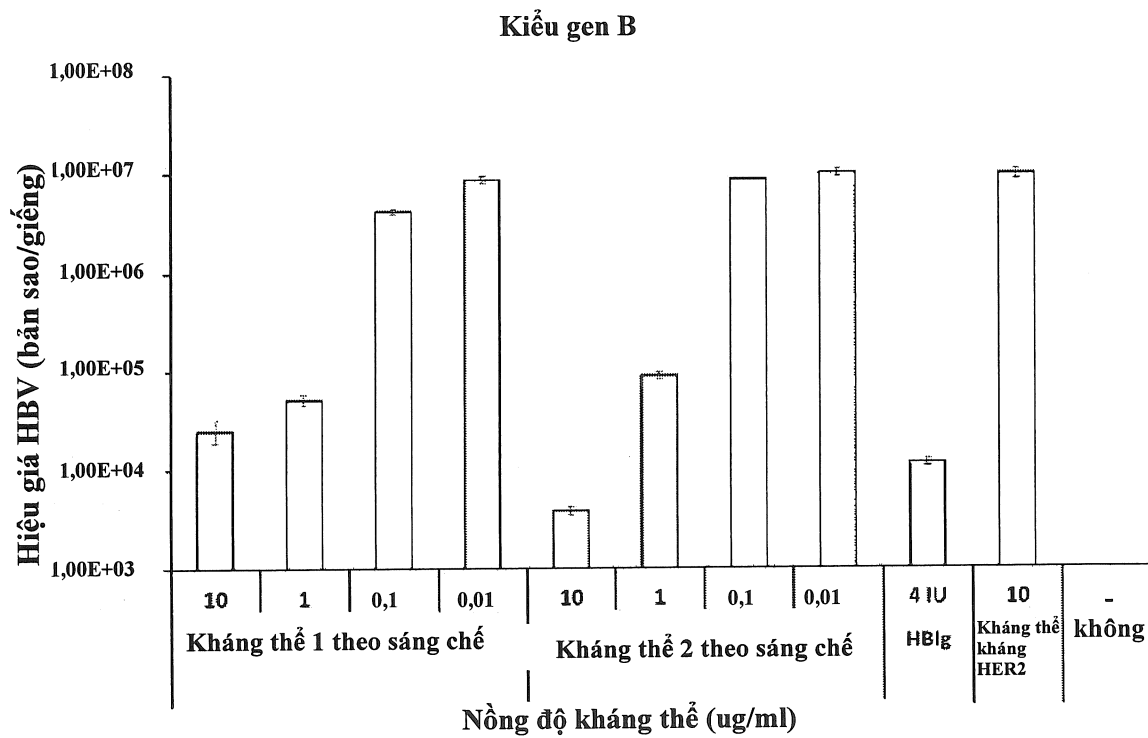


FIG. 8b

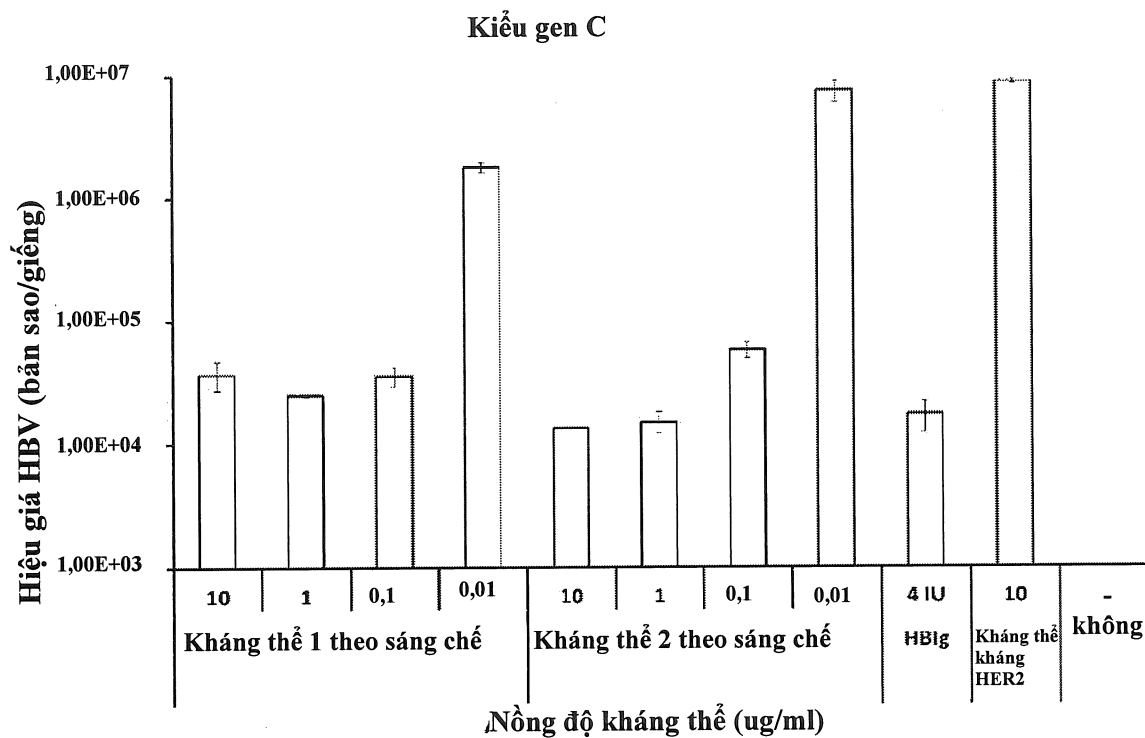


FIG. 8c

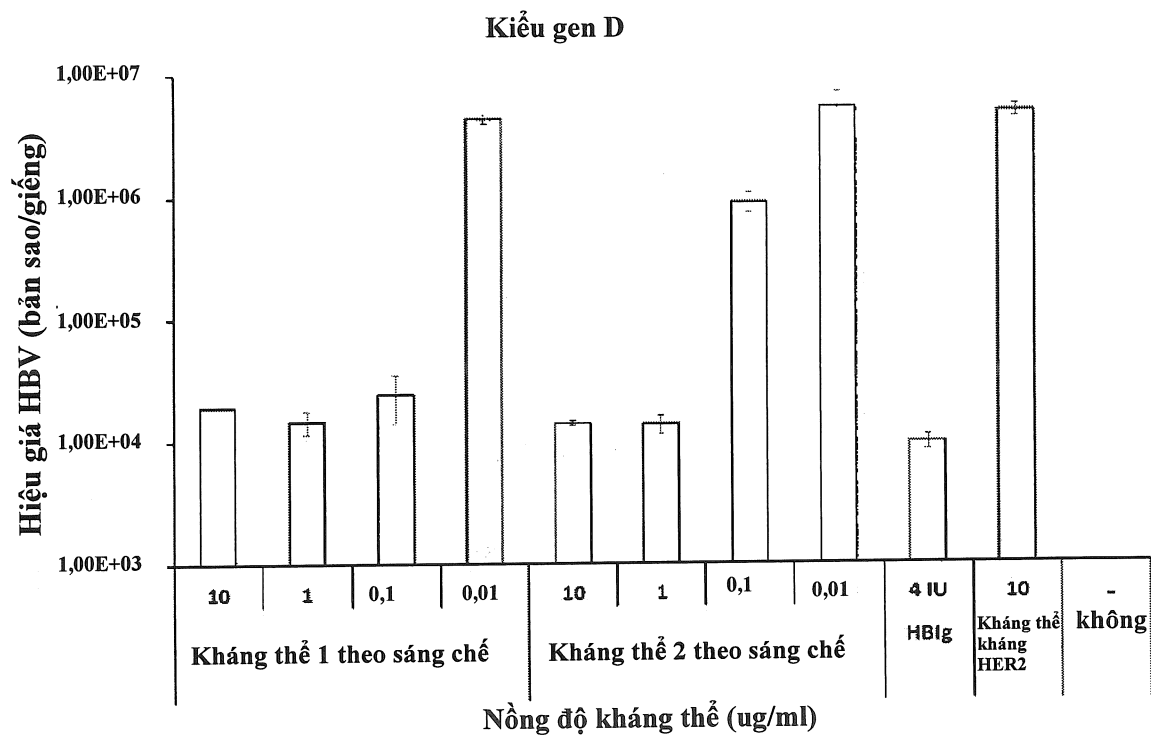


FIG. 8d

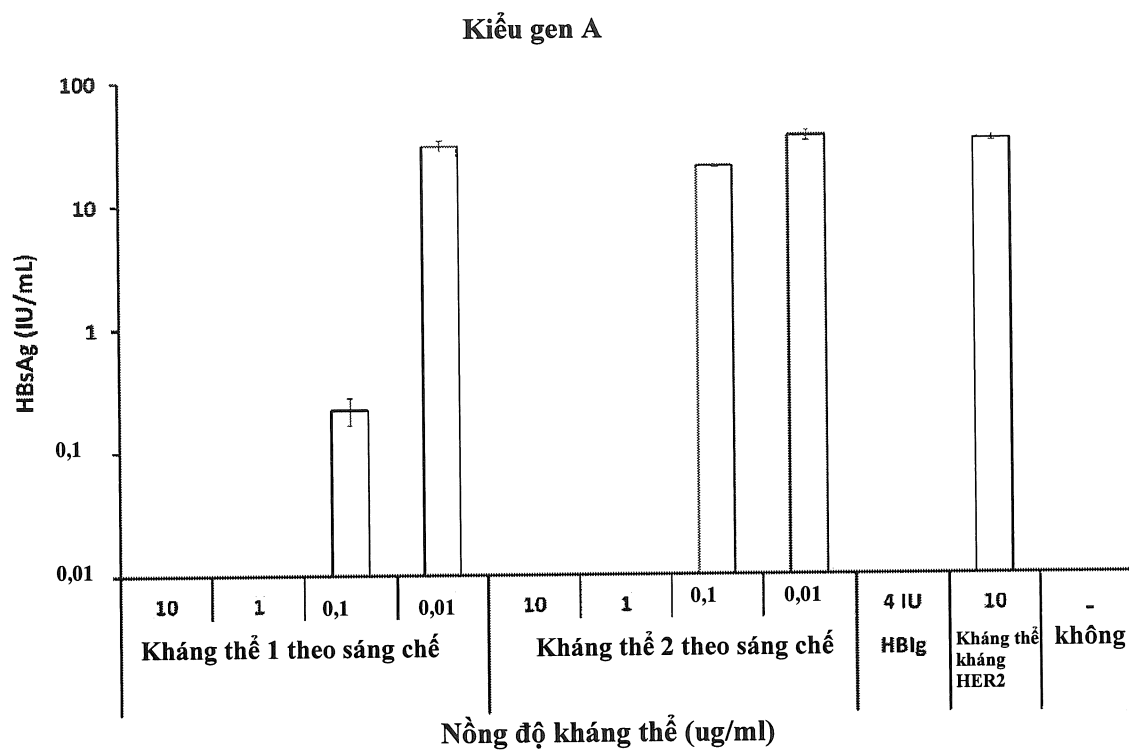


FIG. 9a

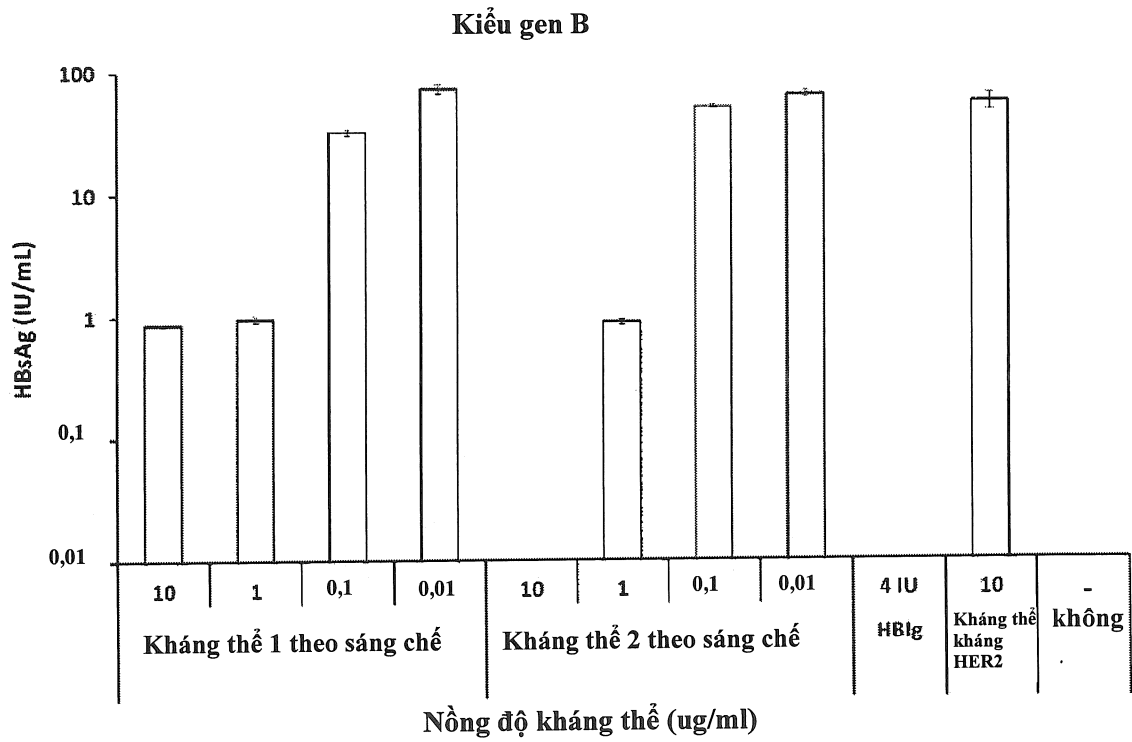


FIG. 9b

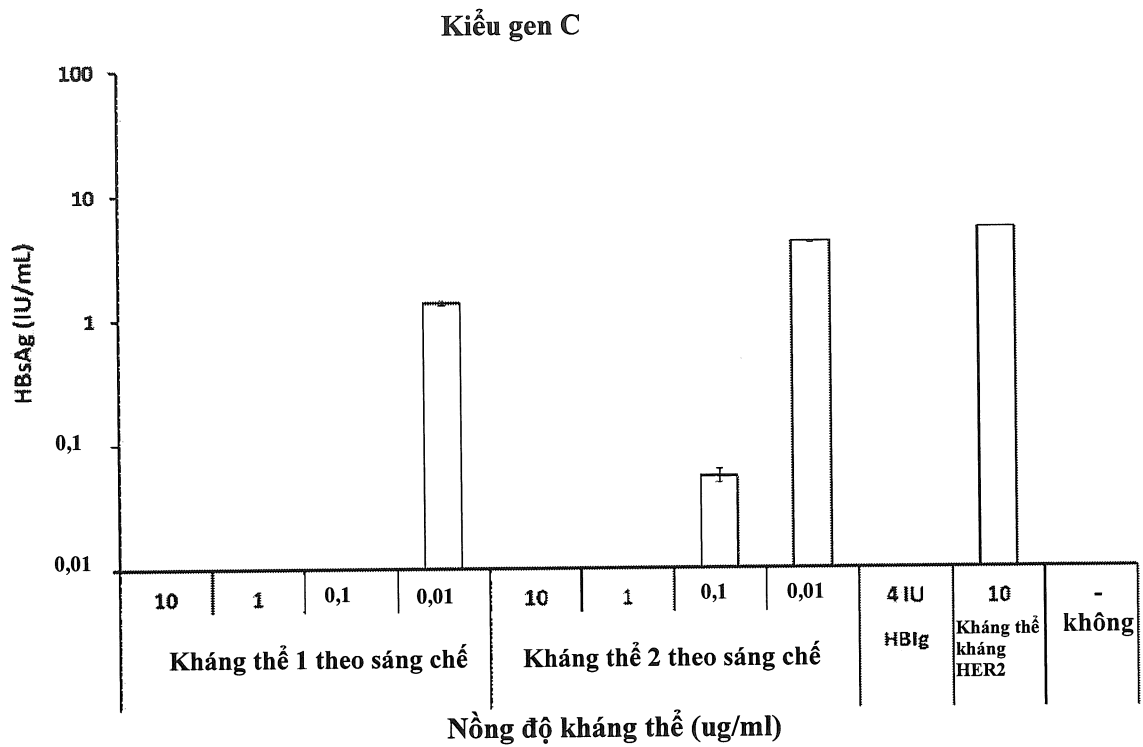


FIG. 9c

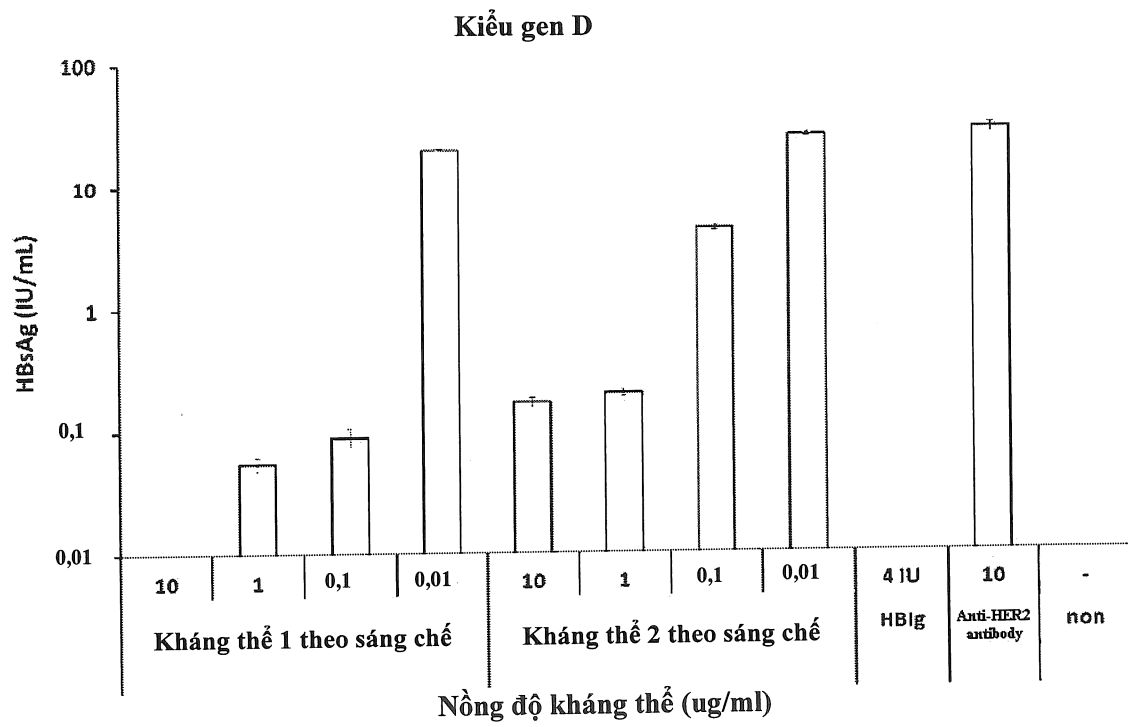


FIG. 9d

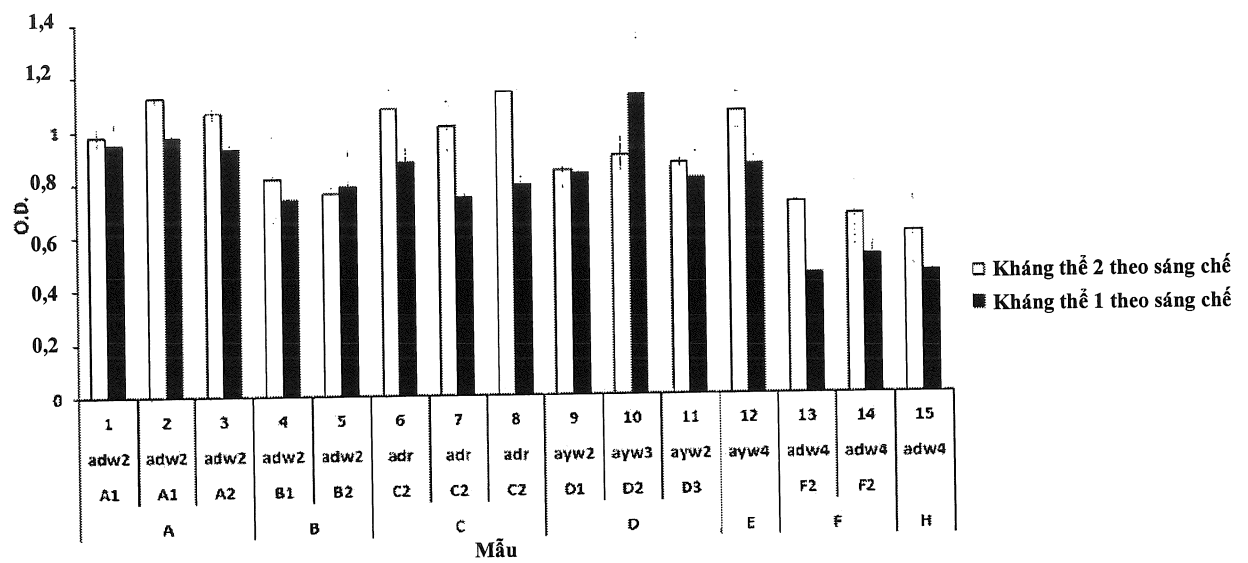


FIG. 10

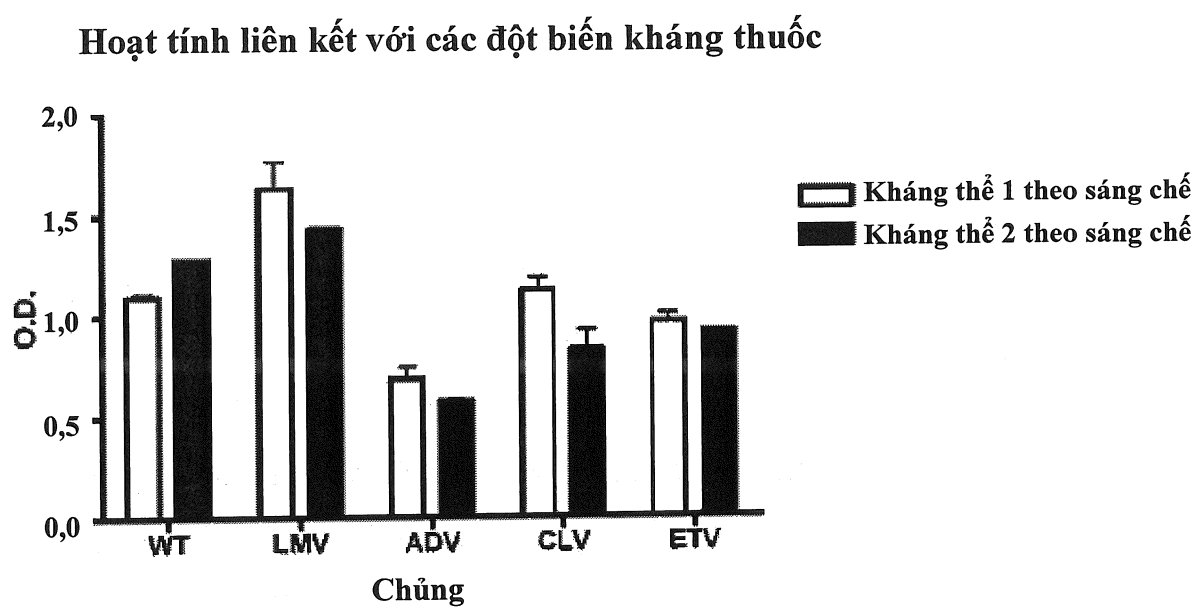


FIG. 11

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Celltrion Inc.

<120> Epitop của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và phân tử liên kết đặc hiệu với nó để trung hòa virus viêm gan B

<130> CPD2015041KR

<150> KR 10-2014-0167937

<151> 2014-11-28

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HBsAg

<400> 1

Met Glu Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln

1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu

20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys

35 40 45

Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser

50 55 60

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe

65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val

85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly

100 105 110

Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala

115 120 125

Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp

130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg

145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu

165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Ala Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu

180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile

195 200 205

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val

210 215 220

Tyr Ile

225

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi xuôi của PCR-thời gian thực để định lượng HBV ADN

<400> 2

cacatcagga ttctaggac c

21

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi ngược của PCR-thời gian thực để định lượng HBV ADN

<400> 3

aggttggtga gtgattggag

20

<210> 4

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò TaqMan của PCR-thời gian thực để định lượng HBV ADN

<400> 4

cagagtctag actcgtggtg gacttc

26