



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

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



1-0036942

(51)⁸ A61K 47/68; G01N 33/574; C07K 16/28 (13) B

(21) 1-2017-04649

(22) 27/04/2016

(86) PCT/EP2016/059336 27/04/2016

(87) WO2016/174051 03/11/2016

(30) 15305644.5 27/04/2015 EP

(45) 25/09/2023 426

(43) 26/03/2018 360A

(73) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)

45, place Abel Gance, 92100 Boulogne-billancourt, France

(72) JOUHANNEAUD, Alexandra (FR).

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

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT THỤ THỂ YẾU TỔ SINH TRƯỞNG TƯƠNG TỰ
INSULIN-1 VÀ KIT CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1;
và kit chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, có thể gắn kết với thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1, cũng như trình tự axit amin và axit nucleic mã hóa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1) là thụ thể có hoạt tính tyrosin kinaza và độ tương đồng với thụ thể insulin bằng 70%. Thụ thể IGF-1R là glycoprotein có khối lượng phân tử khoảng 350000. Thụ thể IGF-1R là thụ thể dị tetrame có mỗi nửa - được liên kết bởi các cầu liên kết disulfua - chứa tiểu đơn vị α ngoại bào và tiểu đơn vị β xuyên màng. Thụ thể IGF-1R gắn kết với IGF1 và IGF2 với ái lực rất mạnh (K_d khoảng 1nM), nhưng cũng có thể gắn kết với insulin với ái lực thấp hơn 100 đến 1000 lần. Ngược lại, thụ thể insulin gắn kết với insulin với ái lực rất mạnh mặc dù yếu tố sinh trưởng tương tự insulin chỉ gắn kết với thụ thể insulin ở ái lực thấp hơn 100 lần. Các vùng tyrosin kinaza của thụ thể IGF-1R và thụ thể insulin có độ tương đồng trình tự rất cao mặc dù các vùng có độ tương đồng thấp hơn tương ứng là vùng chứa nhiều xystein nằm trên tiểu đơn vị α và đầu tận cùng C của tiểu đơn vị β . Mức độ khác biệt về trình tự được quan sát ở tiểu đơn vị α nằm ở vùng gắn kết của các phối tử, do đó tạo ra các ái lực tương đối khác biệt của thụ thể IGF-1R và thụ thể insulin tương ứng với yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 và insulin. Mức độ khác biệt ở đầu tận cùng C của tiểu đơn vị β dẫn đến sự phân kỳ trong các quá trình truyền tín hiệu của hai thụ thể này; quá trình phân bào qua trung gian thụ thể IGF-1R, hiệu ứng biệt hóa và ức chế gây chết tế bào theo chương trình, trong khi đó sự hoạt hóa thụ thể insulin chủ yếu gây ra hiệu ứng ở mức độ của quá trình chuyển hóa.

Vai trò của hệ yếu tố sinh trưởng tương tự insulin trong bệnh ung thư đã được tập trung nghiên cứu trong 20 năm qua. Điều này là do ngoài các đặc tính ức chế chết tế bào theo chương trình và phân bào, IGF-1R là cần thiết để thiết lập và duy trì kiểu hình được biến đổi. Đã biết rằng sự biểu hiện quá mức hoặc hoạt hóa cấu trúc của thụ thể IGF-1R dẫn đến sự phát triển của một loạt các tế bào không phụ thuộc vào thụ thể này trong môi trường không chứa huyết tương bào thai bê, và sự hình thành của các khối u ở chuột nhắt

trội lông. Điều này là do nhiều sản phẩm mã hóa bởi các gen được biểu hiện quá mức có thể chuyển nạp gen tế bào, bao gồm số lượng lớn các thụ thể của các yếu tố sinh trưởng. Tuy nhiên, nghiên cứu về vai trò quan trọng của IGF-1R trong quá trình chuyển gen đã kiểm chứng được rằng tế bào không biểu hiện thụ thể IGF-1R, trong đó gen mã hóa IGF-1R đã được bất hoạt, khó có thể chuyển được bằng các tác nhân khác nhau vào tế bào, như protein E5 của virus gây bệnh u nhú ở bò, biểu hiện quá mức EGFR hoặc PDGFR, kháng nguyên T của SV 40, Ras hoạt hóa hoặc tổ hợp của kháng nguyên T của SV 40 và Ras hoạt hóa.

Do đó, IGF-1R đã được tập trung nghiên cứu làm tác nhân hướng đích trong bệnh ung thư. Nhiều nghiên cứu hướng đích IGF-1R (kháng thể nhân tạo hoặc kháng thể của người hoặc phân tử kích cỡ nhỏ) đã được thực hiện để phát triển chất đối kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin để điều trị bệnh ung thư và hơn 70 thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện theo các hướng khác nhau. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nghiên cứu nào thành công và chưa có kháng thể gắn kết IGF-1R xuất hiện trên thị trường. Ví dụ, WO2007/126876 đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R và sử dụng kháng thể này, cụ thể trong chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư. US 2013/084243 đề cập đến kháng thể của động vật có vú, cụ thể là kháng thể 12B1 và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với thụ thể IGF-1R và có thể được sử dụng để chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư phụ thuộc thụ thể IGF-1R.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến ít nhất một chất phản ứng có thể được sử dụng làm chất chỉ thị sinh học để phát hiện và/hoặc kiểm soát rối loạn sinh ung thư được đặc trưng bởi biểu hiện của thụ thể IGF-1R hoặc qua trung gian biểu hiện bất thường của thụ thể IGF-1R.

Đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện để phát triển kháng thể có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán hoặc dự đoán, nhưng cho đến nay vẫn chưa có kháng thể nào đáp ứng được hoàn toàn mong muốn này.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng các kháng thể có bán trên thị trường hiện nay được sử dụng để đánh giá điểm số của khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R dường như lại không liên quan đến mục đích nêu trên do các kháng thể này cho kết quả dương tính giả và/hoặc âm tính giả. Vấn đề này dẫn đến sự thất bại của các thử

nghiệm lâm sàng với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R do sàng lọc đối tượng bị bệnh chứ không sàng lọc hoạt tính của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R.

Hơn nữa, các nghiên cứu đầu tiên được thực hiện bằng cách sử dụng các kháng thể có bán trên thị trường đã cho thấy khác biệt giữa điểm số đánh giá của thụ thể IGF-1R và hoạt tính kháng khối u của phương điều trị hướng đích bằng thể tiếp hợp kháng thể-được chất.

Sáng chế đề cập đến kháng thể tương quan với đặc tính dược học của phương pháp điều trị hướng đích thụ thể IGF-1R trái ngược với các kháng thể đã biết.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với thụ thể IGF-1R, tốt hơn nếu thụ thể IGF-1R của người, với ái lực cao, do đó có thể hữu ích để chẩn đoán rối loạn sinh ung thư qua trung gian biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa 6 vùng CDR có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ kháng thể này chứa:

i) chuỗi nặng chứa vùng CDR-H1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng CDR-H2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và vùng CDR-H3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 3; và

ii) chuỗi nhẹ chứa vùng CDR-L1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, vùng CDR-L2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 và vùng CDR-L3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các phương án dưới đây cùng hình vẽ kèm theo.

Fig.1 là đồ thị thể hiện các trị số mật độ quang thu được từ kháng thể đơn dòng 810D12 theo phương pháp rhIGF1R ELISA. Dữ liệu hiệu chuẩn và nồng độ EC_{50} được xác định bằng thuật toán Prism.

Fig.2A-Fig.2C là hình ảnh thể hiện kết quả hóa mô miễn dịch mẫu nhận dạng khối u được nhúng parafin MCF-7 bằng kháng thể đơn dòng 810D12 (Fig.2A), kháng thể G11 kháng IGF-1R (Roche Ventana) (Fig.2B) hoặc kháng thể AF-305 kháng IGF-1R (Hệ thống nghiên cứu và phát triển) (Fig.2C).

Fig.3 là đồ thị thể hiện hoạt tính *in vivo* của thể tiếp hợp kháng thể-được chất kháng IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

Fig.4A-Fig.4C là hình ảnh thể hiện kết quả hóa mô miễn dịch mẫu nhận dạng khối u được nhúng parafin SBC-5 bằng kháng thể đơn dòng 810D12, kháng thể G11 kháng IGF-1R (Roche Ventana) (Fig.4B) hoặc kháng thể AF-305 kháng IGF-1R (Hệ thống nghiên cứu và phát triển) (Fig.4C).

Fig.5 là đồ thị thể hiện hoạt tính *in vivo* của thể tiếp hợp kháng thể-được chất kháng IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “kháng thể”, “ab” hoặc “globulin miễn dịch” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ kháng thể đơn dòng, kháng thể phân lập, kháng thể được thiết kế, kháng thể được tổng hợp hóa học, hoặc kháng thể tái tổ hợp (ví dụ kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ hoặc kháng thể đơn dòng nguyên vẹn), kháng thể đa dòng, kháng thể đa hóa trị hoặc kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ kháng thể đặc hiệu kép) và mảnh kháng thể, miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể tái tổ hợp.

Thuật ngữ “kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R” và “kháng thể kháng thụ thể IGF-1R” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ kháng thể có thể gắn kết với thụ thể IGF-1R.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết thụ thể IGF-1R” hoặc “mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit, polypeptit, hoặc protein bất kỳ vẫn có khả năng gắn kết với thụ thể IGF-1R (cũng được gọi là kháng nguyên) của kháng thể. Theo một phương án, “mảnh gắn kết kháng nguyên” được chọn từ nhóm bao gồm mảnh Fv, Fv chuỗi đơn, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc hoặc kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch, hoặc mảnh bất kỳ có thời gian bán thải tăng bằng cách cải biến hóa học, như bổ sung gốc poly(alkylen)glycol, như poly(etylen)glycol (“gắn gốc PEG”)

(mảnh được gắn gốc PEG, được gọi là Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG hoặc Fab'-PEG) (trong đó “PEG” là poly(etylen)glycol), hoặc bằng cách tích hợp vào liposom, các mảnh này có ít nhất một trong số các vùng CDR của kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn nếu, “mảnh gắn kết kháng nguyên” được tạo cấu trúc hoặc chứa một đoạn trình tự của vùng thay đổi chuỗi nặng hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể gốc, đoạn trình tự này đủ để duy trì độ đặc hiệu gắn kết và ái lực tương đương với kháng thể gốc, tốt hơn nếu ái lực của mảnh này với kháng nguyên ít nhất bằng 1/100, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 1/10 ái lực của kháng thể gốc.

Tốt hơn nếu, “mảnh gắn kết thụ thể IGF-1R” hoặc “mảnh gắn kết kháng nguyên” theo sáng chế chứa ít nhất:

i) vùng CDR-H1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng CDR-H2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, và vùng CDR-H3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3; và

ii) vùng CDR-L1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, vùng CDR-L2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, và vùng CDR-L3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

Thuật ngữ “gắn kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, tạo thành phức hợp với kháng nguyên tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Mức độ gắn kết đặc hiệu được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất khoảng 1×10^{-6} M hoặc nhỏ hơn. Phương pháp xác định mức độ gắn kết giữa hai phân tử là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ phương pháp thẩm tách cân bằng, phương pháp cộng hưởng plasma bề mặt, và các phương pháp tương tự. Cần hiểu rằng kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết hoặc tương tác với một kháng nguyên khác ở mức độ thấp. Tuy nhiên, theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chỉ gắn kết với một kháng nguyên.

Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung” hoặc “CDR” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các vùng siêu thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch được xác định bằng hệ thống đánh số thứ tự IMGT.

Hệ thống đánh số thứ tự IMGT đã được phát triển để so sánh các vùng thay đổi của thụ thể kháng nguyên, chuỗi, hoặc các loài bất kỳ [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-

P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. Theo hệ thống đánh số thứ tự IMGT, các axit amin bảo thủ luôn có cùng vị trí, ví dụ xystein 23 (Cys thứ nhất), tryptophan 41 (Trp bảo thủ), axit amin kỵ nước 89, xystein 104 (Cys thứ hai), phenylalanin hoặc tryptophan 118 (J-PHE hoặc J-TRP). Hệ thống đánh số thứ tự IMGT tạo ra ranh giới chuẩn giữa vùng khung (FR1-IMGT: vị trí số 1 đến 26, FR2-IMGT: 39 đến 55, FR3-IMGT: 66 đến 104 và FR4-IMGT: 118 đến 128) và vùng xác định bổ sung: CDR1-IMGT: 27 đến 38, CDR2-IMGT: 56 đến 65 và CDR3-IMGT: 105 đến 117. Khi các khoảng trống xuất hiện ở một số vị trí, thì chiều dài CDR-IMGT (được thể hiện giữa các dấu ngoặc đơn và cách nhau bởi dấu chấm, ví dụ [8.8.13]) là thông tin quyết định. Hệ thống đánh số thứ tự IMGT được sử dụng trong không gian hai chiều được định dạng là IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], và trong không gian ba chiều được định dạng là IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Cần hiểu rằng, “vùng xác định bổ sung” hoặc “CDR” theo sáng chế có nghĩa là các vùng siêu thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch như được xác định theo hệ thống đánh số thứ tự IMGT.

Tuy nhiên, các vùng CDR cũng có thể được xác định theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Có ba vùng CDR chuỗi nặng và ba vùng CDR chuỗi nhẹ. Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung” và “CDR” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vùng chứa các gốc axit amin chính tạo ra ái lực gắn kết với kháng nguyên hoặc epitop của kháng thể. Để đơn giản hóa, các vùng CDR theo Kabat không được xác định. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sử dụng các vùng CDR theo IMGT để xác định các vùng CDR theo Kabat.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế chứa vùng thay đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng với trình tự SEQ ID NO.7 ít nhất bằng 90%.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế chứa vùng thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, hoặc trình tự bất kỳ có độ tương đồng với trình tự SEQ ID NO.8 ít nhất bằng 90%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng 810D12, chứa vùng thay đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% và 98% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu so với trình tự SEQ ID NO.7; và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.8 hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% và 98% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu so với trình tự SEQ ID NO.8.

Thuật ngữ “tỷ lệ phần trăm tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tỷ lệ phần trăm các gốc nucleotit hoặc axit amin giống hệt nhau giữa hai trình tự cần so sánh, thu được sau khi sắp thẳng hàng tối ưu, tỷ lệ phần trăm này có ý nghĩa thống kê tuyệt đối và mức độ khác biệt giữa hai trình tự được phân bố ngẫu nhiên dọc theo chiều dài của chúng. Hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin thường được so sánh bằng cách so sánh các trình tự sau khi sắp thẳng hàng tối ưu, hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin này có thể được so sánh bằng cách sử dụng phân đoạn hoặc “giao diện sắp thẳng hàng”. Sắp thẳng hàng tối ưu của các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, ngoài so sánh bằng tay, bằng thuật toán độ tương đồng vị trí của Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], bằng thuật toán độ tương đồng vị trí của Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], bằng phương pháp tra cứu độ tương đồng của Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] hoặc bằng phần mềm máy vi tính sử dụng các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA và TFASTA trong gói phần mềm Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, hoặc bằng phần mềm so sánh BLAST NR hoặc BLAST P). Đối với trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 85%, 90%, 95% và 98% so với trình tự axit amin đối chiếu, tốt hơn nếu các trình tự axit amin này bao gồm các trình tự chứa trình tự đối chiếu, một số gốc cải biến, tức là gốc loại bỏ, gốc bổ sung hoặc gốc thay thế ít nhất một axit amin, gốc cắt ngắn hoặc gốc kéo dài. Trong trường hợp của gốc thay thế một hoặc nhiều axit amin liền kề hoặc không liền kề, tốt hơn nếu các gốc thay thế này là các gốc trong đó các axit amin được thế được thay bằng “các axit amin tương đương”. Thuật ngữ “các axit amin tương đương” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các axit amin bất kỳ có thể được thế cho

một trong số các axit amin cấu trúc nhưng không làm biến đổi hoạt tính sinh học của các kháng thể tương ứng và ví dụ cụ thể về các axit amin tương đương này được thể hiện dưới đây.

Các axit amin tương đương có thể được xác định dựa trên độ tương đồng cấu trúc với các axit amin thay thế các axit amin tương đương này hoặc kết quả của các thử nghiệm so sánh hoạt tính sinh học giữa các protein gắn kết kháng nguyên khác nhau có thể được tạo ra.

Các gốc thay thế có thể được thực hiện mà không làm biến đổi đáng kể hoạt tính sinh học của protein gắn kết kháng nguyên được cải biến tương ứng được thể hiện trong Bảng 1; các gốc thay thế ngược chiều có thể được thực hiện một cách tự nhiên trong cùng điều kiện.

Bảng 1

Gốc axit amin ban đầu	Gốc axit amin thế
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, không gắn kết với thụ thể insulin.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế cấu thành từ kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc “Mab” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể gần như tương đồng, tức là các kháng thể

riêng biệt của quần thể là giống hệt nhau chỉ khác là các đột biến có trong tự nhiên có thể có mặt ở lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có độ đặc hiệu cao chỉ kháng một epitop duy nhất. Kháng thể đơn dòng có thể được sản xuất bởi dòng tế bào B duy nhất hoặc tế bào lai. Kháng thể đơn dòng cũng có thể là kháng thể đơn dòng tái tổ hợp, tức là được sản xuất bằng phương pháp thiết kế di truyền protein. Kháng thể đơn dòng cũng có thể được phân lập từ thư viện kháng thể của thực khuẩn thể. Ngoài ra, trái ngược với kháng thể đa dòng thường bao gồm các kháng thể khác nhau kháng các epitop và yếu tố quyết định kháng nguyên khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng chỉ kháng một epitop duy nhất của kháng nguyên. Kháng thể này được phân lập hoặc thu nhận bằng cách tinh chế từ nguồn tự nhiên hoặc thu nhận bằng phương pháp tái tổ hợp gen hoặc tổng hợp hóa học.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế cấu thành từ kháng thể tái tổ hợp. Thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể được sản xuất bằng cách biểu hiện ADN tái tổ hợp trong tế bào sống. Kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế được thu nhận bằng phương pháp tái tổ hợp gen đã biết trong lĩnh vực này, tạo ra các trình tự ADN không có trong các cơ thể sinh học.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế cấu thành từ kháng thể được tổng hợp hóa học.

Thuật ngữ “kháng thể gắn kết IGF-1R” bao gồm kháng thể của chuột, kháng thể thể khảm và kháng thể nhân tạo gắn kết thụ thể IGF-1R.

Các trình tự của kháng thể đơn dòng 810D12I, được xác định theo hệ thống đánh số thứ tự IMGT được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Kháng thể	Phương pháp đánh số thứ tự vùng CDR	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO.
810D12I-4893	IMGT	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
		miền biến đổi		7
			miền biến đổi	8

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm kháng thể của

chuột, kháng thể thể khảm, và kháng thể nhân tạo. Kháng thể này có thể thu được từ tế bào lai có nguồn gốc từ chuột được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, tế bào lai này được thu nhận bằng cách dung hợp tế bào lách/tế bào lympho của chuột nhất được gây miễn dịch Balb/C và dòng tế bào u tủy Sp 2/O-Ag 14.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào lai của chuột nhất có khả năng bài tiết kháng thể đơn dòng theo sáng chế, tức là tế bào lai có nguồn gốc từ chuột nhất được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 17 tháng 09 năm 2014, với mã đăng ký là I-4893.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng 810D12, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được bài tiết bởi tế bào lai I-4893.

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ kháng thể này được bài tiết bởi tế bào lai được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 17 tháng 09 năm 2014, với mã đăng ký là I-4893.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào lai của chuột nhất được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 17 tháng 09 năm 2014, với mã đăng ký là I-4893.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic phân lập được chọn từ các axit nucleic sau:

- a) axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế ;
- b) axit nucleic chứa trình tự được chọn từ các trình tự SEQ ID NO.9 hoặc SEQ ID NO.10, hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, tốt hơn nếu 85%, 90%, 95% và 98% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu so với các trình tự SEQ ID NO.9 hoặc SEQ ID NO.10; và
- e) axit nucleic bổ sung của axit nucleic theo mục a) hoặc b).

Các trình tự nucleotit mã hóa kháng thể đơn dòng 810D12 theo sáng chế được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Kháng thể	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO.
810D12I-	miền biến đổi		9

4893		miền biến đổi	10
------	--	---------------	----

Thuật ngữ “axit nucleic”, “trình tự nucleic”, “trình tự axit nucleic”, “polynucleotit”, “oligonucleotit”, “trình tự polynucleotit” và “trình tự nucleotit”, được sử dụng thay cho nhau trong bản mô tả này, có nghĩa là trình tự chính xác của các nucleotit, được cải biến hoặc không, xác định mảnh hoặc vùng axit nucleic, chứa các nucleotit không bảo hòa hoặc không, và là ADN sợi kép, ADN sợi đơn hoặc các sản phẩm phiên mã của các ADN này.

Trong bản mô tả này, sáng chế không đề cập đến các trình tự nucleotit trong môi trường nhiễm sắc thể tự nhiên của chúng, nghĩa là, ở trạng thái tự nhiên. Trình tự theo sáng chế được phân lập và/hoặc được tinh chế, nghĩa là, chúng được lấy mẫu trực tiếp hoặc gián tiếp, ví dụ bằng cách tái bản, môi trường của chúng được cải biến ít nhất một phần. Các axit nucleic phân lập thu được bởi các kỹ thuật di truyền tái tổ hợp, theo các cách, ví dụ, tế bào của vật chủ, hoặc thu được bằng cách tổng hợp hóa học cũng được đề cập trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề cập đến vector chứa axit nucleic như được mô tả trong sáng chế.

Sáng chế đề cập đến vector tách dòng và/hoặc vector biểu hiện chứa trình tự nucleotit này.

Tốt hơn, nếu các vector theo sáng chế chứa các yếu tố cho phép biểu hiện và/hoặc tiết trình tự nucleotit trong tế bào của vật chủ nhất định. Do đó, vector cần chứa gen khởi đầu, tín hiệu bắt đầu và kết thúc dịch mã, cũng như các vùng điều hòa quá trình phiên mã thích hợp. Cần phải duy trì theo cách thích hợp trong tế bào vật chủ và có thể tùy ý có các tín hiệu đặc hiệu mô tả quá trình tiết protein đã được dịch mã. Các yếu tố khác nhau này được chọn và được tối ưu hóa bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này theo tế bào của vật chủ đã dùng. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit có thể được cài xen vào các vector tự tái bản trong vật chủ đã chọn hoặc là vector hợp nhất của vật chủ đã chọn.

Các vector này được tạo ra bằng các phương pháp thông thường đã được sử dụng bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này và các dòng thu được có thể được đưa vào vật chủ thích hợp bằng các phương pháp tiêu chuẩn như phương pháp chuyển nhiễm liposom, xung điện, sốc nhiệt hoặc phương pháp hóa học.

Các vector là, ví dụ, vector có nguồn gốc plasmit hoặc virus. Chúng được sử dụng để biến nạp tế bào của vật chủ để tách dòng hoặc biểu hiện trình tự nucleotit theo sáng

chế.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào của vật chủ được biến nạp bằng cách hoặc chứa vector như được mô tả theo sáng chế.

Tế bào của vật chủ có thể được chọn trong hệ sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình như tế bào của vi khuẩn, ví dụ, mà còn là tế bào nấm men hoặc tế bào của động vật, đặc biệt là tế bào của động vật có vú. Tế bào của côn trùng hoặc thực vật cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến các động vật, không phải là người, mà có tế bào đã được biến nạp theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể, hoặc một trong số các mảnh chức năng của nó, khác biệt ở chỗ bao gồm các bước sau:

a) nuôi cấy tế bào của vật chủ theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy với điều kiện nuôi cấy thích hợp; và

b) thu hồi kháng thể này, hoặc một trong số các mảnh chức năng của nó, từ đó tạo ra được từ môi trường nuôi cấy hoặc từ các tế bào đã được nuôi cấy này.

Các tế bào biến nạp theo sáng chế là các tế bào được sử dụng trong các phương pháp tạo ra kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế. Các phương pháp tạo ra kháng thể ở dạng tái tổ hợp bằng cách sử dụng vector và/hoặc tế bào đã được biến nạp bởi vector theo sáng chế, được chứa trong bản mô tả này. Tốt hơn, nếu tế bào đã được biến nạp bởi vector theo sáng chế được nuôi cấy trong các điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit nêu trên và thu hồi peptit tái tổ hợp này.

Như đã nêu trên, tế bào của vật chủ có thể được chọn trong hệ sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình. Cụ thể, có thể xác định được trình tự nucleotit để tiết trong hệ sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình này. Do đó, vector theo sáng chế mang trình tự này có thể được sử dụng theo cách có lợi để sản sinh các protein tái tổ hợp cần tiết. Thực vậy, quy trình tinh chế các protein tái tổ hợp đáng quan tâm này được thực hiện theo cách có lợi dựa trên thực tế rằng chúng có mặt trong dịch nổi trên bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào chứ không phải là nằm trong tế bào của vật chủ.

Việc sử dụng kháng thể theo sáng chế là chất đánh dấu sinh học cũng được bộc lộ.

Các phương pháp có thể được sử dụng để phát hiện hoặc chẩn đoán các rối loạn sinh ung thư siêu tăng sinh khác nhau liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R được lấy làm ví dụ bởi, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư tiền liệt tuyến, sarcoma xương, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư nội mạc tử cung, u nguyên bào xốp, ung thư ruột kết, ung thư, ung thư dạ dày, ung thư thận, ung thư tụy, ung thư đầu và cổ hoặc ung thư khác bất kỳ liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R. Như có thể được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, mức độ biểu hiện kháng thể có liên quan tới rối loạn cụ thể thay đổi tùy thuộc vào bản chất và/hoặc mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh đã có từ trước.

Việc dùng các kháng thể theo sáng chế theo đường bất kỳ trong số các đường thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, khu trú, ngoài đường tiêu hóa, trong cơ, v.v.), sẽ đưa ra phương pháp cực kỳ hữu ích để phát hiện các tế bào loạn sản trong mẫu cũng như cho phép thầy thuốc lâm sàng kiểm soát phương pháp điều trị của đối tượng bị bệnh khi điều trị rối loạn siêu tăng sinh có liên quan tới sự biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, sẽ tìm ra mục đích điều trị trong y khoa hoặc nghiên cứu khác nhau, bao gồm việc phát hiện, chẩn đoán, tiên lượng và giai đoạn bệnh lý khác nhau liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như được nêu trên để sử dụng làm chất phát hiện các tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Phương án khác theo sáng chế là kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như được nêu trên, để sử dụng trong chẩn đoán hoặc tiên lượng rối loạn sinh ung thư *in vitro* hoặc *ex vivo* liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Thuật ngữ “chẩn đoán bệnh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quy trình nhận diện hoặc phát hiện sự có mặt của rối loạn bệnh sinh ung thư siêu tăng sinh liên quan đến hoặc do sự biểu hiện of IGF-1R gây ra, kiểm soát quá trình tiến triển của bệnh, và nhận diện hoặc phát hiện các tế bào hoặc mẫu là chỉ dấu của rối loạn liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Thuật ngữ “tiên lượng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khả năng phục hồi

bệnh hoặc dự đoán sự phát triển có thể xảy ra hoặc kết quả của bệnh. Ví dụ, nếu mẫu từ đối tượng là âm tính đối với việc nhuộm bằng kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, thì việc “tiên lượng” đối với đối tượng đó là tốt hơn nếu mẫu này dương tính với việc nhuộm bằng IGF-1R. Các mẫu có thể được xác định điểm số đánh giá đối với mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trên thang điểm thích hợp như được mô tả chi tiết dưới đây.

Kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R có thể là có mặt ở dạng thể tiếp hợp miễn dịch hoặc kháng thể được đánh dấu để thu được tín hiệu dễ phát hiện/dễ định lượng. Khi được sử dụng với các nhãn thích hợp hoặc phân tử sinh học hoặc hóa chất dễ phát hiện thích hợp khác, thì kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R là đặc biệt hữu ích để chẩn đoán và tiên lượng *in vitro* và *in vivo*.

Các nhãn để sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch nói chung là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và bao gồm enzym, chất đồng vị phóng xạ, và chất phát huỳnh quang, phát quang và sinh màu, bao gồm các hạt màu như hạt keo vàng hoặc hạt latex. Các thử nghiệm miễn dịch thích hợp bao gồm thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA). Các loại nhãn khác nhau và phương pháp tiếp hợp các nhãn với các kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như các nhãn nêu dưới đây.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "rối loạn sinh ung thư liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R" được dự định bao gồm các bệnh và các rối loạn khác trong đó sự có mặt của thụ thể IGF-1R (bất thường) với nồng độ cao ở đối tượng bị rối loạn có hoặc nghi có đáp ứng với sinh lý bệnh học của rối loạn hoặc yếu tố góp phần làm cho rối loạn tồi tệ hơn. Theo cách khác, các rối loạn như vậy có thể được chỉ ra rõ ràng, ví dụ, bằng cách tăng nồng độ IGF-1R trên bề mặt tế bào ở các tế bào hoặc các mô đã nhiễm bệnh của đối tượng bị rối loạn. Việc tăng nồng độ IGF-1R có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R.

Theo các phương án nhất định, “mức biểu hiện được tăng lên” có liên quan tới IGF-1R được dùng để chỉ mức độ biểu hiện protein hoặc gen thể hiện việc tăng mức biểu hiện đáng kể có ý nghĩa thống (như được đo bằng biểu hiện ARN hoặc biểu hiện protein) đối với nhóm đối chứng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như được nêu trên, để sử dụng trong việc xác định

xem liệu đối tượng bị bệnh bị rối loạn sinh ung thư có thể thích hợp với việc điều trị bằng chất ức chế hướng tới IGF-1R, tốt hơn nếu kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R riêng rẽ, kết hợp hoặc được tiếp hợp.

Như được dùng trong bản mô tả này, sự biểu hiện “chất ức chế hướng tới IGF-1R” có nghĩa là hợp chất bất kỳ có khả năng làm giảm hoặc ức chế hoạt tính tyrosin kinaza của thụ thể IGF-1R, bằng cách gắn kết với (các) phối tử của thụ thể IGF-1R hoặc với chính IGFR. Ví dụ về các chất ức chế như vậy là protein, peptit, các kháng thể hoặc thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc hợp chất bất kỳ hoá học mà có tác dụng làm chất đối kháng IGF-1R, oligonucleotit đối nghĩa hoặc siARN ức chế sự biểu hiện của gen IGF-1R hoặc của gen mã hóa một trong số (các) phối tử IGFR, hoặc thuốc hoặc hợp chất khác bất kỳ đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Cụ thể hơn, trong bản mô tả này, chất ức chế hướng tới IGF-1R được dự định để bao gồm hợp chất hoặc phân tử bất kỳ có khả năng gắn kết với IGF-1R và ức chế khả năng gắn kết của (các) phối tử của nó.

Cụ thể hơn nữa, trong bản mô tả này, chất ức chế hướng tới IGF-1R được dự định để bao gồm kháng thể đơn dòng bất kỳ mà gắn kết với IGF-1R.

Theo một phương án được ưu tiên khác, chất ức chế hướng tới IGF-1R cấu thành bởi thể tiếp hợp kháng thể-được chất (ADC) trong đó gốc kháng thể hướng đích IGF-1R và gốc được chất có thể được chọn từ được chất bất kỳ như chất gây độc tế bào, chất kìm tế bào, độc tố, v.v.. Theo phương án được lấy làm ví dụ, gốc được chất có thể bao gồm auristatin, chất tương tự hoặc dẫn xuất.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phát hiện *in vitro* hoặc *ex vivo* sự có mặt và/hoặc vị trí của các tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế như được nêu trên; và

(b) phát hiện sự gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với mẫu sinh học nêu trên.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp *in vitro* hoặc *ex vivo* để phát hiện và /hoặc

để định lượng và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong, tốt hơn nếu ở bề mặt của các tế bào của đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế như được nêu trên; và

(b) phát hiện, và/hoặc định lượng, và/hoặc xác định nồng độ của quá trình gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với mẫu sinh học nêu trên.

Quá trình gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R có thể được phát hiện và/hoặc được xác định và/hoặc được xác định bởi các thử nghiệm khác nhau đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Mặc dù các phương pháp thích hợp bất kỳ để thực hiện các thử nghiệm này thuộc phạm vi của sáng chế, nhưng phương pháp xác định điểm số đánh giá tế bào đã được hoạt hóa bằng cách phương pháp huỳnh quang (FACS), ELISA, phương pháp nhuộm Tây và hóa mô miễn dịch (IHC) có thể được đề cập cụ thể. Các phương pháp được ưu tiên bao gồm IHC và FACS.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp *in vitro* hoặc *ex vivo* để phát hiện tỷ lệ phần trăm tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như được nêu trên; và

(b) định lượng tỷ lệ phần trăm tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mẫu sinh học nêu trên.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp *in vitro* hoặc *ex vivo* để xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R ở tế bào khối u hoặc ở khối u ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như được nêu trên; và

(b) định lượng mức độ gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với thụ thể IGF-1R trong mẫu sinh học nêu trên.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ dễ dàng nhận thấy rằng nồng độ của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R gắn kết với IGF-1R có thể được xác định bởi các phương pháp bất kỳ đã biết bởi người có hiểu biết trong bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương pháp được ưu tiên bao gồm việc sử dụng quy trình enzym miễn dịch, như thử nghiệm ELISA, phát huỳnh quang miễn dịch, IHC, thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA), hoặc FACS.

Bằng phương pháp của sáng chế, mức độ gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với IGF-1R được xác định bởi phương pháp xác định điểm số đánh giá tế bào đã được hoạt hóa bằng cách phương pháp huỳnh quang (FACS) hoặc hóa mô miễn dịch (IHC).

“Mẫu sinh học” có thể là mẫu bất kỳ có thể được lấy ra từ đối tượng. Mẫu này cho phép xác định mức độ biểu hiện của chất đánh dấu sinh học theo sáng chế. Do đó, bản chất của mẫu này sẽ tùy thuộc vào bản chất của khối u.

Các mẫu sinh học được ưu tiên bao gồm các mẫu như mẫu máu, mẫu huyết tương hoặc mẫu bạch huyết, nếu ung thư là khối u lỏng.

Các mẫu sinh học được ưu tiên bao gồm các mẫu như mẫu sinh thiết hoặc mẫu được lấy ra từ việc trị liệu bằng cách phẫu thuật cắt bỏ, nếu ung thư là khối u rắn.

Tốt hơn, nếu mẫu sinh học này là dịch lỏng sinh học, như huyết thanh, tế bào máu toàn phần, mẫu mô hoặc mẫu sinh thiết có nguồn gốc từ người. Mẫu này có thể, ví dụ, bao gồm, mô được sinh thiết, mà có thể được thử nghiệm một cách thuận lợi về sự có mặt của rối loạn gây bệnh ung thư liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Ngay khi xác định được mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong các mẫu sinh học đã được thử nghiệm, các kết quả có thể được so sánh với kết quả của mẫu đối chứng, thu được theo cách tương tự với các mẫu sinh học đã được thử nghiệm mà từ các cá thể không bị rối loạn sinh ung thư liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R. Nếu nồng độ của thụ thể IGF-1R được tăng lên đáng kể trong mẫu sinh học đã được thử nghiệm, thì có thể kết luận được rằng có sự tăng lên thích hợp trong đối tượng mà nó có nguồn gốc từ đó hoặc sẽ tạo ra rối loạn này.

Sáng chế mô tả quy trình chẩn đoán hoặc tiên lượng *in vitro* hoặc *ex vivo* về khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R, trong đó quy trình này bao gồm các bước (i) xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R bằng phương pháp để xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R *in vitro* hoặc *ex vivo* ở tế bào khối u hoặc ở khối u ở đối tượng theo sáng chế và như được nêu trên, và (ii) so sánh mức độ biểu hiện thu được của bước (i) với mức độ biểu

hiện so sánh của thụ thể IGF-1R từ mô khỏe mạnh hoặc mô không biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Liên quan tới việc phát triển việc trị liệu kháng khối u hướng đích, việc chẩn đoán bằng kỹ thuật mô miễn dịch sẽ đưa ra thông tin tại chỗ về mức độ biểu hiện thụ thể và do đó có thể chọn được các đối tượng bị bệnh mãn cảm cần được điều trị theo mức độ biểu hiện của các thụ thể cần cho việc điều trị này.

Việc xác định theo giai đoạn có giá trị tiên lượng tiềm năng và đưa ra các tiêu chuẩn để thiết kế việc trị liệu tối ưu. Simpson et al., J. Clin. Oncology 18:2059 (2000). Ví dụ, sự chọn lọc việc điều trị đối với các khối u rắn dựa trên giai đoạn phát triển của khối u, mà thường được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm khối u/nút u/di căn từ Ủy ban liên tịch Mỹ về ung thư (AJCC). Thông thường nhận thấy rằng trong khi thử nghiệm này và hệ theo giai đoạn cũng cấp một vài thông tin có giá trị liên quan tới giai đoạn mà tại đó ung thư rắn được chẩn đoán ở đối tượng bị bệnh, thì nó là không chính xác và không đủ. Cụ thể, nó không xác định được giai đoạn tiến triển sớm nhất của khối u.

Phương án khác bao gồm phương pháp *in vitro* hoặc *ex vivo* để xác định điểm số đánh giá thụ thể IGF-1R tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như được nêu trên;

(b) định lượng bằng phương pháp chọn lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang hoặc phương pháp hóa mô miễn dịch mức độ gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với thụ thể IGF-1R trong mẫu sinh học nêu trên; và

(c) xác định điểm số đánh giá tế bào khối u hoặc khối u bằng cách so sánh mức độ gắn kết thu được thu được ở bước (b) với thang điểm thích hợp dựa trên hai thông số là cường độ vết nhuộm và tỷ lệ phần trăm tế bào biểu hiện dương tính.

Theo một phương án, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R có khả năng gắn kết với IGF-1R khi các mẫu mô được cố định bằng formalin, được cố định bởi formol được thế, được cố định bởi Glyco-fixx, được nhúng trong parafin và/hoặc được làm đông lạnh.

Phương pháp phân tích rủi ro thông thường bất kỳ có thể được sử dụng để ước tính trị số tiên lượng của thụ thể IGF-1R. Các phương pháp phân tích đại diện bao gồm phân

tích thoái biến Cox, là phương pháp bán tham biến để lập mô hình dữ liệu về khả năng sống hoặc sự kiện theo thời gian với sự có mặt của các trường hợp được kiểm duyệt (Hosmer and Lemeshow, 1999; Cox, 1972). Trái với việc phân tích về khả năng sống khác, ví dụ, Bảng về sự sống (Life Table) hoặc Kaplan-Meyer, Cox cho phép bao gồm cả các biến dự đoán (đồng tham số) trong các mô hình. Bằng cách sử dụng phương pháp phân tích thông thường, ví dụ, một Cox có thể được dùng để thử nghiệm giả thuyết liên quan tới sự tương quan của tình trạng biểu hiện thụ thể IGF-1R của khối u sơ cấp để thiết lập theo thời gian của bệnh tái phát (thời gian sống không bị bệnh, hoặc thời gian dẫn tới sự di căn bệnh), hoặc thời gian dẫn tới sự tử vong do bệnh (tổng thời gian sống). Phân tích thoái biến Cox còn được gọi là phân tích rủi ro Cox theo tỷ lệ. Phương pháp này là phương pháp tiêu chuẩn để đánh giá trị số tiên lượng của chất đánh dấu khối u theo thời gian sống của đối tượng bị bệnh. Khi được sử dụng trên mô hình đa biến, mức độ ảnh hưởng của một số đồng tham số được thử nghiệm song song sao cho đồng tham số riêng lẻ có giá trị tiên lượng độc lập có thể được xác định, tức là các chất đánh dấu hữu ích nhất. Thuật ngữ “tình trạng IGF-1R” âm tính hoặc dương tính cũng có thể được gọi là [IGF-1R (-)] hoặc [IGF-1R (+)].

Mẫu có thể được “xác định điểm số đánh giá” trong quá trình chẩn đoán hoặc kiểm soát ung thư. Ở dạng đơn giản nhất của nó, điểm số đánh giá thụ thể có thể âm tính hoặc dương tính tuyệt đối như được đánh giá bằng cách thử nghiệm quan sát bằng mắt các mẫu bởi phương pháp hóa mô miễn dịch. Điểm số đánh giá thụ thể định lượng bao gồm việc đánh giá cường độ của hai thông số trong quá trình nhuộm và tỷ lệ của các tế bào đã được nhuộm (“dương tính”) được lấy mẫu.

“Tình trạng IGF-1R” có nghĩa theo sáng chế, được dùng để chỉ việc phân loại khối u với nhóm dương tính với IGF-1R [IGF-1R (+)] hoặc âm tính với IGF-1R [IGF-1R (-)] dựa trên việc xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R như được xác định bằng các phương pháp bất kỳ như hóa mô miễn dịch (IHC), xác định điểm số đánh giá tế bào đã được hoạt hóa bằng cách phương pháp huỳnh quang FACS, hoặc các phương pháp khác đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, để đảm bảo quá trình tiêu chuẩn hóa, các mẫu này có thể được xác định điểm số đánh giá về mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trên các quy mô khác nhau, hầu hết trong số chúng là dựa trên việc đánh giá cường độ của sản phẩm phản ứng và tỷ lệ phần trăm tế bào biểu hiện dương tính (Payne et al., Predictive markers in

breast cancer – the present, Histopathology 2008, 52, 82-90).

Theo phương án khác, điểm số đánh giá thụ thể này, đặc biệt là ở bước (c) của phương pháp theo sáng chế, bao gồm việc sử dụng thang điểm thích hợp dựa trên cường độ vết nhuộm và tỷ lệ phần trăm tế bào biểu hiện dương tính.

Ở ví dụ đầu tiên, bằng cách làm tương đồng với điểm số đánh giá thụ thể Quick Allred để đánh giá IHC của thụ thể oestrogen và thụ thể progesteron, các mẫu có thể được xác định điểm số đánh giá đối với mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R ở phạm vi toàn cầu từ 0 đến 8 kết hợp với số điểm về mức độ phản ứng và về tỷ lệ các tế bào đã được nhuộm (Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC; J. Clin. Oncol. 1999; 17; 1474-1481). Cụ thể hơn, tiêu chuẩn đầu tiên về mức độ phản ứng được xác định điểm số đánh giá ở quy mô từ 0 đến 3, 0 tương ứng với “Không có khả năng phản ứng” và 3 tương ứng với “khả năng phản ứng mạnh”. Tiêu chuẩn thứ hai về khả năng phản ứng theo tỷ lệ được xác định điểm số đánh giá ở quy mô từ 0 đến 5, 0 tương ứng với “không có khả năng phản ứng” và 5 tương ứng với “khả năng phản ứng theo tỷ lệ là 67-100%”. Số điểm về mức độ phản ứng và số điểm về khả năng phản ứng theo tỷ lệ sau đó được tính tổng để tạo ra tổng số điểm bằng 0 đến 8. Tổng số điểm bằng 0-2 được coi là âm tính trong khi tổng số điểm bằng 3-8 được coi là dương tính.

Theo quy mô này, thuật ngữ “tình trạng IGF-1R” âm tính hoặc dương tính của khối u hoặc tế bào khối u được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R lần lượt tương ứng với số điểm 0-2 hoặc 3-8 trên quy mô Allred.

Bảng 4 dưới đây minh họa hướng dẫn kết quả giải thích IHC bằng phương pháp Allred.

Bảng 4

Mức độ phản ứng miễn dịch	Số điểm 1	Khả năng phản ứng theo tỷ lệ	Số điểm 2
Không có khả năng phản ứng	0	Không có khả năng phản ứng	0
Khả năng phản ứng yếu	1	<1%	1
Khả năng phản ứng trung bình	2	1-10%	2
Khả năng phản ứng mạnh	3	11-33%	3
	-	34-66%	4
	-	67-100%	5
Tổng số điểm (Số điểm 1 + Số điểm 2)		Giải thích	
0-2		Âm tính	
3-8		Dương tính	

Theo sáng chế, phương pháp này khác biệt ở chỗ thang điểm thích hợp này là quy mô từ 0 đến 8 trong đó không có khả năng phản ứng thì điểm số đánh giá thụ thể là 0, và khả năng phản ứng mạnh với tỷ lệ 67-100% thì điểm số đánh giá thụ thể là 8.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, phương pháp để xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* về điểm số đánh giá thụ thể IGF-1R tế bào khối u hoặc của khối u ở đối tượng theo sáng chế, được khác biệt ở chỗ ở bước (c) thang điểm thích hợp này là quy mô từ 0 đến 8 trong đó không có khả năng phản ứng thì xác định điểm số đánh giá là 0, và khả năng phản ứng mạnh về tỷ lệ là 67-100% thì xác định điểm số đánh giá là 8.

Mặt khác, nó được mô tả và được yêu cầu bảo hộ về quy trình xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng của khối u hoặc tế bào khối u thu được từ đối tượng, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) xác định điểm số đánh giá khối u hoặc tế bào khối u từ đối tượng theo quy mô Allred; và

(b) - i) xác định tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred nằm trong khoảng từ 3 đến 8 ; hoặc

-ii) xác định tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(-)] với điểm số Allred bằng 0 đến 2.

Theo khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 3.

Theo khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 4.

Theo khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 5.

Theo khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 6.

Theo khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 7.

Theo khía cạnh cụ thể, tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với điểm số Allred bằng 8.

Theo khía cạnh cụ thể khác của sáng chế, tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R (+)] với điểm số Allred nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

Phương pháp cụ thể khác trong bản mô tả này được mô tả để xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng IGF-1R của tế bào khối u hoặc của khối u ở đối tượng, được khác biệt ở chỗ nó bao gồm các bước:

(a) xác định điểm số đánh giá IGF-1R của tế bào khối u hoặc của khối u từ đối tượng này bằng phương pháp theo điểm 18; và

(b) xác định tình trạng IGF-1R của tế bào khối u hoặc của khối u là [IGF-1R(+)] với số điểm nằm trong khoảng từ 3 đến 8; hoặc

(c) xác định tình trạng IGF-1R của tế bào khối u hoặc của khối u là [IGF-1R(-)] với số điểm bằng 0 đến 2.

Trong ví dụ thứ hai, bằng cách làm tương đồng với điểm số đánh giá thụ thể thông thường để đánh giá IHC của thụ thể HER-2, ví dụ, các mẫu có thể được xác định điểm số đánh giá đối với mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong phương pháp xác định điểm số đánh giá đơn giản hơn ở phạm vi nhất định hợp nhất với cường độ vết nhuộm (tốt hơn nếu nhuộm màng) và tỷ lệ của các tế bào nhuộm theo quy mô kết hợp từ 0 đến 3+.

Ở quy mô này, được gọi là quy mô được đơn giản hóa, 0 và 1+ là âm tính trong khi đó 2+ và 3+ tức là việc nhuộm dương tính. Tuy nhiên, số điểm 1+-3+ có thể được ghi lại là dương tính do mỗi số điểm dương tính có thể liên quan tới nguy cơ tái phát và bệnh béo phì cao hơn đáng kể so với số điểm 0 (âm tính), nhưng mức độ tăng dần trong các số điểm dương tính có thể làm giảm nguy cơ khác.

Nói chung, thuật ngữ “tình trạng IGF-1R” âm tính hoặc dương tính của khối u hoặc của tế bào khối u được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R lần lượt tương ứng với số điểm 0-1+ hoặc 2+-3+ ở quy mô được đơn giản hóa. Chỉ xem xét khả năng phản ứng của màng theo chu vi của khối u xâm lấn và thường tương tự với biểu hiện “lưới thép mỏng”. Theo hướng dẫn hiện nay, các mẫu xác định điểm số đánh giá là đường biên (số điểm bằng 2+ hoặc 3+) đối với IGF-1R cần được đánh giá tiếp. Ví dụ không giới hạn về phân tích IHC cần phải loại ra, và được lặp lại hoặc được thử nghiệm bằng FISH hoặc phương pháp khác bất kỳ nếu mẫu đối chứng không được dự đoán, các đối tượng nhân tạo liên quan đến hầu hết các mẫu và mẫu này

có khả năng qua màng mạnh của ống ngực khỏe mạnh (mẫu đối chứng nội) gợi ý sự thu hồi kháng nguyên quá mức.

Để cho rõ ràng, bảng 5 dưới đây tóm tắt các thông số này.

Bảng 5

Tình trạng IGF-1R	Mô tả IHC
0	Không có khả năng phản ứng hoặc khả năng phản ứng qua màng ở dưới 10% tế bào khối u
1 ⁺	Nhận thấy khả năng phản ứng qua màng yếu/không có ở trên 10% tế bào khối u. Các tế bào này chỉ phản ứng miễn dịch ở một phần màng.
2 ⁺	Nhận thấy khả năng phản ứng qua màng hoàn toàn từ yếu đến trung bình ở trên 10% tế bào khối u.
3 ⁺	Nhận thấy khả năng phản ứng hoàn toàn mạnh ở trên 10% tế bào khối u.

Phương pháp theo sáng chế khác biệt ở chỗ thang điểm thích hợp này là quy mô từ 0 đến 3⁺ trong đó khả năng không phản ứng qua màng của các tế bào khối u được xác định điểm số đánh giá 0 và khả năng phản ứng hoàn toàn mạnh ở trên 10% tế bào khối u được xác định điểm số đánh giá 3⁺.

Chi tiết hơn, như được nêu trên, thang điểm thích hợp này là quy mô từ 0 đến 3 trong đó khả năng không phản ứng qua màng các tế bào khối u được xác định điểm số đánh giá 0; nhận thấy khả năng phản ứng qua màng yếu ở trên 10% tế bào khối u được xác định điểm số đánh giá 1⁺; khả năng phản ứng hoàn toàn từ yếu đến trung bình qua màng ở trên 10% tế bào khối u được xác định điểm số đánh giá 2⁺; và khả năng phản ứng hoàn toàn mạnh ở trên 10% tế bào khối u được xác định điểm số đánh giá 3⁺.

Mặt khác, nó được mô tả và được yêu cầu bảo hộ về quy trình xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng của khối u của tế bào khối u từ đối tượng, trong đó quy trình này bao gồm các bước (a) xác định điểm số đánh giá khối u hoặc tế bào khối u từ đối tượng theo quy mô được đơn giản hóa như được nêu trên; và (b) xác định tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(+)] với số điểm bằng 2⁺ hoặc 3⁺; hoặc (c) xác định tình trạng của khối u hoặc của tế bào khối u là [IGF-1R(-)] với số điểm bằng 0 hoặc 1⁺.

Theo khía cạnh cụ thể, khối u hoặc tế bào khối u là [IGF-1R (+)] với số điểm bằng 2⁺.

Theo khía cạnh cụ thể, khối u là, hoặc tế bào khối u là [IGF-1R (+)] với số điểm bằng 3⁺.

Theo khía cạnh cụ thể khác của sáng chế, a khối u là, hoặc tế bào khối u là [IGF-

1R (+)] với số điểm bằng 2+ hoặc 3+.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng IGF-1R tế bào khối u hoặc khối u ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) xác định điểm số đánh giá IGF-1R của tế bào khối u hoặc khối u này từ đối tượng đó bằng phương pháp nêu trên theo sáng chế; và

(b) -i) xác định tình trạng IGF-1R của tế bào khối u hoặc của khối u là [IGF-1R(+)] với số điểm bằng 2⁺ hoặc 3⁺; hoặc

-ii) xác định tình trạng IGF-1R của tế bào khối u là [IGF-1R(-)] với số điểm bằng 0 hoặc 1⁺.

Nói chung, các kết quả của thí nghiệm hoặc thử nghiệm có thể có mặt ở dạng bất kỳ trong số nhiều dạng. Các kết quả này có thể có mặt về mặt định lượng. Ví dụ, báo cáo thử nghiệm có thể chỉ chỉ ra xem liệu polypeptit có được phát hiện hay không, có lẽ cũng đưa ra chỉ dẫn giới hạn của việc phát hiện. Các kết quả này có thể được biểu thị ở dạng bán định lượng. Ví dụ, các khoảng khác nhau có thể được xác định, và các khoản này có thể được gọi là số điểm (ví dụ, 0 đến 3+ hoặc 0 đến 8 tùy thuộc vào quy mô sử dụng) đưa ra mức độ thông tin định lượng nhất định. Số điểm này có thể phản ánh các yếu tố khác nhau, ví dụ, nhiều tế bào trong đó IGF-1R được phát hiện, cường độ của tín hiệu (mà có thể chỉ ra mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R hoặc tế bào mang IGF-1R), v.v.. Các kết quả có thể được biểu hiện theo cách định lượng, ví dụ, như tỷ lệ phần trăm tế bào trong đó IGF-1R được phát hiện, như nồng độ protein, v.v..

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu được rằng loại đầu ra đã được đưa ra bởi thử nghiệm thay đổi tùy thuộc vào giới hạn kỹ thuật của thử nghiệm và ý nghĩa sinh học liên quan tới sự phát hiện của polypeptit. Ví dụ, trong trường hợp các polypeptit nhất định, đầu ra định lượng một cách tinh khiết (ví dụ, có hoặc không phát hiện được polypeptit ở nồng độ phát hiện nhất định) cung cấp thông tin đáng kể. Trong các trường hợp khác, đầu ra định lượng hơn (ví dụ, tỷ lệ về mức độ biểu hiện của polypeptit trong mẫu đã được thử nghiệm với nồng độ thông thường) là cần thiết.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp chẩn đoán rối loạn bệnh sinh ung thư siêu tăng sinh hoặc độ nhạy với tình trạng bệnh lý liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng, bao gồm các bước:

(a) xác định sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào mang IGF-1R trong mẫu bằng phương pháp phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo sáng chế, và

(b) chẩn đoán tình trạng bệnh lý hoặc độ nhạy với tình trạng bệnh lý dựa trên sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào mang IGF-1R này.

Trong các phương pháp được nêu trong bản mô tả này, việc phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R hoặc việc tăng nồng độ của thụ thể IGF-1R thường là chỉ dấu của đối tượng bị bệnh mắc hoặc nghi có mắc rối loạn do IGF-1R gây ra.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp dự đoán nguy cơ của cá thể phát triển ung thư, phương pháp này bao gồm bước phát hiện mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mô mẫu bằng phương pháp phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo sáng chế, trong đó mức độ biểu hiện cao IGF-1R là chỉ dấu của nguy cơ cao để phát triển ung thư.

Sáng chế còn mô tả phương pháp đánh giá sự xâm lấn khối u.

“Sự xâm lấn khối u” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ khối u phát triển một cách nhanh chóng và có xu hướng lây lan nhanh.

Theo một phương án, phương pháp này đánh giá sự xâm lấn khối u bao gồm các bước:

(a) xác định nồng độ của thụ thể IGF-1R đã được biểu hiện bởi các tế bào ở mẫu khối u, bằng phương pháp phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo sáng chế,

(b) xác định nồng độ của thụ thể IGF-1R được biểu hiện trong mẫu mô tương đương được lấy ra từ cùng một cá thể tại thời điểm sau bằng phương pháp phát hiện tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R theo sáng chế, và

(c) xác định tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) và tỷ lệ thu được ở bước (b)

trong đó tỷ lệ biểu hiện thụ thể IGF-1R trong mẫu khối u theo thời gian cung cấp thông tin rủi ro về sự tiến triển của ung thư.

Theo một phương án được ưu tiên, tỷ lệ giữa nồng độ thu được ở bước (a) và nồng độ thu được ở bước (b) lớn hơn 1 chứng tỏ rằng có sự xâm lấn. Theo phương án khác, tỷ lệ nhỏ hơn hoặc bằng 1 chứng tỏ không có sự ăn mòn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc kiểm soát sự biểu hiện thụ thể IGF-1R để đáp lại việc dùng trị liệu hướng tới IGF-1R bằng cách liên quan tới phương pháp phát hiện, và/hoặc để định lượng IGF-1R, và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế. Việc kiểm soát như vậy có thể là rất hữu ích khi việc trị liệu này tạo ra quá trình điều hòa ngược và/hoặc thoái biến IGF-1R.

Mục đích của sáng chế là nhằm mô tả phương pháp xác định xem rối loạn sinh ung thư có nhạy với việc điều trị bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R hay không, bao gồm các bước:

(a) xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u của khối u của đối tượng bằng phương pháp xác định điểm số đánh giá theo sáng chế như được nêu trên, và

(b) xác định xem khi tình trạng thụ thể IGF-1R của tế bào khối u hoặc của khối u là biểu hiện thụ thể IGF-1R, thì rối loạn sinh ung thư có nhạy với việc điều trị bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R hay không.

Cụ thể, việc kiểm soát sự biểu hiện thụ thể IGF-1R trên bề mặt tế bào có thể là công cụ quyết định để đánh giá hiệu quả của việc điều trị trong các nghiên cứu lâm sàng và các phương pháp điều trị “được cá nhân hóa”.

Do đó, sáng chế mô tả các phương pháp xác định phương pháp điều trị thích hợp cho đối tượng.

Việc tăng hoặc giảm về nồng độ của thụ thể IGF-1R có thể được xác định bởi phương pháp phát hiện và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế, là chỉ dấu của việc phát triển ung thư có liên quan tới IGF-1R. Do đó, bằng cách xác định việc tăng nhiều tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R hoặc thay đổi nồng độ của thụ thể IGF-1R có mặt trong các mô hoặc các tế bào khác nhau, có thể xác định được xem liệu phương pháp điều trị thích hợp hỗ trợ trong việc làm giảm nhẹ mức độ ác tính có liên quan tới IGF-1R có hiệu quả hay không.

Đối tượng khác của sáng chế cũng là phương pháp xác định *in vitro* hoặc *ex vivo*

về hiệu quả của phương pháp điều trị được thiết kế để làm thuyên giảm rối loạn sinh ung thư có liên quan tới IGF-1R ở đối tượng bị rối loạn này, bao gồm các bước:

(a) xác định mức độ biểu hiện thứ nhất của thụ thể IGF-1R bằng phương pháp phát hiện và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế, như được nêu trên trong mẫu sinh học thứ nhất, mẫu sinh học thứ nhất này tương đương với thời điểm thứ nhất của phương pháp điều trị này;

(b) xác định mức độ biểu hiện thứ hai của thụ thể IGF-1R bằng phương pháp phát hiện và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế, như được nêu trên trong mẫu sinh học thứ hai, mẫu sinh học thứ hai này tương ứng với thời điểm thứ hai, sau đó của việc điều trị này;

(c) tính toán tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thứ nhất này thu được ở bước (a) với mức độ biểu hiện thứ hai này thu được ở bước (b); và

(d) xác định rằng hiệu quả của phương pháp điều trị này là cao khi tỷ lệ thu được ở bước (c) lớn hơn 1; hoặc xác định hiệu quả của phương pháp điều trị này là thấp khi tỷ lệ thu được ở bước (c) nhỏ hơn hoặc bằng 1.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp điều trị này được thiết kế để làm thuyên giảm rối loạn sinh ung thư có liên quan tới IGF-1R ở đối tượng bị rối loạn này bao gồm bước cho đối tượng này dùng việc trị liệu hướng tới IGF-1R.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp chẩn đoán hình ảnh *in vivo* về rối loạn sinh ung thư liên quan đến sự biểu hiện thụ thể IGF-1R bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện và/hoặc để xác định mức độ biểu hiện theo sáng chế. Phương pháp như vậy là hữu ích để định vị tế bào khối u *in vivo*, cũng như kiểm soát khả năng xâm lấn của chúng. Tương tự, phương pháp này là hữu ích để kiểm soát quá trình tiến triển và/hoặc đáp ứng với việc điều trị ở đối tượng bị bệnh trước đó đã được chẩn đoán bị ung thư do IGF-1R gây ra.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp phát hiện vị trí của các tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng, bao gồm các bước:

a) dùng kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế cho đối tượng này; và

b) phát hiện sự gắn kết của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này,

trong đó khả năng gắn kết chỉ ra sự có mặt của tế bào khối u.

Để phát hiện sự có mặt của khối u biểu hiện, nhiều kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Tuy nhiên, phương pháp được ưu tiên là IHC và FACS.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh *in vivo*, chất phản ứng này chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này tốt hơn nếu được đánh dấu, tốt hơn nữa là được đánh dấu phóng xạ.

Sáng chế cũng dự tính việc sử dụng chất phản ứng này trong việc chẩn đoán hình ảnh cho đối tượng bị bệnh bị ung thư do IGF-1R gây ra.

Phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước:

(a) cho đối tượng bị bệnh dùng lượng hữu hiệu của chất phản ứng để chẩn đoán hình ảnh theo sáng chế và

(b) phát hiện chất phản ứng này.

Theo một phương án được ưu tiên, chất chẩn đoán hình ảnh chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, và gốc hoạt tính.

“Gốc hoạt tính” như được sử dụng trong bản mô tả này là chất cho phép phát hiện *in vivo* chất phản ứng chẩn đoán hình ảnh này. Gốc hoạt tính theo sáng chế bao gồm, cụ thể, các nguyên tố phóng xạ như Techneti-99m (99mTc), Đồng-67 (Cu-67), Scandi-47 (Sc-47), Lutheti-77 (Lu-177), đồng-64 (Cu-64), Yttri-86 (Y-86) hoặc Iot-124 (I-124).

Chất chẩn đoán hình ảnh được dùng với lượng hữu hiệu dùng để chẩn đoán ở động vật có vú như người và sau đó, sự định vị và tích tụ chất chẩn đoán hình ảnh được phát hiện. Sự định vị và tích tụ chất chẩn đoán hình ảnh có thể được phát hiện bằng cách chụp nucleit phóng xạ, ảnh nhận phóng xạ, chụp cộng hưởng từ hạt nhân, chụp cắt lớp vi tính, chụp positron cắt lớp, chụp cắt lớp vi tính theo trục ngang, phương pháp chụp X quang hoặc chụp cộng hưởng từ, phát hiện huỳnh quang, và phát hiện phát hiện hóa học.

Liên quan tới sự phát triển của việc trị liệu kháng khối u hướng đích, việc chẩn đoán bằng kỹ thuật mô miễn dịch cung cấp thông tin tại chỗ về mức độ biểu hiện thụ thể, ví dụ liên quan tới kích thước và/hoặc vị trí của khối u. Do đó, việc chẩn đoán có thể chọn được các đối tượng bị bệnh mãn cảm cần được điều trị theo mức độ biểu hiện thụ

thể cần thiết cho việc điều trị này.

Khía cạnh được đặc biệt quan tâm theo sáng chế là phương pháp chọn lọc đối tượng bị bệnh ung thư được dự đoán là có thể được điều trị hiệu quả hoặc không bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R, bao gồm các bước:

(a) xác định mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R bằng phương pháp theo sáng chế được nêu trên;

(b) so sánh mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) với mức độ biểu hiện đối chiếu; và

(c) chọn lọc đối tượng bị bệnh được dự đoán là có thể được điều trị hiệu quả bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R, khi tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) và mức độ biểu hiện đối chiếu lớn hơn 1; hoặc

(d) chọn lọc đối tượng bị bệnh được dự đoán là không thể điều trị được hiệu quả bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R, khi tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện thu được ở bước (a) và mức độ biểu hiện đối chiếu nhỏ hơn hoặc bằng 1.

Mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R là có lợi nếu được so sánh hoặc được xác định liên quan đến nồng độ trong tế bào hoặc mẫu đối chứng cũng được gọi là “nồng độ so sánh” hoặc “mức độ biểu hiện so sánh”. “Nồng độ so sánh”, “mức độ biểu hiện so sánh”, “nồng độ đối chứng” và “đối chứng” được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này. “Nồng độ đối chứng” có nghĩa là nồng độ đường nền riêng biệt được xác ở tế bào đối chứng có thể so sánh được, thường mang bệnh hoặc không bị ung thư. Tế bào đối chứng này có thể thu được từ cùng một cá thể, do ngay cả ở đối tượng bị bệnh ung thư, mô là vị trí khối u vẫn chứa mô khỏe mạnh không có khối u. Nó cũng có thể có nguồn gốc từ cá thể khác khỏe mạnh hoặc không bị cùng một bệnh mà mẫu bị bệnh hoặc mẫu thử nghiệm thu được từ đó. Trong bản mô tả của sáng chế, thuật ngữ “nồng độ so sánh” được dùng để chỉ “nồng độ đối chứng” của sự biểu hiện thụ thể IGF-1R được dùng để đánh giá nồng độ thử nghiệm của sự biểu hiện thụ thể IGF-1R ở tế bào ung thư chứa mẫu của đối tượng bị bệnh. Ví dụ, khi nồng độ của thụ thể IGF-1R trong mẫu sinh học của đối tượng bị bệnh cao hơn so với nồng độ so sánh của thụ thể IGF-1R, thì các tế bào được coi là có mức độ biểu hiện cao, hoặc biểu hiện quá mức IGF-1R. Nồng độ so sánh có thể được xác định bởi nhiều phương pháp. Do đó, mức độ biểu hiện có thể xác định tế bào mang IGF-1R

hoặc theo cách khác mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R độc lập với nhiều tế bào biểu hiện thụ thể IGF-1R. Do đó, nồng độ so sánh đối với mỗi đối tượng bị bệnh có thể được quy định bởi tỷ lệ so sánh của thụ thể IGF-1R, trong đó tỷ lệ so sánh này có thể được xác định bởi phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp xác định nồng độ so sánh được nêu trong bản mô tả này.

Ví dụ, mức độ đối chứng có thể là trị số xác định trước, mà có thể thu được ở nhiều dạng. Nó có thể là trị số ngưỡng đơn, như trị số trung bình hoặc trung vị. “Nồng độ so sánh” có thể là trị số đơn, đều có thể áp dụng như nhau đối với mọi đối tượng bị bệnh bị bệnh riêng biệt, hoặc nồng độ so sánh này có thể thay đổi theo các phân nhóm cụ thể của đối tượng bị bệnh. Do đó, ví dụ, nam giới lớn tuổi phải có nồng độ so sánh khác với nam giới trẻ tuổi đối với cùng bệnh ung thư, và phụ nữ phải có nồng độ so sánh khác với nam giới đối với cùng bệnh ung thư. Theo cách khác, “nồng độ so sánh” có thể được xác định bằng cách đo mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R ở tế bào ung thư không sinh ung thư từ mẫu mô tương tự như mô chứa tế bào khối u được thử nghiệm. “Nồng độ so sánh” cũng phải là tỷ lệ nhất định của thụ thể IGF-1R ở tế bào khối u của đối tượng bị bệnh so với nồng độ IGF-1R ở tế bào không ung thư trong cùng đối tượng bị bệnh. “Nồng độ so sánh” cũng có thể là nồng độ IGF-1R của tế bào được nuôi cấy *in vitro*, có thể được nhân bội để kích thích tế bào khối u, hoặc có thể được nhân bội theo cách thức bất kỳ khác để thu được mức độ biểu hiện xác định chính xác nồng độ so sánh. Mặt khác, “nồng độ so sánh” có thể được thiết lập dựa trên các nhóm so sánh, như nhóm không có nồng độ IGF-1R gia tăng và nhóm có nồng độ IGF-1R gia tăng. Một ví dụ khác về các nhóm so sánh sẽ là các nhóm bị bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc triệu chứng cụ thể và các nhóm không bị bệnh. Trị số xác định trước có thể được sắp xếp, ví dụ, bằng cách chia đều (hoặc không đều) quần thể thử nghiệm thành các nhóm, như nhóm nguy cơ thấp, nhóm nguy cơ trung bình và nhóm nguy cơ cao.

Nồng độ so sánh cũng có thể được xác định bằng cách so sánh nồng độ IGF-1R trong các quần thể đối tượng bị bệnh bị cùng bệnh ung thư. Nồng độ so sánh này cũng có thể được xác định bằng phân tích biểu đồ tần số, trong đó toàn bộ nhóm đối tượng bị bệnh được vẽ đồ thị, trong đó trục thứ nhất thể hiện nồng độ IGF-1R, và trục thứ hai thể hiện số lượng đối tượng bị bệnh trong nhóm có tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở nồng độ xác định. Hai hoặc nhiều nhóm đối tượng bị bệnh riêng biệt có thể được xác định bằng cách phân loại phân nhóm quần thể đối tượng bị bệnh có cùng hoặc có nồng độ

IGF-1R tương tự. Sau đó, nồng độ so sánh này có thể được xác định dựa trên nồng độ phân biệt tốt nhất các nhóm riêng biệt này. Nồng độ so sánh này cũng có thể thể hiện nồng độ của hai hoặc nhiều chất đánh dấu, một trong số hai chất đánh dấu này là IGF-1R. Hai hoặc nhiều chất đánh dấu có thể được thể hiện bằng tỷ lệ về nồng độ của mỗi chất đánh dấu.

Tương tự, quần thể khỏe mạnh sẽ có khoảng “bình thường” khác với quần thể bị tình trạng bệnh lý liên quan đến việc biểu hiện thụ thể IGF-1R. Theo đó, trị số xác định trước được chọn có thể được tính đến trị số đầu mút trong đó các cá thể nằm ngoài khoảng này. Các khoảng và trị số đầu mút thích hợp có thể được chọn bằng thử nghiệm thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Thuật ngữ “tăng” hoặc “gia tăng” có nghĩa là cao hơn so với mức độ đối chứng đã được chọn. Thông thường, mức độ đối chứng sẽ được chọn dựa trên các cá thể khỏe mạnh ở độ tuổi thích hợp.

Cũng sẽ hiểu rằng ngoài trị số xác định trước, mẫu đối chứng có thể là mẫu nguyên liệu được thử nghiệm song song với nguyên liệu thử nghiệm. Ví dụ về các mẫu này bao gồm mô hoặc tế bào thu được ở cùng thời điểm từ cùng đối tượng, ví dụ, các phần của mẫu sinh thiết duy nhất, hoặc các phần của một mẫu tế bào từ đối tượng.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến được phẩm dùng để chẩn đoán hình ảnh *in vivo* về rối loạn sinh ung thư liên quan đến biểu hiện thụ thể IGF-1R chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được đánh dấu và chất mang được dùng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến kit phát hiện tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng bị bệnh, khác biệt ở chỗ kit này chứa ít nhất một kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như được nêu trên, và tốt hơn nếu kháng thể 810D12.

Nguyên liệu bao gói chứa chế phẩm kết hợp bao gồm các chất phản ứng ở lượng xác định trước và hướng dẫn sử dụng để thực hiện thử nghiệm chẩn đoán này, ví dụ, kit này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Kit này chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R để phát hiện và định lượng thụ thể IGF-1R *in vitro*, ví dụ, trong phương pháp ELISA. Khi kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R được đánh dấu bằng enzym, thì kit này sẽ bao gồm các cơ chất và đồng yếu tố cần có bởi enzym (ví dụ, tiền cơ chất tạo ra nhóm mang màu

hoặc nhóm phát huỳnh quang có thể phát hiện). Ngoài ra, các chất hỗ trợ khác có thể được sử dụng, như chất ổn định, dung dịch đệm (ví dụ, dung dịch đệm phong bế hoặc dung dịch đệm phân giải) và chất tương tự. Kit này có thể chứa đồ đựng được chia ngăn để tiếp nhận một hoặc nhiều đồ chứa, như lọ, ống và tương tự, các đồ chứa này đựng các thành phần riêng biệt theo sáng chế. Ví dụ, một đồ chứa có thể chứa kháng thể thứ nhất được gắn kết với chất mang không hòa tan hoặc hòa tan một phần. Đồ chứa thứ hai có thể chứa kháng thể thứ hai hòa tan được đánh dấu có thể phát hiện, ở dạng đông khô hoặc dung dịch. Đồ đựng này cũng có thể chứa đồ chứa thứ ba mang kháng thể thứ ba được đánh dấu có thể phát hiện ở dạng đông khô hoặc dung dịch. Kit có bản chất này có thể được sử dụng trong thử nghiệm dạng bánh kẹp “sandwich” theo sáng chế. Tờ hướng dẫn sử dụng hoặc nhãn hướng dẫn sử dụng cung cấp thông tin về thành phần cũng như hướng dẫn sử dụng chẩn đoán hoặc *in vitro*.

Lượng tương đối của các chất phản ứng khác nhau có thể được thay đổi để tạo ra nhiều nồng độ của các chất phản ứng trong dung dịch để tối ưu hóa độ nhạy của thử nghiệm. Cụ thể, các chất phản ứng có thể ở dạng bột khan, thường là bột đông khô, bao gồm các tá dược khi hòa tan sẽ tạo ra dung dịch chất phản ứng có nồng độ thích hợp.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đánh dấu bằng gốc có thể phát hiện, sao cho kháng thể này có thể được bao gói và sử dụng ở dạng kit để chẩn đoán hoặc xác định tế bào có kháng nguyên nêu trên. Ví dụ không giới hạn về các chất đánh dấu này bao gồm chất phát huỳnh quang, như fluorescein isothiocyanat; chất mang màu, nuclit phóng xạ, biotin hoặc enzym. Kháng thể kháng IGF-1R được đánh dấu này có thể được sử dụng để xác định vị trí mô của kháng nguyên bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, ELISA, phân loại tế bào, cũng như các kỹ thuật miễn dịch khác để phát hiện hoặc định lượng IGF-1R, và tế bào mang kháng nguyên này, chẳng hạn.

Sáng chế cũng đề cập đến kit, trong đó kit này khác biệt ở chỗ nó chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến kit, trong đó kit này khác biệt ở chỗ nó chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R khám hoặc nhân tạo hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà có thể thu được từ 6 CDR có các trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 đến 6 của kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến kit là hữu ích làm đối chứng dương tính để tinh chế hoặc kết tủa miễn dịch của thụ thể IGF-1R từ các tế bào. Để phân lập và tinh chế IGF-1R, kit này có thể chứa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được nêu trong bản mô tả này được liên hợp với các hạt (ví dụ, các hạt sepharosa). Kit có thể chứa các kháng thể để phát hiện và định lượng IGF-1R *in vitro*, ví dụ, ở ELISA. Kit này chứa đồ chứa và nhãn hướng dẫn sử dụng hoặc tờ hướng dẫn sử dụng trên hoặc liên quan đến đồ chứa này. Đồ chứa khác có thể bao gồm mà chứa, ví dụ, các chất pha loãng và chất đệm, các kháng thể đối chứng. Nhãn hướng dẫn sử dụng hoặc tờ hướng dẫn sử dụng có thể cung cấp thông tin về thành phần cũng như các hướng dẫn sử dụng để sử dụng *in vitro* hoặc chẩn đoán.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kit xác định *in vitro* hoặc *ex vivo* tình trạng IGF-1R của tế bào khối u của khối u ở đối tượng bằng các phương pháp được nêu trong bản mô tả này. Theo một phương án được ưu tiên, như được mô tả trong ví dụ, sáng chế đề cập đến kit xác định tình trạng IGF-1R của khối u hoặc của tế bào khối u bằng phương pháp IHC và/hoặc FACS.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kit chứa ít nhất một kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế như được nêu trên, kháng thể này được đánh dấu.

Theo một phương án được ưu tiên, kit theo sáng chế còn bao gồm chất phản ứng thích hợp để phát hiện sự gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R và IGF-1R.

Theo một phương án được ưu tiên khác, kit theo sáng chế là thích hợp để xác định mức độ biểu hiện *in vitro* hoặc *ex vivo* của thụ thể IGF-1R trong khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R, còn bao gồm chất phản ứng thích hợp để định lượng mức độ gắn kết của giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R đã được đánh dấu này và IGF-1R.

Vẫn theo phương án khác, kit theo sáng chế còn bao gồm: i) chất phản ứng thích hợp để phát hiện sự gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R đã được đánh dấu này và IGF-1R; và ii) mẫu đối chứng dương tính và âm tính thích hợp để xác định điểm số đánh giá mức độ biểu hiện thụ thể IGF-1R.

Kit này có thể còn bao gồm kháng thể đa dòng đặc hiệu với kháng thể của loài gặm nhấm hoặc với kháng thể của người/kháng thể nhân tạo, tốt hơn nếu kháng thể đa dòng này đặc hiệu với kháng thể của loài gặm nhấm, kháng thể nhân tạo hoặc kháng thể

của người được đánh dấu.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kit dùng để chọn lọc *in vitro* đối tượng bị bệnh ung thư mà được dự đoán là thích hợp hoặc không thích hợp với việc điều trị dùng chất ức chế hướng tới IGF-1R có thể bao gồm: i) chất phản ứng thích hợp để phát hiện sự gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này và IGF-1R; ii) nồng độ đối chứng có liên quan tới tính nhạy với chất ức chế IGF-1R và/hoặc iii) nồng độ đối chứng có liên quan tới tính kháng với chất ức chế IGF-1R.

Sáng chế cũng đề cập đến kit xác định xem đối tượng bị bệnh bị rối loạn sinh ung thư có thể thích hợp với việc điều trị bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R, khác biệt ở chỗ kit này chứa ít nhất một kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế như được nêu trên.

Theo phương án khác, kit theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó còn bao gồm

- i) chất phản ứng dùng để phát hiện sự gắn kết giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này và IGF-1R trên bề mặt của tế bào khối u; và/hoặc
- ii) chất phản ứng dùng để định lượng mức độ gắn kết của giữa kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R này và IGF-1R trên bề mặt của tế bào khối u.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất và chọn lọc kháng thể đơn dòng 810D12

Mab đã được tạo ra với rhIGF-1R được sản sinh và được chọn lọc như được mô tả dưới đây.

Chuột nhắt Balb/C cái được gây miễn dịch bằng cách tiêm dưới da 10 μ g protein IGF-1R tái tổ hợp của người (hệ R và D, 391-GR) với chất bổ trợ Freund. Quá trình gây miễn dịch được lặp lại ba lần cách nhau 2 tuần. The lần tiêm thứ tư được thực hiện bằng cách tiêm trong màng bụng với sự có mặt của chất bổ trợ.

Ba ngày sau, các tế bào lá lách được dung hợp với các tế bào u tủy SP2OAg14 với PEG 50%. Sau 14 ngày chọn lọc chất trao đổi HAT, dịch nổi trên bề mặt chứa tế bào lai được thử nghiệm bằng FACS bằng cách sử dụng các tế bào ung thư vú MCF7 của người. Chỉ có các kháng thể gắn kết với MCF7 mới được giữ lại.

Sau đó, các kháng thể quan tâm được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn.

Tám ngày sau khi tách dòng, dịch nổi trên bề mặt được chọn lại ngay bởi FACS bằng cách sử dụng các tế bào MCF7. Ba dòng dương tính được giữ lại đối với mỗi tế bào lai. Đồ hình dạng vẽ của các kháng thể đã được bài tiết được xác định bằng cách sử dụng kit gồm hệ tách dòng SBA-HRP do Southern Biotechnologies cung cấp (Cat: 5300-05). Cuối cùng, một dòng được mở rộng và được làm đông lạnh.

Sau đó, các đặc điểm khác của kháng thể 810D12 được thực hiện bằng cách sử dụng dịch nổi trên bề mặt chứa tế bào lai như rhIGF-1R hoặc rmIGF-1R hoặc rhIR ELISA. Trong tất cả các thử nghiệm ELISA trực tiếp, các protein quan tâm được làm bất động (1 µg/mL) vào đáy của mỗi giếng. Sau khi bão hòa, dịch nổi trên bề mặt chứa tế bào lai được bổ sung vào các giếng. Sau 1 giờ ủ và rửa, dung dịch chứa kháng thể đa dòng được đánh dấu IgG-HRP kháng chuột nhất của dê được sử dụng để phát hiện, trước khi bổ sung cơ chất TMB. Phản ứng được dừng lại bằng dung dịch H₂SO₄ 1M trước khi đọc OD bằng phổ quang kế ở bước sóng 450nm. Dữ liệu được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Trị số OD thu được ở 5µg/mL bằng thử nghiệm ELISA			
	phủ rhIGF1R	phủ rmIGF1R	phủ rhIR
810D12	2,136	0,053	0,048
CTRL dương tính	2,338	1,293	1,077
CTRL âm tính	0,055	0,065	0,048

Đường cong đáp ứng liều đối với kháng thể 810D12 khi phủ rhIGF-1R được thể hiện ở Fig.1. Các trị số EC₅₀ được xác định bằng cách sử dụng ứng dụng Prism.

Dữ liệu chỉ ra rằng kháng thể 810D12 chỉ nhận diện được rh IGF-1R với EC₅₀ bằng 0,51 nM. Nó không gắn kết với dạng IGF-1R của loài gặm nhấm cũng như IR của người.

Ví dụ 2: Đánh giá mối liên quan giữa giai đoạn của kháng thể theo sáng chế và hoạt tính của ADC hướng tới IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

Để đánh giá mối liên quan giữa việc đánh giá khối u với tính dược lý, khối u được đánh giá (phần 2.1) và sau đó các thử nghiệm in vivo trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7 được thực hiện với ADC chứa gốc kháng thể hướng tới IGF-1R đã biết cần nội bào hóa và gốc dược chất được cấu thành bởi auristatin (phần 2.2).

2.1: Phát hiện hóa mô miễn dịch về sự biểu hiện thụ thể IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

Phần mô từ mô hình ghép ngoại lai MCF-7 được khử parafin, hydrat hóa lại, và được đặt trong dung dịch đệm Target Retrieval 1X (Dako S1699) trong bể sôi đã được làm ấm sẵn ở 98°C để thu hồi epitop cảm ứng bởi nhiệt ở 98°C trong 40 phút, tiếp đó để trong 20 phút nữa trong dung dịch đệm Target Retrieval. Sau khi 3 lần trong nước muối đệm Tris-0,05% tween 20 (TBS-T) (Dako S3006) hoạt tính peroxidaza nội sinh được phong bế bằng cách sử dụng chất phản ứng phong bế peroxidaza (Dako K4007) trong năm phút. Các phần được rửa bằng TBS-T và được ủ chất phản ứng phong bế (UltraV block-TA-125UB- LabVision) trong 5 phút trước khi ủ bằng kháng thể 810D12 đơn dòng (ở nồng độ 5µg/mL) hoặc IgG1/kappa của chuột nhắt (5µg/mL, X0931, Dako) làm đối chứng âm tính trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các phần được rửa bằng TBS-T và được ủ bằng Envision (Dako) trong 30 phút. Diaminobenzidin được sử dụng để phát triển sản phẩm phản ứng màu nâu (Dako K3468). Các phần kính được ngâm trong hematoxylin trong 2 phút để phản chất nhuộm (Dako S3309).

Kháng thể kháng IGF-1R đơn dòng 810D12 theo sáng chế nhuộm biệt hóa màng tế bào MCF-7. Trong quy trình IHC này, sản phẩm phản ứng màu nâu có liên quan đến việc nhuộm dương tính màng tế bào và việc không xuất hiện sản phẩm phản ứng màu nâu có liên quan đến việc nhuộm âm tính và không quan sát thấy màng tế bào. Bằng cách sử dụng thuật toán màng, điểm số đánh giá thụ thể để nhuộm các tế bào khối u MCF-7 là 3+ (Fig.2A). Bằng cách sử dụng kháng thể G11 (Roche Ventana) hoặc kháng thể AF-305 (hệ R&D) kháng IGF-1R, phần của cùng một khối u được xác định điểm số đánh giá 2+ (lần lượt là Fig.2B và 2C).

2.2: Hoạt tính *in vivo* của ADC kháng IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

ADC kháng IGF-1R được đánh giá *in vivo*, trên mô hình ghép ngoại lai MCF-7.

Quy trình sử dụng động vật được thực hiện theo hướng dẫn của Chỉ thị 2010/63/UE về việc bảo vệ động vật được sử dụng nhằm mục đích nghiên cứu khoa học. Quy trình này được phê chuẩn bởi Ủy ban đạo đức về động vật của Viện Pierre Fabre. Năm triệu tế bào MCF-7 được tiêm dưới da vào chuột nhắt Swiss/Nude 7 tuần tuổi. Trước khi tiêm tế bào, các viên tròn oestrogen (Innovative Research of America) được

cấy vào sườn trái của chuột nhất để giải phóng estrogen cần cho sự phát triển khối u MCF-7 *in vivo*.

Hai mươi ngày sau khi cấy dưới da tế bào MCF-7, khi các khối u đạt tới kích thước trung bình 120-150 mm³, thì các con vật được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con theo kích thước và dạng khối u. ADC kháng IGF-1R được cấy truyền bằng cách tiêm trong màng bụng trong 6 chu kỳ tiêm cách nhau bốn ngày (Q4d4). Tình trạng sức khỏe của các con vật được kiểm tra hàng ngày. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần bằng thước kẹp điện tử cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Thể tích khối u được tính toán theo công thức sau: $\pi/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$. Độ tính được đánh giá theo trọng lượng của các con vật ba lần một tuần. Việc phân tích thống kê được thực hiện ở mỗi lần đo bằng cách sử dụng thử nghiệm Mann-Whitney.

Việc tiêm ADC kháng IGF-1R gây ức chế đáng kể và thậm chí là làm thoái biến hoàn toàn sự phát triển của khối u (Fig.3) như được kỳ vọng đối với khối u được đánh giá ở mức 3+ nhưng không thu được đối với khối u được đánh giá ở mức 2+.

Ví dụ 3: Đánh giá mối liên quan giữa giai đoạn của kháng thể theo sáng chế và hoạt tính của ADC hướng tới IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

Để đánh giá mối liên quan giữa việc đánh giá khối u với tính được lý, các khối u được đánh giá (phần 3.1) và sau đó các thử nghiệm *in vivo* trên mô hình dị ghép SBC-5 được thực hiện bằng ADC chứa gốc kháng thể hướng tới IGF-1R và gốc được chất được cấu thành bởi auristatin (phần 3.2).

3.1 Phát hiện hóa mô miễn dịch về sự biểu hiện thụ thể IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

Nồng độ IGF-1R được phân tích bằng cách sử dụng quy trình tương tự được mô tả trong phần 2.1 của ví dụ 2 nêu trên.

Khi IGF-1R được phát hiện với 810D12, thì nồng độ thấp được phát hiện (1+). (Fig.4A). Khi IGF-1R được phát hiện bằng kháng thể G11 (Roche Ventana) hoặc kháng thể AF-305 (hệ R&D) kháng IGF-1R, thì các phần từ cùng một khối u được xác định điểm số đánh giá là 3+ (lần lượt là Fig.4B và 4C).

3.2: Hoạt tính *in vivo* của ADC kháng IGF-1R trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

ADC kháng IGF-1R được đánh giá *in vivo*, trên mô hình ghép ngoại lai SBC-5.

Quy trình sử dụng động vật được thực hiện theo hướng dẫn của Chỉ thị 2010/63/UE về việc bảo vệ động vật được sử dụng nhằm mục đích nghiên cứu khoa học. Quy trình này được phê chuẩn bởi Ủy ban đạo đức về động vật của Viện Pierre Fabre. Năm triệu tế bào SBC-5 được tiêm dưới da vào chuột nhắt Athymic 7 tuần tuổi. Hai mươi ngày sau khi cấy tế bào dưới da, khi khối u đạt tới kích thước trung bình 150 mm^3 , thì các con vật được chia thành các nhóm, mỗi nhóm gồm 6 con theo kích thước và dạng khối u. ADC kháng IGF-1R được cấy truyền bằng cách tiêm trong màng bụng trong chu kỳ gồm 6 lần tiêm cách nhau ngày (Q4d6). Tình trạng sức khỏe của các con vật được kiểm tra hằng ngày. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần bằng thước kẹp điện tử cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Thể tích khối u được tính toán theo công thức sau: $\pi/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$. Độ tính được đánh giá theo trọng lượng của các con vật ba lần một tuần. Việc phân tích thống kê được thực hiện ở mỗi lần đo bằng cách sử dụng thử nghiệm Mann-Whitney.

Quá trình tiến triển của khối u chứa tế bào khối u SBC-5 không bị ảnh hưởng khi tiêm ADC kháng IGF-1R. (Fig.5) như được kỳ vọng đối với khối u được xác định điểm số đánh giá là 1+ nhưng không thu được đối với khối u được xác định điểm số đánh giá là 3+.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1), hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa:

i) chuỗi nặng chứa vùng CDR-H1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng CDR-H2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và vùng CDR-H3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 3; và

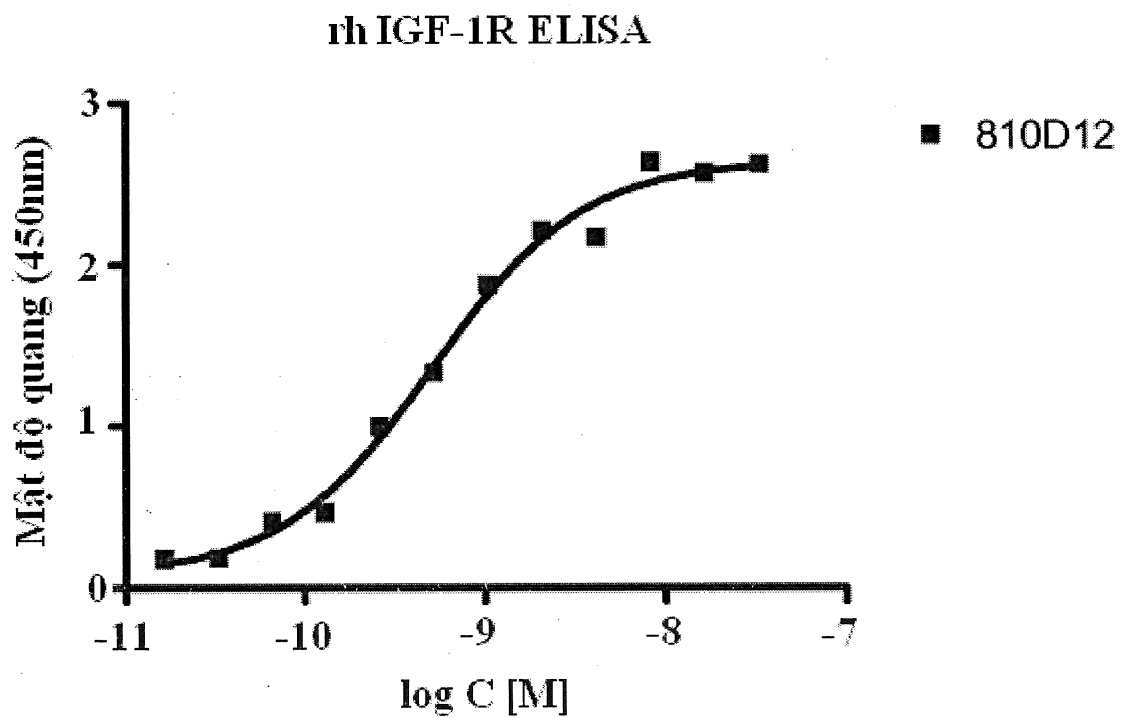
ii) chuỗi nhẹ chứa vùng CDR-L1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, vùng CDR-L2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 và vùng CDR-L3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

2. Kháng thể theo điểm 1, khác biệt ở chỗ kháng thể này chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7 và/hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8.

3. Kháng thể gắn kết thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1R - insulin like growth factor receptor -1), hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, khác biệt ở chỗ kháng thể này được bài tiết bởi tế bào lai được nộp lưu tại Ngân hàng giống và vi sinh vật, Viện Pasteur, Paris, Pháp, vào ngày 17 tháng 09 năm 2014, với mã đăng ký là I-4893.

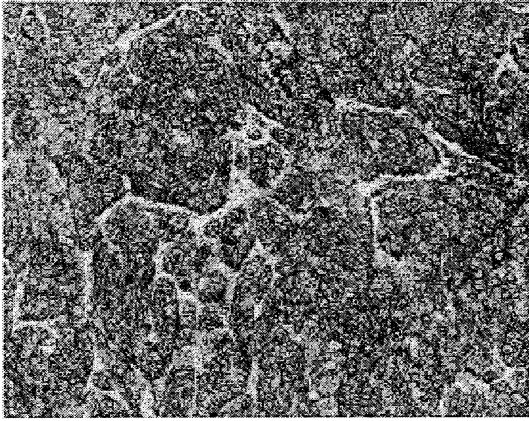
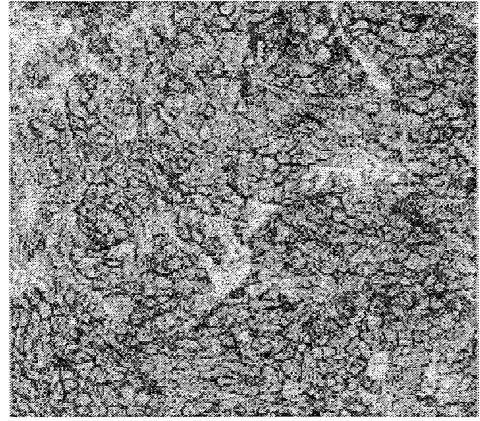
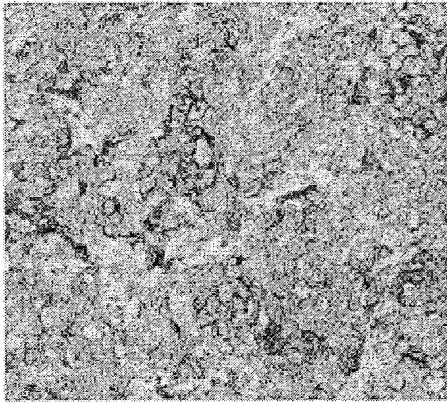
4. Kit phát hiện tế bào khối u biểu hiện thụ thể IGF-1R ở đối tượng bị bệnh, khác biệt ở chỗ kit này chứa ít nhất một kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

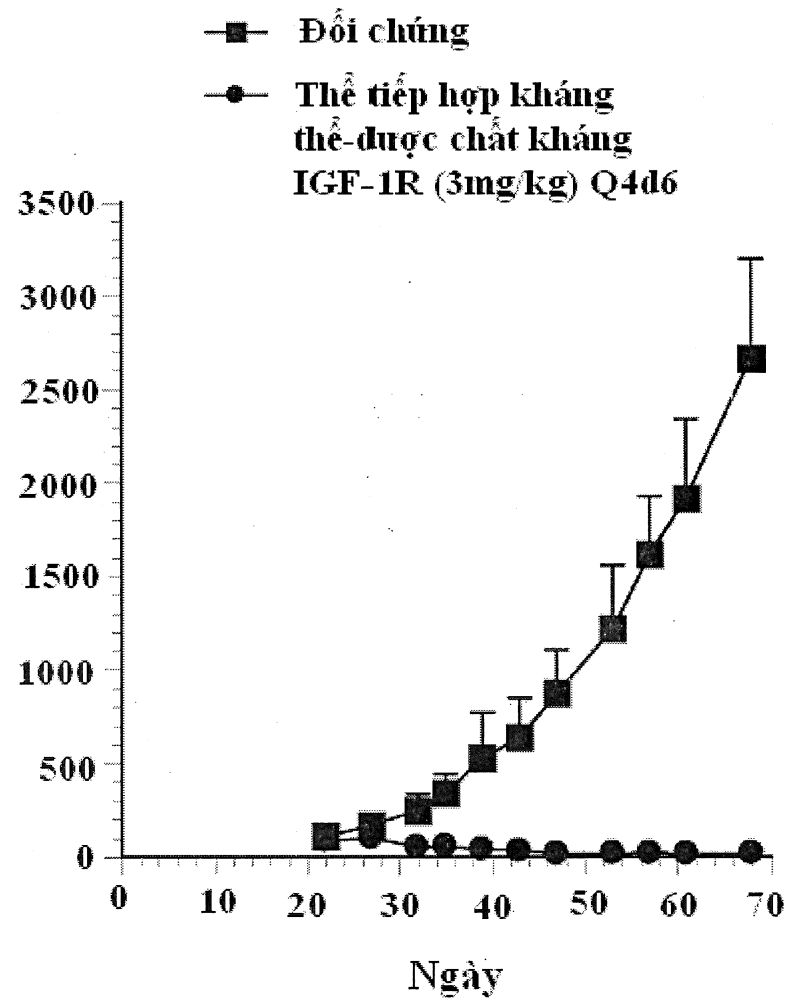
5. Kit xác định xem đối tượng bị rối loạn sinh ung thư có thể được điều trị hiệu quả bằng kháng thể hướng đích thụ thể IGF-1R hay không, khác biệt ở chỗ kit này chứa ít nhất một kháng thể gắn kết thụ thể IGF-1R, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

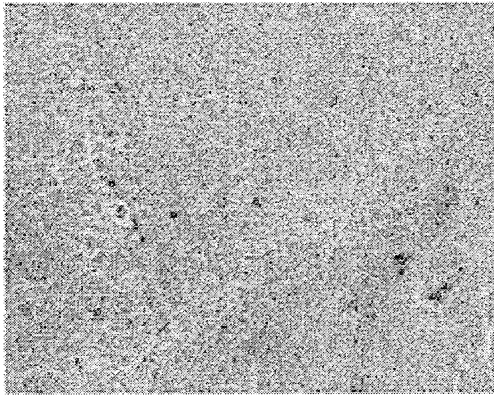


	810D12
Đáp ứng liên xích ma (độ dốc thay đổi)	
Các trị số phù hợp nhất	
Đáy	0,08071
Đỉnh	2,641
Log(EC ₅₀)	-9,290
Độ dốc đồng biến	1,041
EC ₅₀	5,127 x 10 ⁻¹⁰

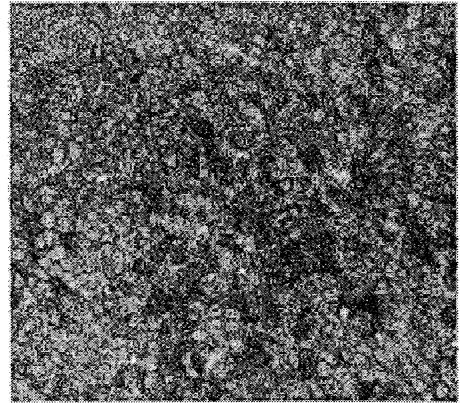
Fig.1

**A****B****C****Fig.2**

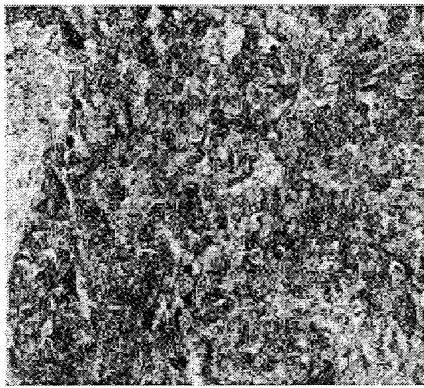
**Fig.3**



A

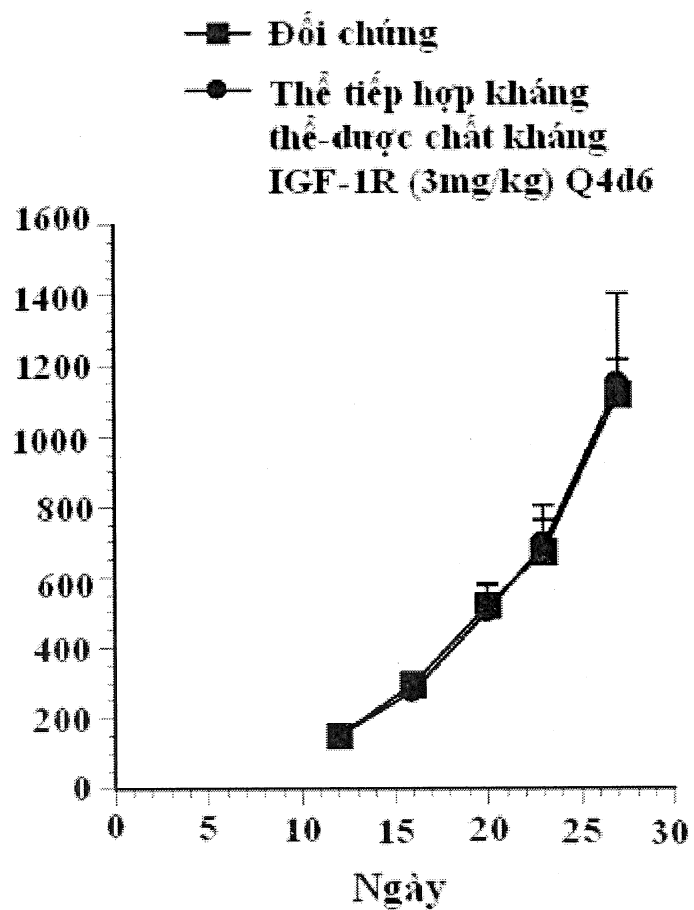


B



C

Fig.4

**Fig.5**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
<120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT THỤ THỂ YẾU TỔ SINH TRƯỞNG TƯƠNG TỰ INSULIN-1, VÀ KIT CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
<130> D34867
<150> EP 15305644.5
<151> 2015-04-27
<160> 10
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 810D12 I-4893, chuỗi nặng, vùng CDR-H1
<400> 1
Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr Met
1 5
<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 810D12 I-4893, chuỗi nặng, vùng CDR-H2
<400> 2
Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr
1 5
<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 810D12 I-4893, chuỗi nặng, vùng CDR-H3
<400> 3
Val Thr Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 810D12 I-4893, chuỗi nhẹ, vùng CDR-L1
<400> 4
Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
1 5
<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 810D12 I-4893, chuỗi nhẹ, vùng CDR-L2
<400> 5
Tyr Thr Ser
1
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 810D12 I-4893, chuỗi nhẹ, vùng CDR-L3
<400> 6
Gln Gln Gly Tyr Ser Leu Pro Trp Thr
1 5
<210> 7
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 810D12 I-4893, chuỗi nặng, miền biến đổi
<400> 7
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Met Leu His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

```

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Val Thr Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 810D12 I-4893, chuỗi nhẹ, miền biến đổi
 <400> 8

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

<210> 9
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 810D12 I-4893, chuỗi nặng, miền biến đổi
 <400> 9

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggaca cacattcact agctatatgc tgcactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gcttggattt attaatcctt acaatgatgt tactaagtac 180
 aatgagaact tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggagctca acagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgt aactaccgcc 300
 tactatggta acggccggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 10
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 810D12 I-4893, chuỗi nhẹ, miền biến đổi
 <400> 10

gatatccaga tgacacagac tacatcttcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattacc aattatttaa cctgggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaagttct gatctactac acatcaagat tatactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggatcagat tattctctca ccattaacaa cctggagcaa 240
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag gggtattcgc ttccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321