



(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)



1-0038113

(51)⁷ C12N 15/13; C12N 1/15; C12N 1/21; (13) B
C07K 16/30; C12N 1/19

(21) 1-2020-00395

(22) 06/07/2018

(86) PCT/JP2018/025618 06/07/2018

(87) WO 2019/009388 10/01/2019

(30) 2017-133698 07/07/2017 JP

(45) 25/01/2024 430

(43) 27/04/2020 385

(73) Astellas Pharma Inc. (JP)

5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8411, Japan

(72) DOIHARA, Hitoshi (JP); HIRAYAMA, Kazunori (JP); SHIRAI, Hiroki (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) MẢNH FAB CỦA KHÁNG THỂ KHÁNG CEACAM5 CỦA NGƯỜI, THỂ LIÊN HỢP CHỨA MẢNH FAB NÀY, CHẾ PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA MẢNH FAB CỦA KHÁNG THỂ KHÁNG CEACAM5 NGƯỜI HOẶC THỂ LIÊN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được kỳ vọng để có thể sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư, cụ thể là, chẩn đoán bệnh ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến giáp hoặc bệnh ung thư do sự di căn của các bệnh ung thư này. Sáng chế đề cập đến mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4, và thể liên hợp bao gồm mảnh Fab này. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người hoặc thể liên hợp bao gồm mảnh Fab. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa thể liên hợp này. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, vector biểu hiện chứa polynucleotit và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến mảnh Fab mới của kháng thể kháng CEACAM5 của người. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm để chẩn đoán chứa mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người này, và phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư bằng cách sử dụng mảnh Fab này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CEA (kháng nguyên ung thư phổi) hoặc CEACAM (phân tử bám dính tế bào liên quan đến kháng nguyên ung thư phổi) là dấu chuẩn khối u được phát hiện vào năm 1965 (J. Exp. Med.; 1965; 121: 439-462; và PNAS; 1969; 64: 161-167), và 23 phân tử liên quan đến CEA đã được phát hiện đến nay (BioMed Central Biology; 2010; 8: 12-33). Trong số các chất này, CEACAM5 hiếm khi được biểu hiện ở các mô bình thường, nhưng lại được biểu hiện ở ung thư đại trực tràng hoặc ống dạ dày ruột của phôi thai (BBA; 1990; 1032: 177-189; and Mol. Pathol.; 1999; 52: 174-178). CEACAM5 được biết là cũng được biểu hiện ở ung thư vú, ung thư phổi, và ung thư tuyến giáp (Diagn. Cytopathol.; 1993; 9: 377-382; Cancer Res.; 1990; 50: 6987-6994; Histopathology; 2000; 37: 530-535).

Nồng độ của CEACAM5 trong máu của bệnh nhân ung thư đại trực tràng cao hơn so với của người khỏe mạnh (J. Exp. Med.; 1965; 121: 439-462), và CEACAM5 được sử dụng làm dấu chuẩn khối u. Theo các nghiên cứu mô học của các bệnh nhân ung thư đại trực tràng, CEACAM5 được biểu hiện cao ở 90% mô hoặc nhiều hơn (British J. Cancer; 2013; 108: 662-667).

Do sự di căn sớm của ung thư đại trực tràng được khu trú ở gan, theo đó việc phát hiện sớm và điều trị hiện tượng di căn gan có thể giảm được tỷ lệ tái phát (Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.; 2017; 3: 163-173). Việc chẩn đoán di căn gan bằng cách sử dụng CT (tạo ảnh cắt lớp vi tính), MRI (tạo ảnh cộng hưởng từ), hoặc FDG- PET

(fluorodeoxyglucose-positron emission tomography - chụp cắt lớp phát positron flodeoxyglucoza). Độ nhạy phát hiện của CT, MRI, và FDG-PET lần lượt là 74,4, 80,3, và 81,4%, và độ nhạy phát hiện đối với khối u kích thước 1 cm hoặc nhỏ hơn được giảm xuống 47,3% đối với CT và 60,2% đối với MRI (Radiology; 2010; 257: 674-684). MRI sử dụng chất tương phản đặc hiệu gan cũng được sử dụng, mặc dù độ nhạy phát hiện của nó với khối u có kích thước 1 cm hoặc nhỏ hơn là từ 29 đến 38% (Radiology; 2005; 237: 89-98).

Các chất chống ung thư hoặc kháng thể được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ kim loại được sử dụng để chẩn đoán hoặc điều trị bệnh ung thư. Việc hướng đích bằng cách sử dụng kháng thể có tính đặc hiệu cao đối với các tế bào khối u và gây ra ít sự kiện bất lợi. Một số kháng thể đơn dòng được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ kim loại được áp dụng lâm sàng trong chẩn đoán và điều trị cho đến nay (Cancer Control; 2012; 19: 196-203).

Đồng thời, các kháng thể thường có thời gian bán hủy trong máu dài và cần khoảng thời gian dài khoảng 4 ngày đến 5 ngày để đạt được tỷ lệ khối u/máu mà tạo ra tỷ lệ tín hiệu trên nền đủ để hiển thị bệnh ung thư, sau khi được dùng trong cơ thể (Clin. Pharmacol. Ther.; 2010; 87: 586-592). Ngoài ra, các vùng Fc của các kháng thể tạo ra tác dụng được lý là hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC) hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC) Glycoconj. J.; 2013; 30: 227-236; and Curr. Opin. Biotechnol.; 2002; 13: 609-614). Ngoài ra, các kháng thể được chuyển hóa trong gan và vì thế được tích lũy nhiều trong gan, không liên quan đến đích. Tuy nhiên, rất khó để phát hiện các tổn thương di căn gan bằng kháng thể do sự di căn sớm của ung thư đại trực tràng được tập trung ở gan (Clin. Pharmacol. Ther.; 2010; 87: 586-592).

Các mảnh kháng thể tái tổ hợp phân tử thấp như Fab, scFv, và diabody (kháng thể kép) dễ dàng đến các tổn thương do khả năng thâm nhập mô cao của chúng và được sử dụng làm các kháng thể trị liệu do được sản xuất với chi phí thấp bằng cách sử dụng hệ biểu hiện ở *E. coli* hoặc nấm men có thể được kỳ vọng. Mặt khác, việc sử dụng chúng làm

được chất chẩn đoán cũng đã được thông báo do thời gian bán hủy của chúng trong máu ngắn và có đặc điểm bài tiết qua thận (Nat. Biotechnol.; 2005; 23: 1126-1136).

M5A (PTL 1), kháng thể được làm giống như của người của kháng thể đơn dòng của chuột T84.66, được biết là kháng thể kháng CEACAM5 người được áp dụng làm được chất chẩn đoán. Đã có thông báo rằng M5A được đánh dấu bằng ^{64}Cu cần mất 22 giờ hoặc lâu hơn sau khi dùng để thu được ảnh PET thuận lợi trong thử nghiệm bằng cách sử dụng chuột được cấy ghép tế bào ung thư dưới da (NPL 1), và được đưa vào mô gan bình thường và vị trí thương tổn của gan ở mức tương đương 3 giờ sau khi dùng và với sự khác biệt đáng kể sau 24 giờ trong thử nghiệm sử dụng mô hình chuột có di căn gan (NPL 2).

Với vai trò là một mảnh của kháng thể kháng CEACAM5 người, người ta đã thông báo rằng CEA-Scan, Fab' được đánh dấu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ của kháng thể đơn dòng chuột NP-4, có thể được sử dụng trong chẩn đoán ung thư đại trực tràng (NPL 3). Tuy nhiên, sự hấp thu CEA-Scan vào trong vị trí thương tổn không vượt quá mức hấp thu của nó vào trong gan bình thường, và độ nhạy phát hiện của nó đối với di căn gan thấp hơn của FDG-PET (NPL 4). CEA-Scan được FDA phê chuẩn làm được chất chẩn đoán đối với ung thư đại trực tràng vào năm 1999, nhưng không còn được bán (NPL 5).

Danh sách tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

PTL 1: Công bố quốc tế số WO 2005/086875

Tài liệu phi sáng chế

NPL 1: Bioconjug. Chem.; 2008; 19: 89-96

NPL 2: PLOS ONE; 2014; 9 (9): e106921

NPL 3: Ann. Surg.; 1997; 226: 621-631

NPL 4: J. Nucl. Med.; 2000; 41: 1657-1663

NPL 5: Kenneth T. Cheng, "99mTc-Arcitumomab", [online], Update: March 17, 2008., Molecular Imaging and Contrast Agent Database, [searched on May 17, 2017], internet <URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23676/>>

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mảnh Fab hóa trị một có khối lượng phân tử bằng khoảng 50 kDa, nhỏ hơn khối lượng (khoảng 150 kDa) của kháng thể, trải qua quá trình bài tiết qua thận, và cũng có thời gian bán thải trong máu ngắn. Vì thế, chúng đạt đến tỷ lệ khối u/máu mà tạo ra tỷ lệ tín hiệu/nền đủ để có thể phát hiện sự di căn gan và hiển thị bệnh ung thư trong vòng 2 đến 32 giờ sau khi sử dụng. Chúng thiếu vùng Fc và vì thế không gây ra ADCC lẫn CDC. Từ các đặc điểm này, các mảnh Fab có thể được kỳ vọng là có hiệu quả hơn với vai trò là được chất chẩn đoán so với kháng thể.

Tuy nhiên, hoạt tính gắn kết của mảnh Fab thường bị làm yếu đi do chúng là phân tử nhỏ. Kháng thể phải được đánh dấu bằng chất có thể phát hiện được như chất đánh dấu PET hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang để sử dụng chúng làm được chất chẩn đoán *in vivo*. Một vấn đề nữa của các mảnh Fab là việc giảm hoạt tính gắn kết của chúng là do việc đánh dấu bằng chất như vậy.

Mục đích của sáng chế là đề xuất mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người mà được sử dụng để phát hiện CEACAM5 người và được mong đợi là được tích lũy trong thương tổn ung thư trong thời gian ngắn (ví dụ, 4 giờ) sau khi dùng. Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm để chẩn đoán chứa mảnh Fab mà được kỳ vọng là sẽ cho phép chẩn đoán vào ngày được sử dụng, và phương pháp chẩn đoán bằng cách sử dụng mảnh Fab này.

Giải pháp kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu về việc tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người có thể được sử dụng để phát hiện CEACAM5 của người, và đặc hiệu bệnh ung thư ở người, và do đó đã tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng

CEACAM5 của người chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4 (Ví dụ 1) và đã phát hiện ra rằng: mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người không chịu sự suy giảm của hoạt tính gắn kết chống lại CEACAM5 người bằng việc gắn kết của gốc đánh dấu (Ví dụ 3); và thể liên hợp bao gồm mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người tích lũy trong tế bào ung thư dương tính với CEACAM5 của người trong các mô hình cấy ghép dưới da và các mô hình cấy ghép gan 4 giờ sau khi dùng và cho phép phát hiện các tế bào ung thư dương tính với CEACAM5 của người (các ví dụ 5 và 6). Cụ thể, sáng chế đề xuất mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người mà tích lũy ở bệnh ung thư, và thể liên hợp bao gồm mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người.

Sáng chế bao gồm các khía cạnh được nêu dưới đây là các chất và phương pháp hữu ích về mặt y tế hoặc công nghiệp.

Cụ thể, theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm các phương án như sau:

(1) Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng gồm có vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 31 đến 35 của SEQ ID NO: 2, CDR2 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 50 đến 66 của SEQ ID NO: 2, và CDR3 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 99 đến 110 của SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 24 đến 38 của SEQ ID NO: 4, CDR2 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 54 đến 60 của SEQ ID NO: 4, và CDR3 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 93 đến 101 của SEQ ID NO: 4.

[2] Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo [1] được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 121

của SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng thu được từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 bằng cách cải biến axit glutamic ở vị trí axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

[3] Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo [2] được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 bằng cách cải biến axit glutamic ở vị trí axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

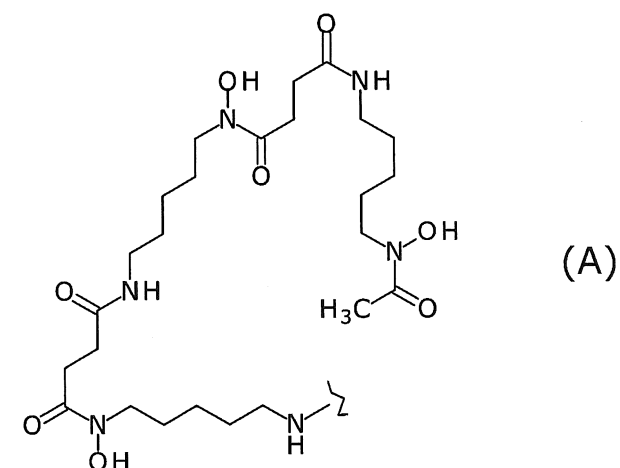
(4) Mảnh kháng thể Fab kháng CEACAM5 của người theo mục (3), chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bằng SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

[5] Thẻ liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo bất kỳ trong số [1] đến [4].

(6) Thẻ liên hợp theo mục (5), trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, (ii) phối tử, (iii) thuốc nhuộm huỳnh quang và phân tử liên kết, hoặc (iv) thuốc nhuộm huỳnh quang.

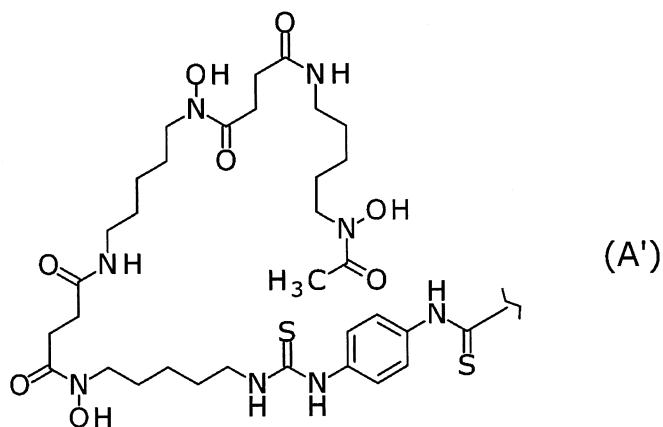
(7) Thể liên hợp theo mục (6), trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phần tử liên kết, hoặc (ii) phối tử.

(8) Thể liên hợp theo mục (7), trong đó phối tử là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người hoặc phần tử liên kết.

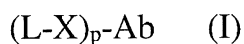
[9] Thể liên hợp theo mục [7], trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phần tử liên kết, trong đó phối tử và phần tử liên kết này là nhóm được biểu diễn bởi công thức (A') dưới đây:



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người.

[10] Thể liên hợp theo mục [9], trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được gắn kết với nguyên tử cacbon của của nhóm C(=S) đầu tận gốc đánh dấu qua nhóm amino trong mảnh Fab.

(11) Thể liên hợp theo mục (7) được biểu diễn bởi công thức (I) sau đây:



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người,

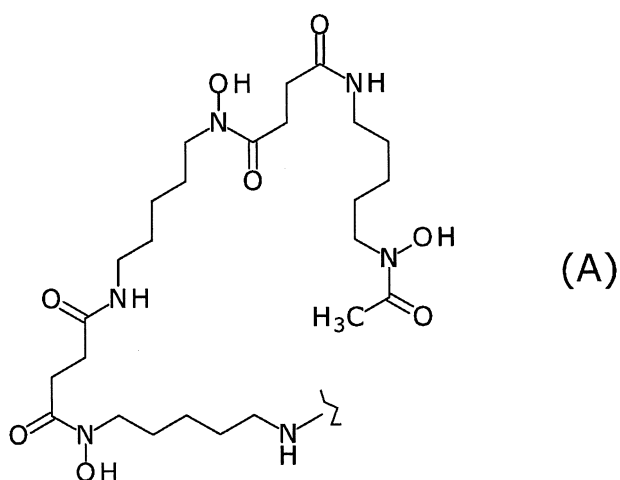
L là phối tử;

X là phân tử liên kết hoặc liên kết; và

p là số tự nhiên từ 1 đến 25.

(12) Thể liên hợp theo mục (11), trong đó L là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:

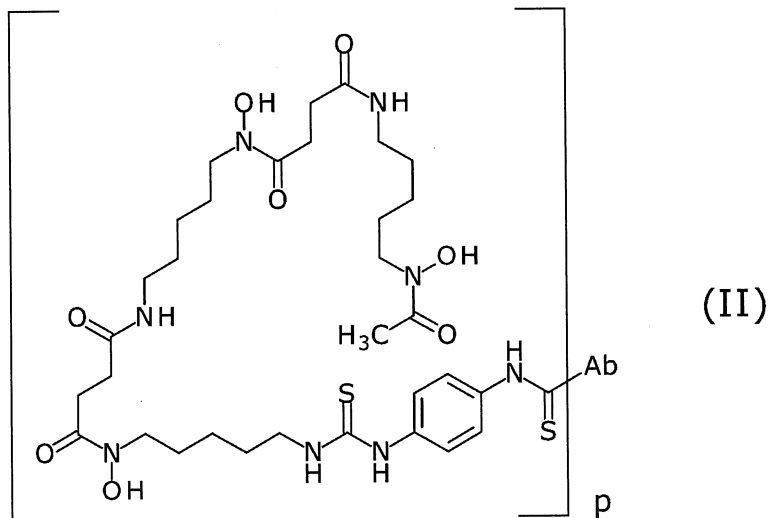
[Công thức hoá học 3]



trong đó đường lượn sóng biểu diễn việc liên kết với X (hoặc Ab khi X là là một liên kết).

(13) Thể liên hợp theo mục (9) hoặc (12) được biểu diễn bởi công thức (I) sau đây:

[Công thức hoá học 4]



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người; và

p là số tự nhiên từ 1 đến 25, trong đó

Ab được liên kết với nguyên tử cacbon của C(=S) đầu tận gốc đánh dấu thông qua nhóm amino trong Ab.

(14) Thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (11) đến (13), trong đó p là số tự nhiên từ 1 đến 16.

(15) Thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (11) đến (13), trong đó p là số tự nhiên từ 4 đến 16.

(16) Thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (6) đến (15), còn bao gồm kim loại.

(17) Thẻ liên hợp theo mục (16), trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại.

(18) Thẻ liên hợp theo mục (16), trong đó kim loại là ^{89}Zr .

(19) Thẻ liên hợp theo (17) hoặc (18) để sử dụng làm chất đánh dấu PET.

(20) Polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo mục [2]; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2].

(21) Polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4]; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo mục (4).

(22) Vector biểu hiện bao gồm (a) và/hoặc (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo mục [2]; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2].

(23) Vector biểu hiện bao gồm (a) và/hoặc (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4]; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo mục (4).

(24) Tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2];

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2];

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo mục [2] và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo mục [2]; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2] và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2].

(25) Tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4];

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục (4);

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4] và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4]; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4] và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4].

(26) Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo mục [2] và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo mục [2]; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2] và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2]; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2], và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người (a) theo mục [2].

(27) Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4] và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4];

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4] và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4]; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4], và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm

trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo mục [4].

[28] Phương pháp tạo ra thể liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người, bao gồm bước: tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người bằng phương pháp theo mục [26] hoặc [27]; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu.

[29] Phương pháp tạo ra thể liên hợp chứa phối tử và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người, bao gồm bước: tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người bằng phương pháp theo mục [26] hoặc [27]; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với phối tử thông qua phân tử liên kết hoặc một cách trực tiếp.

(30) Phương pháp tạo ra thể liên hợp bao gồm gốc đánh dấu được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ kim loại và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, bao gồm các bước: tạo ra thể liên hợp bao gồm phối tử và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bằng phương pháp theo mục (29); và gắn kết đồng vị phóng xạ kim loại với phối tử của thể liên hợp qua liên kết phối trí.

(31) Chế phẩm để chẩn đoán chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [16] đến [19], và chất mang được dụng.

(32) Chế phẩm để chẩn đoán theo (31) là được phẩm chia giai đoạn lâm sàng.

(33) Chế phẩm để chẩn đoán theo (31) hoặc (32) để sử dụng trong chẩn đoán ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến giáp hoặc ung thư do kết quả của việc di căn của chúng.

(34) Chế phẩm để chẩn đoán theo mục (33) để sử dụng trong chẩn đoán ung thư đại trực tràng hoặc ung thư do kết quả của việc di căn ung thư đại trực tràng.

(35) Chế phẩm để chẩn đoán theo mục (34), trong đó ung thư do việc di căn ung thư đại trực tràng là ung thư gan di căn.

(36) Sử dụng thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (16) đến (19) để sản xuất chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến giáp hoặc bệnh ung thư do sự di căn của các bệnh ung thư này.

(37) Thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (16) đến (19) để sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến giáp hoặc bệnh ung thư do sự di căn của các bệnh ung thư này.

(38) Phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến giáp hoặc bệnh ung thư do sự di căn của các bệnh ung thư này, bao gồm việc dùng thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (16) đến (19) cho đối tượng.

(39) Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) để dùng làm thẻ liên hợp bao gồm gốc đánh dấu.

(40) Sử dụng mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) để sản xuất thẻ liên hợp bao gồm gốc đánh dấu.

(41) Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo mục (39), trong đó thẻ liên hợp bao gồm gốc đánh dấu là thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (5) đến (18).

(42) Sử dụng mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo mục (40), trong đó thẻ liên hợp bao gồm gốc đánh dấu là thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (5) đến (18).

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế có thể sử dụng để phát hiện CEACAM5 người và được kỳ vọng là có thể sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư như ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến giáp hoặc bệnh ung thư do sự di căn của các bệnh ung thư này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A là ảnh đại diện được chụp bằng PET 4 giờ sau khi sử dụng PB009-03 cho chuột nhắt trong đó tế bào LS174T dòng tế bào ung thư đại trực tràng người (tế bào dương tính với CEACAM5 người) được cấy dưới da vào vai phải trong khi tế bào HCT-15 dòng tế bào ung thư đại trực tràng người (tế bào âm tính với CEACAM5 người) được cấy vào vai trái. Do chuột được chụp ảnh hướng mặt xuống dưới, vòng tròn bên phải thể hiện vai phải mô tả vai phải của chuột được cấy ghép tế bào LS174T, và vòng tròn bên trái thể hiện vai trái của chuột được cấy ghép tế bào HCT-15. Thanh bên phải thể hiện giá trị hấp thụ được chuẩn hóa tối đa (SUV-Max) với khối u

Fig. 1B là đồ thị thể hiện các kết quả phân tích các ảnh được chụp bằng PET 4 giờ, 24 giờ và 48 giờ sau khi dùng PB009-03 cho chuột nhắt trong đó tế bào LS174T dòng tế bào ung thư đại trực tràng người (tế bào dương tính với CEACAM5) được cấy ghép dưới da vào vai phải trong khi các tế bào HCT-15 dòng tế bào ung thư đại trực tràng người (các tế bào dương tính CEACAM5 người) được cấy dưới da vào vai trái. Trục tung thể hiện giá trị SUV-Max của PB009-03 mà được tích lũy ở vị trí. Thanh sai số trên đồ thị thể hiện giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (giá trị trung bình $\pm$ SEM).

Fig. 2A là ảnh đại diện được chụp bằng PET 4 giờ sau khi dùng PB009-03 cho chuột trong đó tế bào LS174T biểu hiện luciferaza (tế bào dương tính với CEACAM5) được cấy ghép vào gan. Mũi tên thể hiện vị trí được cấy ghép tế bào. Thanh bên phải cho biết giá trị SUV-Max.

Fig. 2B là đồ thị thể hiện kết quả của việc phân tích các hình ảnh được chụp bằng PET 4 giờ và 24 giờ sau khi dùng PB009-03 cho chuột nhắt trong đó các tế bào LS174T biểu hiện luciferaza (tế bào dương tính với CEACAM5 người) được cấy ghép vào gan. Trục tung thể hiện tỷ lệ giữa các giá trị SUV-Max của PB009-03 mà được tích tụ trong gan và vị trí (tỷ lệ khối u/gan). Thanh sai số trên đồ thị thể hiện giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (giá trị trung bình $\pm$ SEM).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó. Các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong sáng chế thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trừ khi có quy định khác.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu kỹ lưỡng về việc tạo ra kháng thể kháng CEACAM5 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và do đó đã thành công tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người có khả năng phát hiện CEACAM5 người.

Cấu trúc cơ sở của phân tử kháng thể là chung giữa các lớp kháng thể và được cấu thành bằng các chuỗi nặng có khối lượng phân tử từ 50000 đến 70000 và các chuỗi nhẹ có khối lượng phân tử từ 20000 đến 30000. Chuỗi nặng thường bao gồm chuỗi polypeptit chứa khoảng 440 axit amin, có đặc điểm cấu trúc của mỗi lớp, và được gọi là các chuỗi γ , μ , α , δ , và ϵ tương ứng với IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE. IgG còn có IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 mà tương ứng được gọi là γ_1 , γ_2 , γ_3 , và γ_4 . Chuỗi nhẹ thường chứa chuỗi polypeptit bao gồm khoảng 220 axit amin và được biết là có hai loại, loại L và K, mà tương ứng được gọi là chuỗi λ và κ . Do cấu hình peptit của cấu trúc cơ sở của phân tử kháng thể, hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau được liên kết qua liên kết disulfua (liên kết S-S) và liên kết phi cộng hóa trị để tạo ra khối lượng phân tử từ 150000 đến 190000. Hai chuỗi nhẹ này có thể bắt cặp với bất kỳ trong số các chuỗi nặng. Một phân tử kháng thể cụ thể chắc chắn được cấu thành từ hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau.

Bốn (hoặc năm đối với các chuỗi μ và ϵ) và hai liên kết S-S trong chuỗi lần lượt có mặt trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và mỗi chuỗi tạo thành một vòng trên mỗi 100 đến 110 gốc axit amin. Cấu hình này là tương tự giữa các vòng và được gọi là miền hoặc đơn vị cấu trúc. Đối với cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, miền được nằm ở phía đầu tận N không có trình tự axit amin không đổi thậm chí trong số các chế phẩm từ cùng một lớp (phân lớp) của các động vật cùng loài, và vì thế được gọi là vùng biến đổi. Các miền tương ứng được gọi là vùng biến đổi của chuỗi nặng (miền V_H) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (miền V_L).

Trình tự axit amin ở phía đầu tận C từ đó hầu như không đổi trên cơ sở lớp hoặc phân lớp và được gọi là vùng hằng định. Các miền tương ứng được biểu diễn bởi C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} và C_L .

Tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể đối với kháng nguyên phụ thuộc vào trình tự axit amin của gốc được cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Mặt khác, hoạt tính sinh học như việc gắn kết với bề mặt hoặc các tế bào khác nhau phản ánh sự khác biệt trong cấu trúc giữa các vùng hằng định của các Ig của các lớp tương ứng. Đã biết rằng tính biến đổi của chuỗi nặng và các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bị giới hạn đáng kể bằng ba vùng siêu biến nhỏ có mặt trong cả các chuỗi. Các vùng này được gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (CDRs; CDR1, CDR2, và CDR3 theo thứ tự từ phía đầu tận N). Các gốc còn lại của vùng biến đổi được gọi là các vùng khung (framework regions - Frs) và tương đối ổn định.

Vùng giữa miền C_{H1} và miền C_{H2} của vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể được gọi là vùng bản lề. Vùng này giàu gốc prolin và chứa nhiều liên kết S-S trong chuỗi mà kết nối hai chuỗi nặng. Ví dụ, các vùng bản lề của IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 người lần lượt chứa 2, 4, 11, và 2 gốc xystein, mà tạo thành liên kết S-S giữa các chuỗi nặng. Vùng bản lề là vùng nhạy cảm cao với enzyme phân giải protein như papain hoặc pepsin. Trong trường hợp phân giải kháng thể bằng papain, chuỗi nặng được phân cắt ở vị trí phía đầu tận N từ liên kết S-S giữa chuỗi nặng của vùng bản lề và vì thế bị phân giải thành hai mảnh Fab và một mảnh Fc. Mảnh Fab được cấu thành bởi chuỗi nhẹ và mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng, miền C_{H1} và một phần của vùng bản lề. Mảnh Fab bao gồm vùng biến đổi và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên.

<Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế>

Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế bao gồm mảnh Fab có đặc điểm sau đây:

mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 121

của SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Vùng hằng định bất kỳ của Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 hoặc Ig γ 4, v.v có thể được chọn làm vùng hằng định của chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế. Theo một phương án, vùng hằng định của chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế là vùng hằng định của Ig γ 1 người.

Vùng hằng định bất kỳ của Ig λ hoặc Ig κ có thể được chọn làm vùng hằng định của chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế. Theo một phương án, vùng hằng định của chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế là vùng hằng định của Ig κ người.

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế là mảnh Fab như sau:

mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

Trong trường hợp biểu hiện kháng thể bao gồm mảnh Fab trong tế bào, kháng thể được biết là trải qua quá trình biến đổi sau dịch mã. Các ví dụ về sự biến đổi sau dịch mã bao gồm phân cắt lysin đầu tận C của chuỗi nặng bằng carboxypeptidaza, biến đổi glutamin hoặc axit glutamic đầu tận N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng quá trình pyroglutamyl hóa, glycosyl hóa, oxy hóa, khử amit và đường hóa. Quá trình biến đổi sau dịch mã được biết là diễn ra ở các kháng thể khác nhau (J. Pharm. Sci., 2008; 97: 2426-2447).

Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế cũng có thể bao gồm mảnh Fab thu được từ quá trình biến đổi sau dịch mã. Các ví dụ về mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế mà có thể thu được từ quá trình biến đổi sau dịch mã bao gồm mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người có chuỗi nặng được pyroglutamyl hóa đầu tận N. Đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật rằng biến đổi sau dịch

mã như vậy bằng cách pyroglutamyl hóa đầu tận N không ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính của kháng thể (Anal. Biochem., 2006; 348: 24-39).

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người có đặc điểm sau đây:

mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng thu được từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 bằng cách cải biến axit glutamic ở vị trí axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án khác, mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người có đặc điểm sau đây:

mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 bằng cách cải biến axit glutamic ở vị trí axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

Sáng chế cũng bao gồm mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người có các dấu hiệu sau đây:

mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 31 đến 35 của SEQ ID NO: 2, CDR2 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 50 đến 66 của SEQ ID NO: 2, và CDR3 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 99 đến 110 của SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 24 đến 38 của SEQ ID NO: 4, CDR2 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 54 đến 60 của SEQ ID NO: 4, và CDR3 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 93 đến 101 của SEQ ID NO: 4.

Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế gắn kết với CEACAM5 người. Phương pháp xác định hoạt tính gắn kết của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người thu được đối với CEACAM5 người bao gồm các phương pháp như phân tích bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) và ELISA. Trong trường hợp sử dụng, ví dụ, phân tích bằng SPR, hằng số tốc độ liên kết (k_a), hằng số tốc độ phân ly (k_d), và hằng số phân ly (K_D) có thể được xác định bằng cách sử dụng Biacore T200 (GE Healthcare Japan Corp.), cố định kit Biotin CAPture Kit (GE Healthcare Japan Corp.) và CEACAM5 người được biotinyl hóa lên chip cảm biến, và bổ sung mảnh Fab được pha loãng theo chuỗi vào đó.

Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế có thể dễ dàng được tạo ra bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này trên cơ sở thông tin trình tự trên mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế được bộc lộ ở đây. Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế có thể được tạo ra theo, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, phương pháp được mô tả trong, ví dụ, <Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế> được đề cập dưới đây.

<Thế liên hợp theo sáng chế>

Thế liên hợp theo sáng chế là thế liên hợp bao gồm gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế.

"Gốc đánh dấu" là (i) phối tử và phân tử liên kết, (ii) phối tử, (iii) thuốc nhuộm huỳnh quang và phân tử liên kết, hoặc (iv) thuốc nhuộm huỳnh quang. Dạng nhất định là (i) phối tử hoặc phân tử liên kết, hoặc (ii) phối tử bao gồm kim loại. Một dạng nhất định là (iii) thuốc nhuộm huỳnh quang và phân tử liên kết. Một dạng nhất định là (i) phối tử và phân tử liên kết. Phối tử của "gốc đánh dấu" có thể còn chứa kim loại. Một dạng nhất định là (i) phối tử và phân tử liên kết chứa kim loại hoặc (ii) phối tử chứa nó, và dạng khác là

(i) phối tử tạo phức hợp chelat với kim loại, và phân tử liên kết, hoặc (ii) phối tử tạo thành phức hợp chelat với kim loại.

Thể liên hợp theo sáng chế bao gồm kim loại, thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc đồng vị phóng xạ phi kim loại có thể được sử dụng trong các chất tương phản khác nhau và các chất tương tự và được sử dụng trong, ví dụ, chất cản quang MRI, chất đánh dấu PET, và chất tạo ảnh phân tử được đánh dấu huỳnh quang.

Trong sáng chế, "kim loại" có nghĩa là ion kim loại thuận từ hoặc đồng vị phóng xạ kim loại. Kim loại không bị giới hạn cụ thể miễn là kim loại tạo thành liên kết phối trí với mỗi phối tử. Tổ hợp đã biết thích hợp của phối tử và kim loại được chọn theo mục đích sử dụng của thể liên hợp.

Ion kim loại thuận từ thích hợp được sử dụng trong chất cản quang MRI. Các ví dụ về dạng ion kim loại thuận từ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Rh^{2+} , Co^{2+} , Gd^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , Tb^{3+} , Pm^{3+} , Nd^{3+} , Tm^{3+} , Ce^{3+} , Y^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , La^{3+} , Yb^{3+} , Mn^{3+} , và Mn^{2+} . Một dạng nhất định là Gd^{3+} , Mn^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , hoặc Fe^{3+} . Một dạng nhất định là Mn^{3+} hoặc Mn^{2+} . Trong trường hợp này, halogen hoặc chất tương tự có thể được sử dụng làm anion trái dấu trong thể liên hợp. Theo cách khác, anion trái dấu có thể là $\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$ của phối tử. Thể liên hợp còn có thể có cation trái dấu như Na^+ .

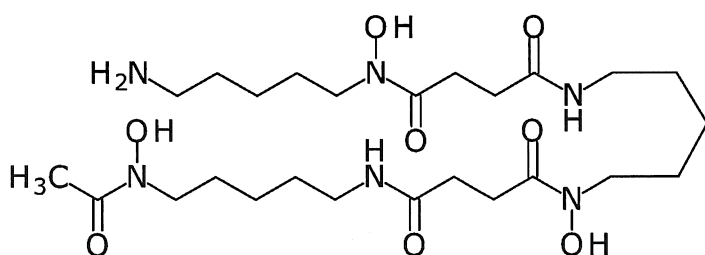
Đồng vị phóng xạ kim loại được sử dụng trong, ví dụ, chất đánh dấu PET. Các ví dụ về dạng của đồng vị phóng xạ kim loại bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ^{89}Zr , ^{51}Mn , ^{52}Fe , ^{60}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, và ^{111}In . Một dạng nhất định là ^{89}Zr , ^{60}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, hoặc ^{111}In . Một dạng nhất định là chất đồng vị phóng xạ của zirconium. Một dạng nhất định là ^{89}Zr .

"Phối tử" là gốc có thể tạo ra phức hợp chelat với kim loại trong thể liên hợp và có nghĩa là nhóm được cấu thành bằng chất tạo chelat ở dạng nhất định. Nhóm cấu thành là nhóm có liên kết bằng cách loại bỏ proton từ chất tạo chelat.

"Chất tạo chelat" là hợp chất mà tạo thành liên kết phối trí với kim loại.

Các ví dụ về "chất tạo chelat" bao gồm thể mang sắt và thể không mang sắt. Các ví dụ của một dạng nhất định bao gồm MAG3 (mercaptoaxetyl-glyxyl-glyxyl-glyxin, CAS No: 66516-09-4) và các dẫn xuất phản ứng đã biết của chúng. Các ví dụ về thể mang sắt bao gồm loại axit hydroxamic, loại catechol, và loại phối tử hỗn hợp. Các ví dụ về thể mang sắt loại axit hydroxamic bao gồm fericrom, deferoxamin (DFO) được biểu diễn bởi công thức dưới đây:

[Công thức hoá học 5]



fusarinin C, ornibactin, axit rhodotorulic, và các dẫn xuất phản ứng đã biết của chúng. Các ví dụ về thể mang sắt loại catechol bao gồm enterobactin, bacillibactin, vibriobactin, và các dẫn xuất phản ứng đã biết của chúng. Các ví dụ về thể mang sắt loại phối tử hỗn hợp bao gồm azotobactin, pyoverdin, yersiniabactin, và các dẫn xuất phản ứng đã biết của chúng. Trong trường hợp thể mang sắt, DFO có thể được phản ứng thông qua nhóm chức phản ứng của nó -NH₂ với phần tử liên kết hoặc mảnh Fab, và thể mang sắt khác ngoài DFO cũng có thể được phản ứng qua nhóm chức phản ứng của nó như nhóm carboxy, nhóm hydroxy, hoặc nhóm amino với phần tử liên kết hoặc mảnh Fab bằng phương pháp thường được người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này sử dụng.

Các ví dụ về thể không mang sắt bao gồm DTPA (axit diethylentriaminpentaaxetic, CAS số: 67-43-6), DTPA-BMA (axit 1,7-bis(metylcarbamoymetyl)-1,4,7-triazaheptan-1,4,7-triaxetic, CAS No: 119895-95-3), EOB-DTPA (etoxymetyl-DTPA, axit 2-[[[(2S)-2-[bis(carboxymetyl)amino]-3-(4-etoxymetyl)propyl]-[2-[bis(carboxymetyl)amino]etyl]amino]axetic), TTHA (triethylentriaminhexaaxetic, CAS No: 869-52-3), DO3A (axit 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triaxetic, CAS No: 217973-03-0), HP-DO3A (axit

10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triaxetic, CAS No: 120041-08-9), DOTA (axit 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic, CAS No: 60239-18-1), và các dẫn xuất phản ứng đã biết của chúng.

Các hợp chất và thể liên hợp được mô tả ở đây cũng bao gồm dạng tự do và các muối của nó trừ khi được quy định khác. Trong ngữ cảnh này, "muối của nó" là muối mà có thể được tạo ra bằng hợp chất hoặc thể liên hợp mà có thể tạo ra muối cộng axit hoặc muối với bazơ phụ thuộc vào loại phần tử thể trong hợp chất hoặc thể liên hợp. Ví dụ cụ thể của chúng bao gồm muối cộng axit với các axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit hydroiodic, axit sulfuric, axit nitric, và axit phosphoric; hoặc các axit hữu cơ như axit formic, axit axetic, axit propionic, axit oxalic, axit malonic, axit suxinic, axit fumaric, maleic, axit lactic, axit malic, axit mandelic, axit tartric, axit dibenzoyltartric, axit ditoluoyltartric, axit xitric, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, axit aspartic và axit glutamic; hoặc các bazơ vô cơ như natri, kali, magie, canxi, và nhôm; muối với các bazơ hữu cơ như metylamin, etylamin, etanolamin, lysin, và ornithin; muối với các axit amin khác nhau và các dẫn xuất của axit amin như axetylleuxin; và các muối amoni. Ví dụ, DFO tồn tại dưới dạng deferoxamin metansulfonat hoặc tồn tại dưới dạng các muối khác. DTPA tồn tại ở cả dạng tự do và dạng muối natri.

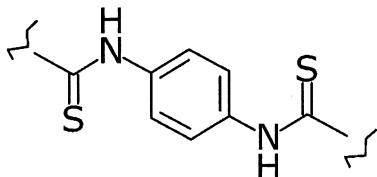
Một phương án nhất định của "chất tạo chelat" để sử dụng trong chất cản quang MRI là chất tạo chelat mang sắt hoặc không mang sắt được mô tả ở trên.

Một phương án nhất định của "chất tạo chelat" để sử dụng trong chất đánh dấu PET là chất tạo chelat chứa sắt hoặc không chứa sắt được mô tả ở trên. Một phương án nhất định là MAG3. Một phương án nhất định là DFO.

Các ví dụ về một phương án nhất định của "chất tạo chelat" cấu thành phối tử được chứa trong thể liên hợp theo sáng chế bao gồm DFO, DTPA, DTPA-BMA, EOB-DTPA, DO3A, HP-DO3A, và DOTA. Một phương án nhất định là DFO, DTPA, hoặc DOTA. Một phương án nhất định là DFO.

"Phần tử liên kết là nhóm tạo ra khoảng cách giữa mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người và phôi tử. Các ví dụ về phương án nhất định của "phần tử liên kết" trong thể liên hợp bao gồm công thức dưới đây:

[Công thức hoá học 6]



(dưới đây, được gọi là $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-phenylen})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$), $-\text{CH}_2-(1,4\text{-phenylen})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$, và $-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_{1-20}\text{ alkylen})-\text{C}(=\text{O})-$. Trong ngữ cảnh này, "C₁₋₂₀ alkylen" là alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 20 nguyên tử cacbon. Trong ngữ cảnh này, "C₁₋₂₀ alkylen" là alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 20 nguyên tử cacbon. Một phương án nhất định của C₁₋₂₀ alkylen là etylen. Một phương án nhất định là $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-phenylen})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$. Một phương án nhất định là $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}(=\text{O})-$. Các ví dụ về chất phản ứng mà có thể được sử dụng để tạo thành phần tử liên kết bao gồm $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_{1-20}\text{ alkylen})-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$, axit succinic, và p-phenylen diisothioxyanat.

Thể liên hợp theo sáng chế bao gồm thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được sử dụng làm chất tạo ảnh phân tử được đánh dấu huỳnh quang.

Thuốc nhuộm có mức hấp thụ tối đa và mức phát xạ tối đa ở bước sóng cận hồng ngoại (650 đến 1000 nm) thường được sử dụng trong nhiếp ảnh có thể được sử dụng làm thuốc nhuộm huỳnh quang để sử dụng trong thể liên hợp theo sáng chế. Các ví dụ về phương án nhất định của thuốc nhuộm huỳnh quang bao gồm các hợp chất xyanin và indoxyanin. Các ví dụ về phương án nhất định bao gồm IRDye800CW (LI-COR, Inc.), Cy (Molecular Probes, Inc.), Alexa Fluor, BODIPY, và DyLight (Thermo Fisher Scientific Inc.), CF790 (Biotium, Inc.), DY (Dyomics GmbH), HiLyte Fluor 680 và HiLyte Fluor 750 (AnaSpec Inc.), và PULSAR650 và QUASAR670 (LGC Biosearch Technologies). Một phương án nhất định là IRDye800CW. Thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được phản

ứng qua nhóm carboxy, nhóm hydroxy, nhóm amino của nó, hoặc tương tự hoặc qua nhóm hoạt tính được đưa vào bằng phương pháp thường được sử dụng bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này với mảnh Fab hoặc phân tử liên kết. Một phương án nhất định của thuốc nhuộm huỳnh quang có nhóm hoạt tính được đưa vào là thuốc nhuộm huỳnh quang được este hóa với nhóm N-hydroxysuccinimide (NHS). Ví dụ, NHS este của IRDye800CW được đề cập ở trên có bán trên thị trường, và chúng có thể được sử dụng.

Thể liên hợp theo sáng chế bao gồm đồng vị phóng xạ phi kim loại có thể được sử dụng làm chất đánh dấu PET.

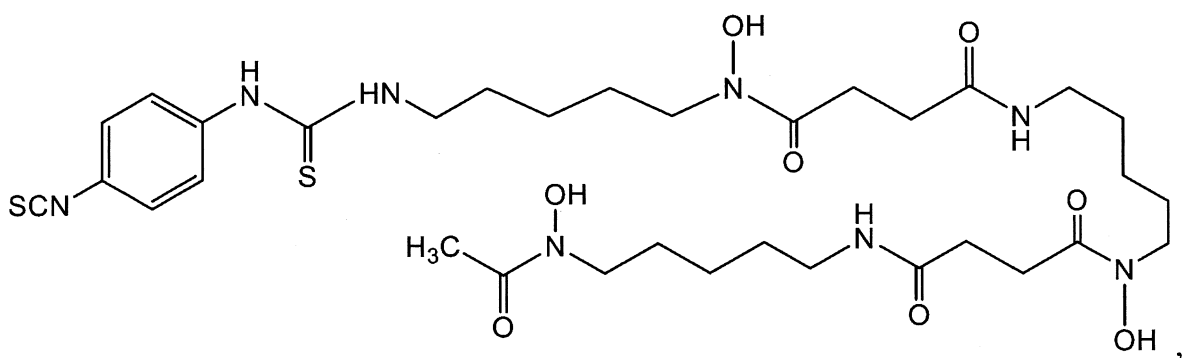
Các ví dụ về đồng vị phóng xạ phi kim loại để sử dụng trong thể liên hợp theo sáng chế bao gồm ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , và ^{13}N . Một phương án nhất định là ^{18}F . Ví dụ, axit N-succinimidyl-4- ^{18}F flobenzoic (^{18}F SFB) có thể được sử dụng để gắn kết hợp chất chứa chất đồng vị phóng xạ phi kim loại.

Việc gắn kết của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế với gốc đánh dấu có thể thích hợp được thực hiện bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này bằng phương pháp đã biết. Ví dụ, gốc đánh dấu có thể liên kết với một hoặc nhiều nhóm amino (ví dụ, nhóm amino đầu tận N và nhóm amino của chuỗi bên axit amin), một hoặc nhiều nhóm thiol (ví dụ, nhóm thiol của chuỗi bên axit amin), hoặc một hoặc nhiều nhóm carboxyl (ví dụ, các nhóm carboxyl của đầu tận C và chuỗi bên axit amin) của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế. Một phương án nhất định của thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp mà gốc đánh dấu được gắn kết với một hoặc nhiều nhóm amino của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế.

Khi gốc đánh dấu là phối tử và phân tử liên kết, thể liên hợp theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách cho chất tạo chelat tạo thành phối tử phản ứng với chất nền thu được thông qua phản ứng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế với phân tử liên kết. Nó có thể được tạo ra bằng cách cho mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế phản ứng với chất nền thu được thông qua phản ứng của chất tạo chelat tạo thành phối tử với phân tử liên kết. Với vai trò là ví dụ phản ứng, cơ chất

thu được từ phản ứng của nhóm amino của chất tạo chelat với phân tử liên kết được phản ứng với một hoặc nhiều nhóm amino (ví dụ, nhóm amino đầu tận N và nhóm amino của chuỗi bên lysin) của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế. Khi gốc đánh dấu là phối tử, nó có thể được tạo ra bằng cách cho chất tạo chelat tạo thành phối tử phản ứng với mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế. Với vai trò là ví dụ phản ứng, chất tạo chelat được phản ứng với một hoặc nhiều nhóm amino (ví dụ, nhóm amino đầu tận N và nhóm amino của chuỗi bên lysin) của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế. Phản ứng tổng hợp thioure bằng cách bổ sung isothioxyanat vào amin, phản ứng tổng hợp amit bằng cách bổ sung axit carboxylic vào amin, hoặc chất tương tự có thể được sử dụng trong sản xuất thể liên hợp theo sáng chế. Phản ứng này có thể được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp đã biết với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này. Hợp chất của phối tử được liên kết với phân tử liên kết trước có thể được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu. Các ví dụ về hợp chất của phối tử được liên kết với phân tử liên kết bao gồm p-SCN-Bn-DFO (DFO được thế bằng nhóm p-isothioxyanophenylaminothiocarbonyl, CAS No: 1222468-90-7) được biểu diễn bởi công thức dưới đây:

[Công thức hoá học 7]



DTPA được thế bằng nhóm p-isothioxyanobenzyl (p-SCN-Bn-DTPA, CAS No: 102650-30-6), DOTA được thay thế bằng nhóm p-isothioxyanobenzyl (p-SCN-Bn-DOTA, CAS No: 127985-74-4), và p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA axit ([[(R)-2-amino-3-(4-isothioxyanatophenyl)propyl]-trans-(S,S)-xyclohexan-1,2-diamin-pentaaxetic, CAS No: 157380-45-5).

Thể liên hợp của sáng chế có thể được tạo ra dưới dạng, ví dụ, thể liên hợp bao gồm mảnh Fab được liên kết với ít nhất một gốc đánh dấu qua các nhóm amino bằng cách cho một hoặc nhiều nhóm amino (ví dụ, nhóm amino đầu tận N và nhóm amino của chuỗi bên axit amin) của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế phản ứng với gốc đánh dấu có nhóm axit isoxyanic.

Kim loại (ion kim loại thuận từ hoặc đồng vị phóng xạ kim loại) có thể được bổ sung vào mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế được liên kết với ít nhất một gốc đánh dấu vì thể được tạo ra bằng phương pháp sản xuất để thu được thể liên hợp theo sáng chế chứa kim loại.

Thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp chứa mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế được liên kết với ít nhất một gốc đánh dấu. Một phương án nhất định của thể liên hợp theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 1 đến 25 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 1 đến 23 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 1 đến 16 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 1 đến 11 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 1 đến 10 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 1 đến 9 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 4 đến 23 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 4 đến 16 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 4 đến 10 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 4 đến 9 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 3 đến 23 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 3 đến 16 gốc

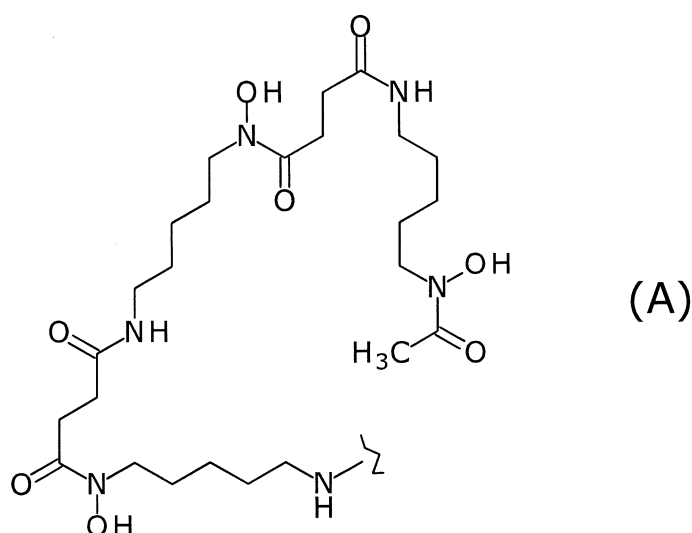
đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 3 đến 10 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với 3 đến 9 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định của thể liên hợp theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với ít nhất một gốc đánh dấu cũng chứa kim loại. Một phương án nhất định của thể liên hợp theo sáng chế có thể là hỗn hợp của các thể liên hợp khác nhau về số lượng các gốc đánh dấu được liên kết.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp bao gồm gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phần tử liên kết, hoặc (ii) phối tử.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phần tử liên kết, hoặc (ii) phối tử, và phối tử là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:

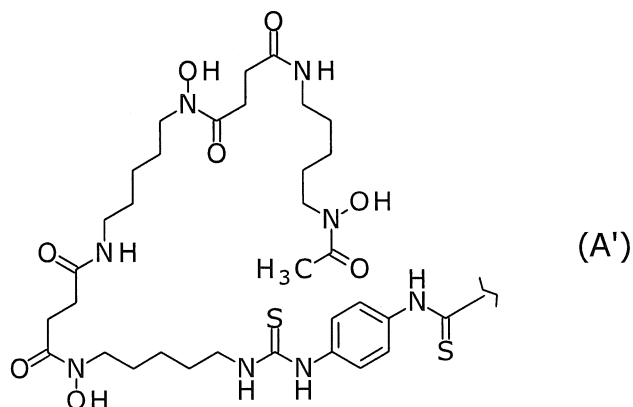
[Công thức hoá học 8]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người hoặc phần tử liên kết.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, và phối tử và phân tử liên kết là nhóm được biểu diễn bởi công thức (A') dưới đây:

[Công thức hoá học 9]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là nhóm được biểu diễn bởi công thức (A'), và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với nguyên tử cacbon của nhóm C(=S) đầu tận gốc đánh dấu qua nhóm amino trong mảnh Fab.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp được biểu diễn bởi công thức (I) dưới đây:



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế;

L là phối tử;

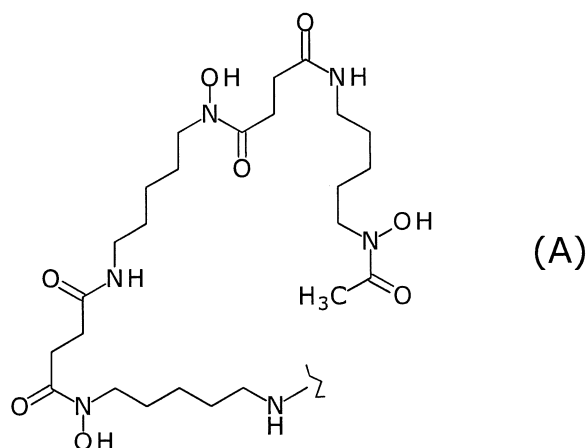
X là phân tử liên kết hoặc liên kết; và

p là số tự nhiên từ 1 đến 25.

Một phương án nhất định của p là số tự nhiên từ 1 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 16. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 11. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 10. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 9. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 4 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 4 đến 16. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 4 đến 10. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 4 đến 9. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 3 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 3 đến 16. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 3 đến 10. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 3 đến 9.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp có công thức (I) trong đó L là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:

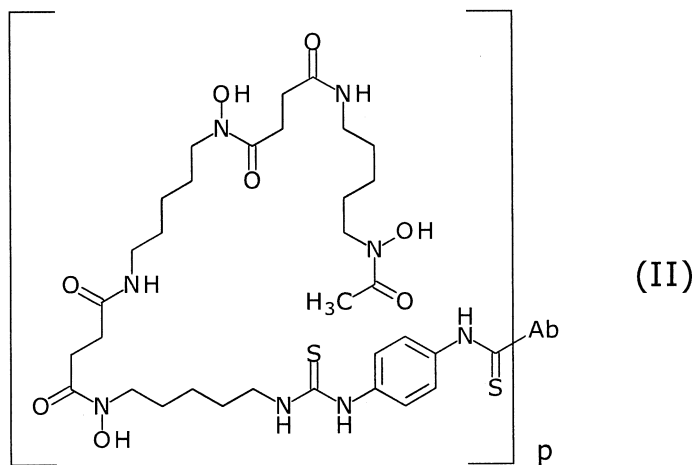
[Công thức hoá học 10]



trong đó đường lượn sóng biểu diễn việc liên kết với X (hoặc Ab khi X là là một liên kết).

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp có công thức (I) là thể liên hợp được biểu diễn bởi công thức (II) dưới đây:

[Công thức hoá học 11]



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế; và p là số tự nhiên từ 1 đến 25.

Một phương án nhất định của p là số tự nhiên từ 1 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 16. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 11. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 10. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 9. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 4 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 4 đến 16. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 4 đến 10. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 4 đến 9. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 3 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 3 đến 16. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 3 đến 10. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 3 đến 9.

Ab được liên kết với nguyên tử cacbon của C(=S) đầu tận gốc đánh dấu thông qua nhóm amino trong Ab.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp có công thức (I) cũng bao gồm kim loại. Một phương án nhất định của kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại. Một phương án nhất định của đồng vị phóng xạ kim loại là ^{89}Zr .

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp có công thức (II) cũng bao gồm kim loại. Một phương án nhất định của kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại. Một phương án nhất định của đồng vị phóng xạ kim loại là ^{89}Zr .

Thẻ liên hợp theo sáng chế cũng bao gồm thẻ liên hợp là hỗn hợp của nhiều thẻ liên hợp. Ví dụ, thẻ liên hợp là hỗn hợp của thẻ liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người không được biến đổi sau dịch mã theo sáng chế, và thẻ liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế thu được từ việc biến đổi sau dịch mã mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người cũng được bao gồm trong thẻ liên hợp theo sáng chế.

Các phương án nhất định của thẻ liên hợp theo sáng chế là hỗn hợp của nhiều thẻ liên hợp theo sáng chế sẽ được thể hiện dưới đây.

(1) Thẻ liên hợp mà là hỗn hợp của thẻ liên hợp trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phân tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A'), và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4, và thẻ liên hợp trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phân tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A'), và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 bằng việc cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

(2) Thẻ liên hợp theo mục (1), còn bao gồm kim loại.

(3) Thẻ liên hợp là hỗn hợp của thẻ liên hợp theo mục (1) còn bao gồm kim loại và thẻ liên hợp theo mục (1) không bao gồm kim loại.

(4) Thẻ liên hợp theo mục (2) hoặc (3), trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại.

(5) Thẻ liên hợp theo mục (4), trong đó đồng vị phóng xạ kim loại là ^{89}Zr .

<Polynucleotit theo sáng chế>

Polynucleotit theo sáng chế bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế, và

polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế.

Theo một phương án, polynucleotit theo sáng chế là polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, hoặc polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 4.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 bao gồm polynucleotit gồm trình tự nucleotit từ các vị trí nucleotit từ 1 đến 363 của SEQ ID NO: 1.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4 bao gồm polynucleotit gồm trình tự nucleotit từ các vị trí nucleotit từ 1 đến 336 của SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án ưu tiên, polynucleotit theo sáng chế là polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2, hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 3.

Polynucleotit theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp gen đã biết trong lĩnh vực này trên cơ sở trình tự nucleotit được thiết kế từ các trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế. Các phương pháp khác nhau đã biết với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này, như phương pháp tổng hợp gen kháng thể được mô tả trong công bố quốc tế số WO 90/07861 có thể được sử dụng làm phương pháp tổng hợp gen.

<Vector biểu hiện theo sáng chế>

Vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế, vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế, và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế.

Vector biểu hiện theo sáng chế tốt hơn là bao gồm vector biểu hiện chứa polynucleotit gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, vector biểu hiện chứa polynucleotit gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4, và vector biểu hiện chứa polynucleotit gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 4.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế tốt hơn là bao gồm vectơ biểu hiện chứa polynucleotit gồm có trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2, vectơ biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4, và vectơ biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là polypeptit được mã hóa bằng polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra trong các tế bào chủ khác nhau của tế bào nhân sơ và/hoặc tế bào nhân chuẩn. Các ví dụ về vectơ biểu hiện như vậy bao gồm vectơ plasmid và các vectơ virus (ví dụ, adenovirus và retrovirus). Tốt hơn, pEE6,4 hoặc pEE12.4 (Lonza Group AG) có thể được sử dụng.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm vùng khởi đầu được liên kết hoạt động với gen mã hóa mảnh chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ trong polynucleotit theo sáng chế. Các ví dụ về vùng khởi đầu để biểu hiện mảnh Fab theo sáng chế trong tế bào chủ bao gồm vùng khởi đầu Trp, vùng khởi đầu lac, vùng khởi đầu recA, vùng khởi đầu λ PL, vùng khởi đầu lpp, và vùng khởi đầu tac khi tế bào chủ là vi khuẩn thuộc giống *Escherichia*. Các ví dụ về vùng khởi đầu để biểu hiện ở nấm men bao gồm vùng khởi đầu PH05, vùng khởi đầu PGK, vùng khởi đầu GAP, và vùng khởi đầu ADH. Các ví dụ về vùng khởi đầu để biểu hiện ở vi khuẩn thuộc giống *Bacillus* bao gồm vùng khởi đầu SL01, vùng khởi đầu SP02, và vùng khởi đầu penP. Các ví dụ của chúng bao gồm vùng khởi đầu có nguồn gốc từ virus như vùng khởi đầu CMV, RSV, và SV40, retrovirus, vùng khởi đầu actin, vùng khởi đầu EF (yếu tố kéo dài) 1 α , và vùng khởi đầu sốc nhiệt khi vật chủ là tế bào nhân chuẩn như tế bào động vật có vú.

Trong trường hợp sử dụng vi khuẩn, cụ thể là, *E. coli*, làm tế bào chủ, vectơ biểu hiện theo sáng chế có thể còn bao gồm codon khởi đầu, codon kết thúc, vùng kết thúc và đơn vị có khả năng sao chép. Mặt khác, trong trường hợp sử dụng nấm men, tế bào động vật hoặc tế bào côn trùng làm vật chủ, vectơ biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm codon

khởi đầu và codon kết thúc. Trong trường hợp này, trình tự tăng cường, các vùng không dịch mã 5' và 3' của gen mã hóa mảnh chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ theo sáng chế, trình tự tín hiệu tiết, điểm nối, vị trí polyadenyl hóa, hoặc đơn vị có khả năng sao chép, v.v có thể được bao gồm trong đó. Ngoài ra, dấu chuẩn chọn lọc thường được sử dụng (ví dụ, gen kháng tetracyclin, gen kháng ampicilin, gen kháng kanamycin, gen kháng neomycin và gen dihydrofolat reductaza) có thể được chứa trong đó theo mục đích.

<Tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế>

Tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế bao gồm tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế, được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế là tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế, được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

- (a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2;
- (b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4;
- (c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 4; và
- (d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và vector biểu hiện chứa polynucleotit gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế là tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế, được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

- (a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2;
- (b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4;
- (c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO:

2 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

Các ví dụ được ưu tiên tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế được sử dụng là tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế, hoặc tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế.

Tế bào chủ được biến nạp không bị giới hạn cụ thể miễn là nó phù hợp với vector biểu hiện được sử dụng và có thể được biến nạp với vector biểu hiện để biểu hiện mảnh Fab. Các ví dụ của nó bao gồm các tế bào khác nhau như tế bào tự nhiên và tế bào được tạo ra theo cách nhân tạo thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế (ví dụ, vi khuẩn (vi khuẩn thuộc giống *Escherichia* và vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*), nấm men (giống *Saccharomyces*, giống *Pichia*, v.v), tế bào động vật và tế bào côn trùng (ví dụ, Sf9)), và các dòng tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào được nuôi cấy như tế bào CHOK1SV, tế bào CHO-DG44, và tế bào 293). Bản thân việc biến nạp có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết, ví dụ, phương pháp canxi phosphat hoặc phương pháp điện di.

<Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế>

Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế được nuôi cấy trong phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây:

- (a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế;
- (b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế; và
- (c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế.

Một phương án nhất định của tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế được nuôi cấy trong phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) sau đây:

- (a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 4;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và vector biểu hiện chứa polynucleotit gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi các vị trí axit amin từ 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Một phương án nhất định của tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế được nuôi cấy trong phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) sau đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

Tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế được sử dụng tốt hơn là tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế, hoặc tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế.

Trong phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế, tế bào chủ được biến nạp có thể được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng. Môi trường dinh dưỡng tốt hơn là chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ vô cơ hoặc nguồn nitơ hữu cơ, cần thiết cho sự sinh trưởng của tế bào chủ được biến nạp. Các ví dụ về nguồn cacbon bao gồm glucoza, dextran, tinh bột hòa tan, và sucroza. Các ví dụ về nguồn nitơ vô cơ hoặc nguồn nitơ hữu cơ bao gồm muối amoni, nitrat, axit amin, dịch chiết ngô, pepton, casein, dịch chiết thịt, bột đậu nành, và dịch chiết khoai tây. Ngoài ra, các chất dinh dưỡng khác (ví dụ, muối vô cơ (ví dụ canxi clorua, natri dihydro phosphat, và magie clorua), vitamin, và chất kháng sinh (ví dụ tetracyclin, neomycin, ampicillin, và kanamycin)) có thể được bao gồm, nếu muốn.

Việc tự nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp được thực hiện bằng phương pháp đã biết. Các điều kiện nuôi cấy, ví dụ, nhiệt độ, độ pH của môi trường, và thời gian nuôi cấy được chọn một cách thích hợp. Khi vật chủ là, ví dụ, tế bào động vật, môi trường MEM (Science; 1952; 122: 501), môi trường DMEM (Virology; 1959; 8: 396-97), môi trường RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc.; 1967; 199: 519-24), môi trường 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1950; 73:1-8), hoặc các môi trường tương tự chứa khoảng 5 đến 20% huyết thanh thai bò có thể được sử dụng làm môi trường. Độ pH của môi trường tốt hơn là khoảng 6 đến 8. Việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 30 đến 40°C trong khoảng 15 đến 336 giờ, và việc sục khí hoặc khuấy cũng có thể được thực hiện, nếu cần. Khi tế bào chủ

là tế bào côn trùng, các ví dụ về môi trường bao gồm môi trường Grace (PNAS; 1985; 82: 8404-8) chứa huyết thanh thai bò. Độ pH của nó tốt hơn là khoảng 5 đến 8. Việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 20 đến 40°C trong 15 đến 100 giờ, và việc sục khí hoặc khuấy cũng có thể được thực hiện, nếu cần. Nếu vật chủ là vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, hoặc nấm sợi, ví dụ, môi trường lỏng chứa nguồn dinh dưỡng được mô tả ở trên là thích hợp. Môi trường có độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 8 được ưu tiên. Nếu vật chủ là *E. coli*, thì các ví dụ được ưu tiên về môi trường gồm môi trường LB và môi trường M9 (Miller et al., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory; 1972: 431). Trong trường hợp như vậy, việc nuôi cấy có thể được thực hiện ở 14 đến 43°C trong khoảng 3 đến 24 giờ trong khi sục khí hoặc khuấy, nếu cần. Khi vật chủ là vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, việc nuôi cấy thường được thực hiện ở 30 đến 40°C trong khoảng 16 đến 96 giờ có sục khí hoặc khuấy, nếu cần. Khi vật chủ là nấm men, các ví dụ về môi trường bao gồm môi trường tối thiểu Burkholder (PNAS; 1980; 77: 4505-8). Độ pH của nó mong muốn là trong khoảng từ 5 đến 8. Việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 20 đến 35°C trong khoảng 14 đến 144 giờ, và việc sục khí hoặc khuấy cũng có thể được thực hiện, nếu cần.

Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế có thể bao gồm bước thu hồi, tốt hơn là tách hoặc tinh chế, mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người được biểu hiện, ngoài bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người. Các ví dụ về phương pháp tách và tinh chế bao gồm: phương pháp dựa vào độ hòa tan, như loại muối và kết tủa dung môi; phương pháp dựa vào sự khác biệt trọng lượng phân tử, như thẩm tách, siêu lọc, lọc gel, và điện di gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit; phương pháp dựa trên sự khác nhau về điện tích, sắc ký trao đổi ion và sắc ký hydroxylapatit; phương pháp dựa trên ái lực đặc thù, như sắc ký ái lực; phương pháp dựa trên sự khác nhau về tính kỵ nước, như sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo; và phương pháp dựa trên sự khác nhau về điểm đẳng điện, như sự hội tụ đẳng điện.

<Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế>

Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế bao gồm bước tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế với gốc đánh dấu. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế cũng có thể bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người; và tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế cũng có thể bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người; thu hồi mảnh Fab đã biểu hiện; và tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu. Phần tử liên kết, phối tử hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang, v.v, và phương pháp liên kết được sử dụng có thể sử dụng được mô tả trong phần <Thể liên hợp theo sáng chế>.

Theo một phương án, phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người; và tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu. Phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; và tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu.

Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người; và i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử. Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; và i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử.

Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện

mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người; tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab thông qua phần tử liên kết hoặc trực tiếp với phối tử; và liên kết kim loại với phối tử của thể liên hợp qua liên kết phối trí (tức là, tạo thành phức hợp chelat). Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab thông qua phần tử liên kết hoặc trực tiếp với phối tử; và liên kết kim loại với phối tử của thể liên hợp thông qua liên kết phối trí.

Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người; tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab thông qua phần tử liên kết hoặc trực tiếp với phối tử; và liên kết đồng vị phóng xạ kim loại với phối tử của thể liên hợp thông qua liên kết phối trí (tức là, tạo ra phức hợp chelat). Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp của sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; tạo liên kết cộng hóa trị mảnh Fab qua phần tử liên kết hoặc trực tiếp với phối tử; và gắn kết đồng vị phóng xạ kim loại với phối tử của thể liên hợp thông qua liên kết phối trí.

Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế có thể được thực hiện dưới dạng phương pháp gồm hai hoặc nhiều bước được xác định ở trên dưới dạng một loạt các bước hoặc có thể được thực hiện dưới dạng phương pháp bao gồm ít nhất một trong các bước được xác định ở trên. Ví dụ, phương pháp bao gồm bước gắn kết mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế với gốc đánh dấu, và phương pháp bao gồm bước đánh dấu mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế được liên kết với gốc đánh dấu bằng kim loại cũng được bao gồm trong phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế. Ngoài ra, phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế bao gồm phương pháp có thứ tự các bước khác nhau. Ví dụ, phương pháp bao gồm việc đánh dấu phối tử bằng đồng vị phóng xạ kim loại, và sau đó tạo liên kết cộng hóa trị phối tử với mảnh Fab

của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế cũng được bao gồm trong phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế.

<Chế phẩm để chẩn đoán và phương pháp chẩn đoán theo sáng chế>

Sáng chế đề cập đến chế phẩm để chẩn đoán chứa thể liên hợp theo sáng chế bao gồm thuốc nhuộm huỳnh quang, kim loại hoặc đồng vị phóng xạ phi kim loại (dưới đây, được gọi là thể liên hợp phát hiện được theo sáng chế). Thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế có thể được phối chế theo phương pháp thông thường và được sử dụng làm được phẩm chia giai đoạn lâm sàng (cụ thể là, để chẩn đoán bệnh ung thư). Được chất phân đoạn lâm sàng có nghĩa là được chất chẩn đoán có thể kiểm tra mức độ tiến triển hoặc tình trạng y tế. Ví dụ, đối với bệnh ung thư, nó có nghĩa là được chất chẩn đoán có thể kiểm tra được giai đoạn lâm sàng của nó. Bệnh ung thư được kỳ vọng là có thể được chẩn đoán bằng chế phẩm để chẩn đoán theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến giáp và bệnh ung thư do sự di căn của các bệnh ung thư này. Bệnh ung thư tốt hơn là ung thư đại trực tràng hoặc bệnh ung thư là kết quả của việc di căn ung thư đại trực tràng. Bệnh ung thư tốt hơn nữa là bệnh ung thư là kết quả của việc di căn ung thư đại trực tràng. Bệnh ung thư như vậy bao gồm di căn gan.

Lượng của thể liên hợp có thể được phát hiện theo sáng chế được bổ sung vào dạng bào chế của chế phẩm để chẩn đoán theo sáng chế khác nhau phụ thuộc vào mức độ triệu chứng hoặc độ tuổi của bệnh nhân, dạng liều lượng của dạng bào chế được sử dụng, hoặc hiệu giá gắn kết của mảnh Fab, v.v. Ví dụ, khoảng 0,001 mg/kg đến 100 mg/kg dựa trên khối lượng của mảnh Fab có thể được sử dụng cho mỗi đơn vị thể trọng của bệnh nhân.

Các ví dụ về dạng liều lượng của chế phẩm để chẩn đoán theo sáng chế có thể bao gồm chất để dùng ngoài đường tiêu hóa như chế phẩm tiêm hoặc các chất để truyền nhỏ giọt. Việc dùng tốt hơn là được thực hiện bằng cách tiêm tĩnh mạch, tiêm trong cơ cục bộ vào đích, tiêm dưới da, hoặc tương tự. Đối với dạng bào chế này, chất mang hoặc chất phụ trợ thích hợp cho các dạng liều này có thể được sử dụng trong khoảng được dụng. Loại

chất mang hoặc chất phụ trợ được dụng không bị giới hạn cụ thể, và chất mang hoặc chất phụ trợ đã biết rõ với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế để sản xuất chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc chế phẩm để xác định giai đoạn ở dạng nhất định. Sáng chế cũng đề cập đến thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế để sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư hoặc để sử dụng trong việc xác định giai đoạn ở dạng nhất định.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư, bao gồm dùng trước phẫu thuật hoặc trong khi phẫu thuật thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế cho đối tượng. Trong ngữ cảnh này, "đối tượng" là người hoặc động vật có vú khác bất kỳ cần tiếp nhận việc chẩn đoán. Một phương án nhất định là người có nhu cầu tiếp nhận việc chẩn đoán. Lượng hữu hiệu của thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế có thể là lượng giống như lượng hữu hiệu của thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế đối với dạng bào chế được mô tả ở trên. Trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế, thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế tốt hơn là được dùng bằng cách tiêm tĩnh mạch hoặc cách tương tự. Thể liên hợp theo sáng chế để sử dụng làm chất đánh dấu PET có thể được chụp ảnh bằng PET sau 1,5 đến 48 giờ, sau 2 đến 48 giờ theo một dạng nhất định, sau 4 đến 24 giờ theo một dạng nhất định, sau 4 đến 6 giờ theo một dạng nhất định, hoặc sau 1,5 đến 6 giờ theo một dạng nhất định từ khi dùng. Trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế, trong trường hợp sử dụng thể liên hợp được đánh dấu huỳnh quang theo sáng chế trong việc chẩn đoán trong khi phẫu thuật, thể liên hợp được dùng cho bệnh nhân, ví dụ, 2 đến 48 giờ, tốt hơn là 4 giờ, trước khi phẫu thuật.

Theo một phương án khác, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế để tạo ra thể liên hợp theo sáng chế. Theo một phương án nhất định, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người theo sáng chế để sản xuất chế phẩm để chẩn đoán chứa thể liên hợp theo sáng chế.

Sáng chế nói chung được mô tả ở trên đây. Các ví dụ cụ thể sẽ được nêu ở đây để tham khảo nhằm hiểu rõ hơn. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người

Kháng thể có các vùng biến đổi được kỳ vọng là không làm giảm ái lực ngay cả bằng việc gắn kết của gốc đánh dấu được thiết kế bằng cách sử dụng mô hình phân tử của kháng thể được làm giống của người được tạo cấu trúc theo tài liệu (Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics; 2014; 82: 1624-1635) sau khi làm giống như của người đối với kháng thể kháng CEACAM5 thu được từ chuột T84.66 bằng cách tham khảo phương pháp được mô tả trong tài liệu (Protein Eng. Des. Sel.; 2004; 17: 481-489).

Gen mã hóa trình tự tín hiệu (Protein Engineering; 1987; 1: 499-505) và gen vùng Igγ1 Fab của người (gồm có trình tự nucleotit từ các vị trí nucleotit từ 364 đến 678 của SEQ ID NO: 1) lần lượt được nối với đầu 5' và đầu 3', của gen vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể, và gen mảnh chuỗi nặng này được gắn chèn vào vector GS pEE6,4 (Lonza Group AG). Cũng như vậy, gen mã hóa trình tự tín hiệu và gen vùng hằng định Igκ người (gồm có trình tự nucleotit từ các vị trí nucleotit 337 đến 657 của SEQ ID NO: 3) lần lượt được nối với đầu 5' và đầu 3', của gen vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể, và gen chuỗi nhẹ này được gắn chèn vào vector GS pEE12.4 (Lonza Group AG). Các vector pEE được đề cập ở trên có các đoạn gắn chèn của các gen mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được phân cắt bằng các enzym giới hạn NotI và PvuI và được nối bằng kit nối TAKARA Ligation Kit Ver 2.1 (Takara Bio Inc.) để tạo cấu trúc vector GS có cả hai đoạn gắn chèn của các gen mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Kháng thể được biểu hiện bằng hai kiểu phương pháp, biểu hiện tạm thời và biểu hiện cơ định, bằng cách sử dụng vector GS được đề cập ở trên có cả các đoạn gắn chèn của các gen mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Đối với việc biểu hiện tạm thời, các tế bào Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) được nuôi cấy thành khoảng 3000000 tế bào/mL

trong môi trường biểu hiện Expi293 (Thermo Fisher Scientific Inc.) được chuyển nhiễm với vector GS được đề cập ở trên có cả hai đoạn gắn chèn của các gen mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bằng cách sử dụng kit chuyển nhiễm ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher Scientific Inc.) và được nuôi cấy trong thời gian từ 5 đến 7 ngày. Dịch nuôi cấy nổi được tinh chế bằng cách sử dụng KappaSelect (GE Healthcare Japan Corp.) để thu được mảnh Fab. Để biểu hiện cơ định, các tế bào CHOK1SV (Lonza Group AG) được chuyển nhiễm với vector tuyến tính thu được với PvuI từ vector GS được đề cập ở trên có cả hai đoạn gắn chèn của các gen mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, bằng cách điện di sử dụng Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Vào ngày sau khi chuyển nhiễm, metionin sulfoximin được bổ sung vào đó, sau đó nuôi cấy trong 5 đến 7 ngày. Các tế bào được chủng vào môi trường bán rắn chứa metylxenluloza. Sau khi tạo thành khuẩn lạc, các tế bào có mức biểu hiện lớn mảnh Fab thu được bằng cách sử dụng ClonePix FL (Molecular Devices, LLC). Dịch nuôi cấy nổi của các tế bào được tinh chế bằng cách sử dụng Capto L (GE Healthcare Japan Corp.), Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Japan Corp.), và BioPro S75 (YMC Co., Ltd.) để thu được mảnh Fab.

Trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (được thiết kế là PB009-01) được tạo thành được thể hiện trên SEQ ID NO: 1, và trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trên SEQ ID NO: 2. Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của PB009-01 được thể hiện trên SEQ ID NO: 3, và trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trên SEQ ID NO: 4. Vùng biến đổi của chuỗi nặng của PB009-01 bao gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, và CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nặng gồm các trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 31 đến 35, 50 đến 66, và 99 đến 110, lần lượt, của SEQ ID NO: 2. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của PB009-01 gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4, và CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm các trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 24 đến 38, 54 đến 60, và 93 đến 101, tương ứng, của SEQ ID NO: 4.

Các vùng biến đổi của các trình tự CDR được xác định theo các đánh số Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda).

Ví dụ 2: Tạo ra thể liên hợp mảnh Fab

p-SCN-Bn-DFO (DFO được thể bằng nhóm p-isothioxyanophenylaminothio carbonyl) (Macrocyclics, Inc.) được sử dụng trong việc gắn kết chất tạo chelat DFO với mảnh Fab PB009-01. 1/5 lượng dung dịch natri cacbonat 0,1 M (độ pH = 9,0) được bổ sung vào dung dịch mảnh Fab được điều chỉnh đến 1 mg/mL bằng nước muối đệm phosphat (độ pH=7,4). p-SCN-Bn-DFO được bổ sung vào đó ở nồng độ cuối là 1 mg/mL và được phát hiện ở 37°C trong 1,5 giờ. Sau khi phản ứng, mảnh Fab được liên kết với DFO qua phần tử liên kết (-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-) (được đặt tên là PB009-02) được tinh chế bằng cách sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra 3K-0,5 mL (Merck Millipore).

Số lượng phối tử được cấu thành bởi DFO được liên kết với PB009-02 được khẳng định bằng phổ khối. PB009-02 được tách muối bằng cách sử dụng MassPREP Micro Desalting Column (Waters Corp.), và việc đo được thực hiện bằng cách sử dụng khối phổ kế SYNAPT G2 (Waters Corp.). Kết quả là, phân tử trong đó ít nhất là 3 đến 10 phối tử được cấu thành bằng DFO được liên kết với một PB009-01 đã được khẳng định.

Ví dụ 3: Đánh giá hoạt tính gắn kết

Để xác định hoạt tính gắn kết chi tiết của PB009-02, việc phân tích được thực hiện bằng SPR. Trong ví dụ này, mảnh Fab của M5A (được gọi là M5A-Fab), kháng thể được làm giống như của người của T84.66, được sử dụng làm mảnh Fab so sánh. M5A-Fab được liên kết với DFO thông qua phần tử liên kết (được gọi là M5A-Fab-DFO) được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2.

Phân tích bằng SPR được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 (GE Healthcare Japan Corp.). 10 µg/mL CEACAM5 người (R&D Systems, Inc.) được biotinyl hóa bằng kit Biotin CAPture Kit, Series S (GE Healthcare Japan Corp.) và Kit-NH₂ đánh dấu Biotin

(Dojindo Laboratories) được bổ sung lên bề mặt của chip cảm biến với lưu lượng là 5 μL /phút trong 2 phút, và được giữ cố định trên đó. PB009-01, PB009-02, M5A-Fab và M5A-Fab-DFO được pha loãng bằng dung dịch HBS-EP+ (GE Healthcare Japan Corp.) trong 6 chuỗi ở tỷ lệ 2 lần từ 400 nM, và 100 μL mỗi chất được bổ sung vào kênh ở lưu lượng là 50 μL /phút. Trong hệ thống đo này, hằng số phân ly (K_D) của PB009-01, PB009-02, M5A-Fab hoặc M5A-Fab-DFO cho CEACAM5 người được tính bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu (BIA Evaluation, GE Healthcare Japan Corp.). Kết quả là, như được thể hiện trong bảng dưới đây, hoạt tính gắn kết của M5A-Fab được làm yếu đi bằng việc gắn kết của DFO, trong khi đó hoạt tính gắn kết của PB009-01 không bị làm yếu đi bằng sự gắn kết của DFO.

Bảng 1

Fab	K_D (M)	Fab được liên kết với DFO	K_D (M)
PB009-01	1,7E-10	PB009-02	6,1E-10
M5A-Fab	1,6E-10	M5A-Fab-DFO	9,6E-09

Ví dụ 4: Đánh dấu ^{89}Zr đối với thể liên hợp của mảnh Fab được liên kết với DFO

^{89}Zr được mua dưới dạng Zr-Oxalat từ 3D Imaging LLC. 20 μL Zr-Oxalat (2,6 mCi) được trung hòa bằng 10 μL 2 M natri cacbonat. Sau đó, 20 μL axit gentisic 5 mg/mL được bổ sung vào đó. Ngoài ra, 110 μL 20 mM HEPES (axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic) chứa 0,05% polysorbat 80 được bổ sung vào đó. 40 μL PB009-02 10 mg/mL được bổ sung vào đó và được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và sau đó phản ứng thêm ở 37°C trong 30 phút. Sau khi phản ứng, PB009-02 được đánh dấu bằng ^{89}Zr (được gọi là PB009-03) được tinh chế bằng cách sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra 10K-0,5 mL (Merck Millipore).

Ví dụ 5: Đánh giá độ tương phản của thể liên hợp trong mô ghép ngoại lai dưới da

1×10^6 tế bào LS174T dòng ung thư đại trực tràng người (ATCC(R); CL-188) được ghép ngoại lai dưới da là các tế bào dương tính với CEACAM5 vào vai phải của chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch (chuột NOG; Taconic Biosciences), và 5×10^6 tế bào HCT-15 dòng tế

bào ung thư đại trực tràng người (ATCC(R); CCL-225) được ghép ngoại lai dưới da là tế bào âm tính với CEACAM5 người vào vai trái. Ví dụ này được thực hiện ở $N = 3$. Sau khi thể tích khối u đạt được khoảng 300 mm^3 , PB009-03 (xấp xỉ $20 \text{ }\mu\text{g}$, xấp xỉ $120 \text{ }\mu\text{Ci}$) được dùng trong tĩnh mạch sau đó. Các ảnh được chụp bằng PET 4 giờ, 24 giờ và 48 giờ sau khi dùng PB009-03, và SUV-Max của vị trí được đo. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 1A, PB009-03 được thể hiện là tích tụ trong các tế bào LS174T (tế bào dương tính với CEACAM5 người) nhiều hơn các tế bào HCT-15 (tế bào âm tính CEACAM5) 4 giờ sau khi dùng. Như được thể hiện trên Fig. 1B, PB009-03 được phát hiện là cho phép phát hiện các tế bào ung thư dương tính với CEACAM5 người từ 4 giờ đến 48 giờ sau khi dùng.

Ví dụ 6: Đánh giá độ tương phản của thể liên hợp trong mô hình ghép gan

1×10^6 tế bào LS174T biểu hiện luciferaza được cấy ghép vào gan của mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột NSG; The Jackson Laboratory) ở trạng thái gây mê. Ví dụ này được thực hiện ở $N = 6$. Việc cấy ghép tế bào trong gan được khẳng định bằng sự biểu hiện của luciferaza là một chỉ số bằng cách sử dụng hệ thống tạo ảnh IVIS (PerkinElmer, Inc.). Sau đó, PB009-03 (khoảng $14 \text{ }\mu\text{g}$, khoảng $100 \text{ }\mu\text{Ci}$) được chuẩn bị theo cách tương tự như trong Ví dụ 4 được sử dụng trong tĩnh mạch thêm vào đó. Các ảnh được chụp bằng PET 4 giờ và 24 giờ sau khi dùng PB009-03. SUV-Max của gan và khối u LS174T (mà để chỉ tình trạng trong đó các tế bào LS174T được cấy ghép được cấy vào gan) được đo để tính tỷ lệ của SUV-Max của khối u với SUV-Max của gan. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 2A, PB009-03 được thể hiện là tích tụ trong khối u LS174T được ghép trong gan 4 giờ sau khi dùng. Các tỷ lệ tín hiệu của khối u với gan 4 giờ và 24 giờ sau khi dùng là các giá trị được thể hiện trên Fig. 2B. Từ các kết quả này, PB009-03 được phát hiện là cho phép sự phát hiện của các tế bào ung thư dương tính với CEACAM5 người có mặt trong gan 4 giờ và 24 giờ sau khi dùng.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo sáng chế và thể liên hợp bao gồm mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được kỳ vọng là có

thể được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư tuyến giáp và bệnh ung thư là do sự di căn của các bệnh ung thư này.

Văn bản không chứa Danh mục trình tự

Tiêu đề phụ bằng số <223> trong danh mục trình tự được nêu dưới đây sẽ được mô tả là "Trình tự nhân tạo". Cụ thể, các trình tự nucleotit được biểu diễn bởi các SEQ ID NO: 1 và 3 của danh mục trình tự là các trình tự nucleotit của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, lần lượt, của PB009-01. Các trình tự axit amin được biểu diễn bởi các SEQ ID NO: 2 và 4 là các trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bằng các SEQ ID NO: 1 và 3, tương ứng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng thu được từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin từ 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 bằng cách cải biến axit glutamic ở vị trí axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin từ các vị trí axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

2. Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 1 được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 bằng cách cải biến axit glutamic ở vị trí axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

3. Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 2, bao gồm mảnh chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

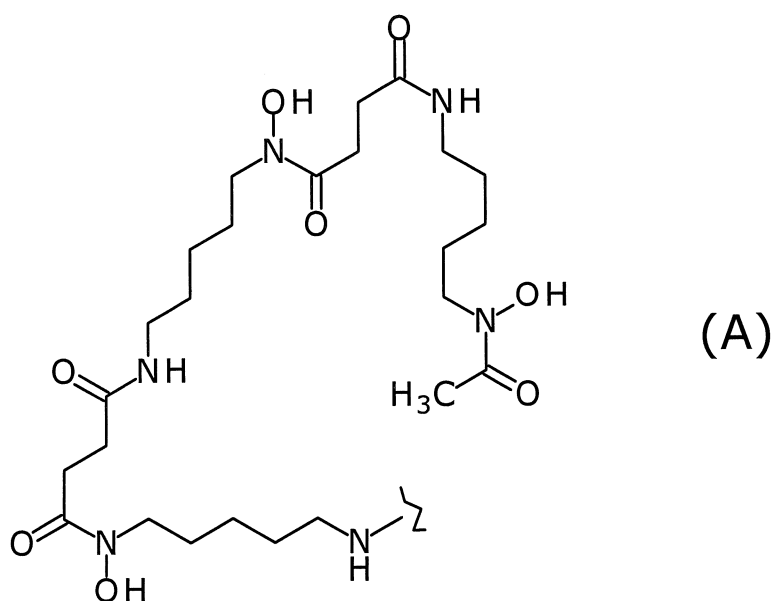
4. Thẻ liên hợp bao gồm gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm bất kì trong số các điểm từ 1 đến 3.

5. Thẻ liên hợp theo điểm 4, trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, (ii) phối tử, (iii) thuốc nhuộm huỳnh quang và phân tử liên kết, hoặc (iv) thuốc nhuộm huỳnh quang.

6. Thẻ liên hợp theo điểm 5, trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, hoặc (ii) phối tử.

7. Thẻ liên hợp theo điểm 6, trong đó phối tử là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:

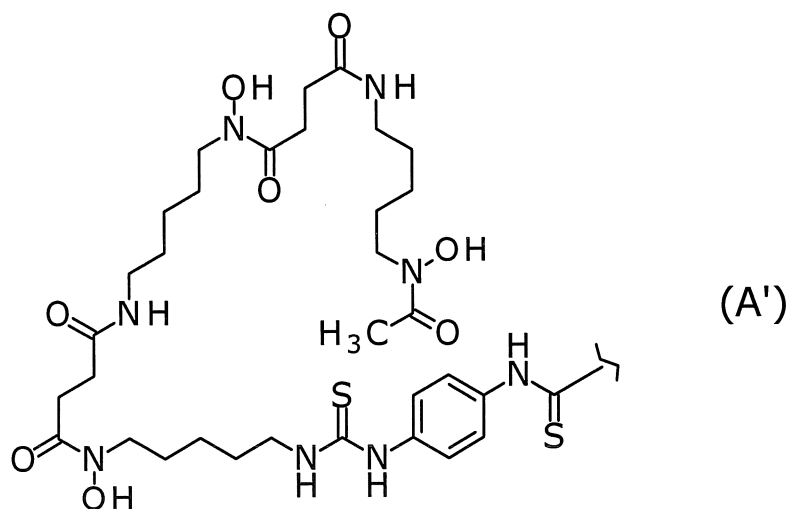
[Công thức hoá học 1]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người hoặc phân tử liên kết.

8. Thẻ liên hợp theo điểm 6, trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, trong đó phối tử và phân tử liên kết là nhóm được biểu diễn bởi công thức (A') dưới đây:

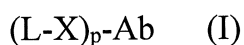
[Công thức hoá học 2]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người.

9. Thể liên hợp theo điểm 8, trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người được liên kết với nguyên tử cacbon của nhóm $C(=S)$ đầu tận gốc đánh dấu thông qua nhóm amino của mảnh Fab.

10. Thể liên hợp theo điểm 6 được biểu diễn bởi công thức (I) dưới đây:



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người,

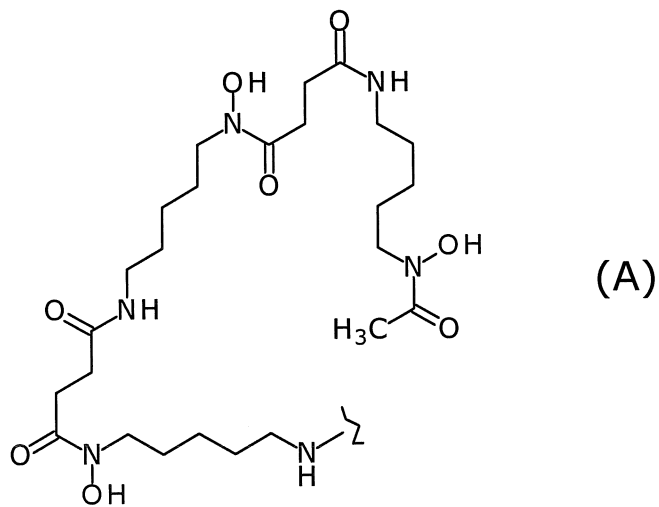
L là phối tử;

X là phần tử liên kết hoặc liên kết; và

p là số tự nhiên từ 1 đến 25.

11. Thể liên hợp theo điểm 10, trong đó L là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:

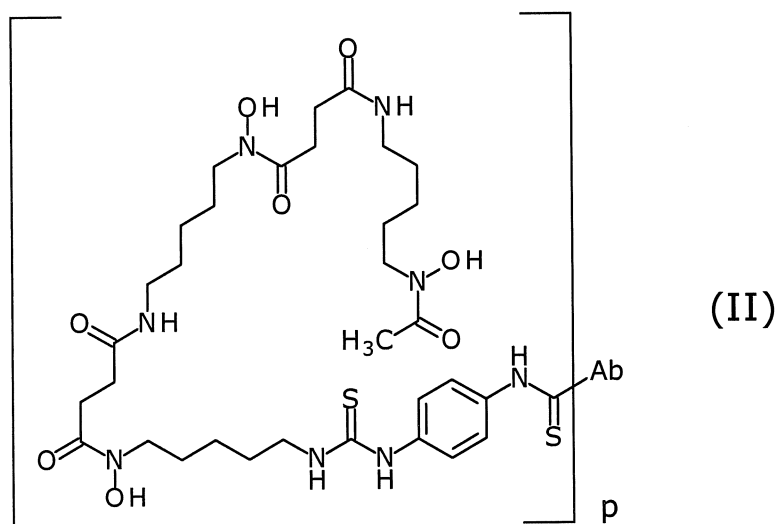
[Công thức hoá học 3]



trong đó đường lượn sóng biểu diễn việc liên kết với X (hoặc Ab khi X là liên kết).

12. Thể liên hợp theo điểm 8 hoặc 11 được biểu diễn bởi công thức (II) dưới đây:

[Công thức hoá học 4]



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người; và

p là số tự nhiên từ 1 đến 25, trong đó

Ab được liên kết với nguyên tử cacbon của C(=S) đầu tận gốc đánh dấu thông qua nhóm amino trong Ab.

13. Thẻ liên hợp theo điểm bất kì trong số các điểm từ 10 đến 12, trong đó p là số tự nhiên từ 1 đến 16.

14. Thẻ liên hợp theo điểm bất kì trong số các điểm từ 10 đến 12, trong đó p là số tự nhiên từ 1 đến 10.

15. Thẻ liên hợp theo điểm bất kì trong số các điểm từ 5 đến 14, còn bao gồm kim loại.

16. Thẻ liên hợp theo điểm 15, trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại.

17. Thẻ liên hợp theo điểm 15, trong đó kim loại là ^{89}Zr .

18. Polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1.

19. Polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3.

20. Vector biểu hiện chứa (a) và/hoặc (b):

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1.

21. Vector biểu hiện chứa (a) và/hoặc (b):

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3.

22. Tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1 và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1.

23. Tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của

người theo điểm 3 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3 và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3.

24. Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1 và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người (a) theo điểm 1.

25. Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3 và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người theo điểm 3.

26. Phương pháp sản xuất thể liên hợp bao gồm gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, bao gồm các bước: tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bằng phương pháp theo điểm 24 hoặc 25; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu.

27. Phương pháp sản xuất thể liên hợp bao gồm phối tử và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, bao gồm các bước: tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bằng phương pháp theo điểm 24 hoặc 25; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với phối tử thông qua phản tử liên kết hoặc một cách trực tiếp.

28. Phương pháp sản xuất thể liên hợp bao gồm gốc đánh dấu được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ kim loại và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, bao gồm các bước: tạo ra thể liên hợp bao gồm phối tử và mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người bằng phương pháp theo điểm 27; và gắn kết đồng vị phóng xạ kim loại với phối tử của thể liên hợp qua liên kết phối trí.

29. Chế phẩm để chẩn đoán bao gồm thể liên hợp theo điểm bất kì trong số các điểm từ 15 đến 18, và chất mang được dụng.
30. Chế phẩm để chẩn đoán theo điểm 29 là được phẩm chia giai đoạn lâm sàng.

Fig. 1A

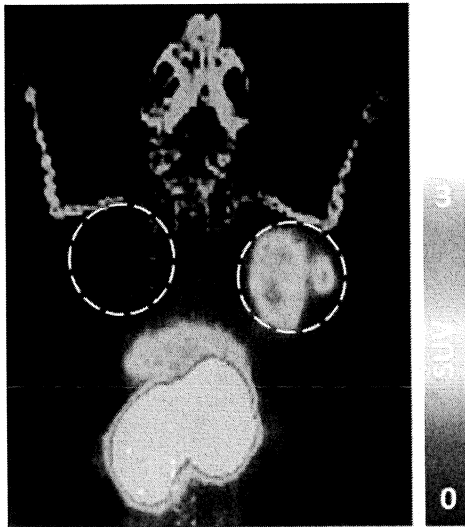


Fig. 1B

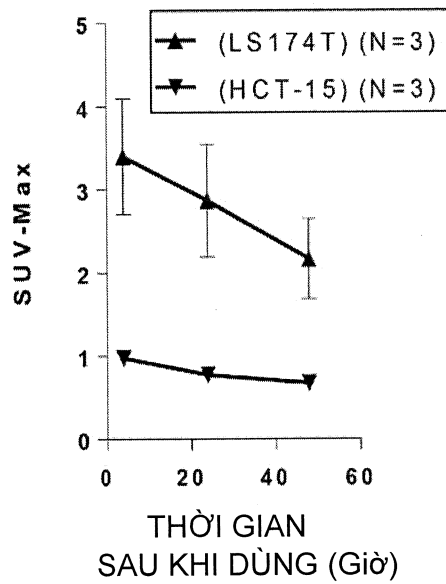


Fig. 2A

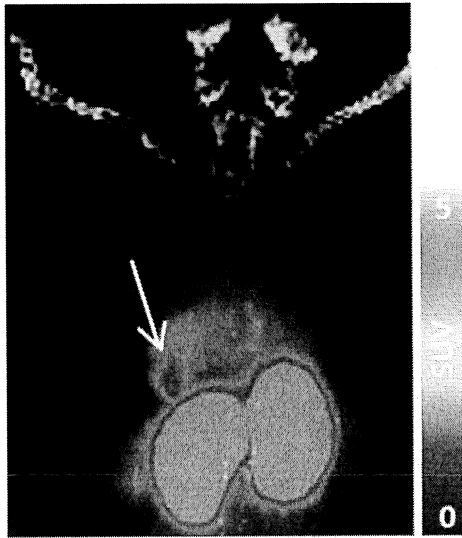
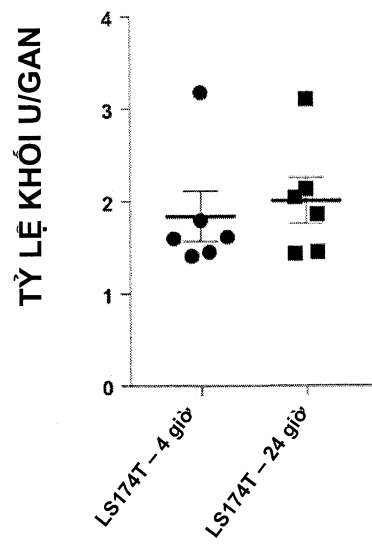


Fig. 2B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người, thể liên hợp chứa mảnh Fab này, chế phẩm chứa thể liên hợp và phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 người hoặc thể liên hợp này

<130> A18007A00

<150> JP 2017-133698

<151> 2017-07-07

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 678

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hoá chuỗi nặng Fab PB009-01

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(678)

<400> 1

gaa	gtg	cag	ctg	gtg	gaa	tct	ggc	ggc	gga	ctg	gtg	cag	cct	ggc	gga	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tct	ctg	aga	ctg	agc	tgt	gcc	gcc	agc	ggc	ttc	aac	atc	cgg	gac	acc	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Arg	Asp	Thr	
			20					25					30			
tac	atg	cac	tgg	gtg	cgc	cag	gcc	cct	ggc	aag	gga	ctg	gaa	tgg	gtg	144
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40						45				
gcc	aga	atc	gac	ccc	gcc	aac	ggc	aac	agc	aga	tac	gtg	ccc	aag	ttc	192
Ala	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Asn	Ser	Arg	Tyr	Val	Pro	Lys	Phe	
	50					55					60					
cag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	agc	gcc	gac	acc	agc	aga	aac	acc	gcc	tac	240
Gln	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn	Thr	Ala	Tyr	
65				70				75						80		
ctg	cag	atg	aac	agc	ctg	cgg	gcc	gag	gac	acc	gcc	gtg	tac	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90					95			
gcc	ccc	ttc	ggc	tac	tac	gtg	tcc	gac	tac	gcc	atg	gcc	tat	tgg	ggc	336

Ala	Pro	Phe	Gly	Tyr	Tyr	Val	Ser	Asp	Tyr	Ala	Met	Ala	Tyr	Trp	Gly	
			100					105					110			
cag	ggc	acc	ctc	gtg	aca	gtg	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	384
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
		115					120					125				
gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	432
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
	130					135					140					
gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	480
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
145					150					155					160	
tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	528
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
			165						170				175			
gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctt	agt	agc	gtg	gtg	acc	gtg	576
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180					185					190			
ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	624
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
		195					200					205				
aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	gtt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	672
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
	210					215					220					
gac	tga															678
Asp																
225																
<210>	2															
<211>	225															
<212>	PRT															
<213>	Trình tự nhân tạo															
<220>																
<223>	Cấu trúc tổng hợp															
<400>	2															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Arg	Asp	Thr	
			20					25					30			

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

<210> 3
 <211> 657

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(657)

<400> 3

gac atc cag ctg acc cag agc cct agc agc ctg tct gcc agc gtg ggc	48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac aga gtg acc atc acc tgt aga gcc ggc gag agc gtg gac atc ttc	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe	
20 25 30	
ggc gtg gga ttt ctg cac tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc	144
Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
35 40 45	
aag ctg ctg atc tac aga gcc agc aac ctg gaa agc ggc atc ccc agc	192
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser	
50 55 60	
aga ttc agc ggc agc ggc tcc aga acc gac ttc acc ctg acc atc agc	240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75 80	
agc ctg cag ccc gag gac ttc gcc acc tac tac tgc cag cag acc aac	288
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn	
85 90 95	
gag gac ccc tac acc ttt ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag cgt	336
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	
100 105 110	
acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag	384
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	
115 120 125	
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat	432
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	
130 135 140	
ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg	480
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser	
145 150 155 160	
ggg aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc	528
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	

```

                                165                                170                                175
tac agc ctg agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa      576
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
                                180                                185                                190

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc      624
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
                                195                                200                                205

gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag      657
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                                210                                215

<210> 4
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1                                5                                10                                15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20                                25                                30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35                                40                                45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser
50                                55                                60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85                                90                                95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100                                105                                110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

```

38113

115					120					125					
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
	130					135					140				
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
145					150					155					160
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				165					170					175	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
			180					185					190		
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
		195					200					205			
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
	210					215									