



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

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



1-0039442

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 47/68; A61P 35/00; (13) B
C07K 16/30; A61P 43/00; A61K 39/00;
A61P 35/02

-
- (21) 1-2016-01346 (22) 10/10/2014
(86) PCT/GB2014/053057 10/10/2014 (87) WO2015/052537 16/04/2015
(30) 61/890,104 11/10/2013 US; 61/890,098 11/10/2013 US
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/07/2016 340A
(73) BERLIN-CHEMIE AG (DE)
Glienicke Weg 125-127, 12489 Berlin, Germany
(72) TERRETT, Jonathan Alexander (GB); ACKROYD, James Edward (GB).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)
-

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT VỚI LY75 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với LY75. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể này, vectơ biểu hiện, tế bào vật chủ và các phương pháp biểu hiện các kháng thể này. Các kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị ung thư, bao gồm ung thư tụy, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư trực tràng, ung thư thực quản, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư phổi, ung thư bàng quang, đa u tủy và u bạch huyết. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể và các protein trị liệu khác hướng đích LY75, axit nucleic mã hóa các kháng thể và protein trị liệu này, các phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng và protein trị liệu khác, và phương pháp điều trị bệnh, như ung thư gây ra bởi sự biểu hiện/hoạt tính của LY75 và/hoặc liên quan đến sự biểu hiện/hoạt tính bất thường của các phối tử của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng nguyên lympho bào 75 hoạt động như thụ thể nhập bào để hướng các kháng nguyên đã bị bắt giữ ra khỏi vùng ngoại bào tới khoang xử lý kháng nguyên biệt hóa và nhận thấy rằng nó làm giảm mức độ tăng sinh của lympho bào B. Sự biểu hiện của kháng nguyên lympho bào 75 được quan sát ở ung thư tụy, buồng trứng, ngực, trực tràng, thực quản, da, tuyến giáp và phổi (tế bào không nhỏ) cũng như đa u tủy và nhiều loại u bạch huyết và bệnh bạch cầu khác nhau.

WO2009/061996 mô tả kháng thể đơn dòng phân lập được mà gắn kết với DEC-205 (LY75) của người và các chế phẩm và phân tử trên cơ sở kháng thể có liên quan. Tài liệu này cũng mô tả được phẩm chứa các kháng thể này, cũng như phương pháp điều trị và chẩn đoán bệnh bằng cách sử dụng các kháng thể này.

WO2008/104806 mô tả các chất phản ứng ái lực có khả năng gắn kết với LY75 dùng để điều trị hoặc ngăn ngừa ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể hướng đích LY75, axit nucleic mã hóa kháng thể này, tế bào vật chủ chứa các axit nucleic này mã hóa các kháng thể theo sáng chế, phương pháp tạo ra chất kháng LY75, và các phương pháp điều trị bệnh, như các rối loạn do LY75 gây ra, ví dụ, ung thư ở người, bao gồm ung thư tụy, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư trực tràng, ung thư thực quản, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư phổi, ung thư đầu và cổ, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, bệnh bạch cầu, đa u tủy và u bạch huyết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó: (a) gắn kết epitop trên LY75 mà được nhận diện bởi kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.2, hoặc (b) cạnh tranh để gắn kết với LY75 với kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một phương án, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với LY75 của người và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa 1, 2 hoặc 3 CDR được chọn từ nhóm bao gồm các CDR có các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, 6, và 7, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa 1, 2 hoặc 3 CDR được chọn từ nhóm bao gồm các CDR có các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, 9 và 10.

Theo các phương án được ưu tiên, các kháng thể này là các kháng thể phân lập.

Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với LY75 (SEQ ID NO.15) và được nội hóa bởi tế bào biểu hiện LY75 để tạo ra đáp ứng hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC) với sự có mặt của tế bào tác động hoặc tạo ra đáp ứng gây độc tế bào T với sự có mặt của các tế bào tác động.

Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng xác định bổ sung (complementarity determining region - CDR) hoặc vùng biến đổi (variable region - VR) của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể cụ thể nêu trong bản mô tả này (ví dụ, trong bản mô tả này được gọi là “LY75_A1”). Do đó, theo một phương án, kháng thể chứa các miền CDR1, CDR2, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable - VH) của kháng thể LY75_A1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, và/hoặc các miền CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable - VL) của LY75_A1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa vHCDR thứ nhất có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.5; vHCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6; và vHCDR thứ ba có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.7; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa vLCDR thứ nhất có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.8; vLCDR thứ hai có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.9; và vLCDR

thứ ba có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.10, tùy ý trong đó một hoặc nhiều CDR bất kỳ độc lập chứa một, hai, ba, bốn hoặc năm đột biến thay thế, bổ sung hoặc khuyết axit amin.

Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với LY75 của người và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1, và/hoặc các đoạn cải biến trình tự bảo thủ của chúng. Các kháng thể này có thể còn bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.2, và/hoặc các đoạn cải biến trình tự bảo thủ của chúng.

Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với LY75 của người và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ lần lượt bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 và/hoặc SEQ ID NO.2, và các đoạn cải biến trình tự bảo thủ của chúng.

Các kháng thể phân lập bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc lớn hơn so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trên cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các khoảng liên quan đến các trị số nêu trên, ví dụ, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80-85%, 85-90%, 90-95% hoặc 95-100% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trên cũng được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo một phương án, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc trình tự có ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% giống với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1. Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc trình tự có ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% giống với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng khung chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% giống so với khung của vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 như được nêu trong các SEQ ID

NO.16, 17, 18 và 19. Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng khung chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% giống so với khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 như được nêu trong SEQ ID NOS: 20, 21, 22 và 23.

Sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể cạnh tranh để gắn kết với LY75 với các kháng thể theo sáng chế. Theo phương án cụ thể, kháng thể cạnh tranh để gắn kết với LY75 với kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 và 2, hoặc các trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%. Theo phương án khác, kháng thể cạnh tranh để gắn kết với LY75 với kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 và 2 (LY75_A1).

Các kháng thể khác theo sáng chế gắn kết với cùng một epitop hoặc epitop trên LY75 đã được nhận diện bởi các kháng thể nêu trong bản mô tả này. Theo phương án cụ thể khác, kháng thể gắn kết với epitop trên LY75 đã được nhận diện bởi kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 và 2, hoặc các trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%. Theo phương án khác, kháng thể gắn kết với epitop trên LY75 đã được nhận diện bởi kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 và 2 (LY75_A1).

Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với một hoặc nhiều, ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 peptit được chọn từ nhóm chứa các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 hoặc 37 hoặc các mảnh của chúng, trong đó các mảnh này chứa ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9 hoặc ít nhất 10 axit amin liền kề. Theo phương án khác, epitop đã được nhận diện bởi các kháng thể theo sáng chế chứa một hoặc nhiều peptit, hai hoặc nhiều peptit hoặc ba hoặc nhiều peptit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27, 29, 30, 34, 35, 36 hoặc 37 hoặc các mảnh của chúng, trong đó các mảnh này chứa ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9 hoặc ít nhất 10 axit amin liền kề. Theo phương án khác, epitop đã

được nhận diện bởi các kháng thể theo sáng chế chứa một hoặc nhiều peptit, ví dụ, hai hoặc ba peptit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.30, 36 và 37 hoặc các mảnh của chúng, trong đó các mảnh này chứa ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9 hoặc ít nhất 10 axit amin liên kề.

Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế chứa các CDR biến đổi so với các kháng thể bố mẹ nêu trong bản mô tả này. Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể biến đổi chứa vùng biến đổi cải biến của kháng thể bố mẹ, trong đó kháng thể bố mẹ này chứa vhCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, vhCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, vhCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, vlCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, vlCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và vlCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10, và trong đó kháng thể biến đổi này thường có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 đột biến thay thế axit amin trong bộ gồm vhCDR thứ nhất, vhCDR thứ hai, vhCDR thứ ba, vlCDR thứ nhất, vlCDR thứ hai và vlCDR thứ ba, với 1 đến 4, 1 đến 3 hoặc 1 đến 2 đột biến thay thế để dùng cụ thể, và trong đó kháng thể này vẫn gắn kết đặc hiệu với LY75.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể bất kỳ trong số các isotyp sau: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, và IgE. Theo cách khác, các kháng thể này có thể là các mảnh như phần gắn kết kháng nguyên hoặc kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, Fab, F(ab')₂, Fv, mảnh Fv chuỗi đơn, vùng xác định bổ sung (CDR) phân lập được hoặc dạng kết hợp của hai hoặc nhiều CDR phân lập được). Các kháng thể này có thể là loại kháng thể bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể của người, nhân tạo, và kháng thể thể khảm.

Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế ở dạng thể tiếp hợp miễn dịch (tức là còn chứa gốc liên kết cộng hóa trị). Theo phương án cụ thể, gốc này là được chất, như maytansinoid, dolastatin, auristatin, trichothecene, calicheamicin, CC1065 hoặc các dẫn xuất của chúng. Theo một phương án được ưu tiên, gốc được chất là DM1 hoặc DM4

Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế còn chứa phân tử đặc hiệu kép và do đó có thể tạo ra đáp ứng hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) với sự có mặt của tế bào tác động, do đó tiêu diệt các tế bào biểu hiện LY75.

Theo các phương án khác, các kháng thể theo sáng chế còn chứa phân tử đặc hiệu kép và do đó có thể tạo ra đáp ứng gây độc tế bào T với sự có mặt của tế bào tác động, từ đó tiêu diệt các tế bào biểu hiện LY75.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic chứa trình tự mã hóa chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic chứa trình tự mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic chứa trình tự mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập được gắn kết với LY75 của người, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic lần lượt chứa các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và 4, hoặc các trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với các trình tự axit nucleic nêu trên hoặc trình tự axit nucleic khác so với các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và 4 do thoái biến mã di truyền.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các kháng thể theo sáng chế được được liên kết điều khiển với một hoặc nhiều đoạn điều hòa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ chứa axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ hoặc các phần gắn kết kháng nguyên của chúng của các kháng thể nêu trên. Tốt hơn, nếu trong đó tế bào vật chủ biểu hiện vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ này hoặc các phần gắn kết kháng nguyên của chúng khi tế bào vật chủ này được phát triển trong các điều kiện trong đó các axit nucleic được biểu hiện.

Theo một phương án được ưu tiên, tế bào vật chủ chứa: (i) vector biểu hiện theo sáng chế; hoặc

(ii) vector biểu hiện thứ nhất chứa axit nucleic trình tự mã hóa chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó và vector biểu hiện thứ

hai chứa axit nucleic trình tự mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế trong các điều kiện, trong đó kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được biểu hiện và tùy ý bước phân lập kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh có nhu cầu điều trị dùng kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, trong đó kháng thể này hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được nội hóa bởi tế bào biểu hiện LY75, kháng thể này hoặc phần gắn kết kháng nguyên chứa thể tiếp hợp được chất liên kết cộng hóa trị. Đã biết rằng kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là kháng thể gắn kết với LY75 (SEQ ID NO.15). Theo một phương án, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa vhCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5; vhCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6; và vhCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được nêu trong vlCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8; vlCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9; và vlCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và thể tiếp hợp được chất liên kết cộng hóa trị.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó đối tượng bị bệnh có nhu cầu điều trị được cho dùng kháng thể hoặc các kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và trong đó kháng thể hoặc các kháng thể như vậy hoặc phần gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế tạo ra đáp ứng ADCC với sự có mặt của tế bào tác động. Tốt hơn, nếu kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa vhCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5; vhCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6; và vhCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa vlCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8; vlCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9; và vlCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó đối tượng bị bệnh có nhu cầu điều trị được cho dùng kháng thể hoặc các kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và trong đó kháng thể hoặc các kháng thể như vậy hoặc phần gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế tạo ra đáp ứng gây độc tế bào T với sự có mặt của tế bào tác động. Tốt hơn, nếu kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa vhCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5; vhCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6; và vhCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa vlCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8; vlCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9; và vlCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế dùng để điều trị ung thư.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc điều trị ung thư.

Theo một số phương án, ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư tụy, ung thư thận, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư trực tràng, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư phổi, bệnh bạch cầu, u tủy, tốt hơn là đa u tủy, và u bạch huyết. Đặc biệt, tốt hơn nếu ung thư bao gồm u bạch huyết không phải dạng Hodgkin, u bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán (diffuse large B-cell lymphoma - DLBCL), u bạch huyết tế bào B, u bạch huyết có nang, u bạch huyết tế bào vỏ não, u bạch huyết của mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue - MALT), u bạch huyết tế bào T/tế bào B giàu mô bào, u bạch huyết Burkitt, u bạch huyết lympho-bào tương, u bạch huyết lympho bào nhỏ, u bạch huyết vùng biên, u bạch huyết tế bào T, u bạch huyết tế bào T ngoại vi, u bạch huyết tế bào lớn tự ghép và u bạch huyết tế bào T miễn dịch-mạch máu, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư bàng quang, ung thư tụy và ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp phát hiện, chẩn đoán và/hoặc sàng lọc hoặc kiểm soát quá trình tiến triển ung thư trong đó LY75 được biểu hiện trong các ung thư này, hoặc kiểm soát hiệu quả của dược chất hoặc phép trị liệu các

loại ung thư này, ở đối tượng bao gồm bước phát hiện sự có mặt hoặc nồng độ kháng thể có khả năng gắn kết miễn dịch đặc hiệu với LY75, hoặc một hoặc nhiều mảnh của chúng.

Tốt hơn, nếu ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư tụy, ung thư thận, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư trực tràng, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư phổi, bệnh bạch cầu, u tủy, tốt hơn là đa u tủy, và u bạch huyết. Đặc biệt tốt hơn, nếu ung thư bao gồm u bạch huyết không phải dạng Hodgkin, u bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán (DLBCL), u bạch huyết tế bào B, U bạch huyết có nang, u bạch huyết tế bào vỏ não, u bạch huyết của mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc (MALT), u bạch huyết tế bào T/tế bào B giàu mô bào, u bạch huyết Burkitt, u bạch huyết lympho-bào tương, u bạch huyết lympho bào nhỏ, u bạch huyết vùng biên, u bạch huyết tế bào T, u bạch huyết tế bào T ngoại vi, u bạch huyết tế bào lớn tự ghép và u bạch huyết tế bào T miễn dịch-mạch máu, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư bàng quang, ung thư tụy và ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon.

Phạm vi của sáng chế cũng bao gồm kit chứa các thành phần (ví dụ, các kháng thể) theo sáng chế và, tùy ý, hướng dẫn sử dụng. Kit này có thể còn chứa ít nhất một chất phản ứng khác hoặc một hoặc nhiều kháng thể khác theo sáng chế.

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế là hiển nhiên đối với phân mô tả chi tiết sáng chế và phần yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện việc so sánh trình tự của chuỗi nặng LY75_A1 (SEQ ID NO.1), dòng mầm VH3-15 của người (SEQ ID NO.11) và dòng mầm JH4 của người (SEQ ID NO.12). Các vùng CDR của chuỗi nặng LY75_A1 được gạch chân.

Fig.2 thể hiện việc so sánh trình tự của chuỗi nhẹ LY75_A1 (SEQ ID NO.2), dòng mầm VK O12 của người (SEQ ID NO.13) và dòng mầm JK4 của người (SEQ ID NO: 14). Các vùng CDR của chuỗi nhẹ LY75_A1 được gạch chân.

Fig.3a thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của kháng thể đơn dòng kháng LY75 tiếp hợp với DM1 trong HT-29 và chứng tỏ rằng hầu hết các kháng thể gắn kết với LY75 nhưng chỉ có hiệu quả rất nhỏ.

Fig.3b thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong HT-29.

Fig.3c thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào RAJI.

Fig.3d thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào Namalwa.

Fig.3e thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào Karpas 299.

Fig.3f thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM 1 hoặc DM4 trong các tế bào BxPC3.

Fig.3g thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào HupT4.

Fig.3h thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào HPAPFII.

Fig.3i thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào EHEB.

Fig.3j thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào Mec-1.

Fig.3k thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào AML-193.

Fig.3l thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào HCC 70.

Fig.3m thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào HCC 1806.

Fig.3n thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào MDA-MB-468.

Fig.3o thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào RT4.

Fig.3p thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào 5637.

Fig.3q thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào SW780.

Fig.3r thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào SCC-9.

Fig.3s thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào OE 19.

Fig.3t thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào OVCAR-3.

Fig.3u thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào SK-OV-3.

Fig.3v thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào MOLP-8.

Fig.3w thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong các tế bào RPMI8226.

Fig.4a thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong mô hình dị ghép của chuột nhắt SCID bị u bạch huyết Raji Burkitt.

Fig.4b thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 trong mô hình dị ghép của chuột nhắt SCID bị u bạch huyết Namalwa Burkitt.

Fig.4c thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 ở mô hình dị ghép của chuột trụi lông tuyến tụy bị ung thư biểu mô tụy HPAFII.

Fig.4d thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 ở mô hình dị ghép của chuột SCID bị ung thư biểu mô bàng quang SW780 ở người.

Fig.4e thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 ở mô hình dị ghép của chuột nhắt bị trụi lông tuyến tụy MDA-MB-468.

Fig.4f thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 hoặc DM4 ở mô hình dị ghép của chuột nhắt trụi lông tuyến tụy bị ung thư biểu mô trực tràng COLO205.

Fig.5a thể hiện khả năng gắn kết cạnh tranh của mAb kháng LY75 và mAb kháng LY75 tiếp hợp với MCC-DM1.

Fig. 5b thể hiện khả năng gắn kết không cạnh tranh của LY75_A1 và mAb kháng LY75 tiếp hợp với MCC-DM1.

Fig.6a-6j là biểu đồ minh họa khả năng gắn kết của kháng thể LY75_A1 với peptit LY75 trên vi mảng peptit.

Fig.7 thể hiện quá trình sắp hàng trình tự axit amin của peptit đã được gắn kết bởi kháng thể LY75_A1 ở cả thử nghiệm vi mảng peptit lẫn thử nghiệm kéo peptit xuống. Peptit đã được đánh dấu là các peptit có khả năng tạo ra epitop đã được nhận diện bởi kháng thể LY75_A1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể phân lập gắn kết với protein LY75 nêu trong SEQ ID NO.15 như được nêu trong bản mô tả này.

Ngoài ra, các kháng thể LY75 theo sáng chế có thể là phân tử đặc hiệu kép và như vậy có thể tạo ra đáp ứng hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) với sự có mặt của tế bào tác động, từ đó tiêu diệt các tế bào biểu hiện LY75.

Ngoài ra, các kháng thể LY75 theo sáng chế có thể là phân tử đặc hiệu kép và như vậy có thể tạo ra đáp ứng gây độc tế bào T với sự có mặt của tế bào tác động, do đó tiêu diệt các tế bào biểu hiện LY75.

Ngoài ra, các kháng thể LY75 theo sáng chế có thể được nội hóa khi được tiếp xúc với các tế bào biểu hiện thụ thể LY75. Như được thảo luận trong bản mô tả này, thụ thể LY75 được biểu hiện quá mức và/hoặc được biểu hiện biệt hóa trên các tế bào ung thư nhất định, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư thận, ung thư gan, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư dạ dày, ung thư trực tràng, ung thư tụy, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, bệnh bạch cầu tốt hơn là bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính hoặc bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, u tủy, tốt hơn là đa u tủy, u bạch huyết, tốt hơn là u bạch huyết tế bào B DLBCL, u bạch huyết có nang, u bạch huyết tế bào vỏ não, u bạch huyết của mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc (MALT), u bạch huyết tế bào T/tế bào B giàu mô bào, u bạch huyết Burkitt, u bạch huyết lympho-bào tương, u bạch huyết lympho bào

nhỏ, u bạch huyết vùng biên, u bạch huyết tế bào T, u bạch huyết tế bào T ngoại vi, u bạch huyết tế bào lớn tự ghép và u bạch huyết tế bào T miễn dịch-mạch máu, và ung thư phổi.

Như vậy, khi các kháng thể LY75 theo sáng chế được tiếp hợp với dược chất (đôi khi trong bản mô tả này được gọi là “thể tiếp hợp kháng thể-dược chất” hoặc “ADC”), quá trình nội tương tác của các phân tử ADC vào các tế bào ung thư sẽ gây chết tế bào và nhờ đó điều trị được khối u.

Sáng chế đề cập đến kháng thể có các đặc điểm cấu trúc cụ thể như các vùng CDR có trình tự axit amin cụ thể. Sáng chế mô tả bộ gồm các CDR có thể tạo ra chất phản ứng ái lực, ví dụ, kháng thể, có khả năng gắn kết với LY75.

Do đó, sáng chế đề cập đến các kháng thể, tốt hơn là các kháng thể phân lập (như được nêu dưới đây, bao gồm nhiều cấu trúc kháng thể đã biết, dẫn xuất, dạng mô phỏng và thể tiếp hợp khác nhau), axit nucleic mã hóa các kháng thể này, tế bào vật chủ được sử dụng để sản xuất kháng thể, phương pháp sản xuất kháng thể, và dược phẩm chứa các kháng thể này và tùy ý chất mang dược dụng, các phương pháp điều trị và chẩn đoán bao gồm việc sử dụng các kháng thể và sử dụng các kháng thể này để điều trị ung thư.

Protein LY75

Kháng nguyên lympho bào 75 hoạt động như thụ thể nhập bào để hướng các kháng nguyên đã bắt giữ ra khỏi vùng ngoại bào tới khoang xử lý kháng nguyên biệt hóa và do đó làm giảm quá trình tăng sinh lympho bào B.

Theo SWISS-PROT, kháng nguyên lympho bào 75 được biểu hiện ở lách, tuyến tụy, ruột kết và lympho bào ở máu ngoại vi. Nó được phát hiện ở tủy bào và dòng tế bào lympho B. Các dạng đồng phân trong bản mô tả này được gọi là OGTA076b và OGTA076c được biểu hiện ở các tế bào u bạch huyết Hodgkin ác tính được gọi là các tế bào Hodgkin và Reed-Sternberg (HRS). LY75 hoạt động như thụ thể nhập bào để hướng các kháng nguyên đã bắt giữ ra khỏi vùng ngoại bào tới khoang xử lý kháng nguyên biệt hóa. Nó làm giảm mức độ tăng sinh của lympho bào B.

Sự biểu hiện của LY75 được quan sát thấy ở ung thư tụy, bàng quang, buồng trứng, ngực (bao gồm âm tính với ba thụ thể hormon), trực tràng, thực quản, da, tuyến

giáp và phổi (tế bào không nhỏ) cũng như đa u tủy và nhiều loại u bạch huyết khác nhau (bao gồm DLBCL) và bệnh bạch cầu.

Trong các trường hợp nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể phản ứng ngang với LY75 từ các loài không phải là người. Ví dụ, để tạo điều kiện thuận lợi cho việc thử nghiệm lâm sàng, các kháng thể theo sáng chế có thể phản ứng ngang với các phân tử LY75 của loài giống gặm nhấm hoặc loài linh trưởng. Theo cách khác, theo một số phương án nhất định, các kháng thể có thể là đặc hiệu hoàn toàn với LY75 của người và không thể biểu hiện loài hoặc các loại phản ứng ngang không phải ở người khác.

Kháng thể

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LY75, thường là kháng thể điều trị và/hoặc chẩn đoán như đã nêu trong bản mô tả này. Nhận thấy rằng các kháng thể sử dụng theo sáng chế có thể được chấp nhận ở nhiều dạng như đã nêu trong bản mô tả, bao gồm các kháng thể truyền thống cũng như dẫn xuất kháng thể, các mảnh và dạng mô phỏng, được mô tả dưới đây. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến cấu trúc kháng thể chứa bộ gồm 6 CDR như được nêu trong bản mô tả (bao gồm số lượng nhỏ các axit amin thay đổi như được mô tả dưới đây).

“Kháng thể” như được sử dụng trong bản mô tả này có nhiều loại cấu trúc, là hiển nhiên đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, theo một số phương án nó chứa tối thiểu một bộ gồm 6 CDR như được nêu trong bản mô tả; bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các kháng thể truyền thống (bao gồm cả kháng thể đơn dòng lẫn kháng thể đa dòng), kháng thể nhân tạo và/hoặc kháng thể thể khảm, mảnh kháng thể, các kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền (ví dụ, bằng cách cải biến axit amin như được nêu dưới đây), kháng thể đa đặc hiệu (bao gồm kháng thể đặc hiệu kép), và các chất tương tự khác đã biết trong lĩnh vực này.

Các đơn vị cấu trúc kháng thể truyền thống thường chứa cấu trúc tứ phân. Mỗi cấu trúc tứ phân thường bao gồm hai cặp giống nhau gồm các chuỗi polypeptit, mỗi cặp này có một chuỗi “nhẹ” (thường có phân tử lượng khoảng 25kDa) và một chuỗi “nặng” (thường có phân tử lượng khoảng 50-70 kDa). Các chuỗi nhẹ của người được phân loại thành chuỗi nhẹ kappa và lambda. Các chuỗi nặng được phân loại thành mu, delta, gamma, alpha, hoặc epsilon, và isotyp của kháng thể xác định như IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE, một cách tương ứng. IgG có một số phân lớp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn

ở IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. IgM có các phân lớp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgM1 và IgM2. Do đó, “isotyp” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là globulin miễn dịch bất kỳ trong số các phân lớp globulin miễn dịch đã được xác định bởi đặc tính hóa học và kháng nguyên của các vùng hằng định chúng. Các globulin miễn dịch đã biết của người là IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, và IgE. Cần phải hiểu rằng các kháng thể điều trị có thể cũng bao gồm các dạng lai của việc kết hợp bất kỳ của các isotyp và/hoặc phân lớp.

Theo nhiều phương án, các isotyp IgG được sử dụng theo sáng chế, nhận thấy rằng IgG1 được dùng trong rất nhiều ứng dụng.

Phần đầu amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi có khoảng 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều axit amin hơn chủ yếu là đáp ứng với việc nhận diện kháng nguyên. Trong vùng biến đổi này, ba vòng được nối đối với mỗi miền V của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên. Mỗi vòng này được gọi là vùng xác định bổ sung (dưới đây được gọi là “CDR”), trong đó mức độ biến đổi trong trình tự axit amin là đáng kể nhất. Trên thực tế, “biến đổi” dùng để chỉ các đoạn nhất định của vùng biến đổi rất khác nhau về trình tự trong số các kháng thể. Tính biến thiên trong vùng biến đổi không được phân bố như nhau. Thực vậy, vùng V bao gồm vùng đuôi tương đối ổn định được gọi là vùng khung (FR) có 15-30 axit amin được tách ra bởi các vùng có chiều dài ngắn hơn rất biến thiên được gọi là “vùng siêu biến” mà mỗi vùng này có 9-15 axit amin hoặc dài hơn.

Mỗi VH và VL bao gồm ba vùng siêu biến (“vùng xác định bổ sung” - “CDR”) và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Vùng siêu biến thường bao gồm các gốc axit amin từ 24 đến 34 (LCDR1 ; “L” dùng để chỉ chuỗi nhẹ), từ 50 đến 56 (LCDR2) và từ 89 đến 97 (LCDR3) trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ và khoảng từ 31 đến 35B (HCDR1 ; “H” dùng để chỉ chuỗi nặng), từ 50 đến 65 (HCDR2), và từ 95 đến 102 (HCDR3) trong vùng biến đổi chuỗi nặng; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) và/hoặc các gốc tạo ra vùng siêu biến (ví dụ, các gốc 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) và 91-96 (LCDR3) trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ và 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) và 96-101 (HCDR3)

trong vùng biến đổi chuỗi nặng; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901 -917. Các CDR cụ thể theo sáng chế được mô tả dưới đây.

Trong bản mô tả này, hệ thống đánh số Kabat thường được sử dụng khi đề cập tới gốc trong miền cải biến (xấp xỉ, các gốc 1-107 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và các gốc 1-113 của vùng biến đổi chuỗi nặng) (ví dụ, Kabat et al., supra (1991)).

Các CDR góp phần tạo ra quá trình gắn kết với kháng nguyên, hoặc đặc biệt hơn, vị trí gắn kết với epitop của các kháng thể. Thuật ngữ “epitop” hoặc “xác định kháng nguyên” dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể gắn kết đặc hiệu vào. Epitop có thể được tạo ra từ axit amin liền kề lẫn axit amin không liền kề nhau được xếp cạnh nhau bằng cách gấp nếp ba lần protein. Epitop đã được tạo ra từ các axit amin liền kề thường vẫn được tiếp xúc với các dung môi biến tính, trong đó các epitop đã được tạo ra bằng cách gấp nếp ba lần thường bị mất đi trong quá trình xử lý bằng các dung môi biến tính. Epitop thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin trong một cấu hình không gian duy nhất. Như đã nêu trong bản mô tả, các phương pháp xác định xem các epitop được gắn kết như thế nào bởi kháng thể nhất định (tức là, lập bản đồ epitop) là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, các thử nghiệm thẩm tách miễn dịch và kết tủa miễn dịch, trong đó các peptit chồng khít hoặc nằm liền kề thu được từ LY75 được thử nghiệm về khả năng phản ứng với kháng thể kháng LY75 nhất định. Các phương pháp xác định cấu hình không gian của các epitop bao gồm các kỹ thuật trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng được nêu trong bản mô tả, ví dụ, nghiên cứu tinh thể tia X và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều (xem, ví dụ, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). Thuật ngữ “lập bản đồ epitop” dùng để chỉ quá trình nhận diện yếu tố xác định phân tử để nhận biết kháng thể-kháng nguyên.

Phần đầu carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định chủ yếu là đáp ứng với chức năng tác động. Kabat và các đồng tác giả đã thu thập nhiều trình tự sơ cấp của vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Dựa vào mức độ bảo thủ trình tự, các tác giả đã phân loại các trình tự sơ cấp riêng rẽ thành CDR và khung và đưa ra danh mục chứa chúng (xem SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al.).

Trong phân nhóm IgG của globulin miễn dịch, có một vài miền globulin miễn dịch trong chuỗi nặng. “Miền globulin miễn dịch (Ig)” trong bản mô tả này có nghĩa là vùng chứa globulin miễn dịch có cấu trúc bậc ba khác biệt. Sáng chế cũng mô tả các miền của chuỗi nặng, kể cả miền của chuỗi nặng hằng định (constant heavy - CH) và miền bản lề. Liên quan đến các kháng thể IgG, mỗi isotyp IgG có ba vùng CH. Do đó, các miền “CH” liên quan đến IgG là như sau: “CH1” dùng để chỉ các vị trí 118-220 theo chỉ số EU như trong hệ thống đánh số Kabat. “CH2” dùng để chỉ các vị trí 237-340 theo chỉ số EU như trong hệ thống đánh số Kabat, và “CH3” dùng để chỉ các vị trí 341-447 theo chỉ số EU như trong hệ thống đánh số Kabat.

Loại miền Ig khác của chuỗi nặng là vùng bản lề. “Bản lề” hoặc “vùng bản lề” hoặc “vùng bản lề chứa kháng thể” hoặc “vùng bản lề chứa globulin miễn dịch” trong bản mô tả này có nghĩa là polypeptit linh động chứa axit amin nằm giữa miền hằng định thứ nhất và miền hằng định thứ hai của kháng thể. Về mặt cấu trúc, miền CH1 của IgG kết thúc ở vị trí EU 220, và miền CH2 của IgG bắt đầu ở vị trí gốc EU 237. Do đó, đối với vùng bản lề chứa kháng thể IgG trong bản mô tả này được xác định bao gồm các vị trí 221 (D221 trong IgG1) đến 236 (G236 trong IgG1), trong đó việc đánh số được thực hiện theo chỉ số EU như nêu trong hệ thống đánh số Kabat. Theo một số phương án, ví dụ liên quan đến vùng Fc, vùng bản lề có chiều dài ngắn hơn cũng bao gồm, trong đó “bản lề có chiều dài ngắn hơn” thường dùng để chỉ các vị trí 226 hoặc 230.

Sáng chế đặc biệt quan tâm tới vùng Fc. “Fc” hoặc “vùng Fc” hoặc “miền Fc” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là polypeptit chứa vùng hằng định của kháng thể loại trừ miền globulin miễn dịch chứa vùng hằng định thứ nhất và trong một số trường hợp, một phần của vùng bản lề. Do đó, Fc dùng để chỉ miền globulin miễn dịch chứa hai vùng hằng định cuối cùng của IgA, IgD, và IgG, miền globulin miễn dịch chứa ba vùng hằng định cuối cùng của IgE và IgM, và đầu N của vùng bản lề linh hoạt với các miền này. Đối với IgA và IgM, Fc có thể bao gồm chuỗi J. Đối với IgG, miền Fc chứa các miền globulin miễn dịch C γ 2 và C γ 3 (C γ 2 và C γ 3) và vùng bản lề ngắn hơn nằm giữa C γ 1 (C γ 1) và C γ 2 (C γ 2). Mặc dù các đoạn biên của vùng Fc có thể thay đổi, nhưng vùng Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định là bao gồm các gốc C226 hoặc P230 tới đầu carboxyl của nó, trong đó việc đánh số được tiến hành theo chỉ số EU như nêu trong hệ thống đánh số Kabat. Theo một số phương án, như sẽ được mô tả chi tiết hơn

dưới đây, các cải biến axit amin được thực hiện đối với vùng Fc, ví dụ, để làm thay đổi khả năng gắn kết với một hoặc nhiều thụ thể FcγR hoặc với thụ thể FcRn.

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ. “Kháng thể có chiều dài đầy đủ” trong bản mô tả này có nghĩa là cấu trúc có khả năng tạo ra dạng sinh học tự nhiên của kháng thể, bao gồm vùng biến đổi và vùng hằng định, bao gồm một hoặc nhiều đoạn cải biến như được nêu trong bản mô tả này.

Theo cách khác, các kháng thể có thể có nhiều cấu trúc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mảnh kháng thể, kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu kép, tiểu thể, kháng thể miền, kháng thể tổng hợp (đôi khi trong bản mô tả này được gọi là “kháng thể mô phỏng”), kháng thể thể khảm, kháng thể nhân tạo, dung hợp kháng thể (đôi khi được gọi là “thể tiếp hợp kháng thể”), và các mảnh của mỗi loại này, một cách tương ứng. Các cấu trúc dựa vào việc sử dụng bộ gồm các CDR được nằm trong định nghĩa của “kháng thể”.

Theo một phương án, kháng thể là mảnh kháng thể. Các mảnh kháng thể đặc hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (i) mảnh Fab bao gồm miền VL, VH, CL và CH1, (ii) mảnh Fd bao gồm các miền VH và CH1, (iii) mảnh Fv bao gồm miền VL và VH của một kháng thể; (iv) mảnh dAb (Ward et al., 1989, Nature 341 :544-546, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn) bao gồm một vùng biến đổi, (v) vùng CDR đã phân lập, (vi) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai chứa hai mảnh Fab đã được liên kết với nhau (vii) phân tử Fv chuỗi đơn (scFv), trong đó miền VH và miền VL được liên kết bởi liên kết peptit cho phép hai miền liên kết để tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn), (viii) Fv chuỗi đơn đặc hiệu kép (WO 03/11161, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) và (ix) “nhị thể” hoặc “tam thể”, các mảnh đa hóa trị hoặc đa đặc hiệu đã được tạo ra bằng cách dung hợp gen (Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Kháng thể thể khảm và kháng thể nhân tạo

Theo một số phương án, kháng thể có thể là hỗn hợp thu được từ các loài khác nhau, ví dụ, kháng thể thể khảm và/hoặc kháng thể nhân tạo. Tức là, theo sáng chế, bộ

CDR có thể được sử dụng chứa khung và các vùng hằng định không phải là các bộ mô tả cụ thể bởi trình tự trong bản mô tả này.

Nói chung, “kháng thể thể khảm” lẫn “kháng thể nhân tạo” dùng để chỉ các kháng thể kết hợp các vùng từ nhiều hơn một loài. Ví dụ, “kháng thể thể khảm” thường bao gồm vùng biến đổi từ chuột nhắt (hoặc trong một số trường hợp là chuột) và vùng hằng định từ người. “Kháng thể nhân tạo” thường dùng để chỉ kháng thể không phải của người có vùng khung chứa miền biến đổi trao đổi trình tự được tìm thấy ở kháng thể của người. Nói chung, trong kháng thể nhân tạo, toàn bộ kháng thể, ngoại trừ CDR, được mã hóa bởi polynucleotit có nguồn gốc từ người hoặc là giống với kháng thể ngoại trừ nằm trong các CDR của nó. CDR, một số hoặc toàn bộ chúng được mã hóa bởi các axit nucleic có nguồn gốc từ sinh vật không phải là người, được ghép vào khung bản beta của vùng biến đổi kháng thể của người để sản xuất kháng thể, độ đặc hiệu của chúng được xác định bởi các CDR đã ghép vào. Việc sản xuất kháng thể này được mô tả trong, ví dụ, WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321 :522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. “Đột biến ngược” của các gốc khung nhận đã chọn với gốc cho tương ứng thường cần phải duy trì được ái lực đã mất trong cấu trúc đã ghép ban đầu (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Kháng thể nhân tạo tối ưu cũng bao gồm ít nhất một phần globulin miễn dịch vùng hằng định, thường là của globulin miễn dịch người, và do đó thường bao gồm vùng Fc của người. Kháng thể nhân tạo cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt có hệ thống miễn dịch đã được tạo ra bằng cách di truyền. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Nhiều kỹ thuật và phương pháp khác nhau để làm giống như của người và phục hồi kháng thể không phải của người là đã biết trong lĩnh vực này (Xem Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), và các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong bản mô tả này, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các phương pháp nhân tạo bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp được mô tả trong Jones et al., 1986, Nature 321 :522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992,

Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp nhân tạo hoặc các phương pháp khác để làm giảm tính miễn dịch của vùng biến đổi kháng thể không phải của người có thể bao gồm phương pháp làm lại bề mặt, như mô tả, ví dụ, trong Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một phương án, kháng thể bố mẹ được tạo ái lực đầy đủ, như đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp trên cơ sở cấu trúc có thể được dùng để nhân tạo và thuần thực ái lực, ví dụ, như được mô tả trong USSN 11/004,590. Các phương pháp trên cơ sở chọn lọc có thể được dùng để nhân tạo và/hoặc hoàn thiện của vùng biến đổi kháng thể, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp được mô tả trong Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp nhân tạo khác có thể bao gồm việc ghép chỉ một số phần của CDR, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp được mô tả trong USSN 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa đặc hiệu, và đặc biệt hơn là kháng thể đặc hiệu kép, cũng đôi khi được gọi là “nhị thể”. Các kháng thể này là kháng thể gắn kết với hai (hoặc nhiều) kháng nguyên khác nhau, hoặc epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên. Nhị thể có thể được sản xuất theo nhiều đã biết trong lĩnh vực này (Holliger and Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn), ví dụ, được tạo ra bằng cách hóa học hoặc từ tế bào lai.

Theo một phương án, kháng thể là tiểu thể. Tiểu thể là protein tương tự kháng thể được giảm đến mức tối thiểu chứa scFv gắn với miền CH3. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Trong một số trường hợp, scFv có thể được gắn với vùng Fc, và có thể bao gồm một số hoặc toàn bộ vùng bản lề. Cần lưu ý rằng các tiểu thể này được nằm trong định nghĩa về “kháng thể” mặc dù trên thực tế nó không có bộ CDR đầy đủ.

Các kháng thể theo sáng chế thường được phân lập hoặc tái tổ hợp. Trong bản mô tả này, “phân lập” được dùng để mô tả các polypeptit khác nhau, có nghĩa là polypeptit được nhận diện và được tách và/hoặc được thu hồi từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào mà nó được biểu hiện. Do đó, kháng thể phân lập được dự định dùng để chỉ kháng thể về cơ bản là không chứa các kháng thể khác có độ đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể phân lập gắn kết đặc hiệu với LY75 về cơ bản là không chứa các kháng thể gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên không phải là LY75). Do đó, kháng thể “phân lập” là kháng thể được tìm thấy ở dạng không thông thường trong tự nhiên (ví dụ, không có trong tự nhiên). Theo một phương án, kháng thể phân lập như được nêu trong bản mô tả có thể bao gồm ít nhất một axit amin không xuất hiện trong kháng thể xuất hiện trong “tự nhiên”. Axit amin này có thể được đưa vào bằng cách bổ sung hoặc thế. Đã biết rằng axit amin đưa vào này có thể là axit amin có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế là protein tái tổ hợp, protein phân lập được hoặc protein về cơ bản là tinh khiết. Protein “phân lập” được không liên kết với ít nhất một số nguyên liệu mà nó thường được liên kết với ở trạng thái tự nhiên của nó, ví dụ, bao gồm ít nhất khoảng 5%, hoặc ít nhất khoảng 50% khối lượng của protein toàn phần trong mẫu nhất định. Cần hiểu rằng protein phân lập được có thể bao gồm 5% đến 99,9% khối lượng protein toàn phần tùy thuộc vào từng trường hợp. Ví dụ, protein có thể được tạo ra ở nồng độ cao hơn đáng kể bằng cách sử dụng yếu tố khởi đầu cảm ứng hoặc yếu tố khởi đầu biểu hiện ở mức cao, sao cho protein này được tạo ra ở nồng độ cao. Trong trường hợp protein tái tổ hợp, định nghĩa này còn bao gồm việc sản sinh ra kháng thể trong nhiều sinh vật và/hoặc tế bào vật chủ khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này, trong đó nó không được sản sinh trong tự nhiên. Thông thường, polypeptit phân lập được tạo ra bởi ít nhất một bước tinh chế. “Kháng thể phân lập” dùng để chỉ kháng thể về cơ bản là không có các kháng thể khác có độ đặc hiệu kháng nguyên khác nhau. Ví dụ, kháng thể phân lập gắn kết đặc hiệu với LY75 về cơ bản là không có các kháng thể gắn kết đặc hiệu các kháng nguyên không phải là LY75.

Kháng thể đơn dòng phân lập được, có độ đặc hiệu khác nhau, có thể được kết hợp vào trong chế phẩm xác định. Do đó, ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể chứa hoặc không chứa một cách tùy ý và riêng rẽ trong chế phẩm, như được bàn luận tiếp dưới đây.

Kháng thể kháng LY75 theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với LY75 (ví dụ, SEQ ID NO.15). “Gắn kết đặc hiệu” hoặc “đặc hiệu gắn kết với” hoặc “đặc hiệu với” kháng

nguyên cụ thể hoặc epitop có nghĩa là khả năng gắn kết là khác nhau theo cách xác định so với khả năng tương tác không đặc hiệu. Khả năng gắn kết đặc hiệu có thể được xác định, ví dụ, bằng cách xác định khả năng gắn kết phân tử so với khả năng gắn kết của phân tử đối chứng, thường là phân tử có cấu trúc tương tự nhưng không có hoạt tính gắn kết. Ví dụ, khả năng gắn kết đặc hiệu có thể được xác định bởi khả năng gắn kết cạnh tranh với phân tử đối chứng là tương tự với phân tử đích.

Khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoặc epitop cụ thể có thể có mặt, ví dụ, bởi kháng thể có K_D với kháng nguyên hoặc epitop ít nhất là khoảng 10^{-4} M, ít nhất là khoảng 10^{-5} M, ít nhất là khoảng 10^{-6} M, ít nhất là khoảng 10^{-7} M, ít nhất là khoảng 10^{-8} M, ít nhất là khoảng 10^{-9} M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-10} M, ít nhất là khoảng 10^{-11} M, ít nhất là khoảng 10^{-12} M, hoặc lớn hơn, trong đó K_D dùng để chỉ tốc độ phân tách của quá trình tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Thông thường, kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên có K_D cao hơn gấp 20, 50, 100, 500, 1000, 5.000, 10.000 lần hoặc nhiều lần với phân tử đối chứng so với kháng nguyên hoặc epitop. Tuy nhiên, theo sáng chế, khi dùng ADC của các kháng thể LY75 theo sáng chế, thì quan trọng nếu K_D là đủ lớn để cho phép diễn ra quá trình nội tương tác và từ đó gây chết tế bào mà không gây ra các tác dụng phụ đáng kể.

Ngoài ra, khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể hoặc epitop có thể có mặt, ví dụ, bởi kháng thể có K_A hoặc K_a với kháng nguyên hoặc epitop ít nhất cao hơn gấp 20, 50, 100, 500, 1000, 5.000, 10.000 lần hoặc lớn hơn đối với epitop so với kháng thể đối chứng, trong đó K_A hoặc K_a dùng để chỉ tốc độ phân tách của quá trình tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Các thử nghiệm tiêu chuẩn để đánh giá khả năng gắn kết của các kháng thể hướng đích LY75 có thể được tiến hành trên protein hoặc ở mức tế bào và đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm ví dụ, thử nghiệm ELISA, thẩm tách Tây, RIA, BIAcore® và phân tích tế bào theo dòng chảy. Các thử nghiệm thích hợp được mô tả chi tiết trong phần Ví dụ. Động học gắn kết (ví dụ, ái lực gắn kết) của các kháng thể cũng có thể được đánh giá bằng các thử nghiệm tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, như phân tích hệ thống Biacore®. Để đánh giá khả năng gắn kết với các tế bào khối u Raji hoặc Daudi B, các tế bào Raji (Số truy cập ATCC: CCL-86) hoặc Daudi (Số truy cập ATCC: CCL-213) có thể thu được từ các nguồn công bố có sẵn, như Trung tâm nuôi giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ

(the American Type Culture Collection), và được sử dụng trong các thử nghiệm tiêu chuẩn, như phân tích tế bào theo dòng chảy.

Kháng thể LY75

Sáng chế đề cập đến các kháng thể LY75 gắn kết với LY75 (SEQ ID NO.15) và có thể được nội hóa khi tiếp xúc với các tế bào biểu hiện LY75 trên bề mặt tế bào hoặc có thể tạo ra đáp ứng ADCC với sự có mặt của tế bào tác động hoặc tạo ra đáp ứng gây độc tế bào T với sự có mặt của tế bào tác động. Trong bản mô tả này, các kháng thể này được dùng để chỉ kháng thể “kháng LY75” hoặc, để cho dễ mô tả, “kháng thể LY75”.

Các kháng thể LY75 được nội hóa khi tiếp xúc với các tế bào, đặc biệt là các tế bào khối u, biểu hiện LY75 trên bề mặt. Tức là, các kháng thể LY75 như được nêu trong bản mô tả cũng chứa thể tiếp hợp được chất được nội hóa bởi các tế bào khối u, dẫn đến quá trình giải phóng được chất và tiếp đó gây chết tế bào, cho phép điều trị ung thư có biểu hiện LY75. Quá trình nội tương tác trong bản mô tả này có thể được xác định theo một số cách. Theo một phương án, các kháng thể LY75 theo sáng chế được cho tiếp xúc với các tế bào, như dòng tế bào như được nêu trong bản mô tả này, bằng cách sử dụng các thử nghiệm tiêu chuẩn như MAbZap. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng hiểu được rằng thử nghiệm MabZap là thử nghiệm tiêu biểu về tác dụng có thể thu được đối với thể tiếp hợp kháng thể-được chất (ADC). Trong trường hợp khác về sau, ADC có thể được nội hóa, từ đó đưa được được chất vào tế bào. Được chất có độc tính có khả năng tiêu diệt tế bào, tức là tiêu diệt tế bào ung thư đích. Dữ liệu thu được từ thử nghiệm MabZap được hiểu một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để đại diện cho các thử nghiệm ADC (Kohls, M and Lappi, D., [2000] Biotechniques, vol. 28, no. 1, 162-165).

Theo các phương án về thử nghiệm in vitro, các kháng thể LY75 theo sáng chế được bổ sung, cùng với kháng thể kháng LY75 chứa độc tố; ví dụ, kháng thể LY75 có thể là kháng thể của loài gặm nhấm hoặc kháng thể nhân tạo và kháng thể kháng LY75 có thể là kháng thể kháng loài gặm nhấm hoặc kháng nhân tạo và chứa độc tố toxin như saporin. Trong quá trình tạo ra phức hợp [kháng thể LY75 theo sáng chế]-[thể tiếp hợp kháng thể kháng LY75-được chất], phức hợp này được nội hóa và được chất (ví dụ, saporin) được giải phóng, từ đó gây chết tế bào. Chỉ khi quá trình nội tương tác làm giải phóng được chất, thì các tế bào vẫn có thể sống sót khi không xảy ra quá trình nội tương

tác. Như được nêu dưới đây, nếu không gắn bởi giả thuyết bất kỳ, trong các ứng dụng điều trị, kháng thể kháng LY75 chứa độc tố, và trong quá trình nội tương tác, liên kết giữa kháng thể và độc tố được phân cắt, do đó làm giải phóng độc tố và tiêu diệt tế bào.

Ngoài ra, các kháng thể LY75 tạo ra đáp ứng ADCC với sự có mặt của tế bào tác động, đặc biệt là các tế bào khối u, biểu hiện LY75 trên bề mặt.

Theo một phương án, kháng thể chứa vùng xác định bổ sung (CDR) hoặc vùng biến đổi (VR) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể cụ thể đã nêu trong bản mô tả (ví dụ, trong bản mô tả này được gọi là “LY75_A1”). Do đó, theo một phương án, kháng thể chứa các miền CDR1, CDR2, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể LY75_A1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, và các miền CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể LY75_A1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa vHCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5; vHCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6; và vHCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa vLCDR thứ nhất có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8; vLCDR thứ hai có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9; và vLCDR thứ ba có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với LY75 của người và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, và các đoạn cải biến trình tự bảo thủ của chúng. Kháng thể có thể còn bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2, và các đoạn cải biến trình tự bảo thủ của chúng.

Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với LY75 của người và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO.1 và/hoặc 2, và các cải biến trình tự bảo thủ của chúng. Trong bản mô tả này, thuật ngữ cải biến trình tự bảo thủ dùng để chỉ, ví dụ, việc thế axit amin bằng axit amin có đặc điểm tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiển nhiên biết được rằng các việc thế như vậy có thể được coi là bảo thủ. Các cải biến khác có thể được coi là các cải biến trình tự bảo thủ bao gồm, ví dụ, quá trình glycosyl hoá.

Các kháng thể phân lập bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc nhiều hơn so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trên cũng bao gồm theo sáng chế. Các khoảng có liên quan đến các trị số nêu trên, ví dụ, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80-85%, 85-90%, 90-95% hoặc 95-100% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trên cũng được dự định là nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo một phương án, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc trình tự có ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% giống với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1. Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc trình tự có ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% giống với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng khung chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% giống với khung của vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16, 17 và 18. Theo phương án khác, kháng thể chứa vùng khung chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% giống với khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.19, 20 và 21.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể kháng LY75 (trong bản mô tả này được gọi là “kháng thể LY75_A1”) chứa các CDR dưới đây, cũng như các biến thể chứa số lượng biến thể axit amin giới hạn:

A1	SEQ ID NO
CDR1 cải biến chuỗi nặng	5
CDR2 cải biến chuỗi nặng	6
CDR3 cải biến chuỗi nặng	7
CDR1 cải biến chuỗi nhẹ	8
CDR2 cải biến chuỗi nhẹ	9
CDR3 cải biến chuỗi nhẹ	10

Sáng chế cũng đề cập đến chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi chứa các bộ CDR theo sáng chế, cũng như chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ (ví dụ, cũng chứa các vùng hằng định). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng bộ CDR theo sáng chế có thể được kết hợp vào vùng hằng định (bao gồm vùng khung) của loài gặm nhấm, nhân tạo hoặc người. Do đó, sáng chế đề cập đến chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi có ít nhất khoảng 90%-99% trình tự giống với các trình tự như nêu trong SEQ ID như đã nêu trong bản mô tả này, với độ tương đồng trình tự là 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 và 99% được tìm thấy trong sáng chế.

Kháng thể gắn kết với cùng một epitop là các kháng thể LY75 theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với cùng một epitop trên LY75 của người là kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể LY75 đơn dòng theo sáng chế. Thuật ngữ “gắn kết với cùng một epitop” với hai hoặc nhiều kháng thể có nghĩa là các kháng thể cạnh tranh liên kết với kháng nguyên và gắn kết với cùng một đoạn axit amin, đoạn axit amin chồng khít hoặc đoạn axit amin liên tục hoặc không liên tục. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng cụm từ “gắn kết với cùng một epitop” không nhất thiết có nghĩa là các kháng thể gắn kết với một cách chính xác với cùng một axit amin, mặc dù theo một phương án nó có thể được xác định như vậy. Theo phương án khác, các axit amin chính xác mà các kháng thể được gắn kết vào có thể khác nhau. Ví dụ, kháng thể thứ nhất có thể gắn kết với đoạn axit amin hoàn toàn chứa đoạn axit amin gắn kết bởi kháng thể thứ hai. Trong ví dụ khác, kháng thể thứ nhất gắn kết với một hoặc nhiều đoạn axit amin chồng khít một cách đáng kể với một hoặc nhiều đoạn gắn kết bởi kháng thể thứ hai. Nhằm mục đích này, các kháng thể này được coi là “gắn kết với cùng một epitop”.

Do đó, một phương án cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các kháng thể gắn kết với epitop trên LY75 bao gồm toàn bộ hoặc một phần epitop nhận diện bởi các kháng thể cụ thể đã nêu trong bản mô tả (ví dụ, cùng một vùng hoặc vùng chồng khít hoặc vùng nằm giữa hoặc nối với vùng này). Sáng chế cũng bao hàm các kháng thể gắn kết đặc hiệu với ít nhất một, ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10, peptit được chọn từ nhóm có trình tự được nêu trong các SEQ ID NO.24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 hoặc 37 hoặc mảnh của chúng, trong đó mảnh này chứa ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9 hoặc ít nhất 10 axit amin liên kề. Theo phương án khác, epitop được nhận diện bởi các kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất một peptit, ít

nhất hai hoặc ít nhất ba peptit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27, 29, 30, 34, 35, 36 hoặc 37 hoặc các mảnh của chúng, trong đó các mảnh này chứa ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9 hoặc ít nhất 10 axit amin liền kề. Theo phương án khác, epitop được nhận diện bởi các kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất một peptit, ví dụ, một, hai hoặc ba peptit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.30, 36 và 37 hoặc các mảnh của chúng, trong đó các mảnh này chứa ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9 hoặc ít nhất 10 axit amin liền kề.

Sáng chế cũng bao hàm các kháng thể gắn kết với cùng một epitop và/hoặc các kháng thể cạnh tranh để liên kết với LY75 của người với các kháng thể nêu trong bản mô tả. Các kháng thể này nhận diện cùng một epitop hoặc cạnh tranh liên kết có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Các kỹ thuật như vậy bao gồm, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch, cho thấy một kháng thể có khả năng phong bế quá trình gắn kết của kháng thể khác với kháng nguyên đích, có nghĩa là thử nghiệm gắn kết cạnh tranh. Khả năng gắn kết cạnh tranh được xác định trong thử nghiệm trong đó globulin miễn dịch trong thử nghiệm có khả năng ức chế quá trình gắn kết đặc hiệu của kháng thể đối chiếu với kháng nguyên thông thường, như LY75. Đã biết rất nhiều loại thử nghiệm gắn kết cạnh tranh khác nhau, ví dụ: thử nghiệm phóng xạ miễn dịch trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn (RIA), thử nghiệm enzym miễn dịch trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn (EIA), thử nghiệm cạnh tranh kiểu “bánh mỳ kẹp chả” (xem Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); biotin-avidin EIA trực tiếp trên pha rắn (xem Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); thử nghiệm đánh dấu trực tiếp pha rắn, thử nghiệm “kiểu bánh mỳ kẹp chả” đánh dấu pha rắn (xem Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA đánh dấu trực tiếp pha rắn bằng cách sử dụng chất đánh dấu 1-125 (xem Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA biotin-avidin trực tiếp trên pha rắn (Cheung et al, *Virology* 176:546 (1990)); và RIA đánh dấu trực tiếp. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Thông thường, các thử nghiệm này bao gồm việc sử dụng kháng nguyên tinh chế được gắn kết với bề mặt rắn hoặc các tế bào chứa chúng, globulin miễn dịch thử nghiệm không được đánh dấu và globulin miễn dịch đối chiếu được đánh dấu. Khả năng ức chế cạnh tranh được đo bằng cách xác định lượng chất đánh dấu đã được gắn kết với bề mặt rắn hoặc các tế bào với sự có mặt của globulin miễn dịch thử nghiệm. Thông thường, globulin miễn dịch thử

nghiệm có mặt với lượng dư. Thông thường, khi kháng thể cạnh tranh có mặt với lượng dư, thì nó sẽ ức chế quá trình gắn kết đặc hiệu của kháng thể đối chiếu với kháng nguyên thông thường ít nhất là 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% 75-80% 80-85% 85-90% 90-95% 95-99% hoặc cao hơn hơn.

Các kỹ thuật khác bao gồm, ví dụ, các phương pháp lập bản đồ epitop, như, phân tích tinh thể tia X của phức hợp kháng nguyên:kháng thể để dung giải ở mức nguyên tử epitop. Các phương pháp khác kiểm tra khả năng gắn kết kháng thể với mảnh kháng nguyên hoặc các biến thể đột biến của kháng nguyên trong đó sự giảm sút khả năng gắn kết là do việc biến đổi gốc axit amin trong trình tự kháng nguyên thường được coi là chỉ dẫn về thành phần epitop. Ngoài ra, các phương pháp tổ hợp bằng máy tính để lập bản đồ epitop cũng có thể được sử dụng. Các phương pháp này dựa trên khả năng của kháng thể nhất định để phân lập ái lực các peptit mạch ngắn đặc hiệu từ thư viện peptit biểu hiện thể thực khuẩn tổ hợp. Sau đó, các peptit này được xem là peptit dẫn đầu để xác định epitop tương ứng với kháng thể đã dùng để sàng lọc thư viện peptit. Để lập bản đồ epitop, các thuật toán bằng máy tính cũng được phát triển để lập bản đồ các epitop không liên tục về cấu trúc.

Theo phương án cụ thể, kháng thể cạnh tranh để gắn kết với LY75 với kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO.1 và 2, hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%. Theo phương án khác, kháng thể cạnh tranh để gắn kết với LY75 với kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO.1 và 2 (LY75_A1).

Các kháng thể khác theo sáng chế gắn kết với epitop trên LY75 đã được nhận diện bởi các kháng thể nêu trong bản mô tả này. Theo phương án cụ thể khác, kháng thể gắn kết với epitop trên LY75 đã được nhận diện bởi kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO.1 và 2, hoặc các trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%. Theo phương án khác, kháng thể gắn kết với epitop trên LY75 đã được nhận diện bởi kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO.1 và 2 (LY75).

Mô tả đặc điểm của kháng thể đơn dòng gắn kết với LY75

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được mô tả đặc điểm để liên kết với LY75 bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết. Nói chung, ban đầu các kháng thể được mô tả đặc điểm bởi ELISA. Tóm lại, đĩa vi chuẩn độ có thể được phủ bằng LY75 đã được tinh chế trong PBS, và sau đó được phong bế bằng các protein không thích hợp như albumin huyết thanh bò (BSA) được pha loãng trong PBS. Dịch pha loãng huyết tương từ chuột nhắt đã được tạo miễn dịch LY75 được bổ sung vào mỗi giếng và ủ trong 1-2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các đĩa này được rửa bằng PBS/Tween 20 và sau đó được ủ bằng chất phản ứng đa dòng đặc hiệu với Fc kháng IgG người của dê đã được tiếp hợp với phosphatase kiềm trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi rửa, các đĩa này được phát triển bằng cơ chất ABTS, và được phân tích ở OD là 405. Tốt hơn, nếu chuột nhắt chứa nồng độ cao nhất sẽ được sử dụng để dung hợp.

Thử nghiệm ELISA như được mô tả trên đây có thể được sử dụng để sàng lọc các kháng thể và, do đó, các thể lai sản sinh ra các kháng thể có khả năng phản ứng dương tính với kháng nguyên LY75.

Sau đó, thể lai gắn kết, tốt hơn là có ái lực lớn, với LY75 có thể được tách dòng phụ và được mô tả đặc điểm tiếp. Một dòng thu được từ mỗi thể lai, vẫn giữ được khả năng phản ứng của các tế bào bố mẹ (bằng thử nghiệm ELISA), sau đó có thể được chọn để tạo ra ngân hàng tế bào, và để tinh chế kháng thể.

Để tinh chế kháng thể kháng LY75, thể lai đã được chọn có thể được nuôi cấy trong các chai cuộn lăn, bình cầu quay dung tích 2L hoặc hệ thống nuôi cấy khác. Dịch nổi trên bề mặt có thể được lọc và được cô trước khi tiến hành ái lực sắc ký với protein A-Sepharosa (Pharmacia, Piscataway, NJ) để tinh chế protein. Sau khi thay chất đệm vào PBS, nồng độ có thể được xác định bởi OD₂₈₀ bằng cách sử dụng hệ số tắt 1.43 hoặc tốt hơn là bằng cách phân tích độ đục. IgG có thể được kiểm tra bằng cách điện di gel và bằng phương pháp đặc hiệu kháng nguyên.

Để xác định xem kháng thể đơn dòng kháng LY75 đã chọn có gắn kết với một epitop hay không, mỗi kháng thể có thể được biotinyl hóa bằng cách sử dụng các chất phản ứng hiện có trên thị trường (Pierce, Rockford, IL). Quá trình gắn kết với MAb đã được biotinyl hóa có thể được phát hiện bằng đoạn môi đánh dấu streptavidin. Để xác định isotyp của kháng thể đã được tinh chế, thử nghiệm ELISA trên isotyp có thể được

thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Ví dụ, các lỗ của đĩa vi chuẩn độ có thể được phủ bằng 10 $\mu\text{g/mL}$ kháng Ig qua đêm ở 4°C. Sau khi phong bế bằng BSA 5%, các đĩa này được cho phản ứng với 10 $\mu\text{g/mL}$ kháng thể đơn dòng hoặc isotyp đối chứng đã được tinh chế, ở nhiệt độ môi trường trong hai giờ. Sau đó, các lỗ này có thể được cho phản ứng với IgG1 hoặc các đoạn môi được tiếp hợp đặc hiệu isotyp khác. Các đĩa được phát triển và được phân tích như được mô tả trên đây.

Để thử nghiệm khả năng gắn kết kháng thể đơn dòng với các tế bào sống biểu hiện LY75, phân tích tế bào theo dòng chảy có thể được sử dụng. Tóm lại, các dòng tế bào và/hoặc PBMC của người biểu hiện LY75 gắn kết màng (được phát triển trong các điều kiện phát triển tiêu chuẩn) được trộn với các nồng độ khác nhau của kháng thể đơn dòng trong PBS chứa 0,1% BSA ở 4°C trong 1 giờ. Sau khi rửa, các tế bào được cho phản ứng với kháng thể kháng IgG đã đánh dấu Florexin trong cùng một điều kiện như khi nhuộm kháng thể sơ cấp. Các mẫu có thể được phân tích bằng thiết bị FACSan có sử dụng các tính chất khuếch tán bên và ánh sáng để đưa lên các tế bào riêng rẽ và quá trình gắn kết của các kháng thể đã đánh dấu được xác định. Thử nghiệm khác sử dụng kính hiển vi phát huỳnh quang có thể được sử dụng phân tích tế bào theo dòng chảy (ngoài ra hoặc thay vì). Các tế bào có thể được nhuộm một cách chính xác như được mô tả trên đây và được kiểm tra bởi kính hiển vi phát huỳnh quang. Phương pháp này cho phép quan sát các tế bào riêng rẽ, nhưng có thể có độ nhạy giảm tùy thuộc vào mật độ kháng nguyên.

IgG kháng LY75 có thể được thử nghiệm tiếp về khả năng phản ứng với kháng nguyên LY75 bằng cách thẩm tách Tây. Tóm lại, các phần chiết tế bào thu được từ các tế bào biểu hiện LY75 có thể được tạo ra và được dùng để điện di gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit. Sau khi điện di, các kháng nguyên đã được tách riêng được chuyển đến màng nitrocellulose, được phong bế bằng 20% huyết thanh chuột nhắt, và được dò bằng kháng thể đơn dòng cần thử nghiệm. Khả năng gắn kết IgG có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phosphatase kiềm kháng IgG và được phát triển bằng bảng cơ chất BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Các phương pháp phân tích ái lực gắn kết, khả năng phản ứng ngang, và động học gắn kết của kháng thể kháng LY75 khác nhau bao gồm các thử nghiệm tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, phân tích cộng hưởng gen nguyên sinh bề mặt (SPR) Biacore™ bằng cách sử dụng thiết bị Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Thụy Điển).

Theo một phương án, kháng thể gắn kết đặc hiệu với LY75 của người có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.15. Tốt hơn, nếu kháng thể theo sáng chế gắn kết với LY75 của người với ái lực lớn.

Tốt hơn, nếu kháng thể theo sáng chế gắn kết với protein LY75 với K_D là 5×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với protein LY75 với K_D là 2×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với protein LY75 với K_D là 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với protein LY75 với K_D là 4×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với protein LY75 với K_D là 3×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với protein LY75 với K_D là 2×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với protein LY75 với K_D là 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, gắn kết với protein LY75 với K_D là 5×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, hoặc gắn kết với protein LY75 với K_D là 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế cạnh tranh (ví dụ, cạnh tranh ngang) để liên kết với LY75 với kháng thể kháng LY75 cụ thể đã nêu trong bản mô tả (ví dụ, LY75_A1). Các kháng thể cạnh tranh như vậy có thể được xác định dựa trên khả năng gắn kết ức chế cạnh tranh với LY75 của một hoặc nhiều mAb trong các thử nghiệm gắn kết LY75 tiêu chuẩn. Ví dụ, thử nghiệm ELISA tiêu chuẩn có thể được sử dụng trong đó protein LY75 tái tổ hợp của người được bất động trên đĩa, một trong số các kháng thể này được đánh dấu huỳnh quang và khả năng không cạnh tranh của các kháng thể không được đánh dấu với khả năng gắn kết của kháng thể đã được đánh dấu được đánh giá. Ngoài ra hoặc theo cách khác, phân tích BIAcore có thể được sử dụng để đánh giá khả năng cạnh tranh ngang của các kháng thể. Kháng thể thử nghiệm có khả năng ức chế quá trình gắn kết của kháng thể kháng LY75 theo sáng chế với LY75 của người chứng tỏ rằng kháng thể thử nghiệm có thể cạnh tranh với kháng thể để liên kết với LY75 của người.

Theo một phương án, kháng thể cạnh tranh là kháng thể gắn kết với cùng một epitop trên LY75 của người như kháng thể đơn dòng kháng LY75 cụ thể đã nêu trong bản mô tả (ví dụ, LY75_A1). Kỹ thuật lập bản đồ epitop tiêu chuẩn, như nghiên cứu tinh thể tia X và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều, có thể được sử dụng để xác định xem kháng thể gắn kết với cùng một epitop có phải là kháng thể đối chiều (xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Theo một phương án, kháng thể cạnh tranh để gắn kết với LY75 và/hoặc gắn kết với cùng một epitop trên LY75 của người là kháng thể của người.

Khi mAb kháng LY75 đơn lẻ, nguyên mẫu được phân lập có các đặc tính mong muốn nêu trong bản mô tả, thì các mAb khác cũng có các đặc tính tương tự, ví dụ, có cùng một epitop, có thể được tạo ra. Ví dụ, chuột nhắt có thể tạo được miễn dịch bằng LY75 như đã nêu trong bản mô tả, thể lai được sản sinh, và mAb thu được được sàng lọc về khả năng cạnh tranh với mAb nguyên mẫu để liên kết với LY75. Chuột nhắt có thể cũng tạo được miễn dịch bằng mảnh LY75 có chiều dài ngắn hơn chứa epitop mà mAb nguyên mẫu được gắn kết vào. Epitop có thể được định vị bằng cách, ví dụ, sàng lọc để liên kết với một loạt peptit chồng khít nối với LY75. Theo cách khác, phương pháp của Jespers và các đồng tác giả trong tài liệu: *Biotechnology* 12:899, 1994 có thể được sử dụng để hướng dẫn việc chọn lọc các mAb có cùng một epitop và do đó có các đặc tính tương tự như mAb nguyên mẫu. Bằng cách sử dụng kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn, trước tiên chuỗi nặng của kháng thể hoặc kháng thể nguyên mẫu được cặp đôi với tổ hợp chứa chuỗi nhẹ (tốt hơn là của người) để chọn lọc mAb gắn kết với LY75, và sau đó chuỗi nhẹ mới được cặp đôi với tổ hợp chứa các chuỗi nặng (tốt hơn là của người) để chọn lọc mAb (tốt hơn là của người) gắn kết với LY75 có cùng một epitop làm mAb nguyên mẫu. Theo cách khác, các biến thể của mAb nguyên mẫu có thể thu được bằng cách tạo đột biến cADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể này.

Việc lập bản đồ epitop, ví dụ, như được mô tả trong Champe et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394, có thể được thực hiện để xác định xem kháng thể có gắn kết với epitop nhất định hay không. "Alanine scanning mutagenesis," như mô tả bởi Cunningham và Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085, hoặc một số dạng khác của việc đột biến điểm của các gốc axit amin trong LY75 của người cũng có thể được sử dụng để xác định epitop chức năng đối với kháng thể kháng LY75 theo sáng chế. Tuy nhiên, các nghiên cứu tạo đột biến, cũng có thể chứng tỏ rằng các gốc axit amin là yếu tố quyết định tới toàn bộ cấu trúc ba chiều của LY75 nhưng nó không liên quan trực tiếp đến việc tiếp xúc kháng thể-kháng nguyên, và do đó các phương pháp khác có thể là cần thiết để khẳng định epitop chức năng xác định được bằng cách sử dụng phương pháp này.

Epitop gắn kết bởi kháng thể đặc hiệu cũng có thể được xác định bằng cách đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể với peptit chứa các mảnh LY75 của người. Một loạt peptit chồng khít trong trình tự của LY75 có thể được tổng hợp và được sàng lọc để liên kết, ví dụ, trong ELISA trực tiếp, ELISA cạnh tranh (trong đó các peptit này được đánh giá về khả năng ngăn ngừa quá trình gắn kết của kháng thể với LY75 gắn kết với lỗ của

đĩa vi chuẩn độ), hoặc trên chip. Các phương pháp sàng lọc peptit như vậy không có khả năng phát hiện một số epitop chức năng không liên tục, tức là epitop chức năng bao gồm các gốc axit amin không liên tục nằm trong trình tự sơ cấp của chuỗi polypeptit LY75.

Epitop gắn kết bởi các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được xác định bằng phương pháp xác định cấu trúc, như xác định cấu trúc tinh thể tia X (ví dụ, WO2005/044853), quang phổ tạo mẫu phân tử và quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), bao gồm NMR xác định tốc độ trao đổi H-D của các hydro amit không ổn định trong LY75 ở dạng tự do và khi được liên kết trong phức hợp với kháng thể nhất định (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31, 11335-11347; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32, 6884-6891).

Liên quan đến nghiên cứu tinh thể tia X, quá trình kết tinh có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr.* D50:339-350; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1-23), bao gồm vi mẻ (ví dụ, Chayen (1997) *Structure* 5: 1269-1274), khuếch tán bay hơi theo kiểu giọt treo (ví dụ, McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303), tạo mầm và thẩm tách. Mong muốn sử dụng chế phẩm protein có nồng độ ít nhất khoảng 1mg/mL và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10mg/mL đến 20mg/mL. Quá trình kết tinh có thể thu được tốt nhất trong dung dịch kết tủa chứa polyetylen glycol 1000-20.000 (PEG; phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 20.000 Da), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5000 đến 7000 Da, tốt hơn nữa là khoảng 6000 Da, với các nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 30% (khối lượng/thể tích). Cũng mong muốn chế phẩm này bao gồm chất ổn định protein, ví dụ, glyxerol ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20%. Muối thích hợp, như natri clorua, lithi clorua hoặc natri xitrat cũng có thể có mặt trong dung dịch kết tủa, tốt hơn là ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 mM đến 1000 mM. Tốt hơn, nếu chất kết tủa được tạo đậm tới độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0, tốt hơn là khoảng 4,0. Các chất đệm cụ thể thích hợp trong dung dịch kết tủa có thể thay đổi và đã biết trong lĩnh vực này (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Ví dụ về các chất đệm thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, HEPES, Tris, MES và axetat. Tinh thể có thể được phát triển trong khoảng nhiệt độ rộng, bao gồm 2°C, 4°C, 8°C và 26°C.

Tinh thể kháng thể:kháng nguyên có thể được nghiên cứu bằng cách sử dụng kỹ thuật nhiễu xạ tia X đã biết và có thể được tinh chế bằng cách sử dụng phần mềm máy tính như X-PLOR (Yale University, 1992, được phân phối bởi Molecular Simulations, Inc.; xem, ví dụ Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/0014194), và BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49:37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) *Acta Cryst.* D56:1313-1323), nội dung của chúng được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Thử nghiệm cạnh tranh kháng thể, như nêu trong bản mô tả, có thể được sử dụng để xác định xem kháng thể có “gắn kết với cùng một epitop” như kháng thể khác hay không. Thông thường, khả năng cạnh tranh là 50% hoặc cao hơn, 60% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, như 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, so với kháng thể đã biết để tương tác với epitop bởi kháng thể thứ hai trong các điều kiện trong đó kháng thể thứ hai này có mặt với lượng dư và trước tiên là bão hòa ở tất cả các vị trí, từ đó chúng tỏ rằng các kháng thể này “gắn kết với cùng một epitop”. Để đánh giá mức độ cạnh tranh giữa hai kháng thể, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ hoặc thử nghiệm có sử dụng các chất đánh dấu khác đối với các kháng thể, có thể được sử dụng. Ví dụ, kháng nguyên LY75 có thể được ủ với lượng bão hòa của kháng thể thứ nhất kháng LY75 hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của chúng được tiếp hợp với hợp chất được đánh dấu (ví dụ, ^3H , ^{25}I , biotin, hoặc rubidi) với sự có mặt của cùng một lượng kháng thể kháng LY75 thứ hai không được đánh dấu. Lượng kháng thể đã được đánh dấu được gắn kết với kháng nguyên với sự có mặt của kháng thể phong bế không được đánh dấu, sau đó được đánh giá và so sánh với khả năng gắn kết khi không có mặt kháng thể phong bế không được đánh dấu. Khả năng cạnh tranh được xác định bằng mức độ thay đổi về tỷ lệ phần trăm của các dấu hiệu gắn kết với sự có mặt của kháng thể phong bế không được đánh dấu so với khi không có mặt kháng thể phong bế. Do đó, nếu khả năng ức chế gắn kết kháng thể đã được đánh dấu là 50% khi có mặt kháng thể phong bế so với khả năng gắn kết khi không có mặt kháng thể phong bế, thì khả năng cạnh tranh giữa hai kháng thể này là 50%. Do đó, khi đề cập tới khả năng cạnh tranh giữa kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai là 50% hoặc cao hơn, 60% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, như 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, thì có nghĩa là kháng thể thứ nhất ức chế khả

năng gắn kết của kháng thể thứ hai (hoặc ngược lại) với kháng nguyên với tỷ lệ là 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn (khi so sánh với khả năng gắn kết của kháng nguyên bởi kháng thể thứ hai khi không có mặt kháng thể thứ nhất). Do đó, tỷ lệ ức chế khả năng gắn kết của kháng thể thứ nhất với kháng nguyên bởi kháng thể thứ hai là 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn chứng tỏ rằng hai kháng thể này gắn kết với cùng một epitop.

Cải biến kháng thể

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể biến thể, đôi khi được gọi là “dẫn xuất kháng thể” cũng như “chất tương tự kháng thể”. Tức là có nhiều cải biến có thể được thực hiện đối với các kháng thể theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cải biến axit amin trong các CDR (thuần thực ái lực), cải biến axit amin trong vùng khung, cải biến axit amin trong vùng Fc, cải biến quá trình glycosyl hóa, cải biến cộng hóa trị của các loại khác (ví dụ, để gắn thể tiếp hợp được chất, v. v...).

“Biến thể” trong bản mô tả này có nghĩa là trình tự polypeptit là khác so với trình tự của polypeptit bố mẹ do cải biến ít nhất một axit amin. Trong trường hợp này, polypeptit bố mẹ là chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ biến đổi có chiều dài đầy đủ, có trình tự lần lượt nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc 2, hoặc các vùng CDR hoặc vùng khung của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO 5-10 và 16-21. Cải biến axit amin có thể bao gồm việc thế, cài xen và khuyết, so với axit amin trước đó được ưu tiên trong một số trường hợp. Đã biết rằng việc thế axit amin có thể là thế bảo thủ hoặc không bảo thủ trong đó việc thế bảo thủ được ưu tiên. Hơn nữa, việc thế này có thể là thế bằng axit amin có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên.

Nói chung, các biến thể có thể bao gồm nhiều cải biến bất kỳ, với điều kiện chức năng của kháng thể vẫn được thể hiện, như được nêu trong bản mô tả này. Tức là, LY75_A1, ví dụ, kháng thể này vẫn gắn kết đặc hiệu với LY75 của người. Tương tự, nếu các axit amin biến thể được tạo ra với vùng Fc, ví dụ, kháng thể biến thể vẫn duy trì chức năng gắn kết với thụ thể cần thiết đối với ứng dụng cụ thể hoặc chỉ dấu của kháng thể.

“Các biến thể” trong trường hợp này có thể được tạo ra trong các trình tự CDR đã nêu, khung hoặc vùng Fc của kháng thể.

Tuy nhiên, nói chung, từ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 axit amin thế thường được sử dụng nhằm thay đổi chức năng với số lần cải biến tối thiểu. Trong một số trường hợp, có 1 đến 5 cải biến (ví dụ, các đột biến thay thế, cài xen hoặc khuyết axit amin riêng rẽ), bằng 1-2, 1-3 và 1-4 cũng được sử dụng theo nhiều phương án. Số lượng các cải biến có thể phụ thuộc vào kích cỡ của vùng cần cải biến; ví dụ, nói chung, mong muốn có một vài cải biến trong các vùng CDR. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng ngay cả trong các vùng CDR, vị trí của các cải biến có thể làm thay đổi tác dụng một cách đáng kể. Theo một phương án, các cải biến có thể được tạo ra trong các CDR1, CDR2 hoặc CDR3 bất kỳ của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Theo phương án khác, các cải biến được tạo ra trong CDR1 hoặc CDR2 bất kỳ của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Vẫn theo phương án khác, các cải biến được nằm trong CDR1 của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ.

Cần lưu ý rằng số lượng các cải biến axit amin có thể nằm trong các miền chức năng: ví dụ, nó có thể có 1-5 cải biến trong vùng Fc của kiểu hoang hoặc các protein được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền, cũng như từ 1 đến 5 cải biến trong vùng Fv, chẳng hạn. Tốt hơn, nếu trình tự polypeptit biến thể có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự bố mẹ (ví dụ, vùng biến đổi, các vùng hằng định, và/hoặc trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và/hoặc các CDR của LY75_A1). Cần lưu ý rằng tùy thuộc vào kích thước của trình tự, độ tương đồng sẽ phụ thuộc vào số lượng axit amin.

“Thế axit amin” hoặc “thế” trong bản mô tả này có nghĩa là việc thay thế axit amin ở vị trí cụ thể trong trình tự polypeptit bố mẹ bằng axit amin khác có thể là axit amin có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên. Ví dụ, việc thế S100A dùng để chỉ polypeptit biến thể trong đó serin ở vị trí 100 được thay thế bằng alanin. “Cài xen axit amin” hoặc “cài xen” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là việc bổ sung axit amin ở vị trí cụ thể trong trình tự polypeptit bố mẹ. “Khuyết axit amin” hoặc “khuyết” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là việc loại bỏ axit amin ở vị trí cụ thể trong trình tự polypeptit bố mẹ.

“Polypeptit bố mẹ”, “protein bố mẹ”, “tiền polypeptit”, hoặc “tiền protein” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là polypeptit không được cải biến, sau đó được cải biến để tạo ra biến thể. Nói chung, polypeptit bố mẹ trong bản mô tả này là

LY75_A1. Do đó, “kháng thể bố mẹ” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là kháng thể được cải biến để sản xuất kháng thể biến thể.

“Kiểu hoang” hoặc “WT” (wild type) hoặc “bẩm sinh” trong bản mô tả này có nghĩa là trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit được tìm thấy trong tự nhiên, bao gồm các biến đổi alen. Protein WT, polypeptit, kháng thể, globulin miễn dịch, IgG, v.v.. có trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit không được cải biến có chủ ý.

“Vùng Fc biến thể” trong bản mô tả này có nghĩa là trình tự Fc khác với trình tự Fc kiểu hoang do ít nhất một cải biến axit amin. Biến thể Fc có thể dùng để chỉ chính polypeptit Fc, các chế phẩm chứa polypeptit biến thể Fc, hoặc trình tự axit amin.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều cải biến axit amin được thực hiện trong một hoặc nhiều CDR của LY75_A1. Nói chung, chỉ 1 hoặc 2 hoặc 3 axit amin được thế trong một CDR bất kỳ, và nói chung không quá 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 biến đổi được thực hiện trong bộ gồm 6 CDR. Tuy nhiên, cần hiểu rằng việc kết hợp bất kỳ của axit amin không không thể, 1, 2 hoặc 3 axit amin thế trong CDR bất kỳ có thể được kết hợp độc lập và tùy ý với axit amin thế khác. Cần hiểu rằng việc thế có thể được thực hiện trong CDR bất kỳ trong số 6 CDR. Theo một phương án, việc thế được thực hiện ở CDR1 của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ.

Trong một số trường hợp, các cải biến axit amin trong CDR được gọi là “thuần thực ái lực”. Kháng thể “có ái lực thuần thực” là kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều CDR, từ đó cải thiện được ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên, so với kháng thể bố mẹ không có các thay đổi này. Trong một số trường hợp, dù hiếm gặp, nhưng mong muốn có thể giảm được ái lực của kháng thể với kháng nguyên của nó, nhưng điều này thường không được ưu tiên.

Quá trình làm thuần thực ái lực có thể được thực hiện để làm tăng ái lực gắn kết của kháng thể với kháng nguyên ít nhất là khoảng 10%, khoảng 20%, khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 100%, khoảng 110%, khoảng 120%, khoảng 130%, khoảng 140%, khoảng 150% hoặc cao hơn, hoặc cao hơn gấp 1, 2, 3, 4 đến 5 lần so với kháng thể “bố mẹ”. Tốt hơn, nếu các kháng thể thuần thực ái lực sẽ có ái lực nanomol hoặc thậm chí là ái lực picomol với kháng nguyên đích. Các kháng thể thuần thực ái lực được tạo ra bằng các phương pháp đã biết. Xem, ví dụ, Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783 mô tả quá trình

làm thuần thực ái lực bằng cách xáo trộn miền của chuỗi nặng (VH) cải biến và chuỗi nhẹ (VL) biến đổi. Quá trình tạo đột biến ngẫu nhiên của CDR và/hoặc các gốc khung được mô tả trong: Barbas, et al. 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91 :3809-3813; Shier et al., 1995, Gene 169:147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9; và Hawkins et al, 1992, J. Mol. Biol. 226:889-896, chẳng hạn.

Theo cách khác, các cải biến axit amin có thể được thực hiện trong một hoặc nhiều CDR của các kháng thể theo sáng chế là “im lặng”, ví dụ, không làm thay đổi đáng kể ái lực của kháng thể với kháng nguyên. Các cải biến này có thể được thực hiện với nhiều lý do, bao gồm tối ưu hóa mức độ biểu hiện (như có thể được thực hiện đối với axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế).

Do đó, sáng chế cũng nằm trong định nghĩa về CDR và các kháng thể theo sáng chế là các CDR biến thể và các kháng thể; tức là, các kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm các cải biến axit amin trong một hoặc nhiều CDR của LY75_A1. Ngoài ra, như được nêu dưới đây, cải biến axit amin cũng có thể được tiến hành độc lập và tùy ý trong vùng bất kỳ nằm ngoài các CDR, bao gồm khung và các vùng hằng định như được nêu trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng LY75 theo sáng chế bao gồm miền Fc biến đổi. Như đã biết trong lĩnh vực này, vùng Fc của kháng thể tương tác với nhiều thụ thể Fc và phối tử, tạo ra nhiều chức năng quan trọng được gọi là chức năng tác động. Các thụ thể Fc này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (ở người) FcγRI (CD64) bao gồm các dạng đồng phân FcγRIa, FcγRIb, và FcγRIc; FcγRII (CD32), bao gồm các dạng đồng phân FcγRIIa (bao gồm alotyp H131 và R131), FcγRIIb (bao gồm FcγRIIb-1 và FcγRIIb-2), và FcγRIIc; và FcγRIII (CD16), bao gồm các dạng đồng phân FcγRIIIa (bao gồm alotyp V158 và F158, liên quan đến hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC)) và FcγRIIIb (bao gồm alotyp FcγRIIIb-NAI và FcγRIIIb-NA2), FcRn (thụ thể mới tạo ra), C1q (protein bổ thể liên quan đến hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)) và FcRn (thụ thể mới tạo ra liên quan đến thời gian bán thải trong huyết thanh). Các cải biến thích hợp có thể được thực hiện ở một hoặc nhiều vị trí như thường được nêu dưới đây, ví dụ trong đơn sáng chế Mỹ 11/841,654 và các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong bản mô tả này, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298,

US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341,769, Patent Mỹ số 6,737,056, Patent Mỹ số 7,670,600, Patent Mỹ số 6,086,875, toàn bộ nội dung của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, và cụ thể đối với các axit amin thể đặc hiệu làm tăng khả năng gắn kết với các thụ thể Fc.

Ngoài các cải biến nêu trên, các cải biến khác cũng có thể được thực hiện. Ví dụ, các phân tử có thể được ổn định bằng cách kết hợp các cầu disulphua liên kết với các miền VH và VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14: 1239-1245, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn).

Ngoài ra, các cải biến ở xystein đặc biệt là thích hợp trong các ứng dụng về thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC), được mô tả tiếp dưới đây. Theo một số phương án, vùng hằng định của các kháng thể có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để chứa một hoặc nhiều xystein đặc biệt là “hoạt động ở thiol”, sao cho thay thế được gốc dược chất đặc hiệu hơn và kiểm soát được. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 7,521,541, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Ngoài ra, các cải biến cộng hóa trị khác nhau của các kháng thể có thể được thực hiện như được nêu dưới đây.

Các cải biến cộng hóa trị của các kháng thể nằm trong phạm vi của sáng chế này, và nói chung, nhưng không thường gặp, được tiến hành sau quá trình dịch mã. Ví dụ, một số loại cải biến cộng hóa trị của kháng thể được đưa vào phân tử bằng cách cho các gốc axit amin đặc hiệu của kháng thể phản ứng với chất tạo dẫn xuất hữu cơ có khả năng phản ứng với chuỗi bên đã được chọn hoặc các gốc có đầu N hoặc C.

Các gốc xystein hầu hết thường được cho phản ứng với ohaloaxetat (và các amin tương ứng), như axit cloaxit hoặc cloaxetamit, để sản xuất dẫn xuất carboxymetyl hoặc carboxyamidometyl. Các gốc xystein cũng có thể được tạo dẫn xuất bằng cách cho phản ứng với bromtrifloaxeton, axit α -bromo- β -(5-imidazolyl)propionic, cloaxetyl phosphat, N-alkylmaleimit, 3-nitro-2-pyridyl disulfua, metyl 2-pyridyl disulfua, p-clomercuribenzoat, 2-clomercuri-4-nitrophenol, hoặc clo-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol và các hợp chất tương tự.

Các gốc histidin được tạo dẫn xuất bằng cách cho phản ứng với diethylpyrocacbonat ở độ pH = 5,5-7,0 do hợp chất này tương đối đặc hiệu với chuỗi bên

histidin. Para-bromophenaxyl bromua cũng là hữu ích; tốt hơn, nếu phản ứng được tiến hành trong natri cacodylat 0,1M ở độ pH = 6,0.

Các gốc có đầu lysin và amin được cho phản ứng với axit succinic hoặc anhydrit của axit carboxylic khác. Quá trình tạo dẫn xuất với các hợp chất khác có tác dụng làm đảo ngược điện tích của các gốc lysin. Các chất phản ứng thích hợp khác để tạo dẫn xuất của các gốc alpha-amino bao gồm các imidoeste như methyl picolinimidat; pyridoxal phosphat; pyridoxal; cloborohyđrua; trinitrobenzenaxit sulfonic; O-metylisoure; 2,4-pentandion; và phản ứng được xúc tác bởi transaminaza với glyoxylat.

Các gốc arginin được cải biến bằng cách cho phản ứng với một hoặc một vài chất phản ứng thông thường, trong số chúng là phenylglyoxal, 2,3-butanedion, 1,2-xyclohexandion, và ninhydrin. Việc tạo dẫn xuất của các gốc arginin đòi hỏi phản ứng này cần được tiến hành trong các điều kiện kiềm do nhóm chức guanidin có trị số pKa lớn. Hơn thế nữa, các chất phản ứng này có thể phản ứng với các nhóm lysin cũng như nhóm arginin epsilon-amino.

Việc cải biến đặc hiệu các gốc tyrosin có thể được thực hiện, đặc biệt là đưa các chất đánh dấu quang phổ vào các gốc tyrosin bằng cách cho phản ứng với các hợp chất diazo thơm hoặc tetranitrometan. Phổ biến nhất, N-axetylimidizol và tetranitrometan được sử dụng để lần lượt sản xuất loại O-axetyl tyrosyl và các dẫn xuất 3-nitro. Các gốc tyrosin được iot hóa bằng cách sử dụng ^{125}I hoặc ^{131}I để sản xuất protein đã đánh dấu để sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, phương pháp cloramin T đã được nêu trên nếu thích hợp.

Các nhóm bên carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl) được cải biến một cách chọn lọc bằng cách cho phản ứng với carbodiimit ($\text{R}'\text{—N}=\text{C}=\text{N-R}'$), trong đó R và R' tùy ý là các nhóm alkyl khác nhau, như 1-xyclohexyl-3-(2-morpholiny-4-etyl) carbodiimit hoặc 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpentyl) carbodiimit. Hơn thế nữa, các gốc aspartyl và glutamyl được chuyển hóa thành các gốc asparaginy- và glutaminy- bằng cách cho phản ứng với các ion amoni.

Việc tạo dẫn xuất với các chất hai chức là hữu ích để tạo liên kết ngang của các kháng thể với nền mang hoặc bề mặt không hòa tan trong nước để dùng trong nhiều phương pháp, ngoài các phương pháp được mô tả dưới đây. Các chất tạo liên kết ngang thường sử dụng bao gồm, ví dụ, 1,1-bis(di-azo-axetyl)-2-phenyletan, glutaraldehyd, N-

hydroxysuccinimide este, ví dụ, các este với axit 4-azidosalicylic, imidoeste có hai chức giống nhau, bao gồm disuccinimidyl este như 3,3'-dithiobis (succinimidylpropionat), và maleimide hai chức như bis-N-maleimido-1,8-octan. Các chất tạo dẫn xuất như methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propionimide sản xuất chất trung gian quang hoạt có khả năng sản xuất liên kết ngang với sự có mặt của ánh sáng. Theo cách khác, chất nền không hoà tan trong nước hoạt tính như hydrat cacbon được hoạt hóa bởi xynomolgusogen bromua và các cơ chất hoạt tính được mô tả trong các Patent Mỹ số 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; và 4,330,440, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, được sử dụng để bất động protein.

Các gốc glutamin và asparagin lần lượt thường được khử amit thành các gốc glutamyl và aspartyl. Theo cách khác, các gốc này được khử amit trong điều kiện axit nhẹ. Dạng gốc này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các cải biến khác bao gồm quá trình hydroxyl hóa prolin và lysin, phosphoryl hoá nhóm hydroxyl của các gốc seryl hoặc threonyl, methyl hóa các nhóm oarmino của chuỗi bên lysin, arginin, và histidin (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn), acetetyl hóa amin có đầu N, và amit hóa nhóm carboxyl bất kỳ có đầu C.

Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng toàn bộ các chất đánh dấu (bao gồm phát huỳnh quang, enzym, từ tính, phóng xạ, v. v... có thể được bổ sung vào các kháng thể (cũng như các thành phần khác của sáng chế).

Phân tử đặc hiệu kép

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả các phân tử đặc hiệu kép chứa kháng thể kháng LY75, hoặc mảnh của nó theo sáng chế. Kháng thể theo sáng chế, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, có thể được tạo dẫn xuất hoặc được liên kết với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác (ví dụ, kháng thể hoặc phối tử khác đối với thụ thể) để tạo ra phân tử đặc hiệu kép gắn kết với ít nhất hai vị trí liên kết khác nhau hoặc phân tử đích. Trên thực tế, kháng thể theo sáng chế có thể được tạo dẫn xuất hoặc được liên kết với nhiều hơn một phân tử chức năng khác để sản xuất phân tử đa đặc hiệu gắn kết với nhiều hơn hai vị trí liên kết và/hoặc phân tử đích khác nhau; các phân tử đa đặc hiệu như vậy cũng được dự định nằm trong thuật ngữ “phân tử đặc hiệu kép” như được

sử dụng trong bản mô tả này. Để tạo ra phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế, kháng thể theo sáng chế có thể được liên kết chức năng (ví dụ, bằng cách liên hợp hóa học, dung hợp di truyền, liên kết không phải cộng hóa trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều phân tử gắn kết khác, như kháng thể khác, mảnh kháng thể, peptit hoặc chất gắn kết mô phỏng, sao cho tạo ra được phân tử đặc hiệu kép.

Do đó, sáng chế bao gồm phân tử đặc hiệu kép chứa ít nhất một vị trí gắn kết đặc hiệu thứ nhất với epitop đích thứ nhất (tức là LY75) và vị trí gắn kết đặc hiệu thứ hai với epitop đích thứ hai. Epitop đích thứ hai này có thể có mặt trên cùng một protein đích do nó đã được gắn kết bởi vị trí gắn kết đặc hiệu thứ nhất; hoặc epitop đích thứ hai này có thể có mặt trên protein đích khác nhau mà đã được gắn kết bởi protein thứ nhất với protein đã được gắn kết bởi vị trí gắn kết đặc hiệu thứ nhất. Epitop đích thứ hai này có thể có mặt trên cùng một tế bào như epitop đích thứ nhất (tức là LY75); hoặc epitop đích thứ hai này có thể có mặt trên đích không được biểu hiện bởi tế bào mà biểu hiện epitop đích thứ nhất. Trong bản mô tả này, thuật ngữ 'vị trí gắn kết đặc hiệu' dùng để chỉ góc chứa ít nhất một miền biến đổi kháng thể.

Theo một phương án theo sáng chế, epitop đích thứ hai là thụ thể Fc, ví dụ, FcγRI (CD64) của người hoặc thụ thể Fcα (CD89) của người. Do đó, sáng chế bao gồm phân tử đặc hiệu kép có khả năng gắn kết với cả tế bào tác động biểu hiện FcγR lẫn FcαR (ví dụ, bạch cầu, đại thực bào hoặc tế bào đa nhân (PMN), và với các tế bào đích biểu hiện LY75. Các phân tử đặc hiệu kép này hướng các tế bào biểu hiện LY75 đích tới tế bào tác động và tạo ra hoạt tính của các tế bào tác động qua trung gian thụ thể Fc, như quá trình thực bào của các tế bào biểu hiện LY75, hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), giải phóng xytokin, hoặc tạo ra anion superoxit.

Theo phương án khác theo sáng chế, epitop đích thứ hai là CD3 hoặc CD5. Do đó, sáng chế bao gồm phân tử đặc hiệu kép có khả năng gắn kết với cả tế bào tác động biểu hiện CD3 lẫn CD5 (ví dụ, tế bào gây độc T biểu hiện CD3 hoặc CD5), và với các tế bào đích biểu hiện LY75. Các phân tử đặc hiệu kép hướng đích tế bào biểu hiện LY75 tới tế bào tác động và tạo ra hoạt tính của tế bào tác động qua trung gian CD3 hoặc CD5, như kéo dài dòng tế bào T và hoạt tính gây độc tế bào T. Theo phương án này, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể bao gồm toàn bộ hai hoặc ba miền biến đổi kháng thể, trong đó phần thứ nhất của kháng thể đặc hiệu kép có khả năng phục hồi hoạt tính của tế

bào tác động miễn dịch của người bằng cách gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tác động nằm trên tế bào tác động miễn dịch của người, trong đó kháng nguyên tác động này là kháng nguyên CD3 của người hoặc kháng nguyên CD5 của người, phần thứ nhất này bao gồm một miền biến đổi kháng thể, và phần thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên đích không phải là kháng nguyên tác động, ví dụ, LY75, kháng nguyên đích này nằm trên tế bào đích không phải là tế bào tác động miễn dịch của người, và phần thứ hai này chứa một hoặc hai miền biến đổi kháng thể.

Theo một phương án của sáng chế, trong đó phân tử đặc hiệu kép là phân tử đa đặc hiệu, phân tử này có thể còn có độ đặc hiệu gắn kết thứ ba, ngoài độ đặc hiệu gắn kết kháng Fc hoặc độ đặc hiệu gắn kết kháng CD3 hoặc kháng CD5 và độ đặc hiệu gắn kết kháng LY75. Theo một phương án, độ đặc hiệu gắn kết thứ ba là một phần của yếu tố kháng tăng cường (EF), ví dụ, phân tử gắn kết với protein bề mặt có liên quan đến hoạt tính gây độc tế bào và từ đó làm tăng đáp ứng miễn dịch với tế bào đích. “Một phần của yếu tố kháng tăng cường” có thể là kháng thể, mảnh kháng thể chức năng hoặc phối tử gắn kết với phân tử nhất định, ví dụ, kháng nguyên hoặc thụ thể, và từ đó tạo ra tính tăng cường về tác dụng của miền xác định gắn kết của thụ thể Fc hoặc tế bào đích kháng nguyên. “Một phần của yếu tố kháng tăng cường” có thể gắn kết với thụ thể Fc hoặc tế bào đích kháng nguyên. Theo cách khác, một phần của yếu tố kháng tăng cường có thể gắn kết với thực thể khác với thực thể mà độ đặc hiệu gắn kết thứ nhất và thứ hai được gắn kết vào. Ví dụ, một phần của yếu tố kháng tăng cường có thể gắn kết với tế bào gây độc T (ví dụ, thông qua CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 hoặc tế bào miễn dịch khác tạo ra đáp ứng miễn dịch với tế bào đích tăng cường).

Theo một phương án, phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có độ đặc hiệu gắn kết ở ít nhất một kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó, bao gồm, ví dụ Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb hoặc Fv chuỗi đơn. Kháng thể cũng có thể là đime của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, hoặc mảnh rất nhỏ của chúng bất kỳ như Fv hoặc cấu trúc chuỗi đơn như được mô tả trong Patent Mỹ số 4,946,778, nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, độ đặc hiệu gắn kết với thụ thể Fc γ được tạo ra bởi kháng thể đơn dòng, khả năng gắn kết của nó không được phong bế bởi globulin miễn dịch G (IgG) của người. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thụ thể IgG” dùng để chỉ gen bất kỳ trong số tám gen chuỗi γ nằm trên nhiễm sắc thể 1. Các gen này mã hóa toàn bộ mười hai

dạng đồng phân thụ thể xuyên màng hoặc hòa tan mà được phân vào ba nhóm thụ thể Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII(CD32), và FcγRIII (CD16). Theo một phương án được ưu tiên, thụ thể Fcγ là FcγRI có ái lực cao của người. FcγRI của người là phân tử có kích thước 72kDa, có ái lực cao đối với IgG monome (10^8 - 10^9 M⁻¹).

Sự sản sinh và đặc điểm của các kháng thể đơn dòng kháng Fcγ nhất định ưu tiên được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 88/00052 và trong Patent Mỹ số 4,954,617, nội dung của chúng được đưa vào toàn bộ trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các kháng thể này gắn kết với epitop của FcγRI, FcγRII hoặc FcγRIII ở vị trí mà khác với vị trí gắn kết Fcγ của thụ thể và do đó, khả năng gắn kết của chúng về cơ bản không được phong bế bởi IgG ở nồng độ sinh lý. Các kháng thể kháng FcγRI cụ thể thích hợp trong sáng chế là mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 và mAb 197. MAb 32 sản sinh ra thể lai là có sẵn từ Trung tâm nuôi giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ, số truy cập ATCC HB9469. Theo các phương án khác, kháng thể thụ thể kháng Fcγ là dạng nhân tạo của kháng thể đơn dòng 22 (H22). Sự sản sinh và đặc điểm của kháng thể H22 được mô tả trong Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 94/10332. Kháng thể H22 này sản sinh dòng tế bào được lưu giữ ở Trung tâm nuôi giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ với tên gọi HA022CL1 và có số truy cập CRL 11177.

Vẫn theo phương án khác được ưu tiên, độ đặc hiệu gắn kết với thụ thể Fc được tạo ra bởi kháng thể mà gắn kết với thụ thể IgA của người, ví dụ, thụ thể Fc-alpha [FcαRI (CD89)], tốt hơn nếu khả năng gắn kết của chúng được phong bế bởi globulin miễn dịch A (IgA) người. Thuật ngữ “thụ thể IgA” được dự định để bao gồm sản phẩm gen của một α-gen (FcαRI) nằm ở nhiễm sắc thể 19. Đã biết rằng gen này mã hóa một số dạng đồng phân xuyên màng đã được ghép theo cách khác có kích thước nằm trong khoảng từ 55 đến 110 kDa. FcαRI (CD89) hầu như được biểu hiện trên bạch cầu/đại thực bào, ưa eosin và bạch cầu hạt trung tính, nhưng không nằm trên nhóm tế bào không tác động. FcαRI có ái lực trung bình ($\approx 5 \times 10^7$ M⁻¹) đối với cả IgA1 lẫn IgA2, được tăng lên trong quá trình tiếp xúc với xytokin như G-CSF hoặc GM-CSF [Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440]. Bốn kháng thể đơn dòng đặc hiệu FcαRI, được xác định là A3, A59, A62 và A77, gắn kết FcαRI bên ngoài miền gắn kết phối tử IgA, được mô tả [Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764].

Fc α RI và Fc γ RI là các thụ thể ban đầu được ưu tiên để dùng trong phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế do chúng (1) được biểu hiện chủ yếu trên các tế bào tác động miễn dịch, ví dụ, bạch cầu, PMN, đại thực bào và tế bào tua; (2) được biểu hiện ở nồng độ cao (ví dụ, 5.000-100.000/tế bào); (3) là chất trung gian có hoạt tính gây độc tế bào (ví dụ, ADCC, quá trình thực bào); và (4) có vai trò trung gian trong việc biểu hiện kháng nguyên tăng cường của các kháng nguyên, bao gồm tự kháng nguyên, được hướng tới chúng.

Các kháng thể có thể được sử dụng trong phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế là kháng thể của loài gặm nhấm, người, kháng thể thể khảm và kháng thể đơn dòng nhân tạo.

Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách tạo tiếp hợp các chất đặc hiệu gắn kết thành phần, ví dụ, chất đặc hiệu gắn kết kháng FcR, kháng CD3, kháng CD5 và kháng LY75, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, chất đặc hiệu gắn kết của mỗi phân tử đặc hiệu kép có thể được tạo ra riêng rẽ và sau đó được tiếp hợp với các chất còn lại. Khi chất đặc hiệu gắn kết là protein hoặc peptit, thì nhiều chất liên hợp hoặc liên kết ngang có thể được sử dụng để tạo tiếp hợp cộng hóa trị. Ví dụ về các chất gắn kết ngang bao gồm protein A, carbodiimide, N-succinimidyl-S-axetyl-thioacetat (SATA), 5,5'-đithiobis(axit 2-nitrobenzoic) (DTNB), o-phenylenđimaleimide (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridylđithio)propionat (SPDP), và sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) xyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) [xem, ví dụ, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648]. Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả trong Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 1 18-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81 -83, và Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375. Tốt hơn, nếu các chất tạo tiếp hợp là SATA và sulfo-SMCC, cả hai chất này đều có sẵn trên thị trường do Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) cung cấp].

Khi các chất đặc hiệu gắn kết là kháng thể, thì chúng có thể được tạo tiếp hợp thông qua liên kết sulfhydryl của vùng bản lề có đầu C của hai chuỗi nặng. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, vùng bản lề được cải biến để chứa lượng dư các gốc sulfhydryl, tốt hơn là một, trước khi tạo tiếp hợp.

Theo cách khác, cả hai chất đặc hiệu gắn kết có thể được mã hóa trong cùng một vectơ và được biểu hiện và đưa vào cùng một tế bào vật chủ. Phương pháp này đặc biệt là hữu ích trong đó phân tử đặc hiệu kép là mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ hoặc phối tử x protein dung hợp Fab. Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể là phân tử chuỗi đơn chứa một kháng thể chuỗi đơn và yếu tố xác định gắn kết, hoặc phân tử đặc hiệu kép chuỗi đơn chứa hai yếu tố xác định gắn kết. Phân tử đặc hiệu kép có thể chứa ít nhất hai phân tử chuỗi đơn. Các phương pháp tạo ra phân tử đặc hiệu kép được mô tả ví dụ trong các Patent Mỹ số 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; và 5,482,858, toàn bộ nội dung của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là hệ kháng thể tế bào T đặc hiệu kép (BiTEs). BiTE là nhóm kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép nhân tạo. Chúng hướng tới hệ thống miễn dịch của vật chủ, đặc biệt hơn hoạt tính gây độc tế bào T, kháng lại các tế bào ung thư. BiTE thường là các protein dung hợp bao gồm hai mảnh cải biến chuỗi đơn (scFv) của các kháng thể khác nhau, hoặc trình tự axit amin từ bốn gen khác nhau, trên chuỗi peptit đơn, tốt hơn là khoảng 55 kilodalton. Tốt hơn, nếu một trong số các scFv gắn kết với các tế bào T thông qua thụ thể CD3, và scFv còn lại gắn kết với tế bào khối u thông qua phân tử đặc hiệu khối u.

Khả năng gắn kết của phân tử đặc hiệu kép với các đích đặc hiệu của chúng có thể được xác nhận bằng, ví dụ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), phân tích FACS, thử nghiệm sinh học (ví dụ, ức chế sự phát triển), hoặc thử nghiệm thẩm tách Tây. Mỗi thử nghiệm này thường phát hiện sự có mặt của phức hợp protein-kháng thể nhất định bằng cách sử dụng chất phản ứng đã đánh dấu (ví dụ, kháng thể) đặc hiệu với phức hợp nhất định này. Ví dụ, các phức hợp FcR-kháng thể có thể được phát hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, kháng thể liên kết với enzym hoặc mảnh kháng thể nhận diện và gắn kết đặc hiệu với phức hợp kháng thể-FcR. Theo cách khác, các phức hợp có thể được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm miễn dịch khác. Ví dụ, kháng thể có thể được đánh dấu phóng xạ và sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) (xem, ví dụ, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radiligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Chất đồng vị phóng xạ có thể được phát hiện bằng cách này như khi

sử dụng máy đếm γ hoặc máy đếm nhấp nháy hoặc bằng cách chụp tự động bằng tia phóng xạ.

Glycosyl hoá

Loại cải biến cộng hóa trị khác là các thay đổi trong quá trình glycosyl hoá. Theo một số phương án, các kháng thể nêu trong bản mô tả này có thể được cải biến để bao gồm một hoặc nhiều dạng glycol tạo ra bằng kỹ thuật di truyền. “Dạng glyco tạo ra bằng kỹ thuật di truyền” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là thành phần hydrat cacbon được gắn kết cộng hóa trị vào kháng thể, trong đó thành phần hydrat cacbon này khác biệt về mặt hóa học so với kháng thể bố mẹ. Dạng glyco tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có thể là hữu ích trong nhiều mục đích, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở tăng cường hoặc làm giảm chức năng tác động. Ví dụ, kháng thể đã được aglycosylat hóa có thể được tạo ra (tức là kháng thể không xảy ra quá trình glycosyl hoá). Quá trình glycosyl hoá có thể được thay đổi để, ví dụ, làm tăng ái lực của kháng thể với kháng nguyên. Các cải biến hydrat cacbon như vậy có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, thay đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá trong trình tự kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến thay thế axit amin có thể được thực hiện để loại bỏ một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá của vùng biến đổi khung, từ đó loại bỏ quá trình glycosyl hoá ở vị trí đó. Quá trình aglycosyl hóa như vậy có thể làm tăng ái lực của kháng thể với kháng nguyên. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong các Patent Mỹ số 5,714,350 và 6,350,861 của Co và các đồng tác giả, và có thể được thực hiện bằng cách loại bỏ asparagin ở vị trí 297.

Dạng glyco tạo ra bằng kỹ thuật di truyền được ưu tiên là afucosyl hóa, nhận thấy rằng nó có liên quan đến việc gia tăng chức năng ADCC, có thể thông qua quá trình gắn kết mạnh hơn với thụ thể Fc γ RIIIa. Trong bản mô tả này, “afucosyl hóa” có nghĩa là phần lớn kháng thể sản sinh trong tế bào vật chủ về cơ bản là không có fucoza, ví dụ 90-95-98% kháng thể tạo ra không có fucoza rõ ràng là thành phần của gốc hydrat cacbon của kháng thể này (thường được gắn ở N297 trong vùng Fc). Các kháng thể afucosyl hóa, xác định được về mặt chức năng thường có ái lực ít nhất là 50% hoặc cao hơn so với thụ thể Fc γ RIIIa.

Dạng glyco tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (Umafia et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-

26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn; (kỹ thuật POTEILLIGENT® [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; kỹ thuật di truyền glycosyl hóa GlycoMAb® [Glycart Biotechnology AG, Zurich, Switzerland]). Nhiều kỹ thuật trong số các kỹ thuật này là dựa trên việc kiểm soát nồng độ của các oligosacarit đã được fucosyl hóa và/hoặc cắt đôi mà được gắn cộng hóa trị vào vùng Fc, ví dụ, bằng cách biểu hiện IgG trong các vi sinh vật hoặc dòng tế bào khác nhau, được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền hoặc bằng cách khác (ví dụ, các tế bào Lec-13 CHO hoặc các tế bào lai YB2/0 của chuột, bằng cách điều hòa enzym liên quan đến quá trình glycosyl hoá (ví dụ, FUT8 [α 1,6-fucosyltransferase] và/hoặc β 1-4-N-acetylglucosaminyltransferase III [GnTIII]), hoặc bằng cách cải biến hydrat cacbon sau khi IgG đã được biểu hiện. Ví dụ, “kháng thể tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có mặt đường” hoặc “kỹ thuật SEA” của công ty Seattle Genetics hoạt động bằng cách bổ sung sacarit đã được cải biến ức chế quá trình fucosyl hóa trong quá trình sản xuất; xem, ví dụ, US2009/0317869, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. “Dạng glyco tạo ra bằng kỹ thuật di truyền” thường dùng để chỉ các hydrat cacbon hoặc oligosacarit khác nhau khi so sánh với kháng thể được tạo ra khi không có mặt kỹ thuật glycosyl hóa; do đó, kháng thể có thể bao gồm dạng glyco tạo ra bằng kỹ thuật di truyền.

Theo cách khác, dạng glyco tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có thể dùng để chỉ biến thể IgG chứa hydrat cacbon hoặc oligosacarit khác nhau. Như đã biết trong lĩnh vực này, mô hình glycosyl hoá có thể phụ thuộc vào cả trình tự protein (ví dụ, có mặt hoặc không có mặt quá trình glycosyl hoá các gốc axit amin cụ thể, như được nêu dưới đây), lẫn tế bào vật chủ hoặc sinh vật trong đó protein này được tạo ra. Hệ thống biểu hiện cụ thể được bàn luận dưới đây.

Quá trình glycosyl hoá polypeptit thường được liên kết ở đầu N hoặc đầu O. Liên kết ở đầu N dùng để chỉ việc gắn gốc hydrat cacbon với chuỗi bên của gốc asparagin. Các trình tự tri-peptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là các trình tự nhận diện để gắn enzym của gốc hydrat cacbon với chuỗi bên asparagin. Do đó, sự có mặt của các trình tự tri-peptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hoá tiềm năng. Quá trình glycosyl hoá được liên kết ở đầu O dùng để chỉ việc gắn một trong số các đường N-acetylgalactosamin, galactosa, hoặc xyloza, với

axit hydroxyamin, hầu hết thường là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể được sử dụng.

Việc bổ sung vị trí glycosyl hoá vào kháng thể được thực hiện một cách thuận lợi bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tri-peptit đã nêu trên (đối với vị trí glycosyl hoá đã được liên kết đầu N). Việc thay đổi này cũng có thể được thực hiện bằng cách bổ sung, hoặc thế một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự ban đầu (đối với các vị trí glycosyl hóa được liên kết ở đầu O). Để cho dễ dàng, tốt hơn nếu kháng thể trình tự axit amin được thay đổi bằng cách biến đổi nồng độ ADN, đặc biệt là bằng cách tạo đột biến ADN mã hóa polypeptit đích ở các bazo đã được chọn trước sao cho các bộ ba mã hóa được tạo ra sẽ được dịch mã thành các axit amin mong muốn.

Các phương pháp khác để làm tăng số lượng các gốc hydrat cacbon trên kháng thể là liên hợp hóa học hoặc enzyme của glycosit với protein. Các phương pháp này có ưu điểm ở chỗ chúng không cần tạo ra protein ở tế bào vật chủ có khả năng glycosyl hoá đối với quá trình glycosyl hóa được liên kết ở đầu N và đầu O. Tùy thuộc vào kiểu liên hợp đã dùng, đường có thể được gắn với arginin và histidin, nhóm carboxyl tự do, (c) nhóm sulfhydryl tự do như nhóm xystein, (d) nhóm hydroxyl tự do như nhóm serin, threonin, hoặc hydroxyprolin, (e) các gốc thơm như phenylalanin, tyrosin, hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit của glutamin.

Các phương pháp này được mô tả trong WO 87/05330 và trong Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, cả hai tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Việc loại bỏ các gốc hydrat cacbon có mặt trên kháng thể ban đầu (ví dụ, sau dịch mã) có thể được thực hiện theo cách hóa học hoặc enzym. Quá trình khử glycosyl hóa học cần có bước cho protein tiếp xúc với hợp chất trifloaxit metanesulfonic, hoặc hợp chất tương tự. Bước xử lý này làm phân cắt hầu hết hoặc toàn bộ đường ngoại trừ đường liên kết (N-acetylglucosamin hoặc N-acetylgalactosamin), đồng thời loại bỏ polypeptit. Quá trình khử glycosyl hóa học được mô tả bởi Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 và bởi Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131, cả hai tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Quá trình phân cắt các gốc hydrat cacbon bởi enzym trên polypeptit có thể được tiến hành bằng cách sử dụng nhiều

endo- và exo-glycosidaza khác nhau như mô tả bởi Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn, bao gồm việc loại bỏ các gốc fucoza bằng cách sử dụng enzym fucosidaza như đã biết trong lĩnh vực này. Quá trình glycosyl hoá ở vị trí glycosyl hoá tiềm năng có thể được tìm hãm bằng cách sử dụng hợp chất tunicamycin như mô tả bởi Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Tunicamycin phong bế quá trình sản xuất liên kết protein-N-glycosit.

Các loại cải biến cộng hóa trị khác của kháng thể bao gồm việc liên kết kháng thể với các polyme không có protein khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rượu polyhydric khác nhau như polyetylen glycol, polypropylen glycol hoặc polyoxyalkylen, theo cách nêu trong, ví dụ, 2005-2006 PEG Catalog do Nektar Therapeutics cung cấp (có sẵn trên trang web Nektare), các Patent Mỹ 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 hoặc 4,179,337, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Ngoài ra, như đã biết trong lĩnh vực này, việc thể axit amin có thể được thực hiện ở các vị trí khác nhau trong kháng thể để tạo điều kiện thuận lợi cho việc bổ sung polyme như PEG. Xem, ví dụ, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0114037A1, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo các phương án bổ sung, ví dụ trong việc sử dụng các kháng thể theo sáng chế nhằm mục đích chẩn đoán hoặc phát hiện, các kháng thể này có thể chứa chất đánh dấu. “Đánh dấu” trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất có ít nhất một yếu tố, chất đồng vị hoặc hợp chất hoá học được gắn vào để phát hiện được hợp chất này. Nói chung, các chất đánh dấu được chia thành ba nhóm: a) chất đánh dấu đồng vị, có thể có hoạt tính phóng xạ hoặc chất đồng vị nặng; b) có từ tính, có mang điện, nhiệt; và c) chất nhuộm có màu hoặc phát huỳnh quang; mặc dù các chất đánh dấu bao gồm enzym và các hạt như hạt từ tính. Các chất đánh dấu được ưu tiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phức hợp lanthanit phát huỳnh quang (bao gồm Europi và Tecbi), và chất đánh dấu phát huỳnh quang bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dầu chấm lượng tử, florexin, rhodamine, tetramethylrhodamine, eosin, erythrosin, coumarin, metyl-coumarin, pyrene, chất màu xanh lá cây Malacite, stilben, chất màu vàng Lucifer, chất màu xanh da trời Cascade, chất màu đỏ Texas, chất tạo màu Alexa, chất nhuộm Cy, và các chất khác được mô tả trong Sổ tay đoạn môi phân tử (Molecular Probes Handbook) phát hành lần thứ 6 bởi Richard P. Haugland, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất

Theo một số phương án, kháng thể kháng LY75 theo sáng chế được tạo thể tiếp hợp với dược chất để tạo ra thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC). Nói chung, ADC được sử dụng trong các ứng dụng điều trị ung thư, trong đó việc sử dụng thể tiếp hợp kháng thể-dược chất này để phân phối tại chỗ chất gây độc hoặc kìm tế bào toàn cho phép phân phối đích gốc dược chất tới các khối u, có thể tạo ra hiệu lực tốt hơn, độc tính thấp hơn, v. v... Tổng quan về kỹ thuật này được đề cập trong Ducry et al., *Bioconjugate Chem.*, 21 :5-13 (2010), Carter et al., *Cancer J.* 14(3):154 (2008) và Senter, *Current Opin. Chem. Biol.* 13:235-244 (2009), toàn bộ chúng được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Do đó, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng LY75 được tiếp hợp với dược chất. Nói chung, quá trình tạo tiếp hợp được thực hiện bằng cách gắn cộng hóa trị với kháng thể, như được mô tả tiếp dưới đây, và nói chung dựa vào liên kết, thường là liên kết peptit (như được mô tả dưới đây, có thể được thiết kế để nhạy với việc phân cắt bởi proteaza ở vị trí đích hoặc không). Ngoài ra, như được mô tả trên đây, quá trình tạo liên kết của đơn vị liên kết-dược chất (linker-drug unit - LU-D) có thể được thực hiện bằng cách gắn vào xystein trong kháng thể. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng nhiều gốc dược chất trong một kháng thể có thể thay đổi, tùy thuộc vào các điều kiện phản ứng, và dược chất:kháng thể có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng số thực tế là số trung bình.

Do đó, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với dược chất. Như được mô tả dưới đây, dược chất của ADC có thể là nhiều chất bất kỳ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, chất gây độc tế bào như tác nhân hóa trị liệu, chất ức chế sự phát triển, độc tố (ví dụ, độc tố có hoạt tính enzym của vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc chất đồng vị phóng xạ (tức là thể tiếp hợp phóng xạ). Theo các phương án khác, sáng chế còn mô tả các phương pháp sử dụng ADC.

Dược chất dùng trong sáng chế bao gồm dược chất gây độc tế bào, đặc biệt là các dược chất được sử dụng để điều trị ung thư. Nói chung, các dược chất này bao gồm chất làm hư hại ADN, chất kháng chuyển hóa, sản phẩm tự nhiên và các chất tương tự của

chúng. Nhóm chất gây độc tế bào đại diện bao gồm chất ức chế enzym như chất ức chế dihydrofolat reductaza, và chất ức chế thymidylat syntaza, chất xen vào ADN, chất phân cắt ADN, chất ức chế topoisomeraza, họ dược chất antraxyclin, dược chất chứa thành phần của cây dừa cạn, mitomycin, bleomycin, nucleosit gây độc tế bào, họ dược chất pteridine, diynene, podophyllotoxin, dolastatin, maytansinoids, chất cảm ứng biệt hóa, và taxol.

Các hợp chất thuộc các nhóm này bao gồm, ví dụ, taxol, metotrexate, metoplerin, điclometotrexate, 5-flouraxil, 6-mercaptapurin, xytosin arabinoside, melphalan, leurosine, leurosideine, actinomycin, daunorubicin, đoxorubixin, mitomycin C, mitomycin A, caminomycin, aminopterin, tallysomycin, podophyllotoxin và các dẫn xuất podophyllotoxin như etoposide hoặc etoposide phosphat, vinblastine, vincristine, vindesine, các taxan bao gồm taxol, axit taxotere retinoic, axit butyric, N8-axetyl spermidin, camptothecin, calicheamicin, esperamicin, ene-diynene, duocarmycin A, duocarmycin SA, calicheamicin, camptothecin, hemiasterlin, maytansinoid (bao gồm DM1), monometylauristatin E (MMAE), monometylauristatin F (MMAF), và maytansinoids (DM4) và các chất tương tự của chúng.

Các độc tố có thể được sử dụng làm thể tiếp hợp kháng thể-độc tố và bao gồm các độc tố vi khuẩn như độc tố gây bệnh bạch hầu, độc tố thực vật như rixin, độc tố phân tử nhỏ như geldanamycin (Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maytansinoids (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), và calicheamicin (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342), hemiasterlins (WO2004/026293; Zask et al., (2004) J. Med. Chem, 47: 4774-4786). Các độc tố này có thể tạo ra tác dụng gây độc và kìm tế bào theo các cơ chế bao gồm gắn kết tubulin, gắn kết ADN, hoặc ức chế topoisomeraza.

Thể tiếp hợp chứa kháng thể kháng LY75 và một hoặc nhiều độc tố phân tử nhỏ, như maytansinoid, dolastatin, auristatin, trichothecene, calicheamicin, và CC1065, và các dẫn xuất của các độc tố này có hoạt tính gây độc, cũng có thể được sử dụng.

Maytansinoid

Các hợp chất maytansine thích hợp để làm gốc được chất maytansinoid đã biết trong lĩnh vực này, và có thể được tách ra từ các nguồn tự nhiên theo các phương pháp đã biết, bằng cách sử dụng phương pháp được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền (xem Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973), hoặc các chất tương tự maytansinol và maytansinol đã được điều chế bằng cách tổng hợp theo các phương pháp đã biết. Như được mô tả dưới đây, được chất có thể được cải biến bằng cách đưa nhóm chức có hoạt tính như nhóm thiol hoặc amin để tạo tiếp hợp vào kháng thể.

Gốc được chất maytansinoid được lấy làm ví dụ bao gồm các gốc có nhân thom được cải biến, như: C-19-đeclo (patent Mỹ số 4,256,746) (được điều chế bằng cách khử lithi nhôm hydrua của ansamycin P2); C-20-hydroxy (hoặc C-20-đemetyl) +/-C-19-đeclo (các patent Mỹ số 4,361,650 và 4,307,016) (được điều chế bằng cách demetyl hóa bằng cách sử dụng Streptomyces hoặc Actinomyces hoặc khử clo bằng cách sử dụng LAH); và C-20-demetoxy, C-20-axyloxy (-OCOR), +/-đeclo (patent Mỹ số 4,294,757) (được điều chế bằng cách axyl hóa nhờ sử dụng axyl clorua) và các hợp chất có các cải biến ở các vị trí khác.

Gốc được chất maytansinoid được lấy làm ví dụ cũng bao gồm các gốc được chất có các biến đổi như: C-9-SH (patent Mỹ số 4,424,219) (được điều chế bằng cách cho maytansinol phản ứng với H₂S hoặc P₂S₅); C-14-alkoxymetyl(đemetoxy/CH₂OR) (patent Mỹ số 4,331,598); C-14-hydroxy methyl hoặc axyloxymetyl (CH₂OH hoặc CH₂OAc) (patent Mỹ số 4,450,254) (được điều chế do Nocardia cung cấp); C-15-hydroxy/axyloxy (patent Mỹ số 4,364,866) (được điều chế bằng cách chuyển hóa hợp chất maytansinol bởi Streptomyces); C-15-metoxy (các patent Mỹ số 4,313,946 và 4,315,929) (được tách ra từ Trewia nudiflora); C-18-N-đemetyl (Các patent Mỹ số 4,362,663 và 4,322,348) (được điều chế bằng cách demetyl hóa maytansinol bởi Streptomyces); và 4,5-đeoxy (patent Mỹ số 4,371,533) (được điều chế bằng cách khử titan trichlorua/LAH của maytansinol).

Đặc biệt DM1 (được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5,208,020, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) và DM4 (được bộc lộ trong Patent Mỹ số 7,276,497, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) có thể được sử dụng. Cũng xem nhiều dẫn xuất maytansinoid khác và các phương pháp trong 5,416,064, WO/01/24763, 7,303,749, 7,601,354, USSN 12/631,508, WO02/098883, 6,441,163, 7,368,565, WO02/16368 và WO04/1033272, toàn bộ nội dung của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế đề cập đến ADC chứa maytansinoid, phương pháp tạo ra chúng, và sử dụng chúng trong điều trị, ví dụ, trong các patent Mỹ số 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163 và Patent châu Âu số 0 425 235 B1, nội dung của chúng được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) được mô tả ADC chứa maytansinoid được ký hiệu là DM1 được liên kết với kháng thể đơn dòng C242 hướng trực tiếp tới ung thư trực tràng người. Nhận thấy rằng thể tiếp hợp có hoạt tính gây độc tế bào mạnh hướng tới các tế bào ung thư ruột kết đã được nuôi cấy, và có hoạt tính kháng khối u trong thử nghiệm phát triển khối u in vivo.

Tài liệu Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) mô tả ADC trong đó maytansinoid được tiếp hợp thông qua liên kết disulfua với kháng thể A7 của loài gặm nhấm gắn kết với kháng nguyên trên dòng tế bào ung thư ruột kết của người, hoặc với kháng thể đơn dòng TA.1 khác của loài gặm nhấm mà gắn kết với gen đột biến gây ung thư HER-2/neu. Hoạt tính gây độc tế bào của thể tiếp hợp TA.1-maytansinoid được thử nghiệm in vitro trên dòng tế bào ung thư vú của người SK-BR-3, biểu hiện 3×10^5 kháng nguyên bề mặt HER-2/tế bào. Thể tiếp hợp được chất này có nồng độ gây độc tế bào tương tự như được chất maytansinoid tự do, có thể được tăng lên bằng cách tăng số lượng phân tử maytansinoid/phân tử kháng thể. Thể tiếp hợp A7-maytansinoid có hoạt tính gây độc tế bào toàn thân thấp ở chuột nhắt.

Auristatin và Dolastatin

Theo một số phương án, ADC chứa kháng thể kháng LY75 được tiếp hợp với các chất tương tự dolastatin hoặc dolostatin peptit và các dẫn xuất, auristatins (Các patent Mỹ số 5,635,483; 5,780,588). Đã biết rằng dolastatin và auristatin có ảnh hưởng tới động học vi ống, thủy phân GTP, và phân chia nhân và tế bào (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) và có hoạt tính chống ung thư (patent Mỹ số 5,663,149) và hoạt tính chống nấm (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Gốc được chất dolastatin hoặc auristatin có thể được gắn với kháng thể thông qua đầu N (amino) hoặc đầu C (carboxyl) của gốc được chất peptit (WO 02/088172).

Các phương án về auristatin được lấy làm ví dụ bao gồm các gốc được chất monomethylauristatin được liên kết ở đầu N là DE và DF, được bộc lộ trong "Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract

Number 623, presented Mar. 28, 2004 và được mô tả trong Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0238648, nội dung của chúng được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Phương án về auristatin được lấy làm ví dụ là MMAE (được thể hiện trên Fig.10 trong đó đường lượn sóng thể hiện gắn kết cộng hóa trị với liên kết (L) của thể tiếp hợp kháng thể dược chất; xem Patent Mỹ số 6,884,869 được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn).

Phương án khác về auristatin được lấy làm ví dụ là MMAF, được thể hiện trên Fig.10 trong đó đường lượn sóng thể hiện gắn kết cộng hóa trị với liên kết (L) của thể tiếp hợp kháng thể dược chất (US 2005/0238649, 5,767,237 và 6,124,431, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn).

Phương án khác được lấy làm ví dụ bao gồm MMAE hoặc MMAF và các thành phần liên kết khác nhau (được mô tả tiếp trong bản mô tả này) có cấu trúc và các chữ viết tắt dưới đây (trong đó Ab có nghĩa là kháng thể và p bằng 1 đến 8):

Thông thường, gốc dược chất trên cơ sở peptit có thể được điều chế bằng cách tạo ra liên kết peptit giữa hai hoặc nhiều axit amin và/hoặc các mảnh peptit. Các liên kết peptit như vậy có thể được tạo ra, ví dụ, theo phương pháp tổng hợp pha lỏng (xem E. Schroder and K. Lubke, "The Peptide", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) là đã biết trong lĩnh vực hoá học peptit. Gốc dược chất auristatin/dolastatin có thể được điều chế theo phương pháp nêu trong: patent Mỹ số 5,635,483; patent Mỹ số 5,780,588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design Design 13:243-277; Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; và Doronina (2003) Nat Biotechnol 21 (7)778-784.

Calicheamicin

Theo các phương án khác, ADC chứa kháng thể theo sáng chế được tiếp hợp với một hoặc nhiều phân tử calicheamicin. Ví dụ, Mylotarg là dược chất ADC thương mại đầu tiên và sử dụng $\gamma 1$ làm chất có ích (xem Patent Mỹ số 4,970,198, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Các dẫn xuất calicheamicin khác được mô tả trong các Patent Mỹ số 5,264,586, 5,384,412, 5,550,246, 5,739,116, 5,773,001, 5,767,285 và 5,877,296, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Họ chất kháng sinh calicheamicin có khả năng tạo ra ADN chuỗi kép phá vỡ ở nồng độ cận picomol. Để điều

chế thể tiếp hợp thuộc họ calicheamicin, xem các patent Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (toàn bộ chúng thuộc Công ty American Cyanamid). Chất tương tự cấu trúc của calicheamicin có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, γ 11, α 21, α 21, N-acetyl- γ 11, PSAG và θ 11 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) và các patent Mỹ nêu trên thuộc Công ty American Cyanamid). Các dược chất kháng khối u khác mà kháng thể có thể được tiếp hợp là QFA như kháng folat. Cả calicheamicin lẫn QFA có vị trí tác động nội bào và không qua màng huyết tương một cách dễ dàng. Do đó, mức độ hấp thụ tế bào của các chất này thông qua kháng thể qua trung gian quá trình nội tương tác làm tăng đáng kể hoạt tính gây độc tế bào của chúng.

Duocarmycin

CC-1065 (xem 4,169,888, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) và duocarmycin là thành phần của họ kháng sinh kháng khối u sử dụng trong ADC. Các chất kháng sinh này hoạt động thông qua quá trình alkyl hóa chọn lọc trình tự ADN ở vị trí N3 của adenin theo khía cạnh, bắt đầu một chuỗi các sự kiện gây chết theo chương trình.

Các hợp chất quan trọng của duocarmycin bao gồm duocarmycin A (Patent Mỹ số 4,923,990, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) và duocarmycin SA (patent Mỹ số 5,101,038, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), và nhiều chất tương tự như được mô tả trong các Patent Mỹ số 7,517,903, 7,691,962, 5,101,038; 5,641,780; 5,187,186; 5,070,092; 5,070,092; 5,641,780; 5,101,038; 5,084,468, 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, WO2007/089149, WO2009/017394A1, 5,703,080, 6,989,452, 7,087,600, 7,129,261, 7,498,302, và 7,507,420, toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Pyrolobenzodiazepin

Pyrolobenzodiazepin (PBD) (Journal of Medicinal Chemistry 2001, 44, 737-748) là chất tác động qua ADN có hoạt tính gây độc tế bào đáng kể. Mười ba cấu trúc của họ này được phân lập, bao gồm các hợp chất như anthramycin, mazethramycin, porothramycin, prothracarcin, sibanomycin, tomaymycin, sibiromycin, chicamycin A, neothramycin A, B, và DC-81 (Medicinal Chemistry and Drug Design, ISBN: 978-953-51-0513-8, Ahmed Kamal et al. DOI: 10.5772/38869). Các chất tương tự khác của họ

này đã được điều chế và được tiếp hợp với các kháng thể như được mô tả trong các patent số WO201 1/130598 và WO2011/130616, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Chất gây độc tế bào khác

Các chất kháng khối u khác có thể được tiếp hợp với các kháng thể theo sáng chế bao gồm BCNU, streptozocin, vincristine và 5-flouraxil, họ các chất thường được gọi là phức hợp LL-E33288 được mô tả trong các patent Mỹ số 5,053,394, 5,770,710, cũng như esperamicin (patent Mỹ số 5,877,296).

Các độc tố có hoạt tính enzym và các mảnh của chúng có thể được sử dụng bao gồm độc tố gây bệnh bạch cầu chuỗi A, các mảnh hoạt tính không gắn kết của độc tố gây bệnh bạch hầu, ngoại độc tố chuỗi A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), rixin chuỗi A, abrin chuỗi A, modeccin chuỗi A, alpha-sarcin, các protein *Aleurites fordii*, protein dianthin, protein *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế *momordica charantia*, curcin, crotin, chất ức chế *sapaonaria officinalis*, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin và tricothecene. Xem, ví dụ, WO 93/21232 được công bố ngày 28 tháng 10 năm 1993.

Sáng chế còn dự định bao hàm ADC đã được tạo ra giữa kháng thể và hợp chất có hoạt tính phân giải nhân tế bào (ví dụ, ribonucleaza hoặc ADN endonucleaza như deoxyribonucleaza; DNaza).

Để phá hủy chọn lọc khối u, kháng thể có thể chứa nguyên tử có hoạt tính phóng xạ ở mức cao. Nhiều chất đồng vị phóng xạ là có sẵn trên thị trường để sản sinh kháng thể được tạo tiếp hợp phóng xạ. Ví dụ bao gồm At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 và chất đồng vị phóng xạ Lu.

Chất đánh dấu phóng xạ hoặc các chất đánh dấu khác có thể được đưa vào thể tiếp hợp theo các cách đã biết. Ví dụ, peptit có thể được sinh tổng hợp hoặc có thể được tổng hợp bằng cách tổng hợp axit amin tổng hợp bằng cách sử dụng các tiền chất axit amin thích hợp kể cả, ví dụ, flo-19 thay cho hydro. Các chất đánh dấu như Tc99m hoặc I123, Re186, Re188 và In111 có thể được gắn kết qua gốc xystein ở peptit. Yttrium-90 có thể được gắn kết qua gốc lysin. Phương pháp IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 có thể được sử dụng để đưa Iot-123 vào. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) mô tả chi tiết hơn về các phương pháp khác.

Đối với các chế phẩm chứa nhiều kháng thể, khả năng mang được chất được thể hiện bởi p , số phân tử được chất trung bình/kháng thể. Khả năng mang được chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20 được chất (D)/kháng thể. Số lượng được chất trung bình/kháng thể trong quá trình tạo ra phản ứng tạo tiếp hợp có thể được đặc trưng bằng các cách thông thường như phổ khối, thử nghiệm ELISA, và HPLC. Khả năng phân bố số lượng kháng thể-được chất-thể tiếp hợp theo p cũng có thể được xác định.

Trong một số trường hợp, quá trình tách, tinh chế và mô tả đặc điểm của thể tiếp hợp kháng thể-được chất đồng nhất trong đó p là trị số nhất định thu được từ thể tiếp hợp kháng thể-được chất với các được chất hữu ích khác có thể thu được bằng các cách như HPLC pha đảo hoặc điện di. Theo phương án minh họa, p bằng 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 hoặc một phần của nó.

Việc sản xuất hợp chất chứa thể tiếp hợp kháng thể-được chất có thể được thực hiện bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Tóm lại, các hợp chất chứa thể tiếp hợp kháng thể-được chất có thể bao gồm kháng thể kháng LY75 làm đơn vị kháng thể, được chất, và tùy ý liên kết gắn được chất với các chất gắn kết.

Nhiều phản ứng khác nhau là có sẵn để gắn kết cộng hóa trị của được chất và/hoặc liên kết với các chất gắn kết. Điều này có thể được thực hiện bằng cách phản ứng của các gốc axit amin trong các chất gắn kết, ví dụ, phân tử kháng thể, bao gồm các nhóm amin lysin, nhóm axit carboxylic tự do của axit glutamic và aspartic, nhóm sulfhydryl của cystein và các gốc khác nhau của axit amin thơm. Các phương pháp gắn kết cộng hóa trị không đặc hiệu thường được sử dụng là phản ứng của carbodiimide để liên kết nhóm carboxy (hoặc amino) của hợp chất với nhóm amino (hoặc carboxy) của kháng thể. Ngoài ra, các chất hai chức như dialdehyt hoặc imidoeste được sử dụng để liên kết nhóm amino của hợp chất vào các nhóm amino của phân tử kháng thể.

Cũng biết rằng việc gắn kết được chất với các chất gắn kết là phản ứng bazơ Schiff. Phương pháp này bao gồm quá trình periodat oxy hóa được chất chứa nhóm glycol hoặc hydroxy, từ đó tạo ra aldehyt mà sau đó được phản ứng với các chất gắn kết. Quá trình gắn kết xảy ra thông qua việc tạo ra bazơ Schiff với nhóm amino của các chất gắn kết. Izothioxyanat cũng có thể được sử dụng làm các chất liên hợp để gắn kết cộng

hóa trị giữa dược chất và các chất gắn kết. Các kỹ thuật khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một số phương án, chất trung gian, là tiền chất của chất liên kết, được phản ứng với dược chất trong điều kiện thích hợp. Theo các phương án khác, các nhóm hoạt động được sử dụng trên dược chất và/hoặc chất trung gian. Sản phẩm của phản ứng giữa dược chất và chất trung gian, hoặc dẫn xuất của dược chất, sau đó được cho phản ứng với kháng thể kháng LY75 theo sáng chế trong điều kiện thích hợp.

Đã biết rằng các biến đổi hóa học cũng có thể được tiến hành đối với hợp chất mong muốn để tiến hành phản ứng của hợp chất đó diễn ra dễ dàng hơn nhằm mục đích điều chế thể tiếp hợp theo sáng chế. Ví dụ về nhóm chức, ví dụ, amin, hydroxyl, hoặc sulfhydryl, có thể được gắn vào dược chất ở vị trí có tác dụng tối thiểu hoặc tác dụng có thể chấp nhận được về hoạt tính hoặc các đặc tính khác của dược chất.

Đơn vị liên kết

Thông thường, các hợp chất của thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa đơn vị liên kết giữa đơn vị dược chất và đơn vị kháng thể. Theo một số phương án, liên kết có thể phân cắt trong điều kiện nội bào hoặc ngoại bào, sao cho quá trình phân cắt thể liên kết có thể giải phóng đơn vị dược chất ra khỏi kháng thể trong môi trường thích hợp. Ví dụ, các khối u rắn tiết ra một số proteaza nhất định có thể đóng vai trò làm đích liên kết để phân cắt; theo các phương án khác, nó là proteaza nội bào được sử dụng. Theo các phương án khác, đơn vị liên kết không thể phân cắt và dược chất được giải phóng, ví dụ, bằng cách thoái biến kháng thể trong tiêu bào.

Theo một số phương án, liên kết có thể phân cắt bởi chất phân cắt có mặt trong môi trường nội bào (ví dụ, trong lysosom hoặc nội thể hoặc caveolea). Liên kết có thể là, ví dụ, liên kết peptidyl được phân giải bởi peptidaza nội bào hoặc enzym proteaza, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lysosomal hoặc endosomal proteaza. Theo một số phương án, liên kết peptidyl có ít nhất hai axit amin hoặc ít nhất ba axit amin hoặc nhiều hơn.

Chất phân cắt có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các cathepsin B và D và plasmin, đã biết rằng toàn bộ chúng có thể thủy phân các dẫn xuất dược chất dipeptit làm giải phóng dược chất bên trong các tế bào đích (xem, ví dụ, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Các liên kết peptidyl được phân cắt bằng các

enzym có mặt trong các tế bào biểu hiện LY75. Ví dụ, liên kết peptidyl có thể phân cắt bởi proteaza phụ thuộc thiol cathepsin-B, được biểu hiện ở mức cao trong mô ung thư, có thể được sử dụng (ví dụ, liên kết Phe-Leu hoặc Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO.X)). Ví dụ khác về các liên kết như vậy được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 6,214,345, được đưa toàn bộ vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn và nhằm mọi mục đích.

Theo một số phương án, liên kết peptidyl có thể phân cắt được bởi proteaza nội bào là liên kết Val-Cit hoặc liên kết Phe-Lys (xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,214,345, mô tả việc tổng hợp doxorubixin bằng liên kết val-cit).

Theo các phương án khác, liên kết dễ phân cắt là liên kết nhạy với độ pH, tức là nhạy với quá trình thủy phân ở các trị số pH nhất định. Thông thường, liên kết nhạy với độ pH có khả năng thủy phân trong các điều kiện axit. Ví dụ, liên kết dễ bị axit hóa có khả năng thủy phân trong lysosom (ví dụ, hydrazon, semicarbazon, thiosemicarbazon, amit cis-aconitic, orthoeste, axetal, ketal, hoặc các chất tương tự) có thể được sử dụng. (Xem, ví dụ, Các patent Mỹ số 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661). Các liên kết như vậy là tương đối ổn định trong các điều kiện pH trung tính, như liên kết trong máu, nhưng không ổn định ở độ pH nhỏ hơn 5,5 hoặc 5,0, độ pH xấp xỉ của lysosom. Theo một số phương án nhất định, liên kết dễ thủy phân là liên kết thioete (như, ví dụ, thioete được gắn vào chất trị liệu thông qua liên kết axylhydrazon (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,622,929).

Theo các phương án khác, liên kết có thể phân cắt được trong các điều kiện khử (ví dụ, liên kết disulfua). Nhiều liên kết disulfua là đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, ví dụ, chúng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng SATA (N-succinimidyl-5-axetylthioaxetat), SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridylđithio)propionat), SPDB (N-succinimidyl-3-(2-pyridylđithio)butyrat) và SMPT (N-succinimidyl-oxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-pyridyl-đithio)toluen)-, SPDB và SMPT. (Xem, ví dụ, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Cũng xem patent Mỹ số 4,880,935).

Theo các phương án khác, liên kết là liên kết malonat (Johnson et al., 1995, AntiCancer Res. 15:1387-93), liên kết maleimidobenzoyl (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-

Chem. 3(10):1299-1304), hoặc chất tương tự 3'-N-amit (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

Theo các phương án khác, đơn vị liên kết không thể phân cắt và được chất được giải phóng bằng cách thoái biến kháng thể. (Xem Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0238649 được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn và nhằm mọi mục đích).

Theo nhiều phương án, liên kết is self-immolative. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “đoạn nối tự hủy” dùng để chỉ gốc hóa học hai chức có khả năng liên kết cộng hóa trị cùng với hai gốc hóa học có khoảng chống vào phân tử chứa ba phần ổn định. Nó sẽ tự tách ra khỏi gốc hóa học thứ hai nếu liên kết của nó với gốc thứ nhất được phân cắt. Xem ví dụ, WO 2007/059404A2, WO06/1 10476A2, WO05/1 12919A2, WO2010/062171, WO09/017394, WO07/089149, WO 07/018431, WO04/043493 và WO02/083180, dùng để chỉ thể tiếp hợp được chất-cơ chất dễ phân cắt trong đó được chất và cơ chất dễ phân cắt tùy ý được gắn qua liên kết tự chết và toàn bộ chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Thông thường, liên kết này về cơ bản là không nhạy với môi trường ngoại bào. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “về cơ bản là không nhạy với môi trường ngoại bào” về mặt liên kết, có nghĩa là không quá khoảng 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, hoặc không quá khoảng 1% liên kết, trong mẫu của hợp chất chứa thể tiếp hợp kháng thể-được chất, được phân giải khi hợp chất chứa thể tiếp hợp kháng thể-được chất có mặt ở môi trường ngoại bào (ví dụ, ở huyết tương).

Việc xem xét liên kết về cơ bản là không nhạy với môi trường ngoại bào có thể được xác định, ví dụ, bằng cách ủ với hợp chất chứa thể tiếp hợp kháng thể-được chất huyết tương trong thời gian định trước (ví dụ, 2, 4, 8, 16, hoặc 24 giờ) và sau đó tính lượng được chất tự do có mặt trong huyết tương.

Theo phương án không loại trừ lẫn nhau khác, liên kết thúc đẩy quá trình nội tương tác tế bào. Theo một số phương án nhất định, liên kết thúc đẩy quá trình nội tương tác tế bào khi được tiếp hợp với chất trị liệu (tức là môi trường chứa gốc liên kết-chất trị liệu của hợp chất chứa thể tiếp hợp kháng thể-được chất như được nêu trong bản mô tả). Theo các phương án khác, liên kết thúc đẩy quá trình nội tương tác tế bào khi được tiếp hợp với cả hợp chất auristatin lẫn kháng thể kháng LY75 theo sáng chế.

Nhiều liên kết minh họa có thể được sử dụng cùng với chế phẩm và phương pháp được mô tả trong WO 2004/010957, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0074008, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20050238649, và Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0024317 (mỗi tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn và nhằm mọi mục đích).

Khả năng mang được chất

Khả năng mang được chất được thể hiện bằng trị số p và là số gốc được chất trung bình/kháng thể trong phân tử. Khả năng mang được chất (" p ") có thể bằng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều gốc (D)/kháng thể, mặc dù thông thường số gốc được chất trung bình này là phân số hoặc số thập phân. Nói chung, khả năng mang được chất từ 1 đến 4 là thích hợp nhất, và từ 1 đến 2 là cũng thích hợp. ADC theo sáng chế bao gồm tập hợp các kháng thể tạo thể tiếp hợp với nhiều gốc được chất, từ 1 đến 20, ví dụ, 1-15, 1-10, 2-9, 3-8, 4-7, 5-6. Số gốc được chất trung bình/kháng thể trong chế phẩm chứa ADC thu được từ phản ứng tạo tiếp hợp có thể được đặc trưng bởi các phương pháp thông thường như khối phổ và, thử nghiệm ELISA.

Khả năng phân bố số lượng ADC liên quan đến trị số p cũng có thể được xác định. Trong một số trường hợp, quá trình tách, tinh chế, và mô tả đặc điểm của ADC đồng nhất trong đó p là trị số nhất định thu được từ ADC với khả năng mang được chất khác có thể thu được bằng các phương pháp như điện di.

Đối với một số thể tiếp hợp kháng thể-được chất, p có thể bị giới hạn bởi số vị trí gắn kết trên kháng thể. Ví dụ, trong đó vị trí gắn kết là xystein thiol, như theo phương án minh họa nêu trên, kháng thể này có thể chỉ có một hoặc một vài nhóm xystein thiol, hoặc có thể chỉ có một hoặc một vài nhóm thiol hoạt động thích hợp mà liên kết có thể được gắn vào qua đó. Theo một số phương án nhất định, khả năng mang được chất cao hơn, ví dụ $p > 5$, có thể gây kết tụ, không tan, độc tính, hoặc làm giảm khả năng thẩm thấu của một số thể tiếp hợp kháng thể-được chất nhất định. Theo một số phương án nhất định, khả năng mang được chất đối với ADC theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 đến 8; nằm trong khoảng từ 2 đến 6; nằm trong khoảng từ 3 đến 5; nằm trong khoảng từ 3 đến 4; nằm trong khoảng từ 3,1 đến 3,9; nằm trong khoảng từ 3,2 đến 3,8; nằm trong khoảng từ 3,2 đến 3,7; nằm trong khoảng từ 3,2 đến 3,6; nằm trong khoảng từ 3,3 đến 3,8; hoặc nằm trong khoảng từ 3,3 đến 3,7. Thực vậy, nhận thấy rằng đối với một số ADC nhất định, tỷ lệ tối ưu của gốc được chất/kháng thể có thể là nhỏ hơn 8, và có thể nằm trong khoảng từ

2 đến 5. Xem US 2005/0238649 A1 (trong bản mô tả này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn).

Theo một số phương án nhất định, gốc được chất với số lượng nhỏ hơn số lượng tối đa lý thuyết được tiếp hợp với kháng thể thông qua phản ứng tạo tiếp hợp. Kháng thể có thể chứa, ví dụ, gốc lysin không phản ứng với chất trung gian được chất-liên kết hoặc chất phản ứng liên kết, như được bàn luận dưới đây. Nói chung, các kháng thể không chứa nhiều nhóm xystein thiol tự do và hoạt động có thể được liên kết với gốc được chất; thực vậy, hầu hết các gốc xystein thiol trong các kháng thể có mặt dưới dạng cầu disulfua. Theo một số phương án nhất định, kháng thể có thể được khử bằng chất khử như dithiotreitol (DTT) hoặc tricarboyletylphosphin (TCEP), trong điều kiện khử một phần hoặc hoàn toàn, để tạo ra nhóm xystein thiol hoạt động. Theo một số phương án nhất định, kháng thể được làm biến tính để tạo ra nhóm ái nhân hoạt động như lysin hoặc xystein.

Khả năng mang (tỷ lệ được chất/kháng thể) của ADC có thể được kiểm soát theo các cách khác nhau, ví dụ, bằng cách: (i) giới hạn lượng mol dư của chất trung gian được chất-liên kết hoặc chất phản ứng liên kết so với kháng thể, (ii) giới hạn thời gian hoặc nhiệt độ của phản ứng tiếp hợp, (iii) khử một phần hoặc giới hạn điều kiện khử đối với các cải biến xystein thiol, (iv) tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp trình tự axit amin của kháng thể sao cho số lượng và vị trí của các gốc xystein được cải biến để kiểm soát số lượng và/hoặc vị trí của gắn kết liên kết-được chất (như thioMab hoặc thioFab đã được tạo ra như được mô tả trong bản mô tả này và trong WO2006/034488 (trong bản mô tả này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn)).

Cần phải hiểu rằng nếu nhiều hơn một nhóm ái nhân phản ứng với chất trung gian được chất-liên kết hoặc chất phản ứng liên kết, tiếp đó là chất phản ứng gốc được chất, sau đó sản phẩm thu được là hỗn hợp gồm các hợp chất chứa ADC với khả năng phân bố một hoặc nhiều gốc được chất được gắn vào kháng thể. Số lượng trung bình của được chất/kháng thể có thể được tính toán từ hỗn hợp bởi thử nghiệm kháng thể ELISA kép, là đặc hiệu với kháng thể và đặc hiệu với được chất này. Các phân tử ADC riêng rẽ có thể được nhận diện trong hỗn hợp bằng khối phổ và được tách ra bằng HPLC, ví dụ, sắc ký tương tác kỵ nước.

Theo một số phương án, ADC đồng nhất có trị số mang đơn lẻ có thể được phân lập từ hỗn hợp tạo tiếp hợp bằng cách điện di hoặc sắc ký.

Phương pháp xác định tác dụng gây độc tế bào của các ADC

Các phương pháp xác định xem được chất hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có tác dụng kìm tế bào và/hoặc gây độc tế bào trên tế bào là đã biết hay không. Nói chung, hoạt tính gây độc tế bào hoặc kìm tế bào của thể tiếp hợp kháng thể dược chất có thể được xác định bằng cách: cho các tế bào CHO động vật có vú biểu hiện protein đích của thể tiếp hợp kháng thể dược chất vào môi trường nuôi cấy tế bào; nuôi cấy các tế bào này trong khoảng thời gian từ 6 giờ đến 5 ngày; và xác định khả năng sống sót của tế bào. Thử nghiệm in vitro trên cơ sở tế bào có thể được sử dụng để xác định khả năng sống sót (tăng sinh), hoạt tính gây độc tế bào, và cảm ứng quá trình chết theo chương trình (hoạt hóa caspaza) của thể tiếp hợp kháng thể dược chất.

Để xác định xem thể tiếp hợp kháng thể dược chất có tác dụng kìm tế bào hay không, thử nghiệm kết hợp thymidin có thể được sử dụng. Ví dụ, các tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên đích ở mật độ 5.000 tế bào/giếng của đĩa 96 giếng có thể được nuôi cấy trong khoảng thời gian là 72 giờ và được tiếp xúc với 0,5 μCi ^3H -thymidin trong 8 giờ cuối cùng của khoảng thời gian 72 giờ. Việc kết hợp ^3H -thymidin vào các tế bào của môi trường nuôi cấy được xác định với sự có mặt và không có mặt của thể tiếp hợp kháng thể dược chất.

Để xác định hoạt tính gây độc tế bào, quá trình gây hoại tử hoặc chết theo chương trình (tế bào chết theo chương trình) có thể được xác định. Việc gây hoại tử thường kèm theo khả năng thấm gia tăng của màng huyết tương; trương nở tế bào, và rách màng huyết tương. Việc chết theo chương trình thường được đặc trưng bởi quá trình tạo bong bóng, ngưng tụ bào chất, và hoạt hóa endonucleaza nội sinh. Việc xác định tác dụng bất kỳ trong số các tác dụng này trên các tế bào ung thư chứng tỏ rằng thể tiếp hợp kháng thể dược chất là hữu ích để điều trị ung thư.

Khả năng sống sót của tế bào có thể được xác định bằng cách xác định khả năng hấp thụ thuốc nhuộm trong tế bào như chất màu đỏ tự nhiên, chất màu xanh da trời trypan, hoặc chất xanh da trời ALAMAR™ (xem, ví dụ, Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476). Trong thử nghiệm này, các tế bào được ủ trong môi trường chứa thuốc nhuộm, các tế bào này được rửa, và phần thuốc nhuộm còn lại, ảnh hưởng tới mức

độ hấp thụ thuốc nhuộm trong tế bào, được xác định bằng phổ quang kế. Thuốc nhuộm gắn kết với protein sulforhodamine B (SRB) cũng có thể được sử dụng để xác định hoạt tính gây độc tế bào (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1 107-12).

Theo cách khác, muối tetrazolium, như MTT, được sử dụng trong thử nghiệm so màu định lượng đối với khả năng sống sót tế bào của động vật có vú và tăng sinh bằng cách phát hiện khả năng sống sót, nhưng không gây chết các tế bào (xem, ví dụ, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

Khả năng gây chết theo chương trình có thể được định lượng bằng cách đo, ví dụ, tạo mảnh ADN. Các phương pháp đo sáng thương mại để xác định định lượng quá trình tạo mảnh ADN in vitro là có sẵn trên thị trường. Ví dụ về các thử nghiệm này, bao gồm TUNEL (phát hiện quá trình kết hợp nucleotit được đánh dấu trong ADN đã được tạo mảnh) và thử nghiệm trên cơ sở ELISA, được mô tả trong Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Khả năng gây chết theo chương trình có thể cũng được xác định bằng cách xác định sự thay đổi hình thái trong tế bào. Ví dụ, đối với việc gây hoại tử, việc làm giảm tính toàn vẹn màng huyết tương có thể được xác định bằng cách đo mức độ hấp thụ của một số thuốc nhuộm nhất định (ví dụ, thuốc nhuộm phát huỳnh quang như, ví dụ, chất màu cam acridine hoặc ethidi bromua). Phương pháp đo số lượng tế bào chết theo chương trình đã được mô tả bởi Duke and Cohen, Current Sequences in Immunology (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Các tế bào này cũng có thể được đánh dấu bằng thuốc nhuộm ADN (ví dụ, chất màu cam acridine, ethidi bromua, hoặc propidium iodua) và các tế bào đã được quan sát về ngưng tụ chất nhiễm sắc và việc tạo mép dọc theo màng nhân bên trong. Sự thay đổi hình thái khác có thể được xác định để xác định quá trình chết theo chương trình bao gồm, ví dụ, ngưng tụ bào chất, tăng quá trình tạo bóng màng, và co màng.

Sự có mặt của các tế bào chết theo chương trình có thể được xác định ở cả hai khoang đã được gắn vào và “quá trình nổi” của môi trường nuôi cấy. Ví dụ, cả hai khoang này có thể được thu gom bằng cách loại bỏ dịch nổi trên bề mặt, trypsin hóa các tế bào đã được gắn vào, kết hợp các chế phẩm sau bước rửa ly tâm (ví dụ, 10 phút ở 2000 vòng/phút), và phát hiện hiện tượng gây chết theo chương trình (ví dụ, bằng cách xác

định quá trình tạo mảnh ADN). (Xem, ví dụ, Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:31 10-16).

In vivo, tác dụng của chế phẩm điều trị chứa kháng thể kháng LY75 theo sáng chế có thể được đánh giá ở mô hình động vật thích hợp. Ví dụ, mô hình ung thư dị ghép có thể được sử dụng, trong đó các mô cấy ung thư hoặc các mô dị ghép đã chuyển vào được đưa vào các động vật bị tổn thương hệ miễn dịch, như chuột nhắt trụi lông hoặc SCID (Klein et al., 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Hiệu lực này có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm xác định khả năng ức chế sự tạo ra khối u, khả năng thoái biến hoặc di căn khối u, và các yếu tố tương tự.

Chế phẩm điều trị đã dùng trong thực tế theo các phương pháp nêu trên có thể được bào chế thành được phẩm chứa chất mang thích hợp đối với phương pháp phân phối mong muốn. Các chất mang thích hợp bao gồm nguyên liệu bất kỳ mà khi được kết hợp với chế phẩm điều trị này vẫn có tác dụng kháng khối u của chế phẩm điều trị và thường không phản ứng với hệ miễn dịch của đối tượng bị bệnh. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất mang được dùng bất kỳ trong số nhiều chất mang được dùng tiêu chuẩn như dung dịch muối đệm phosphat vô trùng, nước kim khuẩn, và các chất tương tự (xem, nói chung, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

Phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sản xuất kháng thể kháng LY75 theo sáng chế. Các phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ chứa axit nucleic đã được phân lập mã hóa các kháng thể theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng phương pháp này có thể được thực hiện theo nhiều cách, tùy thuộc vào bản chất của kháng thể. Theo một số phương án, trong trường hợp trong đó các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể truyền thống có chiều dài đầy đủ, ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong các điều kiện sao cho kháng thể được tạo ra và có thể được phân lập.

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi của LY75_A1 được nêu trong bản mô tả này (cả protein lẫn trình tự axit nucleic); người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng hiểu được rằng chúng có thể được gia tăng một cách dễ dàng để tạo ra chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ. Tức là, sáng chế đề cập đến các mảnh ADN mã hóa các đoạn V_H và V_K như được nêu trong bản mô tả này, các mảnh ADN này có thể

được thao tác tiếp bằng tay bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN tiêu chuẩn, ví dụ, để biến đổi các gen vùng biến đổi thành các gen chuỗi kháng thể có chiều dài đầy đủ, thành các gen mảnh Fab, hoặc thành các gen scFv. Trong các thao tác này, mảnh AND mã hóa V_K hoặc V_H được liên kết điều khiển với mảnh ADN khác mã hóa protein khác, như kháng thể vùng hằng định hoặc liên kết linh hoạt. Thuật ngữ “liên kết linh hoạt”, như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định có nghĩa là hai mảnh ADN được nối với nhau sao cho trình tự axit amin được mã hóa bởi hai mảnh ADN này vẫn nằm trong khung.

ADN đã được phân lập mã hóa vùng V_H có thể được biến đổi thành gen chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bằng cách liên kết linh hoạt AND mã hóa V_H thành phân tử ADN khác mã hóa các vùng hằng định chuỗi nặng (C_H1 , C_H2 và C_H3). Trình tự của gen vùng hằng định chuỗi nặng của loài gặm nhấm là đã biết trong lĩnh vực này [xem, ví dụ, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] và các mảnh ADN chứa các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Chuỗi nặng vùng hằng định có thể là vùng hằng định IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM hoặc IgD, nhưng tốt nhất là vùng hằng định IgG1 hoặc IgG4. Đối với gen chuỗi nặng của mảnh Fab, AND mã hóa V_H có thể được liên kết điều khiển với phân tử ADN khác chỉ mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng C_H1 .

ADN đã được phân lập mã hóa vùng VL/VK có thể được biến đổi thành gen chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ (cũng như gen chuỗi nhẹ Fab) bằng cách liên kết linh hoạt AND mã hóa V_L với phân tử ADN khác mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ, C_L . Trình tự của các gen vùng hằng định chuỗi nhẹ của loài gặm nhấm đã biết trong lĩnh vực này [xem, ví dụ, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] và các mảnh ADN chứa các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Theo các phương án được ưu tiên, vùng hằng định chuỗi nhẹ có thể là vùng hằng định kappa hoặc lambda.

Để tạo ra gen scFv, các mảnh ADN mã hóa V_H và V_L/V_K được liên kết điều khiển với mảnh khác mã hóa liên kết linh hoạt, ví dụ, mã hóa trình tự axit amin (Gly₄ - Ser)₃, sao cho các trình tự V_H và V_L/V_K có thể được biểu hiện như protein chuỗi đơn liên tục, trong đó các vùng V_L/V_K và V_H được nối với nhau bởi liên kết linh hoạt [xem, ví dụ,

Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554].

Nói chung, các axit nucleic được tạo ra mã hóa các kháng thể theo sáng chế. Các polynucleotit này mã hóa cả vùng biến đổi lẫn vùng hằng định của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mặc dù các cách kết hợp khác cũng được dự định bởi sáng chế phù hợp với các chế phẩm đã nêu trong bản mô tả. Sáng chế cũng dự định bao gồm các mảnh oligonucleotit có nguồn gốc từ các polynucleotit đã nêu và trình tự axit nucleic bổ trợ với các polynucleotit này.

Các polynucleotit có thể ở dạng ARN hoặc ADN. Polynucleotit ở dạng ADN, cADN, ADN bộ gen, các chất tương tự axit nucleic, và ADN tổng hợp là nằm trong phạm vi của sáng chế. ADN có thể ở dạng sợi kép hoặc sợi đơn, và nên nó ở dạng sợi đơn, có thể là sợi mã hoá (có nghĩa) hoặc sợi không mã hoá (đối nghĩa). Trình tự mã hóa mã hóa polypeptit có thể giống với trình tự mã hóa đã nêu trong bản mô tả hoặc có thể là khác trình tự mã hoá, do làm dư thừa hoặc thoái biến mã di truyền, nên trình tự mã hóa cùng một polypeptit như ADN đã nêu trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa các kháng thể theo sáng chế được đưa vào vector biểu hiện, có thể là ngoài nhiễm sắc thể hoặc được thiết kế để hợp nhất vào bộ gen của tế bào vật chủ mà nó được đưa vào. Vector biểu hiện có thể chứa số trình tự điều hòa thích hợp bất kỳ (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự phiên mã và kiểm soát dịch mã, gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, gen tăng cường, sao chép, v. v...) hoặc các thành phần khác (gen chọn lọc, v. v..), toàn bộ chúng được liên kết linh hoạt như đã biết trong lĩnh vực này. Trong một số trường hợp, hai axit nucleic được sử dụng và mỗi axit này được đưa vào một vector biểu hiện khác nhau (ví dụ, chuỗi nặng nằm trong vector biểu hiện thứ nhất, chuỗi nhẹ nằm trong vector biểu hiện thứ hai), hoặc theo cách khác chúng có thể được đặt trong cùng một vector biểu hiện. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này việc thiết kế vector biểu hiện, bao gồm việc chọn lọc trình tự điều hòa có thể phụ thuộc vào các yếu tố như lựa chọn tế bào vật chủ, nồng độ biểu hiện protein mong muốn, v. v...

Nói chung, các axit nucleic và/hoặc sự biểu hiện có thể được đưa vào tế bào vật chủ thích hợp để tạo ra tế bào vật chủ tái tổ hợp bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ thích hợp với tế bào vật chủ đã được chọn (ví dụ, biến nạp, gây nhiễm, điện di, gây

nhuộm), sao cho axit nucleic được liên kết điều khiển với một hoặc nhiều yếu tố kiểm soát biểu hiện (ví dụ, trong vector, trong cấu trúc đã được tạo ra bởi các quy trình trong tế bào, được hợp nhất vào bộ gen của tế bào vật chủ). Tế bào vật chủ tái tổ hợp thu được có thể được giữ trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện (ví dụ, với sự có mặt của chất cảm ứng, ở động vật không phải là người thích hợp, trong môi trường nuôi cấy thích hợp có bổ sung các muối thích hợp, yếu tố sinh trưởng, chất kháng sinh, chất bổ sung dinh dưỡng, v. v...), từ đó polypeptit mã hóa được tạo ra. Trong một số trường hợp, các chuỗi nặng được tạo ra trong một tế bào và chuỗi nhẹ được tạo ra trong tế bào khác.

Các dòng tế bào của động vật có vú có sẵn là vật chủ để biểu hiện là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm nhiều dòng tế bào sống mãi lấy từ Trung tâm nuôi giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ (ATCC), Manassas, VA bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào HEK 293, tế bào NSO, tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng mới sinh (BHK), tế bào thận của khỉ (COS), tế bào gan carcinom của người (ví dụ, Hep G2), và nhiều dòng tế bào khác. Các tế bào không phải động vật có vú bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở vi khuẩn, nấm men, côn trùng, và thực vật cũng có thể được sử dụng để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp. Theo một số phương án, các kháng thể có thể được tạo ra ở các động vật chuyển gen như bò hoặc gà.

Các phương pháp chung đối với sinh học phân tử, biểu hiện, tinh chế, và sàng lọc kháng thể là đã biết, ví dụ, xem các Patent Mỹ số 4,816,567, 4,816,397, 6,331,415 và 7,923,221, cũng như tạo kháng thể bằng kỹ thuật di truyền, được mô tả bởi Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 and 2010 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; và Morrison, S. (1985) Science 229:1202.

Dược phẩm

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa một hoặc dạng kết hợp của các kháng thể LY75, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, được bào chế cùng với chất mang dược dụng. Các dược phẩm này có thể bao gồm một hoặc dạng kết hợp của kháng thể (ví dụ, hai hoặc nhiều thành phần khác nhau), hoặc thể tiếp hợp miễn dịch hoặc phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa dạng kết hợp của các kháng thể (hoặc thể tiếp hợp miễn

dịch hoặc đặc hiệu kép) gắn kết với các epitop khác nhau trên kháng nguyên đích hoặc có hoạt tính hỗ trợ.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được dùng trong trị liệu kết hợp, tức là kết hợp với các chất khác. Ví dụ, việc trị liệu kết hợp có thể bao gồm kháng thể theo sáng chế kết hợp với ít nhất một chất kháng khối u khác, hoặc chất kháng viêm hoặc ức chế miễn dịch. Ví dụ về các chất trị liệu có thể được sử dụng trong trị liệu kết hợp được mô tả chi tiết hơn dưới đây trong phần sử dụng các kháng thể theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “chất mang dược dụng” bao gồm dung môi bất kỳ và toàn bộ các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và chất kìm hãm sự hấp thu, và chất tương tự tương hợp về mặt sinh lý. Tốt hơn, nếu chất mang là thích hợp để dùng theo đường tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường phân giải, theo đường xương sống hoặc biểu bì (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền). Tùy thuộc vào đường dùng, hoạt chất, tức là kháng thể, thể tiếp hợp miễn dịch, hoặc phân tử đặc hiệu kép, có thể được bao trong nguyên liệu để bảo vệ hợp chất khỏi tác động của axit và các điều kiện tự nhiên khác có thể không phản ứng với hợp chất.

Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều muối dược dụng. “Muối dược dụng” dùng để chỉ muối có hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất gốc và không tạo ra độc tính không mong muốn bất kỳ [xem, ví dụ Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19]. Ví dụ về các muối như vậy bao gồm muối cộng axit và muối cộng bazơ. Muối cộng axit bao gồm các muối có nguồn gốc từ axit vô cơ không độc, như axit clohydric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phospho và các axit tương tự, cũng như có nguồn gốc từ các axit hữu cơ không độc như axit mono- và dicarboxylic béo, các axit alkanoic được thế phenyl, axit hydroxy alkanoic, axit thơm, axit sulfonic béo và thơm và các axit tương tự. Muối cộng bazơ bao gồm các muối có nguồn gốc từ kim loại kiềm thổ, như natri, kali, magie, canxi và các muối tương tự, cũng như có nguồn gốc từ amin hữu cơ không độc, như N,N'-đibenzyletylendiamin, N-metylglucamin, cloprocain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, procain và các amin tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm chất chống oxy hóa dược dụng. Ví dụ về chất chống oxy hóa dược dụng bao gồm: (1) chất chống oxy hóa tan trong nước,

như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfit, natri sulfit và các chất tương tự; (2) chất chống oxy hoá tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxylanisol được butyl hóa (BHA), hydroxytoluen được butyl hóa (BHT), lexitin, propyl galat, alpha-tocopherol, và các chất tương tự; và (3) chất càngh hóa kim loại, như axit xitric, axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA), sorbitol, axit tarttric, axit phosphoric, và các chất tương tự.

Ví dụ về chất mang trong nước hoặc không trong nước thích hợp có thể được dùng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm nước, etanol, c rượu polyhydric (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và các chất tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng, dầu thực vật, như dầu ôliu, và este hữu cơ dùng để tiêm, như etyl oleat. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất bao, như lexitin, bằng cách duy trì của kích thước hạt mong muốn trong trường hợp các thể phân tán, và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt.

Các dược phẩm này có thể còn chứa chất hỗ trợ như chất bảo quản, chất gây ẩm, chất tạo nhũ tương và chất phân tán. Việc ngăn ngừa sự có mặt của vi sinh vật có thể được đảm bảo bằng các phương pháp khử trùng, nêu trên, và bao gồm cả các chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clobutanol, phenol axit sorbic, và các chất tương tự. Cũng mong muốn dược phẩm bao gồm chất đặng trưng, như đường, natri clorua, và các chất tương tự. Ngoài ra, khả năng hấp thu kéo dài các dược phẩm dùng để tiêm có thể được tạo ra bằng cách chất làm chậm mức độ hấp thu như nhôm monostearat và gelatin.

Các chất mang dược dụng bao gồm các dung dịch hoặc thể phân tán trong nước vô trùng và bột vô trùng để điều chế tức thì các dung dịch hoặc thể phân tán tiêm vô trùng. Việc sử dụng các môi trường và các chất như vậy đối với dược chất là đã biết trong lĩnh vực này. Ngoại trừ trường hợp môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ không tương hợp với hoạt chất, việc sử dụng chúng trong dược phẩm theo sáng chế được bao hàm. Các hoạt chất khác có thể cũng được kết hợp vào dược phẩm.

Các dược phẩm điều trị thường phải vô trùng và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Dược phẩm có thể được bào chế ở dạng dung dịch, vi nhũ tương, liposom, hoặc khác cấu trúc theo trật tự khác thích hợp với nồng độ dược chất cao. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví

dụ, glyxerol, propylen glycol, và lỏng polyetylen glycol, và các chất tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất bao như lexitin, bằng cách duy trì của kích thước hạt mong muốn trong trường hợp thể phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong một số trường hợp, tốt hơn nếu được phẩm này bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong dược phẩm này. Khả năng hấp thu kéo dài của dược phẩm dùng để tiêm có thể được tạo ra bằng cách bao gồm các chất có khả năng làm chậm mức độ hấp thu, ví dụ, muối monostearat và gelatin.

Dung dịch tiêm vô trùng có thể được bào chế bằng cách đưa hoạt chất với lượng mong muốn trong dung môi thích hợp với một hoặc kết hợp các thành phần liên quan đã nêu trên, nếu cần, tiếp đó là vi lọc vô trùng. Nói chung, các thể phân tán được bào chế bằng cách đưa hoạt chất vào tá dược vô trùng chứa môi trường bazơ phân tán và các thành phần cần thiết khác liên quan đã nêu trên. Trong trường hợp bột vô trùng để bào chế dung dịch tiêm vô trùng, phương pháp bào chế được ưu tiên là sấy khô chân không và đông khô (làm khô lạnh) để tạo ra bột chứa hoạt chất cùng với thành phần mong muốn bổ sung khác thu được từ dung dịch đã lọc vô trùng trước đó.

Lượng hoạt chất có thể được kết hợp với chất mang để tạo ra dạng liều đơn có thể thay đổi tùy thuộc vào đối tượng cần điều trị, và đường dùng cụ thể. Lượng hoạt chất có thể được kết hợp với chất mang để tạo ra dạng liều đơn thường là lượng của dược phẩm tạo ra tác dụng điều trị. Nói chung, tính theo 100%, lượng này sẽ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 99% hoạt chất, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 70%, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1% đến 30% hoạt chất kết hợp với chất mang dược dụng.

Phác đồ dùng liều được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, dạng liều đơn lớn có thể được dùng, một số liều đã được chia có thể được dùng theo thời gian hoặc liều này có thể được giảm hoặc tăng theo tỷ lệ như được chỉ định bởi tình trạng điều trị. Đặc biệt có lợi nếu bào chế được dược phẩm dùng ngoài đường phân giải với dạng liều đơn vị để dễ dùng và đồng đều liều lượng. Dạng liều đơn vị như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ đơn vị riêng rẽ về mặt sinh lý thích hợp với liều lượng đơn vị đối với các đối tượng cần được điều trị; mỗi đơn vị này chứa lượng định trước của hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang dược dụng cần thiết. Việc mô tả dạng liều đơn vị theo sáng chế được đưa ra bởi và phụ thuộc trực tiếp vào (a) đặc tính duy nhất của hoạt chất và tác

dùng điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) hạn chế vốn có trong lĩnh vực kỹ thuật về hợp chất như hoạt chất để điều trị tính miễn cảm ở các cá thể.

Để dùng kháng thể, liều lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 100mg/kg, ví dụ, từ 0,001 đến 50mg/kg, từ 0,005 đến 20mg/kg, từ 0,01 đến 10mg/kg và tốt hơn là từ 0,01 đến 5mg/kg thể trọng của vật chủ. Ví dụ, liều lượng có thể là 0,05mg/kg thể trọng, 0,1mg/kg thể trọng, 0,3mg/kg thể trọng, 0,3mg/kg thể trọng, 0,5mg/kg thể trọng, 1mg/kg thể trọng, 2mg/kg thể trọng, 3mg/kg thể trọng, 4mg/kg thể trọng, 5mg/kg thể trọng, 6mg/kg thể trọng, 7mg/kg thể trọng, 8mg/kg thể trọng, 9mg/kg thể trọng, 10mg/kg thể trọng, 12mg/kg thể trọng, 15mg/kg thể trọng, 20mg/kg thể trọng, 25mg/kg thể trọng, 30mg/kg thể trọng, hoặc nằm trong khoảng 0,1 -20mg/kg, 0,5-15mg/kg, 1-10mg/kg, 2-8mg/kg, 3-7mg/kg, 4-6mg/kg. Phác đồ điều trị minh họa cần dùng 1 lần 1 ngày, 1 lần cách nhau 2 ngày, 1 lần 1 tuần, 1 lần cách nhau hai tuần, 1 lần cách nhau ba tuần, 1 lần cách nhau bốn tuần, 1 lần 1 tháng, 1 lần cách nhau 6 tuần, 1 lần cách nhau 3 tháng hoặc 1 lần cách nhau từ 3 đến 6 tháng. Tốt hơn, nếu phác đồ dùng liều kháng thể kháng LY75 theo sáng chế bao gồm 1mg/kg thể trọng hoặc 3mg/kg thể trọng thông qua đường tĩnh mạch, chứa kháng thể đã nêu bằng cách sử dụng một trong số các liệu trình dùng liều sau: (i) 6 liều dùng cách nhau 4 tuần, sau đó cứ ba tháng dùng 1 lần; (ii) cách nhau ba tuần; (iii) dùng 1 lần 3mg/kg thể trọng, tiếp đó là 1mg/kg thể trọng cách nhau ba tuần.

Theo một số phương pháp, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có độ đặc hiệu gắn kết khác nhau được dùng đồng thời, trong trường hợp liều lượng của mỗi kháng thể được dùng nằm trong khoảng đã nêu. Kháng thể thường được dùng nhiều lần. Khoảng cách giữa các liều đơn có thể là, ví dụ, hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, hằng tháng, cách nhau ba tháng, cách nhau sáu tháng, hoặc hằng năm. Khoảng cách dùng có thể cũng là đều đặn như được chỉ định bằng cách đo nồng độ máu của kháng thể với kháng nguyên đích ở đối tượng bị bệnh. Theo một số phương pháp, liều lượng được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể trong huyết tương là khoảng 1 -1000 $\mu\text{g/ml}$, 5-750 $\mu\text{g/ml}$, 10-600 $\mu\text{g/ml}$, 15-500 $\mu\text{g/ml}$, 20-400 $\mu\text{g/ml}$ và theo một số phương pháp là khoảng 25-300 $\mu\text{g/ml}$.

Theo cách khác, kháng thể có thể được dùng làm chế phẩm giải phóng kéo dài, trong trường hợp có thể dùng không thường xuyên. Liều lượng và tần số thay đổi tùy thuộc vào thời gian bán thải của kháng thể ở đối tượng bị bệnh. Nói chung, kháng thể người có thời gian bán thải kéo dài nhất, tiếp đó là kháng thể nhân tạo, kháng thể thể

kháng thể không phải của người. Liều lượng và tần số dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào việc điều trị là ngăn ngừa hoặc điều trị. Trong trường hợp ngăn ngừa, liều tương đối nhỏ được dùng trong khoảng thời gian dài cách nhau tương đối ít. Một số đối tượng bị bệnh tiếp tục nhận việc điều trị trong quãng đời còn lại của họ. Trong trường hợp điều trị, liều tương đối lớn ở khoảng cách nhau tương đối ngắn đôi khi cần cho tới khi quá trình tiến triển của bệnh thuyên giảm hoặc được kết thúc, và tốt hơn là cho tới khi đối tượng bị bệnh có các triệu chứng bệnh được cải thiện một phần hoặc hoàn toàn. Sau đó, đối tượng bị bệnh có thể được dùng phác đồ ngăn ngừa.

Nồng độ liều thực tế của các thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi để thu được lượng hoạt chất là hữu hiệu để đạt được đáp ứng điều trị mong muốn đối với đối tượng bị bệnh cụ thể, dược phẩm, và đường dùng, không độc với đối tượng bị bệnh. Nồng độ liều đã chọn sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố được động học bao gồm hoạt tính của dược phẩm cụ thể theo sáng chế được sử dụng, hoặc este, muối hoặc amit của chúng, đường dùng, thời điểm dùng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể cần dùng, khoảng thời gian điều trị, các dược chất khác, các hợp chất và/hoặc các chất sử dụng kết hợp với dược phẩm cụ thể đã dùng, tuổi tác, giới tính, khối lượng, tình trạng bệnh, tình hình sức khỏe tổng quát và tiền sử dùng dược chất của đối tượng bị bệnh cần điều trị, và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y khoa.

Tốt hơn, nếu “liều hữu hiệu có tác dụng điều trị” của kháng thể kháng LY75 theo sáng chế làm giảm mức độ trầm trọng của các triệu chứng của bệnh, làm tăng số lần và thời gian không xuất hiện triệu chứng bệnh, hoặc ngăn ngừa sự suy yếu hoặc mất khả năng do sự đau đớn của bệnh. Ví dụ, để điều trị khối u qua trung gian LY75, tốt hơn nếu “liều hữu hiệu có tác dụng điều trị” có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào hoặc khối u ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70% và còn tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 80% hoặc ít nhất khoảng 90%, đối với đối tượng không được điều trị. Khả năng ức chế sự phát triển của khối u của hợp chất có thể được đánh giá ở hệ thống mô hình động vật được dự đoán là có hiệu quả đối với khối u người. Theo cách khác, đặc tính của dược phẩm có thể được đánh giá bằng cách kiểm tra khả năng năng ức chế sự phát triển của tế bào của hợp chất, khả năng ức chế như vậy có thể được xác định in vitro bằng các thử nghiệm đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của hợp chất trị liệu có thể làm giảm kích

thước khối u, hoặc bằng cách khác cải thiện các triệu chứng ở đối tượng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định được lượng dựa trên các yếu tố như vậy theo đối tượng, mức độ trầm trọng của các triệu chứng của đối tượng, và được phẩm cụ thể hoặc đường dùng đã được chọn.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng theo một hoặc nhiều đường dùng bằng cách sử dụng một hoặc nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, đường dùng và/hoặc cách dùng sẽ thay đổi tùy thuộc vào kết quả mong muốn. Tốt hơn, nếu đường dùng đối với các kháng thể theo sáng chế bao gồm đường tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong màng bụng (IP), dưới da, xương sống hoặc đường dùng ngoài ruột khác, ví dụ bằng cách tiêm hoặc truyền. Thuật ngữ “dùng ngoài đường phân giải” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là đường dùng không phải trong ruột và khu trú, thường bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong vỏ, trong hốc, trong ổ mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng (IP), qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới hốc, dưới màng nhện, trong xương sống, trên màng cứng và trong xương ức.

Theo cách khác, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng theo đường ngoài đường phân giải, như đường dùng khu trú, biểu bì hoặc niêm mạc, ví dụ, qua mũi, qua đường miệng, âm đạo, trực tràng, dưới lưỡi hoặc khu trú.

Các hoạt chất có thể được bào chế với chất mang sẽ có tác dụng bảo vệ hợp chất kháng lại quá trình giải phóng nhanh, như dược phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm cấy ghép, cao dán qua da, và hệ phân phối vi nang. Polyme dễ bị vi sinh vật phá hủy, tương hợp sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp bào chế các dược phẩm đã được bảo hộ hoặc thường đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này [xem, ví dụ, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y].

Các dược phẩm điều trị có thể được dùng bằng các thiết bị y khoa đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm điều trị theo sáng chế có thể được dùng bằng thiết bị tiêm dưới da không cần kim tiêm, như các thiết bị được bộc lộ trong các Patent Mỹ số 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880;

4,790,824; hoặc 4,596,556. Ví dụ về các vật cấy ghép và mô đun đã biết là hữu ích theo sáng chế bao gồm: Patent Mỹ số 4,487,603, bộc lộ bơm vi truyền có khả năng cấy ghép để phân tán được chất với tốc độ kiểm soát; Patent Mỹ số 4,486,194, bộc lộ thiết bị điều trị để dùng được chất qua da; Patent Mỹ số 4,447,233, bộc lộ bơm truyền được chất để phân phối được chất với tốc độ truyền chính xác; Patent Mỹ số 4,447,224, bộc lộ thiết bị truyền theo dòng có khả năng cấy ghép biến đổi để phân phối được chất liên tục; Patent Mỹ số 4,439,196, bộc lộ hệ phân phối được chất thẩm thấu có nhiều khoang; và Patent Mỹ số 4,475,196, bộc lộ hệ phân phối được chất thẩm thấu. Các patent này được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Nhiều vật cấy ghép, hệ phân phối, và mô đun khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án nhất định, kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được bào chế để đảm bảo khả năng phân bố in vivo thích hợp. Ví dụ, hàng rào máu não (BBB) loại trừ nhiều hợp chất ưa nước ở mức cao. Để đảm bảo rằng các hợp chất điều trị theo sáng chế đi qua được BBB (nếu muốn), chúng có thể được bào chế, ví dụ, trong liposom. Đối với các phương pháp sản xuất liposom, xem, ví dụ các Patent Mỹ 4,522,811; 5,374,548; và 5,399,331. Liposom có thể chứa một hoặc nhiều gốc được vận chuyển vào các tế bào hoặc cơ quan cụ thể một cách có chọn lọc, do đó tăng cường quá trình phân phối được chất đích [xem, ví dụ V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685]. Các gốc hướng đích minh họa bao gồm folat hoặc biotin (xem, ví dụ Patent Mỹ 5,416,016.); mannoside [Umezawa et al. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]; các kháng thể [P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]; thụ thể chất hoạt động bề mặt protein A [Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]; p120 [Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090]; cũng xem K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Sử dụng và phương pháp

Các kháng thể, chế phẩm kháng thể và phương pháp theo sáng chế có nhiều lợi ích chẩn đoán và điều trị in vitro và in vivo kể cả chẩn đoán và điều trị các rối loạn do LY75 gây ra.

Theo một số phương án, các phân tử có thể được dùng các tế bào CHO trong môi trường nuôi cấy, in vitro hoặc ex vivo, hoặc cho người, ví dụ in vivo, để điều trị, ngăn

ngừa và chẩn đoán nhiều rối loạn. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” được dự định để bao gồm người và động vật không phải người. Động vật không phải người bao gồm toàn bộ động vật có xương sống, ví dụ, động vật có vú và động vật không phải có vú, như các loài linh trưởng không phải người, cừu, chó, mèo, bò, ngựa, gà, động vật lưỡng cư, và loài bò sát. Các đối tượng được ưu tiên bao gồm người có các rối loạn qua trung gian bởi hoạt tính LY75. Phương pháp là đặc biệt thích hợp để điều trị cho người có rối loạn kèm sự biểu hiện LY75 bất thường. Khi các kháng thể kháng LY75 được dùng cùng với chất khác, hai chất này có thể được dùng theo thứ tự hoặc đồng thời.

Khả năng gắn kết đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế với LY75, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng to phát hiện đặc hiệu sự biểu hiện của LY75 trên bề mặt của các tế bào và, hơn nữa, có thể được sử dụng để tinh chế LY75 bằng cách tinh chế ái lực miễn dịch.

Hơn thế nữa, sự biểu hiện của LY75 trên các tế bào khối u, các kháng thể, chế phẩm kháng thể và các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng bị rối loạn khối u khung thư, ví dụ, disorder được đặc trưng bởi sự có mặt của các tế bào khối u biểu hiện LY75 hoặc trong việc sản xuất được chất điều trị rối loạn như vậy bao gồm, ví dụ, ung thư dạ dày, ung thư thận, ung thư tuyến giáp, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư da, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư trực tràng, ung thư bàng quang, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư vú bao gồm ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, u tủy, bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính và bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, u bạch huyết không phải dạng Hodgkin, bao gồm DLBCL, u bạch huyết tế bào B, u bạch huyết có nang, u bạch huyết tế bào vỏ não, u bạch huyết của mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc (MALT), u bạch huyết tế bào T/tế bào B giàu mô bào, u bạch huyết Burkitt, u bạch huyết lympho bào tương, u bạch huyết lympho bào nhỏ, u bạch huyết vùng biên, u bạch huyết tế bào T, u bạch huyết tế bào T ngoại vi, u bạch huyết tế bào lớn tự ghép và u bạch huyết tế bào T miễn dịch-mạch máu. Đã chứng minh được rằng LY75 được nội hóa trong quá trình gắn kết với kháng thể như được minh họa trong Ví dụ 5 và 7 dưới đây, do đó có thể sử dụng các kháng thể theo sáng chế trong cơ chế mang hữu ích bất kỳ, ví dụ, phương pháp ADC, thể tiếp hợp phóng xạ miễn dịch, hoặc phương pháp ADEPT.

Theo một phương án, các kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng, mảnh kháng thể, Nanobody®, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép và chế phẩm, v.v...) theo sáng chế có

thể được sử dụng to phát hiện nồng độ LY75, hoặc nồng độ của các tế bào chứa LY75 trên bề mặt màng của chúng, sau đó các nồng độ này có thể liên quan với một số triệu chứng nhất định của bệnh. Theo cách khác, các kháng thể, thường được gọi là ADC, có thể được sử dụng để ức chế hoặc phong bế chức năng LY75, sau đó có thể liên quan đến việc ngăn ngừa hoặc cải thiện một số triệu chứng nhất định của bệnh, nhờ đó chỉ ra rằng LY75 là chất trung gian gây bệnh. Điều này có thể đạt được bằng cách cho mẫu và mẫu đối chứng tiếp xúc với kháng thể kháng LY75 trong các điều kiện cho phép tạo ra phức hợp giữa kháng thể và LY75. Các phức hợp bất kỳ đã được tạo ra giữa kháng thể và LY75 được phát hiện và so sánh trong mẫu và đối chứng.

Theo phương án khác, các kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép và chế phẩm) theo sáng chế có thể là vào lúc đầu được thử nghiệm về hoạt tính liên kết có liên quan đến việc sử dụng trong điều trị hoặc chẩn đoán in vitro. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm này đo dòng chảy tế bào được mô tả trong Ví dụ dưới đây.

Các kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép, thể tiếp hợp miễn dịch và chế phẩm) theo sáng chế có lợi ích khác trong việc trị liệu và chẩn đoán các bệnh liên quan đến LY75. Ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép và thể tiếp hợp miễn dịch có thể được sử dụng để tạo ra một hoặc nhiều hoạt tính sinh học in vivo hoặc in vitro: để ức chế sự phát triển của và/hoặc tiêu diệt tế bào biểu hiện LY75; qua trung gian quá trình thực bào hoặc ADCC của tế bào biểu hiện LY75 với sự có mặt của tế bào tác động của người, hoặc để phong bế phối tử LY75 với LY75.

Theo phương án cụ thể, các kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép và chế phẩm) được sử dụng in vivo để điều trị, ngăn ngừa hoặc chẩn đoán nhiều bệnh liên quan đến LY75. Ví dụ về các bệnh liên quan đến LY75 bao gồm, trong số các bệnh khác, các mô ung thư của người biểu hiện ung thư dạ dày, ung thư trực tràng, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư vú, ung thư buồng trứng ung thư thận, ung thư tuyến giáp, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư da, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư bàng quang, u tủy, bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, u bạch huyết không phải dạng Hodgkin, bao gồm DLBCL, u bạch huyết tế bào B, u bạch huyết có nang, u bạch huyết tế bào vỏ não, u bạch huyết của mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc (MALT), u bạch huyết tế bào T/tế bào

B giàu mô bào, u bạch huyết Burkitt, u bạch huyết lympho-bào tương, u bạch huyết lympho bào nhỏ, u bạch huyết vùng biên, u bạch huyết tế bào T, u bạch huyết tế bào T ngoại vi, u bạch huyết tế bào lớn tự ghép và u bạch huyết tế bào T miễn dịch-mạch máu và ung thư phổi.

Đường dùng chế phẩm kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép và thể tiếp hợp miễn dịch) thích hợp theo sáng chế in vivo và in vitro đã biết trong lĩnh vực này và có thể được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, chế phẩm kháng thể có thể được dùng bằng cách tiêm (ví dụ, tĩnh mạch hoặc dưới da). Liều thích hợp của các phân tử đã dùng sẽ phụ thuộc vào tuổi tác và thể trọng của đối tượng và nồng độ và/hoặc được phẩm chứa chế phẩm kháng thể.

Như được mô tả trước đó, kháng thể kháng LY75 theo sáng chế có thể được dùng đồng thời với một hoặc nhiều chất trị liệu khác, ví dụ, chất gây độc tế bào, chất gây độc phóng xạ hoặc chất kìm hãm miễn dịch. Kháng thể có thể được liên kết với chất (như phức hợp miễn dịch) hoặc có thể được dùng riêng biệt với chất. Trong trường hợp khác về sau (dùng riêng rẽ), kháng thể có thể được dùng trước, sau hoặc đồng thời với chất này hoặc có thể được dùng đồng thời với phương pháp điều trị đã biết khác, ví dụ, trị liệu kháng ung thư, ví dụ, phóng xạ. Các chất trị liệu như vậy bao gồm, trong số các chất khác, chất kháng ung thư như doxorubicin (adriamycin), xisplatin bleomycin sulfat, carmustine, clorambuxil, và xyclophosphamid hydroxyure, mà bản thân chúng chỉ có tác dụng ở nồng độ gây độc hoặc cận gây độc cho đối tượng bị bệnh. Xisplatin được dùng trong tĩnh mạch với liều 100mg/kg, 1 lần cách nhau bốn tuần và adriamycin được dùng trong tĩnh mạch với liều 60-75mg/ml, cách nhau 21 ngày. Các chất khác thích hợp để dùng đồng thời với các kháng thể theo sáng chế bao gồm các chất khác sử dụng để điều trị ung thư, ví dụ, ung thư dạ dày, ung thư trực tràng, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư vú, ung thư buồng trứng hoặc ung thư phổi, như Avastin®, 5FU và gemcitabine. Việc dùng đồng thời kháng thể kháng LY75 hoặc kháng nguyên gắn kết các mảnh của chúng theo sáng chế cùng với tác nhân hóa trị liệu với hai chất kháng ung thư hoạt động qua các cơ chế khác nhau để tạo ra tác dụng gây độc tế bào khối u ở người. Việc dùng đồng thời như vậy có thể giải quyết được các vấn đề do sự phát triển về tính kháng được chất hoặc sự thay đổi về tính kháng nguyên của các tế bào khối u làm cho chúng không phản ứng với kháng thể.

Tế bào tác động đặc hiệu đích, ví dụ, tế bào tác động được liên kết với chế phẩm (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép) theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm các chất trị liệu. Tế bào tác động để hướng có thể là bạch cầu của người như đại thực bào, bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu đơn nhân. Các tế bào khác bao gồm các tế bào ưa eosin, tế bào tiêu diệt tự nhiên và tế bào mang thụ thể IgG hoặc IgA khác. Nếu muốn, tế bào tác động có thể thu được từ đối tượng cần được điều trị. Tế bào tác động đặc hiệu đích có thể được dùng làm hỗn dịch chứa các tế bào trong dung dịch được chấp nhận về mặt sinh lý. Nhiều tế bào đã dùng có thể có mật độ 10^8 - 10^9 , nhưng sẽ thay đổi tùy thuộc vào mục đích điều trị. Nói chung, lượng này là đủ để thu được vị trí ở tế bào đích, ví dụ, khối u tế bào biểu hiện LY75, và để có tác dụng tiêu diệt tế bào bằng cách, ví dụ, thực bào. Đường dùng có thể cũng thay đổi.

Việc trị liệu bằng tế bào tác động đặc hiệu đích có thể được thực hiện kết hợp với các kỹ thuật khác để loại bỏ các tế bào đích. Ví dụ, việc trị liệu kháng khối u bằng cách sử dụng chế phẩm (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép) theo sáng chế và/hoặc tế bào tác động gắn với các chế phẩm này có thể được sử dụng kết hợp với phương pháp hóa trị liệu. Ngoài ra, phương pháp trị liệu miễn dịch kết hợp có thể được sử dụng để hướng tới hai nhóm tác dụng gây độc tế bào riêng biệt hướng tới sự đào thải tế bào khối u. Ví dụ, kháng thể kháng LY75 được liên kết với kháng Fc-gamma R1 hoặc kháng CD3 có thể được sử dụng kết hợp với chất gắn kết đặc hiệu với thụ thể IgG hoặc IgA.

Phân tử đặc hiệu kép và đa đặc hiệu theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều hòa nồng độ FcγR hoặc FcγR trên tế bào tác động, như bằng cách chụp và loại bỏ các thụ thể trên bề mặt tế bào. Hỗn hợp gồm các thụ thể kháng Fc cũng có thể được sử dụng nhằm mục đích này.

Chế phẩm (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép và thể tiếp hợp miễn dịch) theo sáng chế có vị trí liên kết bổ thể, như các phân tử IgG1, IgG2, hoặc IgG3 hoặc IgM mà gắn kết với bổ thể, cũng có thể được sử dụng khi có mặt bổ thể. Theo một phương án, việc điều trị ex vivo của nhóm các tế bào chứa các tế bào đích với các chất gắn kết theo sáng chế và tế bào tác động thích hợp có thể được bổ sung bằng cách bổ sung bổ thể hoặc bổ thể chứa huyết thanh. Quá trình thực bào các tế bào đích đã được phủ bằng các chất gắn kết theo sáng chế có thể được cải thiện bằng cách gắn kết với

các protein bề mặt. Theo phương án khác, các tế bào đích đã được phủ bằng chế phẩm (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép) theo sáng chế có thể cũng được phân giải bởi bề mặt. Vẫn theo phương án khác, chế phẩm theo sáng chế không phản ứng với bề mặt.

Chế phẩm (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép và thể tiếp hợp miễn dịch) theo sáng chế có thể cũng được dùng cùng với bề mặt. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa các kháng thể, phân tử đa đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép và huyết thanh hoặc bề mặt. Các chế phẩm này có thể là hữu ích khi bề mặt này nằm ở vị trí gần với các kháng thể, phân tử đa đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép. Theo cách khác, các kháng thể, phân tử đa đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép theo sáng chế và bề mặt hoặc huyết thanh có thể được dùng riêng rẽ.

Phạm vi của sáng chế cũng bao gồm kit chứa chế phẩm kháng thể theo sáng chế (ví dụ, kháng thể đơn dòng, phân tử đa đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch) và hướng dẫn sử dụng. Kit này có thể còn chứa một hoặc nhiều chất phản ứng bổ sung, như chất phản ứng kìm hãm miễn dịch, chất gây độc tế bào hoặc chất gây độc phóng xạ, hoặc một hoặc nhiều kháng thể khác theo sáng chế (ví dụ, kháng thể có hoạt tính bổ trợ gắn kết với epitop trong kháng nguyên LY75 khác với kháng thể thứ nhất).

Do đó, các đối tượng bị bệnh đã được điều trị bằng chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế có thể được dùng theo cách khác (trước khi, đồng thời với, hoặc sau khi dùng của kháng thể theo sáng chế) với chất trị liệu khác, như chất gây độc tế bào hoặc chất gây độc phóng xạ, tăng cường hoặc gia tăng tác dụng điều trị của các kháng thể.

Theo các phương án khác, đối tượng có thể được điều trị theo cách khác bằng chất có tác dụng điều biến, ví dụ, tăng cường hoặc ức chế, sự biểu hiện hoặc hoạt tính của các thụ thể Fcγ hoặc Fcγ bằng cách, ví dụ, cho đối tượng điều trị bằng xytokin. Tốt hơn, nếu xytokin để dùng trong quá trình điều trị bằng phân tử đa đặc hiệu bao gồm yếu tố kích thích tạo khuẩn lạc bạch cầu hạt (G-CSF), yếu tố kích thích tạo khuẩn lạc bạch cầu hạt đại thực bào (GM-CSF), interferon-γ (IFN-γ), và yếu tố gây hoại tử khối u (TNF).

Chế phẩm (ví dụ, kháng thể, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép) theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để các tế bào đích biểu hiện FcγR hoặc LY75, ví dụ, để đánh dấu các tế bào này. Nhằm mục đích sử dụng này, các chất gắn kết có thể được liên kết với phân tử mà có thể phát hiện được. Do đó, sáng chế đề cập đến các phương pháp định

vị ex vivo hoặc in vitro các tế bào biểu hiện các thụ thể Fc, như FcγR, hoặc LY75. Chất đánh dấu để phát hiện được có thể là, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, hợp chất phát huỳnh quang, enzym, hoặc đồng yếu tố enzym.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của kháng nguyên LY75 trong mẫu, hoặc đo lượng kháng nguyên LY75, bao gồm bước cho mẫu, và mẫu đối chứng, tiếp xúc với kháng thể đơn dòng, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, đặc hiệu gắn kết với LY75, trong các điều kiện cho phép tạo ra phức hợp giữa kháng thể hoặc phần của nó và LY75. Sau đó, quá trình tạo ra phức hợp được phát hiện, trong đó sự tạo ra phức hợp khác nhau giữa mẫu so với mẫu đối chứng là dấu hiệu về sự có mặt của kháng nguyên LY75 trong mẫu này.

Theo các phương án khác, sáng chế mô tả các phương pháp điều trị rối loạn do LY75 gây ra ở đối tượng, ví dụ, ung thư ở người, bao gồm ung thư dạ dày, ung thư thận, ung thư tuyến giáp, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư da, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư trực tràng, ung thư bàng quang, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư vú bao gồm ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, u tủy, bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính và bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, và u bạch huyết không phải dạng Hodgkin, bao gồm DLBCL, u bạch huyết tế bào B, u bạch huyết có nang, u bạch huyết tế bào vỏ não, u bạch huyết của mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc (MALT), u bạch huyết tế bào T/tế bào B giàu mô bào, u bạch huyết Burkitt, u bạch huyết lympho-bào tương, u bạch huyết lympho bào nhỏ, u bạch huyết vùng biên, u bạch huyết tế bào T, u bạch huyết tế bào T ngoại vi, u bạch huyết tế bào lớn tự ghép và u bạch huyết tế bào T miễn dịch-mạch máu.

Theo toàn bộ các phương án của sáng chế, tốt hơn nếu ung thư bao gồm u bạch huyết không phải dạng Hodgkin, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính và ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormone, ung thư bàng quang và ung thư tụy.

Toàn bộ các tài liệu được nêu trong bản mô tả này, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở toàn bộ giấy tờ, công bố đơn, patent, đơn yêu cầu cấp patent, chứng từ, bài văn, thông báo, bản viết tay, tập sách mỏng, sách, bưu gửi qua mạng internet, bài báo, tạp chí, bảng ghi sự kiện về sản phẩm, và các chất tương tự, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Việc bàn luận về các tài liệu này được dự định chỉ để tổng kết các tuyên bố của

tác giả của các tài liệu này và không được mà tài liệu bất kỳ tạo nên tình trạng kỹ thuật và bảo lưu quyền của Người nộp đơn để đòi hỏi độ chính xác và tính hợp lý của các tài liệu đã nêu.

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết hơn bằng cách minh họa và ví dụ để nhằm mục đích làm rõ sự hiểu biết, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rõ ràng là hiển nhiên trong việc đề cập sáng chế này mà các biến đổi và cải biến có thể được thực hiện mà không nằm ngoài phạm vi hoặc ý tưởng của các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa tiếp bằng các ví dụ dưới đây nhưng không nhằm mục đích giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1: Sản xuất kháng thể đơn dòng của người kháng kháng nguyên LY75

Theo các phương pháp tiêu chuẩn sau, chuột nhắt (chuột nhắt dị ghép IgG1) được tạo miễn dịch bằng các tế bào CHO đã được gây nhiễm bằng LY75 có chiều dài đầy đủ.

Độ đặc hiệu của các kháng thể kháng LY75 được thử nghiệm bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy trên các tế bào HEK293 đã được gây nhiễm bằng LY75 và sau đó trên các tế bào HT29 biểu hiện LY75. Để thử nghiệm khả năng gắn kết của các kháng thể với protein LY75 bề mặt tế bào, các kháng thể này được ủ với các tế bào biểu hiện LY75. Các tế bào này được rửa trong dung dịch đệm FACS (DPBS, 2% FBS), ly tâm và được tạo hỗn dịch lại trong 100µl kháng thể LY75 sơ cấp đã được pha loãng (như được pha loãng trong dung dịch đệm FACS). Phức hợp kháng thể-dòng tế bào được ủ trên băng trong 60 phút và sau đó được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS như được mô tả trên đây. Viên tế bào-kháng thể được tạo hỗn dịch lại trong 100µl kháng thể thứ cấp đã được pha loãng (như được pha loãng trong dung dịch đệm FACS) và ủ trên băng trong 60 phút trên băng. Viên này được rửa trước đó và được tạo hỗn dịch lại trong 200µl dung dịch đệm FACS. Các mẫu được đưa lên máy đo dòng tế bào BD FACScanto II và dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm BD FACSDiva (kết quả không được thể hiện).

Ví dụ 2: Mô tả đặc điểm cấu trúc của kháng thể đơn dòng với LY75

Các trình tự cADN mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng LY75_A1 thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR tiêu chuẩn và được sắp trình tự bằng cách sử dụng kỹ thuật tạo trình tự ADN tiêu chuẩn.

Các trình tự kháng thể có thể được tạo đột biến để biến đổi ngược thành các gốc mầm phôi ở một hoặc nhiều gốc.

Trình tự nucleotit và axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của LY75_A1 được nêu lần lượt trong SEQ ID NO.3 và 1.

Trình tự nucleotit và axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của LY75_A1 được nêu lần lượt trong SEQ ID NO.4 và 2.

Việc so sánh trình tự chuỗi nặng LY75_A1 của globulin với trình tự chuỗi nặng của globulin mầm phôi người đã biết đã chứng minh được rằng chuỗi nặng LY75_A1 sử dụng đoạn VH từ VH 3-15 của mầm phôi người và đoạn JH từ J_H JH4 của mầm phôi người. Hơn nữa, việc phân tích trình tự VH của LY75_A1 bằng cách sử dụng hệ Kabat của vùng xác định CDR sẽ mô tả được các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 chuỗi nặng như được nêu lần lượt trong SEQ ID NO.5, 6 và 7. Việc sắp trình tự của các trình tự V_H của CDR1, CDR2 và CDR3 của LY75_A1 với trình tự V_H 3-15 của mầm phôi và trình tự J_H JH4 của mầm phôi được thể hiện trên Fig.1.

Việc so sánh trình tự chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch của LY75_A1 với trình tự chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch của mầm phôi người đã biết đã chứng minh được rằng chuỗi nhẹ của LY75_A1 sử dụng đoạn V_K từ đoạn V_K O12 của mầm phôi người và đoạn JK từ J_K JK4 của mầm phôi người. Hơn nữa, việc phân tích trình tự V_K LY75_A1 bằng cách sử dụng hệ Kabat của vùng xác định CDR sẽ mô tả được vùng CDR1, CDR2 và CDR3 chuỗi nhẹ như được nêu lần lượt trong các SEQ ID NO.8, 9 và 10. Việc sắp trình tự V_K của CDR1, CDR2 và CDR3 của LY75_A1 với trình tự V_K O12 của mầm phôi và trình tự J_K JK4 của mầm phôi được thể hiện trên Fig. 2.

Ví dụ 3: Thử nghiệm hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng LY75

Bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng của người đặc hiệu với LY75, thử nghiệm hóa mô miễn dịch được thực hiện trên các viên tế bào FFPE HT-29 và A549, mảng u bạch huyết không phải dạng Hodgkin FFPE và ung thư tụy, và các khối u u bạch

huyết/bệnh bạch cầu mới được làm đông lạnh, các phần của ung thư buồng trứng, ung thư tụy, và ung thư vú và mảng mô khỏe mạnh.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Xylen (X5P-1 gal) do Fisher Scientific, PA, United States of America cung cấp.

Histoprep 100% etanol (HC-800-1 GAL) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Dung dịch đệm xitrat 10x để phục hồi epitop đã được cảm ứng nhiệt (AP9003125) do Thermo Scientific, MA, USA cung cấp.

Chất kim hãm Thermo Scientific* Pierce* peroxidaza (35000) do Thermo Scientific, MA, USA cung cấp.

Khối protein không chứa huyết thanh (X0909) do Dako, CA, USA cung cấp

Kháng thể thứ cấp: thể tiếp hợp IgG Fab-FITC kháng người của dê (109-097-003) do Jackson ImmunoResearch, PA, USA cung cấp

IgG người tinh khiết chứa crom, toàn bộ phân tử (09-000-003) do Jackson ImmunoResearch, PA, USA cung cấp

Kháng thể tam cấp: kháng FITC của chuột nhắt (ab10257) do Abcam, MA, USA cung cấp

Isotyp IgG đối chứng đã được tinh chế của người (1 -001 A) do R&D Systems, MN, USA cung cấp

Tween-20 (BP337-100) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp

Axeton (BP2403-4) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp

Polyme được tạo tiếp hợp EnVision+HRP liên kết kép, của chuột nhắt và thỏ (K4063) do Dako, CA, USA cung cấp. Kit dung dịch DAB 2 (882014) do Invitrogen, NY, USA cung cấp.

Harris Hematoxylin (23-245-677) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường Faramount mounting (S302580) do Dako, CA, USA cung cấp.

Các phần và mảng mô được mua từ US Biomax Inc., MD, USA hoặc Origene, MD, USA.

Tạo ra lam kính FFPE: Khử parafin hóa và tái hydrat hoá

Các lam kính FFPE được khử parafin hóa trong xylen (2 x 3 phút), sau đó tái hydrat hoá trong xylen: 100% etanol với tỷ lệ 1:1 (1 x 3 phút), 100% etanol (2 x 3 phút), 95% etanol (1 x 3 phút), 70% etanol (1 x 3 phút), 50% etanol (1 x 3 phút), và nước máy (1 x 3 phút).

Sản xuất lam kính FFPE: Phục hồi kháng nguyên (Vi sóng).

Kháng nguyên LY75 được phục hồi bằng cách sử dụng nhiệt vi sóng, công suất cao cho tới khi sôi, sau đó ở công suất thấp trong 10 phút trong 50mL dung dịch đệm xitrat 1 lần trong bình Coplin. Sau đó, các lam kính được để nguội tới nhiệt độ phòng trong 15 phút nữa, sau đó rửa bằng nước máy, 3 phút. Các vòng được vẽ quanh mỗi phần mô/TMA bằng bút cân nước và sau đó, các lam kính rửa 3 lần trong PBS, mỗi lam kính rửa 3 phút.

Tạo ra lam kính FF

Các lam kính được lấy ra từ khu bảo quản ở -80°C và để khô ở nhiệt độ phòng trong tủ hút khí độc trong 20-30 phút. Các lam kính này được để cố định trong 10 phút trong axeton băng lạnh ở -20°C , sau đó để khô trong 20 phút trong tủ hút khí độc ở nhiệt độ phòng. Các lam kính này được rửa và tái hydrat hoá trong PBS, mỗi lam kính được rửa 3 lần trong 3 phút. Các phần được vẽ bằng bút cân nước.

Tạo ra phức hợp kháng thể

Kháng thể sơ cấp kháng LY75 được pha loãng trong khối protein không chứa huyết thanh (SFPB) để thu được dung dịch có nồng độ lớn hơn gấp 20 lần so với nồng độ mong muốn cuối cùng (20 $\mu\text{g/mL}$ đối với nồng độ cuối cùng 1 $\mu\text{g/mL}$). Kháng thể thứ cấp, mảnh gắn kết với kháng nguyên (Fab) của globulin miễn dịch G (IgG) kháng người của dê, được điều chế tương tự trong SFPB để tạo ra dung dịch chứa nồng độ tương đương.

Thế tích tương đương của kháng thể sơ cấp và thứ cấp được kết hợp trong ống đã được đánh dấu, được trộn nhẹ, và ủ trong 3 phút ở nhiệt độ phòng, làm cho kháng thể sơ cấp có nồng độ lớn hơn gấp 10 lần so với nồng độ cuối cùng mong muốn (10 $\mu\text{g/mL}$ đối với nồng độ cuối cùng 1 $\mu\text{g/mL}$). Hỗn hợp này được pha loãng theo tỷ lệ 1:5 bằng SFPB, được trộn nhẹ, và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, làm cho kháng thể sơ cấp có nồng độ

gấp hai lần so với nồng độ cuối cùng mong muốn (2 $\mu\text{g/mL}$ đối với nồng độ cuối cùng 1 $\mu\text{g/mL}$).

Để tạo ra phức hợp nhuộm cuối cùng, dung dịch 1% (10 $\mu\text{g } \mu\text{L}$) chứa IgG người được tạo ra trong SFPB và thể tích tương đương được bổ sung vào hỗn hợp kháng thể sơ cấp/kháng thể thứ cấp. Việc kết hợp này được trộn nhẹ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, pha loãng một nửa nồng độ kháng thể sơ cấp của hỗn hợp kháng thể sơ cấp/kháng thể thứ cấp và tạo ra nồng độ kháng thể sơ cấp cuối cùng mong muốn (1 $\mu\text{g/mL}$).

Nhuộm miễn dịch

Đồng thời, hoạt tính peroxidaza của mô nội sinh được phong bế bằng cách ủ các mô bằng chất kìm hãm peroxidaza trong 5-10 phút ở nhiệt độ phòng trong buồng ẩm. Sau đó, các lam kính này được rửa trong PBS, mỗi lam kính rửa 3 lần trong 3 phút. Các mô này được ủ trong SFPB trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong buồng ẩm. Phức hợp nhuộm cuối cùng được dùng cho mỗi phần mô và/hoặc vi mảnh, và các lam kính này được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong buồng ẩm. Sau đó, các lam kính này được rửa một lần trong PBS và một lần trong PBST (PBS+0,125% Tween-20), mỗi lam kính được rửa trong 3 phút. Kháng thể tam cấp kháng FITC của chuột nhắt, được dùng với nồng độ 2 $\mu\text{g/mL}$ trong 30 phút, nhiệt độ phòng, trong buồng ẩm. Sau đó, các phần được rửa một lần trong PBS và một lần trong PBST, mỗi phần được rửa trong 3 phút. Sau đó, polyme được tạo tiếp hợp EnVision+ kháng chuột nhắt liên kết kép/HRP của thỏ được dùng cho các mô và các lam kính này được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong buồng ẩm. Sau đó, các lam kính này rửa một lần trong PBS, một lần trong PBST, mỗi phần được rửa trong 3 phút. Các mô này được ủ trong dung dịch DAB đã được tạo ra theo hướng dẫn của nhà sản xuất ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, các lam kính này được rửa một lần ở nước máy đang chảy trong 2 phút và một lần trong PBS trong 3 phút. Các lam kính này được nhuộm tương phản bằng Hematoxylin trong 30 giây ở nhiệt độ phòng, và được rửa bằng nước máy đang chảy. Các lam kính này được làm khô ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và sau đó các miếng thủy tinh bảo vệ được lắp lên trên các lam kính bằng cách sử dụng môi trường Faramount mounting.

Kết quả

Nhận thấy rằng LY75_A1 là dương tính trong các mẫu ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon FFPE, trong đó 77% phần cho kết quả nhuộm dương tính và 55% cho kết quả nhuộm dương tính mạnh (+++).

Nói chung, khả năng nhuộm LY75 trong các mô khỏe mạnh FF thường không xuất hiện đến mức rất thấp. Biểu mô ống ngực, tuyến nước bọt, và tụy có khả năng nhuộm rất nhỏ đến vừa phải, và lá lách đã nhuộm cho kết quả dương tính thấp. Do đó, các kháng thể hướng đích LY75 có thể có lợi để dùng trong phương pháp điều trị và chẩn đoán trong một số thử nghiệm ung thư và các loại ung thư khác có biểu hiện LY75.

Ví dụ 4: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 trong các tế bào HT-29

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp. PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT- 10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy tới nồng độ của 1e5 tế bào/mL.

50µL hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ gấp 3 lần) tương ứng với nồng độ 0-20 nM (gấp hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường (đối với các mẫu không được xử lý) (50µL/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200µL/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa này được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời, dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa này được gõ nhẹ và được rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để sản xuất viên tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa này được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Các kết quả được mô tả trên Fig.3a chỉ ra rằng nhóm nhỏ các kháng thể, có khả năng gắn kết với LY75, có thể có khả năng tiêu diệt tế bào HT-29. Điều này gợi ý rằng trong khi các kháng thể có thể gắn kết với LY75 chỉ có hiệu quả biểu hiện rất nhỏ so với khi được tiếp hợp với DM1. Sau đó, các kháng thể được chọn từ nhóm nhỏ được phân tích hoạt tính gây độc tế bào tiếp.

Ví dụ 5: Hiệu quả của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 trong các tế bào ung thư trực tràng

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp. PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ là 1e5 tế bào/mL. 50 μ L hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng các nồng độ 0-20 nM (gấp hai lần nồng độ thử

nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50 μ L/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200 μ L/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời, dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3b chỉ ra rằng các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào HT-29 có hoạt tính gây độc tế bào. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể và các kháng thể kháng LY75 khác được tiếp hợp với độc tố (được chọn từ Ví dụ 1).

Ví dụ 6: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 trong các dòng tế bào u bạch huyết

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp. PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các

viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1×10^5 tế bào/mL.

50 μ L hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch.

Các kháng thể này được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (gấp hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50 μ L/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200 μ L/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời, dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3c chỉ ra rằng các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào RAJI có hoạt tính gây độc tế bào. Fig.3d chỉ ra hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào Namalwa. Fig.3e có hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào Karpas 299. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể và các kháng thể kháng LY75 khác được tiếp hợp với DM1 và DM4 (được chọn từ Ví dụ 1).

Ví dụ 7: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 trong dòng tế bào ung thư tụy

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp. PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào này được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5×10^3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10×10^3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1×10^5 tế bào/mL.

50 μ L hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể này được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50 μ L/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200 μ L/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3f thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào BxPC3. Fig.3g thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào HupT4.

Fig.3h thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào HPAAFFII. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể và các kháng thể kháng LY75 khác được tiếp hợp với DM1 và DM4 (được chọn từ Ví dụ 1).

Ví dụ 8: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở dòng tế bào bạch cầu lympho bào mạn tính

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1e5 tế bào/mL.

50μL hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch.

Các kháng thể này được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50μL/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200μL/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100μL

PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3i thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới tế bào EHEB. Fig. 3j thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới tế bào Mec-1. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể và các kháng thể kháng LY75 khác được tiếp hợp với DM1 và DM4 (được chọn từ Ví dụ 1).

Ví dụ 9: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở các dòng tế bào bạch cầu đơn nhân cấp tính

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1e5 tế bào/mL.

50 μ L hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể này được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm

(nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50 μ L/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200 μ L/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3k thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào AML-193. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể và các kháng thể kháng LY75 khác được tiếp hợp với DM1 và DM4 (được chọn từ Ví dụ 1).

Ví dụ 10: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở các dòng tế bào ung thư vú

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có

thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như $10e3$ tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới $1e5$ tế bào/mL.

50 μ L hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch.

Các kháng thể được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50 μ L/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200 μ L/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3l thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào HCC 70 (âm tính với ER, PR và Her2). Fig.3m thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào HCC 1806 (âm tính với ER, PR và Her2). Fig.3n thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào MDA-MB-468. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể.

Ví dụ 11: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở các dòng tế bào ung thư bàng quang

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào này được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5×10^3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10×10^3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1×10^5 tế bào/mL.

50 μ L hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50 μ L/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200 μ L/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3o thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào RT4. Fig.3p thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào 5637. Fig.3q

thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào SW780. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể.

Ví dụ 12: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở các dòng tế bào ung thư đầu và cổ

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1e5 tế bào/mL.

50µL hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể này được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50µL/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200µL/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100µL PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100µL PBS/giếng và 100µL Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và

được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3r thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới SCC-9 các tế bào. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể.

Ví dụ 13: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở các dòng tế bào ung thư thực quản

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT- 10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1e5 tế bào/mL.

50µL hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể này được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50µL/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200µL/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3s thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới OE 19 các tế bào. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể.

Ví dụ 14: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở các dòng tế bào ung thư buồng trứng

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào này được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1e5 tế bào/mL.

50 μ L hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ

thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50 μ L/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200 μ L/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100 μ L PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100 μ L PBS/giếng và 100 μ L Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3t thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào OVCAR-3. Fig.3u thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào SK-OV-3. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể.

Ví dụ 15: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở các dòng tế bào đa u tủy

Nguyên liệu

Thiết bị tách tế bào (Phân tách tế bào không cần enzym) (MT-25-056CI) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

PBS ở độ pH=7,4 (1X) (SH30028LS) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Môi trường RPMI 1640 (MT-10-041-CM) do Fisher Scientific, PA, USA cung cấp.

Cell Titer Glo (G7572) do Promega, WI, USA cung cấp.

Phương pháp

Các tế bào được phân tách bằng cách sử dụng thiết bị tách tế bào và được đếm. 5e3 tế bào/giếng được quay tròn thành viên (đối với các tế bào hỗn dịch, nhiều tế bào có

thể được sử dụng tùy thuộc vào thời gian nhân đôi tế bào, như 10e3 tế bào/giếng). Các viên này được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy để nồng độ đạt tới 1e5 tế bào/mL.

50µL hỗn dịch tế bào/giếng được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 giếng có mặt bên màu trắng, có đáy sạch. Các kháng thể được pha loãng và được chuẩn độ tới 8 điểm (nồng độ chuẩn độ cao gấp 3 lần) tương ứng với các nồng độ 0-20 nM (hai lần nồng độ thử nghiệm). Các kháng thể đã được pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy (đối với các mẫu không được xử lý) (50µL/giếng) được bổ sung vào các lỗ thích hợp. Môi trường dư (200µL/giếng) được bổ sung vào các hàng và cột bên ngoài của các đĩa để ngăn ngừa quá trình bay hơi. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời dung dịch Cell Titer Glo được làm tan. Các đĩa được gõ nhẹ và rửa 1 lần bằng 100µL PBS/giếng (đối với các tế bào hỗn dịch, trước tiên đĩa này được ly tâm để tạo hạt các tế bào). 100µL PBS/giếng và 100µL Cell Titer Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được nghiền nhỏ để trộn. Các đĩa được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được quan sát bằng kính hiển vi để đảm bảo xảy ra quá trình phân giải tế bào. Sau đó, các đĩa được đọc trên phát quang kế Glomax.

Kết quả

Fig.3v thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào MOLP-8. Fig.3w thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của các kháng thể kháng LY75 tiếp hợp với DM1 và DM4 hướng tới các tế bào RPMI8226. Các kết quả này chứng tỏ rằng mức tăng hoạt tính gây độc tế bào tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể.

Ví dụ 16: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở mô hình dị ghép Raji

Tác dụng của LY75_DM1 và LY75_DM4 được thử nghiệm ở mô hình dị ghép của chuột nhắt SCID bị u bạch huyết Burkitt Raji dưới da.

Chuột nhắt SCID thiếu hụt miễn dịch được tạo miễn dịch dưới da bằng các tế bào khối u Raji (u bạch huyết Burkitt người). Các khối u được hình thành và các con chuột được chia vào năm nhóm điều trị, 3-6 con/nhóm. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới

kích thước trung bình là 129-132 mm³/nhóm, mỗi nhóm này được điều trị bằng một trong số các hợp chất sau, được dùng trong tĩnh mạch với liều đã định: nhóm 1 (Tá dược; nước muối đệm phosphat (PBS)); nhóm 2 (LY75_DM1; 10mg/kg), nhóm 3 (Isotyp DM1 đối chứng; 10mg/kg), nhóm 4 (LY75_DM4; 5mg/kg), nhóm 5 (isotyp SPBDDM4 đối chứng; 5mg/kg). Liều thứ hai được dùng một tuần sau đó. Thể trọng (BW) được kiểm tra, chuột nhất được kiểm tra thường xuyên về sức khỏe và các tác dụng phụ, và các khối u được đo hai lần hằng tuần. Chuột nhất được gây chết không đau đớn khi các khối u của chúng đạt tới thể tích cuối 2000 mm³ hoặc sau 60 ngày, tính theo ngày nào đạt được trước. Hiệu quả được xác định từ mức độ làm chậm sự phát triển của khối u (TGD), tăng theo thời gian trung bình đến điểm cuối (TTE) và từ phân tích logrank về sự sai khác trong đường cong sống sót Kaplan Meier ở chuột nhất đã được điều trị bằng ADC với chuột nhất được điều trị bằng PBS. Năm con chuột đầu tiên được điều trị bằng tá dược để đạt điểm cuối được kiểm tra khối u mà được xử lý bằng cách cố định formalin fixation và được nhúng parafin.

Kết quả

Fig.4a thể hiện mỗi LY75_DM1 và LY75_DM4 có hoạt tính kháng khối u đáng kể và khả năng sống sót kéo dài đáng kể ở mô hình dị ghép của chuột nhất SCID bị u bạch huyết Burkitt Raji khi so sánh với nhóm đối chứng; tuy nhiên, liều LY75_DM4 là 5mg/kg là hữu hiệu hơn so với liều LY75_DM1 là 10mg/kg, làm cho 5 trong 6 con chuột nhất có tác dụng hoàn toàn mà còn gây thoái biến khối u tạm thời. Toàn bộ các dược chất điều trị được dung nạp tốt và nhận thấy không có độc tính trên lâm sàng. Các dữ liệu này gợi ý rằng tác dụng của ADC hướng đích LY75, ví dụ, LY75_DM1 và LY75_DM4, tạo ra tác dụng lâm sàng có lợi để điều trị cho đối tượng bị bệnh ung thư bạch huyết không phải Hodgkin.

Ví dụ 17: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở mô hình dị ghép Namalwa

Tác dụng của LY75_DM1 và LY75_DM4 được thử nghiệm ở mô hình dị ghép của chuột nhất SCID bị u bạch huyết Namalwa Burkitt dưới da.

Chuột nhất SCID thiếu hụt miễn dịch được tạo miễn dịch dưới da bằng các tế bào khối u Namalwa (u bạch huyết Burkitt của người). Các khối u được tạo ra và chuột nhất được chia vào năm nhóm điều trị, 6 con/nhóm. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới kích

thước trung bình là 114 mm³/nhóm, mỗi nhóm này được điều trị bằng một trong số các hợp chất sau, được dùng trong tĩnh mạch với liều đã định: nhóm 1 (Tá dược; nước muối đệm phosphat (PBS)); nhóm 2 (LY75_DM1; 10mg/kg), nhóm 3 (Isotyp DM1 đối chứng; 10mg/kg), nhóm 4 (LY75_DM4; 5mg/kg), nhóm 5 (isotyp SPBDDM4 đối chứng; 5mg/kg). Thể trọng (BW) được kiểm tra, chuột nhắt được kiểm tra thường xuyên về sức khỏe và các tác dụng phụ, và các khối u được đo hai lần hằng tuần. Chuột nhắt được gây chết không đau đớn khi các khối u của chúng đạt tới thể tích cuối là 2000 mm³ hoặc sau 60 ngày, tính theo ngày nào đạt được trước. Hiệu quả được xác định theo mức độ làm chậm sự phát triển của khối u (TGD), tăng theo thời gian trung bình tới điểm cuối (TTE), và từ việc phân tích log rank về sự sai khác ở đường cong sống sót Kaplan Meier ở chuột nhắt đã được điều trị bằng ADC so với chuột nhắt đã được điều trị bằng PBS. Năm con chuột đầu tiên được điều trị bằng tá dược để đạt tới điểm cuối được kiểm tra các khối u mà được xử lý bằng cách cố định formalin và được nhúng parafin.

Kết quả

Fig.4b chỉ ra rằng mỗi LY75_DM1 và LY75_DM4 có hoạt tính kháng khối u đáng kể và khả năng sống sót kéo dài ở mô hình dị ghép của chuột nhắt SCID bị u bạch huyết Namalwa Burkitt khi so sánh với nhóm đối chứng; tuy nhiên, liều LY75_DM4 là 50mg/kg có tác dụng tốt hơn đáng kể so với liều LY75_DM1 là 10mg/kg, làm giảm nhẹ thể tích khối u. Toàn bộ các dược chất điều trị được dung nạp tốt và nhận thấy không có độc tính trên lâm sàng. Các dữ liệu này gợi ý rằng tác dụng của ADC hướng đích LY75, ví dụ, LY75_DM1 và LY75_DM4, tạo ra tác dụng có lợi trên lâm sàng để điều trị cho đối tượng bị bệnh ung thư bạch huyết không phải Hodgkin.

Ví dụ 18: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở mô hình dị ghép ung thư tụy

Tác dụng của LY75_DM1 và LY75_DM4 được thử nghiệm ở mô hình dị ghép của chuột trụi lông tuyến tụy bị ung thư biểu mô tụy HPAFII dưới da.

Chuột nhắt trụi lông bị thiếu hụt miễn dịch ở tụy được tạo miễn dịch dưới da bằng các tế bào khối u HPAFII (ung thư biểu mô tụy ở người). Các khối u được tạo ra và chuột nhắt được chia vào năm nhóm điều trị, 6 con/nhóm. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới kích thước trung bình ~114 mm³/nhóm, mỗi nhóm được điều trị bằng một trong số các hợp chất sau, được dùng trong tĩnh mạch với liều đã định: nhóm 1 (Tá dược; nước muối

đệm phosphat (PBS)); nhóm 2 (LY75_DM1; 10mg/kg), nhóm 3 (isotyp DM1 đối chứng; 10mg/kg), nhóm 4 (LY75_DM4; 5mg/kg), nhóm 5 (isotyp SPBDDM4 đối chứng; 5mg/kg). Thở trọng (BW) được kiểm tra, chuột nhất được kiểm tra thường xuyên về sức khỏe và các tác dụng phụ, và khối u được đo ba lần hàng tuần. Chuột nhất được gây chết không đau đớn khi các khối u của chúng đạt tới thể tích cuối là 2000 mm³ hoặc sau 90 ngày, tính theo ngày nào đạt được trước. Hiệu quả được xác định theo tác dụng điều trị về thể tích khối u và từ việc phân tích log rank của sự sai khác ở đường cong về khả năng sống sót Kaplan-Meier ở chuột nhất đã được điều trị bằng ADC hoặc đã được điều trị bằng PBS. Các khối u được kiểm tra từ chuột nhất đối chứng được điều trị bằng tá dược và được xử lý bằng cách cố định formalin và được nhúng parafin.

Kết quả

Fig.4c chỉ ra rằng LY75_DM1 và LY75_DM4 có hoạt tính kháng khối u đáng kể và có tiềm năng và khả năng sống sót kéo dài ở mô hình dị ghép của chuột nhất trụi lông HPAFII tương tự so với nhóm đối chứng. Toàn bộ các dược chất điều trị được dung nạp tốt và nhận thấy không có độc tính trên lâm sàng. Các dữ liệu này gợi ý rằng ADC có khả năng hướng đích LY75, ví dụ LY75_DM1 và LY75_DM4, để tạo ra tác dụng có lợi trên lâm sàng để điều trị cho đối tượng bị bệnh ung thư tụy.

Ví dụ 19: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở mô hình dị ghép của chuột nhất bị ung thư bàng quang

Tác dụng của LY75_DM1 và LY75_DM4 được thử nghiệm ở mô hình dị ghép của chuột nhất SCID bị ung thư bàng quang SW780 dưới da người.

Chuột nhất trụi lông bị thiếu hụt miễn dịch ở tụy được tạo miễn dịch dưới da bằng các tế bào khối u HPAFII (ung thư biểu mô tụy ở người). Khối u được tạo ra và chuột nhất được chia vào năm nhóm điều trị, 6 con/nhóm. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới kích thước trung bình ~114 mm³/nhóm, mỗi nhóm được xử lý bằng một trong số các hợp chất sau, được dùng trong tĩnh mạch với liều đã định: nhóm 1 (Tá dược; nước muối đệm phosphat (PBS)); nhóm 2 (LY75_DM1; 1mg/kg), nhóm 3 (LY75_DM1; 2,5mg/kg), nhóm 4 (LY75_DM1; 5mg/kg), nhóm 5 (LY75_DM4; 1mg/kg), nhóm 6 (LY75_DM4; 2,5mg/kg), nhóm 7 (LY75_DM4; 5mg/kg), nhóm 8 (isotyp SPBDDM4 đối chứng; 5mg/kg). Thở trọng (BW) được kiểm tra, chuột nhất được kiểm tra thường xuyên về sức khỏe và các tác dụng phụ, và khối u được đo ba lần hàng tuần. Chuột nhất được gây chết

không đau đớn khi các khối u của chúng đạt tới thể tích cuối là 2000 mm³ hoặc sau 90 ngày, tính theo ngày nào đạt được trước. Hiệu quả được xác định theo tác dụng điều trị về thể tích khối u và từ việc phân tích log rank của sự sai khác ở đường cong về khả năng sống sót Kaplan-Meier ở chuột nhất đã được điều trị bằng ADC hoặc đã được điều trị bằng PBS. Các khối u được kiểm tra từ chuột nhất đối chứng được điều trị bằng tá được và được xử lý bằng cách cố định formalin và được nhúng parafin.

Kết quả

Fig.4d chỉ ra rằng LY75_DM1 và LY75_DM4 có hoạt tính kháng khối u đáng kể và tiềm năng và khả năng sống sót kéo dài ở mô hình dị ghép của chuột nhất trụ lông SW780 tương tự so với đối chứng. Toàn bộ các được chất điều trị được dung nạp tốt và nhận thấy không có độc tính trên lâm sàng. Các dữ liệu này gợi ý rằng các ADC có khả năng hướng đích LY75, ví dụ, LY75_DM1 và LY75_DM4, để tạo ra tác dụng có lợi trên lâm sàng để điều trị đối tượng bị bệnh ung thư bàng quang.

Ví dụ 20: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở mô hình dị ghép bị ung thư vú

Tác dụng của LY75_DM1 và LY75_DM4 được thử nghiệm ở mô hình dị ghép của chuột nhất trụ lông không có tuyến ức MDA-MB-468 dưới da.

Chuột nhất trụ lông bị thiếu hụt miễn dịch ở tụy được tạo miễn dịch dưới da bằng các tế bào khối u MDA-MB-468 (ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon). Các khối u được tạo ra và chuột nhất được chia vào bảy nhóm điều trị, 10 con/nhóm. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới kích thước trung bình 167mm³/nhóm, mỗi nhóm được điều trị bằng một trong số các hợp chất sau, được dùng trong tĩnh mạch với liều đã định: nhóm 1 (Tá được; natri suxinat 20mM, độ pH = 5,0, 6% trehaloza, 0,04% polysorbat); nhóm 2 (LY75_DM1; 5mg/kg), nhóm 3 (LY75_DM1; 10mg/kg), nhóm 4 (LY75_DM4; 5mg/kg), nhóm 5 (LY75_DM4; 2,5mg/kg), nhóm 6 (LY75_DM4; 1mg/kg), nhóm 7 (Isotyp control-DM4; 5mg/kg). Thể trọng (BW) được kiểm tra, chuột nhất được kiểm tra thường xuyên về sức khỏe và các tác dụng phụ, và các khối u được đo hai lần hằng tuần. Chuột nhất được gây chết không đau đớn 82 ngày sau gây nhiễm khối u. Hiệu quả được xác định từ hoạt tính kháng khối u (kích thước khối u trung bình trong nhóm điều trị/kích thước khối u trung bình trong nhóm đối chứng x 100) và mức tăng theo thời gian trung bình và điểm cuối (TTE) ở chuột nhất đã được điều trị bằng ADC so với chuột nhất đã

được điều trị bằng PBS. Năm khối u có kích thước lớn nhất ở chuột nhất đối chứng được điều trị bằng tá dược vào ngày 71 sau khi gây nhiễm được kiểm tra được xử lý bằng cách cố định formalin và được nhúng parafin.

Kết quả

Fig.4e chỉ ra rằng mỗi LY75_DM1 và LY75_DM4 có hoạt tính kháng khối u mạnh ở mô hình dị ghép của chuột nhất trị liệu MDA-MB-468 so với nhóm đối chứng. Hoạt tính phụ thuộc liều quan sát được ở LY75_DM4, trong đó liều 2,5 và 5mg/kg có tác dụng mạnh hơn so với liều 1mg/kg. Ở liều 5mg/kg, LY75_DM1 và LY75_DM4 có tác dụng tương đương nhau. Mức độ thoái biến kéo dài về thể tích khối u trung bình quan sát được với LY75_DM1 ở liều 10 và 5mg/kg và LY75_DM4 ở liều 5 và 2,5mg/kg. Toàn bộ các dược chất điều trị được dung nạp tốt và nhận thấy không có độc tính trên lâm sàng. Các dữ liệu này gợi ý rằng các ADC có khả năng hướng đích LY75, ví dụ LY75_DM1 và LY75_DM4, để tạo ra tác dụng có lợi trên lâm sàng để điều trị có đối tượng bị bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể hormon.

Ví dụ 21: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở mô hình dị ghép ung thư trực tràng

Tác dụng của LY75_DM1 và LY75_DM4 được thử nghiệm ở mô hình dị ghép của chuột nhất trị liệu tuyến tụy bị ung thư biểu mô trực tràng COLO205 dưới da.

Chuột nhất trị liệu bị thiếu hụt miễn dịch ở tụy được tạo miễn dịch dưới da các tế bào khối u bằng COLO205 (ung thư trực tràng ở người). Khối u được tạo ra và chuột nhất được chia vào năm nhóm điều trị, 6 con/nhóm. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới kích thước trung bình 117 mm³/nhóm, mỗi nhóm được xử lý bằng một trong số các hợp chất sau, được dùng trong tĩnh mạch với liều đã định: nhóm 1 (Tá dược; nước muối đệm phosphat (PBS)); nhóm 2 LY75_DM1; 10mg/kg), nhóm 3 (Isotyp DM1 đối chứng; 10mg/kg), nhóm 4 (LY75_DM4; 5mg/kg), nhóm 5 (Isotyp control-DM4; 5mg/kg). Liều thứ hai được dùng mười hai ngày sau liều thứ nhất. Thể trọng (BW) được kiểm tra, chuột nhất được kiểm tra thường xuyên về sức khỏe và các tác dụng phụ, và khối u được đo hai lần hàng tuần. Chuột nhất được gây chết không đau đớn khi các khối u của chúng đạt tới thể tích cuối là 1000 mm³ hoặc sau 60 ngày, tính theo ngày nào đạt được trước. Tác dụng được xác định theo mức độ làm chậm sự phát triển của khối u (TGD), tăng theo thời gian trung bình tới điểm cuối (TTE) và từ việc phân tích log rank về sự sai khác ở đường cong

sống sót Kaplan Meier ở chuột nhất đã được điều trị bằng ADC so với chuột nhất đã được điều trị bằng PBS. Năm con chuột đầu tiên được điều trị bằng tá được để đạt tới điểm cuối được kiểm tra khối u mà được xử lý bằng cách cố định formalin và được nhúng parafin.

Kết quả

Fig.4f chỉ ra rằng LY75_DM1 và LY75_DM4 có hoạt tính kháng khối u vừa phải và khả năng sống sót kéo dài tương tự ở mô hình dị ghép của chuột nhất trĩu long bị ung thư trực tràng COLO205 so với nhóm đối chứng. Toàn bộ các được chất điều trị được dung nạp tốt và nhận thấy không có độc tính trên lâm sàng. Các dữ liệu này gợi ý rằng các ADC có khả năng hướng đích LY75, ví dụ, LY75_DM1 và LY75_DM4, để tạo ra tác dụng có lợi trên lâm sàng để điều trị cho đối tượng bị bệnh ung thư trực tràng.

Ví dụ 22: Độc tính của kháng thể đơn dòng kháng LY75 được tạo tiếp hợp với DM1 và DM4 ở khi đuôi dài

Sáu con khi đực được nghiên cứu, trong đó 2 con/nhóm. Tá được (PBS), LY75_DM4 (dễ phân tách) hoặc LY75_DM1 (không dễ phân tách) được dùng hai lần (vào ngày 1 và ngày 29) bằng cách truyền tĩnh mạch 15 phút với nồng độ 0mg/kg/liều (PBS, tá được), 5mg/kg/liều (LY75_DM4, dễ phân tách) hoặc 10mg/kg/liều (LY75_DM1, không dễ phân tách). Các mẫu máu được thu gom để đánh giá độc học trước khi bắt đầu dùng liều (Ngày 1), và 1, 2, 3, 7, 14, 21 và 28 ngày sau khi dùng mỗi liều. Các mẫu máu để phân tích bệnh trên lâm sàng được thu gom trước khi bắt đầu dùng liều (Ngày 1), và 1, 3, 7, 14, 21 và 28 ngày sau khi dùng mỗi liều (28 ngày sau khi dùng liều thứ nhất được gọi là thời điểm định liều trước đối với liều thứ hai). Toàn bộ các con vật nghiên cứu được gây chết không đau đớn và mổ khám nghiệm sau khi lấy máu lần cuối cùng vào ngày 57. Huyết tương đã được tách riêng khỏi mỗi ống lấy máu được phân lập, được làm đông lạnh và được chuyển tới Oxford BioTherapeutic, Inc. để phân tích nồng độ ADC bởi thử nghiệm ELISA.

Các phát hiện về bệnh học trên lâm sàng liên quan đến việc điều trị bao gồm thiếu máu tái sinh nhẹ và làm giảm tạm thời profin bạch cầu trong máu, là thường gặp nhất khi đếm bạch cầu trung tính. Bệnh thiếu máu quan sát được ở cả hai con vật đã được điều trị bằng 5mg/kg LY75_DM4 và ở một trong hai con đã được điều trị bằng 10mg/kg LY75_DM1. Chứng giảm bạch cầu nghiêm trọng tới mức đáy khi dùng liều sau một tuần

và quan sát thấy số lượng phục hồi lại nhanh chóng ở toàn bộ các động vật; mức đáy khi đếm bạch cầu trung tính tuyệt đối giảm xuống ở các con vật đã được điều trị bằng LY75_DM4. Không nhận thấy có ảnh hưởng liên quan đến hợp chất thử nghiệm đối với các thông số kết tụ APTT và PT. Mức thay đổi trong huyết thanh bao gồm việc giảm tạm thời AST, CK, LDH (ở 1 trong 2 con vật trong mỗi nhóm điều trị) và globulin sau khi dùng 5mg/kg LY75_DM4 và 10mg/kg LY75_DM1. Ngoài ra, mức tăng tạm thời enzym ALT đặc hiệu ở gan chỉ quan sát được ở các con vật đã được điều trị bằng LY75_DM4. Khoảng thời gian ngắn và/hoặc độ lớn về mức tăng các thông số hóa học trong huyết thanh gợi ý rằng chúng không có tác dụng phụ. Không thấy các hợp chất thử nghiệm khi phân tích nước tiểu. Khi mổ khám nghiệm sau 4 tuần phục hồi không nhận thấy sự béo phì bệnh lý liên quan đến việc điều trị hoặc sự thay đổi khối lượng gan tuyệt đối và tương đối. Các phát hiện mô học chỉ ở tuyến giáp (biến đổi hình thái của chất kéo trong các nang) và thận (các ống nở ra ở vỏ ngoài), chỉ ở mức độ trầm trọng tối thiểu; không liên quan đến các biến đổi về các thông số nghiên cứu khác; và, không có tác dụng phụ và độc tính tối thiểu đáng kể. Kết luận: Việc điều trị với liều nhắc lại với hai liều là 5mg/kg LY75_DM4 hoặc 10mg/kg LY75_DM1 có tác dụng dung nạp tối ở khỉ cynomologus. Các phát hiện về độc tính liên quan đến toàn bộ việc điều trị biến mất sau 4 tuần phục hồi.

Ví dụ 23: Mô tả đặc tính epitop của LY75 A1 bằng cách phân tích gắn kết phân loại tế bào đã phát huỳnh quang (FACS) cạnh tranh

Phương pháp

Các tế bào COLO205 (ATCC, tổ hợp # CCL-222) được tách ra khỏi bình cầu nuôi cấy mô bằng thiết bị tách tế bào (Cellgro, tổ hợp # MT-25-056CI). Các tế bào này được rửa và được tạo hỗn dịch lại trong dung dịch đệm FACS (PBS + 2%FBS), được trung hòa bằng môi trường phát triển, và được đếm. Các tế bào được phủ với mật độ 50.000 tế bào/giếng trong đĩa 96 giếng đáy hình chữ V. Các tế bào này được rửa một lần bằng dung dịch đệm FACS (PBS (Fisher, tổ hợp # SH30028-03) + 2% FBS). mAb kháng LY75 (được chọn từ Ví dụ 1) hoặc LY75_A1 được bổ sung vào các lỗ bắt đầu với nồng độ 250 nM và được pha loãng 3 lần theo dãy và được dùng cho các lỗ liên quan trong 45 phút trên băng. Các lỗ thử nghiệm đã nhuộm 1 lần hoặc nhiều lần được để trong dung dịch đệm FACS nếu thích hợp để đảm bảo lần nhuộm cuối được hoàn thành đồng thời đối với

toàn bộ các điều kiện được thử nghiệm. Hai lỗ được để yên không nhuộm trong dung dịch đệm FACS làm lỗ đối chứng.

Sau gây nhiễm bằng kháng thể phong bế, các tế bào này được rửa hai lần trong dung dịch đệm FACS. Các tế bào này được tạo hỗn dịch lại trong dung dịch đệm FACS chứa mAb kháng LY75 được tiếp hợp với MCC-DM1 (1 nM) và ủ trên băng trong 45 phút. Các tế bào này được rửa như đã nêu trên và được tạo hỗn dịch lại trong dung dịch đệm FACS cộng với 1 ug/ml kháng thể kháng maytansine của chuột nhắt và ủ trên băng trong 45 phút. Các tế bào này được rửa như đã nêu trên và được tạo hỗn dịch lại trong dung dịch đệm FACS chứa 2 ug/ml RPE kappa kháng chuột nhắt của dê. Các tế bào này được ủ trên băng trong 45 phút, sau đó được rửa như đã nêu trên. Các tế bào này được tạo hỗn dịch lại trong dung dịch đệm FACS với nồng độ 200 ul/giếng. Cường độ phát huỳnh quang trung bình của mỗi mẫu được xác định bằng cách sử dụng Guava EasyCyte cùng với máy đo dòng tế bào HT Flow Cytometer (có dạng đĩa 96 giếng) và dữ liệu thô được phân tích bằng cách sử dụng Guava Cytosoft.

Kết quả

Fig.5a thể hiện khả năng phong bế bằng mAb kháng LY75-MCC-DM1 làm giảm khả năng gắn kết với mAb kháng LY75. Phân tích về khả năng gắn kết của LY75_A1 với các tế bào COLO205 chứng tỏ rằng LY75_A1 không có khả năng phong bế quá trình gắn kết của mAb kháng LY75-MCC-DM1 (xem Fig.5b). Do đó, có thể xác định được rằng mAb kháng LY75 và LY75_A1 là các kháng thể không cạnh tranh và LY75_A1 nhận diện epitop khác nhau và đơn nhất của LY75 so với kháng thể kháng LY75 khác.

Ví dụ 24: Mô tả đặc điểm epitop của LY75 A1 bằng thử nghiệm vi mảng peptit.

Phương pháp

Phân tích vi mảng peptit được thực hiện bởi LC Sciences, Houston TX, nói tóm lại phương pháp này bao gồm các bước sau:- Các peptit liên tiếp 8mer chứa protein LY75 có một axit amin chồng khít với các gốc quay tròn từ 216 đến 1666 của protein LY75 có chiều dài đầy đủ được tổng hợp và được bất động trên chip vi mảng. Chip này chứa ba bản sao cho thử nghiệm này được thực hiện lặp lại ba lần. Vi mảng này hướng đích LY75_A1 để xác định khả năng gắn kết với kháng thể của peptit. Thử nghiệm gắn kết được thực hiện trong các điều kiện sau:- Vi mảng này chứa các peptit liên tiếp được rửa ba lần bằng 1mL dung dịch đệm gắn kết ở 4°C trong 20 phút. Sau đó, nó được ủ với 1

$\mu\text{g/mL}$ LY75_A1 trong dung dịch đệm gắn kết (độ pH = 7,0) ở 4°C trong 2 giờ. Màng này được rửa lại bằng 0,5mL dung dịch đệm rửa ở 4°C trong 30 phút, sau đó được ủ bằng 25 ng/mL thể tiếp hợp Alexa 647 IgG kháng người trong dung dịch đệm gắn kết (độ pH = 7,0) ở 4°C trong 1 giờ. Màng này được rửa lại bằng 0,5mL dung dịch đệm rửa ở 4°C trong 30 phút.

Sau đó, màng này được quét ở 635 nm và PMT 500 và cường độ tín hiệu được ghi lại. Peptit được xếp vào loại có thể phát hiện được nếu nó có mặt với mức độ lặp lại ít nhất 2/3. Cường độ tín hiệu trung bình của các lần lặp lại này được thông báo là cường độ tín hiệu cuối cùng.

Kết quả

Như có thể thấy từ Fig.6, kháng thể LY75_A1 có khả năng gắn kết đặc hiệu với nhiều peptit nằm trên màng. Tín hiệu cực đại quan sát được đối với quá trình gắn kết LY75_A1 là 25000 (phạm vi 1-65535), với tín hiệu trung bình đối với toàn bộ các điểm trên màng này là khoảng 885. Cường độ tín hiệu 3000 được thiết lập làm điểm cắt rời nền đối với quá trình gắn kết không đặc hiệu. Dựa trên cường độ tín hiệu gắn kết với kháng thể có thể chỉ ra trình tự tiềm năng tạo ra epitop đối với LY75_A1 được xác định. Các vùng này được thể hiện trên các Fig.6a - 6j và như được nêu trong các trình tự SEQ ID NO.22-31.

Ví dụ 25: Thử nghiệm kéo peptit xuống LY75 A1

Phương pháp

1.1. Thử nghiệm kéo xuống

Protein LY75 tái tổ hợp được phân giải bằng cách phân giải protein tryxin trên hạt (Promega, US). Peptit phân giải thu được được thu hồi bằng cách sử dụng cột bắt giữ C18 (Thermo Fisher Scientific). Sau đó, peptit đã được tinh chế được ủ với 200 μL hạt protein A đã được tạo liên kết ngang bằng kháng thể LY75A1 qua đêm ở 4°C. Vào ngày tiếp theo, peptit chưa được gắn kết được thu gom và các hạt này được rửa hai lần bằng 1mL PBS. Peptit đã được gắn kết với kháng thể được rửa giải ra khỏi các hạt này bằng cách gia nhiệt chúng ở 90°C trong 100 μL PBS trong 5 phút. Bước rửa giải này được tiến hành lặp lại.

1.2 Khởi phở

Các mẫu được phân tích bằng khối phổ sắc ký lỏng bằng cách sử dụng hệ Waters nanoACQUITY UPLC phù hợp với cột nanoACQUITY UPLC BEH 130 C18, 75µm x 250mm (186003545) và LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Các peptit được rửa giải bằng 300nl/phút gradien tăng dần từ 3% đến 35% axetonitril trong 120 phút. Khối phổ quét toàn bộ thu được ở năng suất phân giải 60000 trong khoảng khối phổ 400-2000 m/z trong thiết bị Orbitrap. Trong mỗi vòng, hai mươi peptit có cường độ mạnh nhất được chọn để quét CID MS/MS trong bẫy ion tuyến tính có nguồn phun ion cỡ nano được lắp đặt trong thiết bị này.

1.3. Phân tích trình tự axit amin của peptit

Dữ liệu thô thu được từ LTQ Orbitrap Velos được xử lý bằng phần mềm Mascot (Matrix Science) nhờ sử dụng thuật toán Mowse (Curr Biol. 1993 Jun 1; 3(6):327-3) để đưa ra trình tự axit amin từ danh mục các pic bằng cách tra cứu dữ liệu trình tự chứa Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html) và SwissProt (<http://www.uniprot.org>) cùng với trình tự protein tạp. Tiêu chuẩn để nhận diện peptit là có xảy ra quá trình phân giải trypsin, tối đa 2 vị trí phân cắt bị bỏ qua và xảy ra quá trình cải biến sinh học và hóa học khác nhau (methionin đã được oxy hóa, cải biến xystein bởi MMTS hoặc iodoacetamid và phosphoryl hoá serin, threonin và tyrosin). Peptit được đánh số 1 có trị số kỳ vọng là 0,05% hoặc nhỏ hơn, số điểm ion là 28 hoặc cao hơn được đưa vào dữ liệu OGAP của các tác giả sáng chế.

1.4. Phân biệt các peptit liên quan đến L Y75

Quy trình nhận diện LY75 có dùng các trình tự peptit thu được bằng thử nghiệm nhờ phổ khối, như được mô tả trên đây, của các protein có trong tự nhiên của người để nhận diện và sản xuất exon mã hóa trong các trình tự về bộ gen người đã được công bố. Các trình tự đã được xác định bằng thử nghiệm này được so sánh với dữ liệu OGAP® mà được tiến hành bằng cách xử lý và hợp nhất các khối peptit, các chỉ dấu peptit, dữ liệu trình tự về bộ gen (ESTs and Public Domain Genomic Sequence Data) như được mô tả trong Công bố đơn quốc tế W02009/087462.

Kết quả

Các kết quả của thử nghiệm kéo peptit xuống bằng cách sử dụng kháng thể LY75_A1 được thể hiện trong Bảng 1 sau và trên Fig.7. Peptit đã được nhận diện ở cả

hai lần rửa giải peptit 1a và 1b trong thử nghiệm kéo xuống và trong thử nghiệm vi mảng được coi là các peptit dự tuyển thích hợp nhất để tạo ra epitop.

Bảng 1. So sánh thử nghiệm vi mảng peptit và thử nghiệm kéo peptit xuống.

Peptit được nhận diện bởi thử nghiệm vi mảng	Peptit được nhận diện bởi thử nghiệm kéo xuống
Vùng 1 (aa609-618)	-
Vùng 2 (aa651-662)	-
Vùng 3 (aa761-780)	GWHFYDDR (765-772)
Vùng 4 (aa883-901)	ISEWPIDDHFTYSR (877 đến 890) FPVTFGEECLYMSAK (896-910)
Vùng 5 (aa1029-1040)	ELTYSNFHPLLVSQR (1030-1044)
Vùng 6 (aa1077-1093)	HFVSLCQK (1084-1091)
Vùng 7 (aa1107-1118)	QTLQNASQTVK (1099-1109)
Vùng 8 (aa1368-1378)	-
Vùng 9 (aa1518-1528)	-
Vùng 10 (aa1535-1554)	-

Bảng 1 chứng tỏ rằng nhiều vùng peptit LY75 chồng khít được nhận diện trong cả thử nghiệm vi mảng peptit lẫn thử nghiệm kéo peptit xuống ở cả hai lần rửa giải 1a và 1b. Các vùng này được coi là thích hợp nhất để chứa epitop được nhận diện bởi kháng thể LY75_A1 do chúng được gắn kết bởi LY75_A1 đã được thử nghiệm bởi cả hai kỹ thuật đã được dùng.

Trình tự

SEQ ID NO.	Mô tả	Trình tự
1	A1_VH aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTIFGVVSFDYWGQGTLLTVSS
2	A1_VL aa	DVQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQISIDYLSWYQQRPGKA PNLLIYAASNLKGTGPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYC QQSYRSPWTFGQGTKVEIKR
3	A1_VH nt	gaggtgcagctgggtgagctctgggggagggcttggtaaagccggggggtcccttagactctcctgt gcagcctctggcttcacttacagtaacgcctggatgagctgggtccgagcaggtccaggaagg gctggagtggttgccgtattaaaagcaaaactgatggtgggacaacagactacgctgcaccgt gcaaggcagattcaccatctcaagagatgattcaaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg aaaaccgaggacacagcctgtattactgtacgatttttgagtggttagctttgactactggggcca gggaacctgtgacacgtctcctca
4	A1_VL nt	gacgtccagatgacccagctccatcctccctgtctgcactctgttgagacagagtcaccatcacttg ccgggcaagtcagagcattagcagactatttaagttggtatcagcagagaccagggaagccctaa cctcctgatctatgctgcacaaatttaagactggggtccatcaagggtcagtgagcagtgatctgg gacagattcactctcaccatcagcactctgcaacctgaagattttgcaacgtactactgtcaacagag ttacaggtccccgtggacgttcggccaagggaaggtggaatcaaacga
5	A1_VH_CDR 1 aa	NAWMS
6	A1_VH_CDR 2 aa	RIKSKTDGGTTDYAAPVQG
7	A1_VH_CDR 3 aa	FGVVSFDY
8	A1_VL_CDR	RASQISIDYLS

	1 aa	
9	A1_VL_CDR 2 aa	AASNLKT
10	A1_VL_CDR 3 aa	QQSYRSPWT
11	VH3 3- 15/D4 411	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTTTT
12	JH4	YFDYWGGQTLVTSS
13	O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYS
14	JK1	WTFGQGTKVEIKR
15	LY75 (DEC- 205)	MRTGWATPRRPAGLLMLFWFFDLAEPSCGRAANDPFTIVHGN TGKCIKPVYGWIVADDCDEDEDKLWKWVSQHRFLHLSQKCL GLDITKSVNELRMFSCDSSAMLWWKCEHHSYGAARYRLALK DGHGTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNSYGRPC EFPFLIDGTWHHDCILDEDHSGPWCATTLYNEYDRKWGICLKP ENGCEDNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSWKEAYVSCQNQGAD LLSINSAEELTYLKEKEGIAKIFWIGLNQLYSARGWEWS DHKPL NFLNWDPRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCEAQLPYVC RKPLNNTVELTDVWTYS DTRCDAGWLPNNGFCYLLVNESNS WDKAHAKCKAFSSDLISHSADVEVVTKLHNEDIKEEVWIG LKNINPTLTFQWSDGTEVTLTYWDENEPNVPYNKTPNCVSYLG ELGQWKVQSCEEKLYVCKRKGEKLNDASSDKMCPPEDEGWK RHGETCYKIYEDEVPGTNCNLTISRFEQEYLN DLMKKYDKS LRKYFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGRRRAVTFSNWNFLEPA SPGGCVAMSTGKSVGKWEVKDCRSFKALSICKKMSGPLGPEE ASPKPDDPCPEGWQSFPASLSCYKVFAERIVRKRNWEEAERF CQALGAHLSSFSHVDEIKEFLHFLTDQFSGQHWLWIGLNKRSP DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYDIRDCAAVKV FHRPW RRGWHFYDDREFIYLRPFACDTKLEWVCQIPKGRTPKTPDWY NPDRAGIHGPPLIEGSEYWFVADLHLNYEEAVLYCASNHSFLA TITSFVGLKAIKNKIANISGDGQKWWIRISEWPIDDHFTYSRYP WHRFPVTFGEECLYMSAKTWLIDL GKPTDCSTKLPFICEKYNV SSLEKYSPDSAAKVQCSEQWIPFQNKCF LKIKPVSLTFSQASDT CHSYGGTLPSVLSQIEQDFITSLLPDMEATLWIGLRWTAYEKIN KWTDNRELTYSNFHPLL VSGRLRIPENFFEEESRYHCALILNLQ KSPFTGTWNFTSCSERHFVSLCQKYSEVKSRQTLQNASSETVKY LNNLYKIIPKTLTWHS AKRECLKSNMQLVSITDPYQQAFLSVQ ALLHNSSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHFSRWAETNGQLE DCVVLDTDGFWKTVDCNDNQPGAICYYSNETEKEVKPVDSV KCPSPVLNTPWIPFQNC CYNFIITKNRHMATTQDEVHTKCQKL NPKSHLSIRDEKENNFVLEQLLYFN YMASWVMLGITYRNKSL MWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIQT FKV EEAVYFHQHSILACKIEMVDYKEEYNTTLPQFMPYEDGIYSVIQ KKVTWYEALNMCSQSGGHLASVHNQNGQLFLEDIVKRDGFPL WVGLSSH DGSSESSF EWSDGSTFDYIPWKGQTS PGNCVLLDPKG TWKHEKCNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPAAKENGSR WIQYKGHCYKSDQALHSFSEAKKLCSKHDSATIVSIKDEDEN KFVSRLMRENNITMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVTFV KWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKKVECEHGFGRRVVCVPLG PDYTAIAIIVATLSILVLMGGLIWFLFQRHRLHLAGFSSVRYAQ GVNEDEIMLP SFHD
16	A1_VH_FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYS
17	A1_VH_FR2	WVRQAPGKGLEWVG

18	A1_VH_FR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTI
19	A1_VH_FR4	WGQGTILVTVSS
20	A1_VL_FR1	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
21	A1_VL_FR2	WYQQRPGKAPNLLIY
22	A1_VL_FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYC
23	A1_VL_FR4	FGQGTKVEIKR
24	LY75 609-618	WEVKDCRSFK
25	LY75 651-662	PASLSCYKVFHA
26	LY75 761-780	PWRRGWHFYDDREFIYLRPF
27	LY75 883-901	DDHFTYSRYPWHRFPVTFG
28	LY75 1029-1040	RELTYSNFHPLL
29	LY75 1077-1093	FTSCSERHFVSLCQKYS
30	LY75 1107-1118	TVKYLNLYKII
31	LY75 1368-1378	EAVYFHQHSIL
32	LY75 1518-1528	KKLSRLTYSSC
33	LY75 1535-1554	NGSRWIQYKGHCYKSDQALH
34	LY75 877-901	ISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFG
35	LY75 1099-1118	QTLQNASETVKYLNLYKII
36	LY75 883-892	DDHFTYSRYP
37	LY75 1077-1091	FTSCSERHFVSLCQK

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BERLIN-CHEMIE AG
 <120> KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT VỚI LY75 VÀ DUỘC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> OB00135PCT
 <150> US 61/890104
 <151> 2013-10-11
 <150> US 61/890098
 <151> 2013-10-11
 <160> 37
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ile Phe Gly Val Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 2
 Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Ser Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 3
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Người
 <400> 3
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc cggggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggctt cacttacagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggttgccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180
 gactacgctg caccctgca aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtacgatt 300
 tttggagtgg ttagctttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357
 <210> 4
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Người
 <400> 4
 gacgtccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctggtggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gacattagc gactatttaa gttggtatca gcagagacca 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccaatt taaagactgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcac tctgcaacct 240
 gaagattttg caacgtacta ctgtcaacag agttacaggt ccccgtaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acga 324
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 5
 Asn Ala Trp Met Ser

```

1          5
<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> Người
<400> 6
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1          5          10          15
Val Gln Gly
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Người
<400> 7
Phe Gly Val Val Ser Phe Asp Tyr
1          5
<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Người
<400> 8
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Ser
1          5          10
<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Người
<400> 9
Ala Ala Ser Asn Leu Lys Thr
1          5
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Người
<400> 10
Gln Gln Ser Tyr Arg Ser Pro Trp Thr
1          5
<210> 11
<211> 104
<212> PRT
<213> Người
<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
          20          25          30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
          50          55          60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65          70          75          80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          85          90          95
Tyr Cys Thr Thr Thr Thr Val Thr
          100
<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Người
<400> 12
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1          5          10          15
<210> 13
<211> 93
<212> PRT
<213> Người
<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser
          85          90

```

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 14
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 1722
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 15
 Met Arg Thr Gly Trp Ala Thr Pro Arg Arg Pro Ala Gly Leu Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Trp Phe Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ser Gly Arg Ala Ala
 20 25 30
 Asn Asp Pro Phe Thr Ile Val His Gly Asn Thr Gly Lys Cys Ile Lys
 35 40 45
 Pro Val Tyr Gly Trp Ile Val Ala Asp Asp Cys Asp Glu Thr Glu Asp
 50 55 60
 Lys Leu Trp Lys Trp Val Ser Gln His Arg Leu Phe His Leu His Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Cys Leu Gly Leu Asp Ile Thr Lys Ser Val Asn Glu Leu Arg
 85 90 95
 Met Phe Ser Cys Asp Ser Ser Ala Met Leu Trp Trp Lys Cys Glu His
 100 105 110
 His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Asp Gly
 115 120 125
 His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys Gly Gly
 130 135 140
 Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr Thr Arg
 145 150 155 160
 Asp Gly Asn Ser Tyr Gly Arg Pro Cys Glu Phe Pro Phe Leu Ile Asp
 165 170 175
 Gly Thr Trp His His Asp Cys Ile Leu Asp Glu Asp His Ser Gly Pro
 180 185 190
 Trp Cys Ala Thr Thr Leu Asn Tyr Glu Tyr Asp Arg Lys Trp Gly Ile
 195 200 205
 Cys Leu Lys Pro Glu Asn Gly Cys Glu Asp Asn Trp Glu Lys Asn Glu
 210 215 220
 Gln Phe Gly Ser Cys Tyr Gln Phe Asn Thr Gln Thr Ala Leu Ser Trp
 225 230 235 240
 Lys Glu Ala Tyr Val Ser Cys Gln Asn Gln Gly Ala Asp Leu Leu Ser
 245 250 255
 Ile Asn Ser Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Lys Glu Lys Glu Gly Ile
 260 265 270
 Ala Lys Ile Phe Trp Ile Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ser Ala Arg Gly
 275 280 285
 Trp Glu Trp Ser Asp His Lys Pro Leu Asn Phe Leu Asn Trp Asp Pro
 290 295 300
 Asp Arg Pro Ser Ala Pro Thr Ile Gly Gly Ser Ser Cys Ala Arg Met
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Ser Gly Leu Trp Gln Ser Phe Ser Cys Glu Ala Gln Leu
 325 330 335
 Pro Tyr Val Cys Arg Lys Pro Leu Asn Asn Thr Val Glu Leu Thr Asp
 340 345 350
 Val Trp Thr Tyr Ser Asp Thr Arg Cys Asp Ala Gly Trp Leu Pro Asn
 355 360 365
 Asn Gly Phe Cys Tyr Leu Leu Val Asn Glu Ser Asn Ser Trp Asp Lys
 370 375 380
 Ala His Ala Lys Cys Lys Ala Phe Ser Ser Asp Leu Ile Ser Ile His
 385 390 395 400
 Ser Leu Ala Asp Val Glu Val Val Val Thr Lys Leu His Asn Glu Asp
 405 410 415
 Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys Asn Ile Asn Ile Pro Thr
 420 425 430
 Leu Phe Gln Trp Ser Asp Gly Thr Glu Val Thr Leu Thr Tyr Trp Asp
 435 440 445
 Glu Asn Glu Pro Asn Val Pro Tyr Asn Lys Thr Pro Asn Cys Val Ser
 450 455 460
 Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys Val Gln Ser Cys Glu Glu Lys
 465 470 475 480
 Leu Lys Tyr Val Cys Lys Arg Lys Gly Glu Lys Leu Asn Asp Ala Ser
 485 490 495
 Ser Asp Lys Met Cys Pro Pro Asp Glu Gly Trp Lys Arg His Gly Glu
 500 505 510
 Thr Cys Tyr Lys Ile Tyr Glu Asp Glu Val Pro Phe Gly Thr Asn Cys
 515 520 525
 Asn Leu Thr Ile Thr Ser Arg Phe Glu Gln Glu Tyr Leu Asn Asp Leu
 530 535 540

```

Met Lys Lys Tyr Asp Lys Ser Leu Arg Lys Tyr Phe Trp Thr Gly Leu
545                               550           555           560
Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn Trp Ala Thr Val Gly Gly
                               565           570           575
Arg Arg Arg Ala Val Thr Phe Ser Asn Trp Asn Phe Leu Glu Pro Ala
                               580           585           590
Ser Pro Gly Gly Cys Val Ala Met Ser Thr Gly Lys Ser Val Gly Lys
                               595           600           605
Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile Cys Lys
610                               615           620
Lys Met Ser Gly Pro Leu Gly Pro Glu Glu Ala Ser Pro Lys Pro Asp
625                               630           635           640
Asp Pro Cys Pro Glu Gly Trp Gln Ser Phe Pro Ala Ser Leu Ser Cys
                               645           650           655
Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg Lys Arg Asn Trp Glu
                               660           665           670
Glu Ala Glu Arg Phe Cys Gln Ala Leu Gly Ala His Leu Ser Ser Phe
675                               680           685
Ser His Val Asp Glu Ile Lys Glu Phe Leu His Phe Leu Thr Asp Gln
690                               695           700
Phe Ser Gly Gln His Trp Leu Trp Ile Gly Leu Asn Lys Arg Ser Pro
705                               710           715           720
Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro Val Ser Thr
                               725           730           735
Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile Arg Asp Cys
740                               745           750
Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe
755                               760           765
Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe Ala Cys Asp Thr
770                               775           780
Lys Leu Glu Trp Val Cys Gln Ile Pro Lys Gly Arg Thr Pro Lys Thr
785                               790           795           800
Pro Asp Trp Tyr Asn Pro Asp Arg Ala Gly Ile His Gly Pro Pro Leu
805                               810           815
Ile Ile Glu Gly Ser Glu Tyr Trp Phe Val Ala Asp Leu His Leu Asn
820                               825           830
Tyr Glu Glu Ala Val Leu Tyr Cys Ala Ser Asn His Ser Phe Leu Ala
835                               840           845
Thr Ile Thr Ser Phe Val Gly Leu Lys Ala Ile Lys Asn Lys Ile Ala
850                               855           860
Asn Ile Ser Gly Asp Gly Gln Lys Trp Trp Ile Arg Ile Ser Glu Trp
865                               870           875           880
Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe
885                               890           895
Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr Trp
900                               905           910
Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys Leu Pro Phe
915                               920           925
Ile Cys Glu Lys Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys Tyr Ser Pro Asp
930                               935           940
Ser Ala Ala Lys Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn
945                               950           955           960
Lys Cys Phe Leu Lys Ile Lys Pro Val Ser Leu Thr Phe Ser Gln Ala
965                               970           975
Ser Asp Thr Cys His Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Pro Ser Val Leu Ser
980                               985           990
Gln Ile Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Leu Leu Pro Asp Met Glu Ala
995                               1000          1005
Thr Leu Trp Ile Gly Leu Arg Trp Thr Ala Tyr Glu Lys Ile Asn
1010                               1015          1020
Lys Trp Thr Asp Asn Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro
1025                               1030          1035
Leu Leu Val Ser Gly Arg Leu Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu
1040                               1045          1050
Glu Glu Ser Arg Tyr His Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys
1055                               1060          1065
Ser Pro Phe Thr Gly Thr Trp Asn Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg
1070                               1075          1080
His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser Arg
1085                               1090          1095
Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn
1100                               1105          1110
Leu Tyr Lys Ile Ile Pro Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys
1115                               1120          1125
Arg Glu Cys Leu Lys Ser Asn Met Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp
1130                               1135          1140
Pro Tyr Gln Gln Ala Phe Leu Ser Val Gln Ala Leu Leu His Asn
1145                               1150          1155
Ser Ser Leu Trp Ile Gly Leu Phe Ser Gln Asp Asp Glu Leu Asn
1160                               1165          1170

```

Phe Gly	Trp Ser Asp Gly Lys	Arg Leu His Phe Ser	Arg Trp Ala
1175	1180	1185	
Glu Thr	Asn Gly Gln Leu Glu	Asp Cys Val Val Leu	Asp Thr Asp
1190	1195	1200	
Gly Phe	Trp Lys Thr Val Asp	Cys Asn Asp Asn Gln	Pro Gly Ala
1205	1210	1215	
Ile Cys	Tyr Tyr Ser Gly Asn	Glu Thr Glu Lys Glu	Val Lys Pro
1220	1225	1230	
Val Asp	Ser Val Lys Cys Pro	Ser Pro Val Leu Asn	Thr Pro Trp
1235	1240	1245	
Ile Pro	Phe Gln Asn Cys Cys	Tyr Asn Phe Ile Ile	Thr Lys Asn
1250	1255	1260	
Arg His	Met Ala Thr Thr Gln	Asp Glu Val His Thr	Lys Cys Gln
1265	1270	1275	
Lys Leu	Asn Pro Lys Ser His	Ile Leu Ser Ile Arg	Asp Glu Lys
1280	1285	1290	
Glu Asn	Asn Phe Val Leu Glu	Gln Leu Leu Tyr Phe	Asn Tyr Met
1295	1300	1305	
Ala Ser	Trp Val Met Leu Gly	Ile Thr Tyr Arg Asn	Lys Ser Leu
1310	1315	1320	
Met Trp	Phe Asp Lys Thr Pro	Leu Ser Tyr Thr His	Trp Arg Ala
1325	1330	1335	
Gly Arg	Pro Thr Ile Lys Asn	Glu Lys Phe Leu Ala	Gly Leu Ser
1340	1345	1350	
Thr Asp	Gly Phe Trp Asp Ile	Gln Thr Phe Lys Val	Ile Glu Glu
1355	1360	1365	
Ala Val	Tyr Phe His Gln His	Ser Ile Leu Ala Cys	Lys Ile Glu
1370	1375	1380	
Met Val	Asp Tyr Lys Glu Glu	Tyr Asn Thr Thr Leu	Pro Gln Phe
1385	1390	1395	
Met Pro	Tyr Glu Asp Gly Ile	Tyr Ser Val Ile Gln	Lys Lys Val
1400	1405	1410	
Thr Trp	Tyr Glu Ala Leu Asn	Met Cys Ser Gln Ser	Gly Gly His
1415	1420	1425	
Leu Ala	Ser Val His Asn Gln	Asn Gly Gln Leu Phe	Leu Glu Asp
1430	1435	1440	
Ile Val	Lys Arg Asp Gly Phe	Pro Leu Trp Val Gly	Leu Ser Ser
1445	1450	1455	
His Asp	Gly Ser Glu Ser Ser	Phe Glu Trp Ser Asp	Gly Ser Thr
1460	1465	1470	
Phe Asp	Tyr Ile Pro Trp Lys	Gly Gln Thr Ser Pro	Gly Asn Cys
1475	1480	1485	
Val Leu	Leu Asp Pro Lys Gly	Thr Trp Lys His Glu	Lys Cys Asn
1490	1495	1500	
Ser Val	Lys Asp Gly Ala Ile	Cys Tyr Lys Pro Thr	Lys Ser Lys
1505	1510	1515	
Lys Leu	Ser Arg Leu Thr Tyr	Ser Ser Arg Cys Pro	Ala Ala Lys
1520	1525	1530	
Glu Asn	Gly Ser Arg Trp Ile	Gln Tyr Lys Gly His	Cys Tyr Lys
1535	1540	1545	
Ser Asp	Gln Ala Leu His Ser	Phe Ser Glu Ala Lys	Lys Leu Cys
1550	1555	1560	
Ser Lys	His Asp His Ser Ala	Thr Ile Val Ser Ile	Lys Asp Glu
1565	1570	1575	
Asp Glu	Asn Lys Phe Val Ser	Arg Leu Met Arg Glu	Asn Asn Asn
1580	1585	1590	
Ile Thr	Met Arg Val Trp Leu	Gly Leu Ser Gln His	Ser Val Asp
1595	1600	1605	
Gln Ser	Trp Ser Trp Leu Asp	Gly Ser Glu Val Thr	Phe Val Lys
1610	1615	1620	
Trp Glu	Asn Lys Ser Lys Ser	Gly Val Gly Arg Cys	Ser Met Leu
1625	1630	1635	
Ile Ala	Ser Asn Glu Thr Trp	Lys Lys Val Glu Cys	Glu His Gly
1640	1645	1650	
Phe Gly	Arg Val Val Cys Lys	Val Pro Leu Gly Pro	Asp Tyr Thr
1655	1660	1665	
Ala Ile	Ala Ile Ile Val Ala	Thr Leu Ser Ile Leu	Val Leu Met
1670	1675	1680	
Gly Gly	Leu Ile Trp Phe Leu	Phe Gln Arg His Arg	Leu His Leu
1685	1690	1695	
Ala Gly	Phe Ser Ser Val Arg	Tyr Ala Gln Gly Val	Asn Glu Asp
1700	1705	1710	
Glu Ile	Met Leu Pro Ser Phe	His Asp	
1715	1720		
<210>	16		
<211>	30		
<212>	PRT		
<213>	Người		
<400>	16		
Glu Val	Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		

```

1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Ser
                20                25                30
<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Người
<400> 17
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1           5           10
<210> 18
<211> 32
<212> PRT
<213> Người
<400> 18
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1           5           10           15
Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
                20                25                30
<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Người
<400> 19
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1           5           10
<210> 20
<211> 23
<212> PRT
<213> Người
<400> 20
Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
                20
<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Người
<400> 21
Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
1           5           10           15
<210> 22
<211> 32
<212> PRT
<213> Người
<400> 22
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1           5           10           15
Leu Thr Ile Ser Thr Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
                20                25                30
<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Người
<400> 23
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1           5           10
<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Người
<400> 24
Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys
1           5           10
<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Người
<400> 25
Pro Ala Ser Leu Ser Cys Tyr Lys Val Phe His Ala
1           5           10
<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> Người
<400> 26
Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr
1           5           10           15
Leu Arg Pro Phe

```

20

<210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 27
 Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe Pro Val
 1 5 10 15
 Thr Phe Gly
 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 28
 Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro Leu Leu
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 29
 Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys Tyr
 1 5 10 15
 Ser
 <210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 30
 Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Ile Ile
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 31
 Glu Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 32
 Lys Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Cys
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 33
 Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys Ser Asp
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu His
 20
 <210> 34
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 34
 Ile Ser Glu Trp Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro
 1 5 10 15
 Trp His Arg Phe Pro Val Thr Phe Gly
 20 25
 <210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 35
 Gln Thr Leu Gln Asn Ala Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Leu
 1 5 10 15
 Tyr Lys Ile Ile
 20
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 36
 Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro
 1 5 10

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> Người
<400> 37
Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg His Phe Val Ser Leu Cys Gln Lys
1 5 10 15

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với LY75, trong đó kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên này chứa:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

i) vhCDR thứ nhất chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5;

ii) vhCDR thứ hai chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6; và

iii) vhCDR thứ ba chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7; và

b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa :

i) vlCDR thứ nhất chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8;

ii) vlCDR thứ hai chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9; và

iii) vlCDR thứ ba chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

tùy ý trong đó một hoặc nhiều trình tự như nêu trong SEQ ID NO bất kỳ nêu trên độc lập chứa một hoặc hai đột biến thay thế axit amin và trong đó kháng thể này được nội hóa.

2. Kháng thể phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với LY75, trong đó kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên này chứa:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa:

i) vhCDR thứ nhất chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5;

ii) vhCDR thứ hai chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6; và

iii) vhCDR thứ ba chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7; và

b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa :

i) vlCDR thứ nhất chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8;

ii) vlCDR thứ hai chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9; và

iii) vlCDR thứ ba chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10

3. Kháng thể phân lập hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 99% hoặc 100% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ

có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 99% hoặc 100% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

4. Kháng thể phân lập hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này còn chứa gốc liên kết cộng hóa trị, tùy ý trong đó gốc này là được chất.

5. Kháng thể phân lập hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó được chất được chọn từ nhóm bao gồm maytansinoid, dolastatin, hemiasterlin, auristatin, trichothecene, calicheamicin, CC1065 và các dẫn xuất của chúng, tốt hơn nếu trong đó được chất là maytansinoid được chọn từ nhóm bao gồm DM4 và DM1.

6. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, cùng với một hoặc nhiều chất pha loãng, tá dược hoặc chất mang dược dụng.

7. Axit nucleic mã hóa i) chuỗi nặng của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, và ii) chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

8. Vector biểu hiện chứa một hoặc cả hai axit nucleic theo điểm 7 được liên kết điều khiển với một hoặc nhiều đoạn điều hòa

9. Tế bào vật chủ chứa:

(i) vector biểu hiện chứa các axit nucleic theo điểm 7 được liên kết điều khiển với một hoặc nhiều đoạn điều hòa; hoặc

(ii) vector biểu hiện thứ nhất chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 7 được liên kết điều khiển với một hoặc nhiều đoạn điều hòa và vector biểu hiện thứ hai chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 7 được liên kết điều khiển với một hoặc nhiều đoạn điều hòa.

10. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 9 trong các điều kiện trong đó kháng thể này hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó được biểu hiện và tùy ý bước phân lập kháng thể này hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó.

```

SEQ ID NO.11      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT
SEQ ID NO.1       EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT
SEQ ID NO.12      -----
                  *****:*****

```



```

SEQ ID NO.11      DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTTIVT-----
SEQ ID NO.1       DYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTIFGVVSFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO.12      -----YFDYWGQGTLVTVSS
                  *****:*****

```

Fig.1

```

SEQ ID NO.2       DVQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQSSISDYLSWYQQRPGKAPNLLIYAASNLKTGVPS
SEQ ID NO.13      DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQSSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
SEQ ID NO.14      -----
                  *:***** ** ****:****:***** *: ****

```



```

SEQ ID NO.2       RFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSRYRSEWTFGGGTKEVLEIKR
SEQ ID NO.13      RFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYSE-----
SEQ ID NO.14      -----WTFGGGTKEVLEIKR
                  *****:*****

```

Fig.2

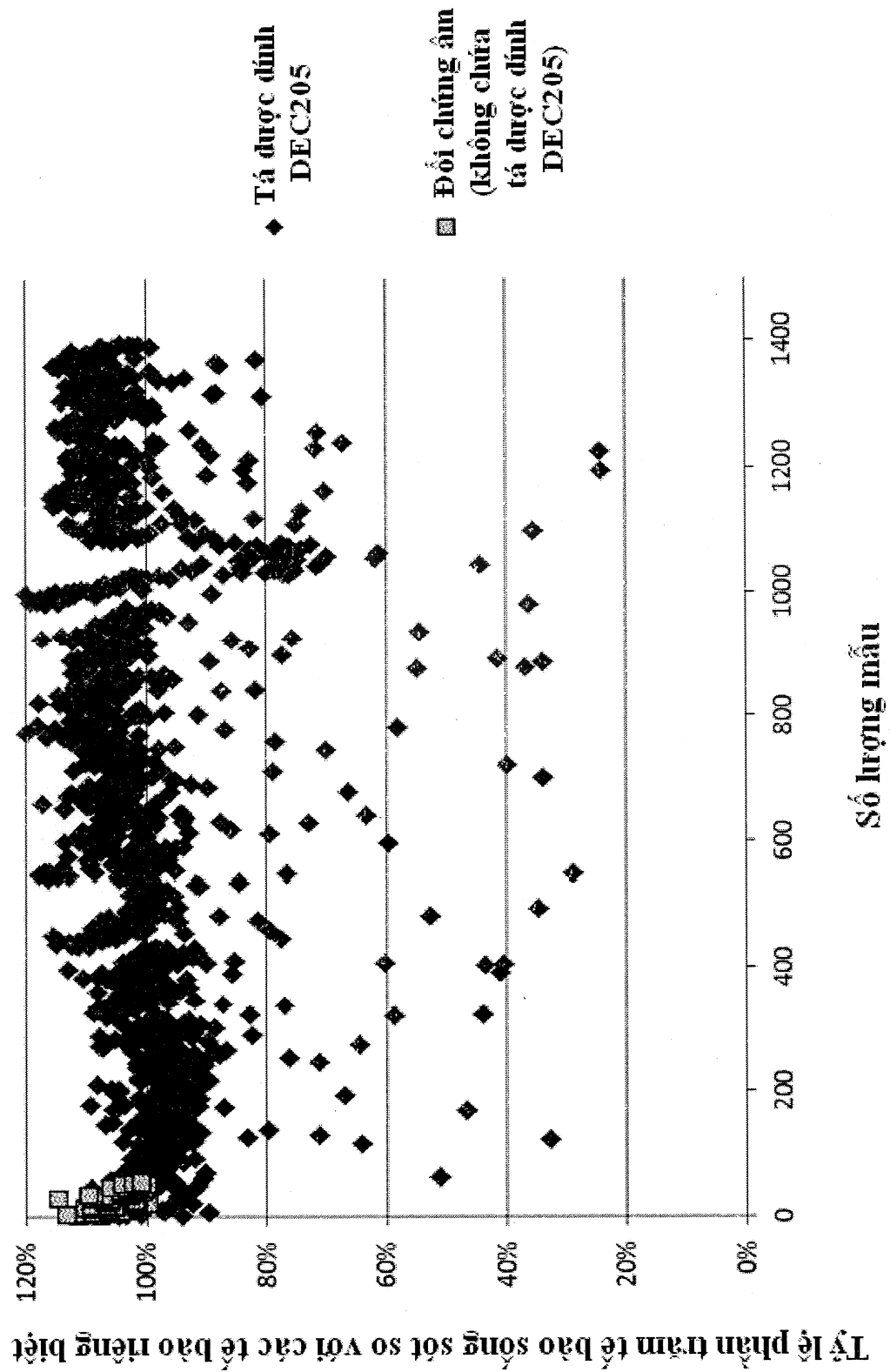
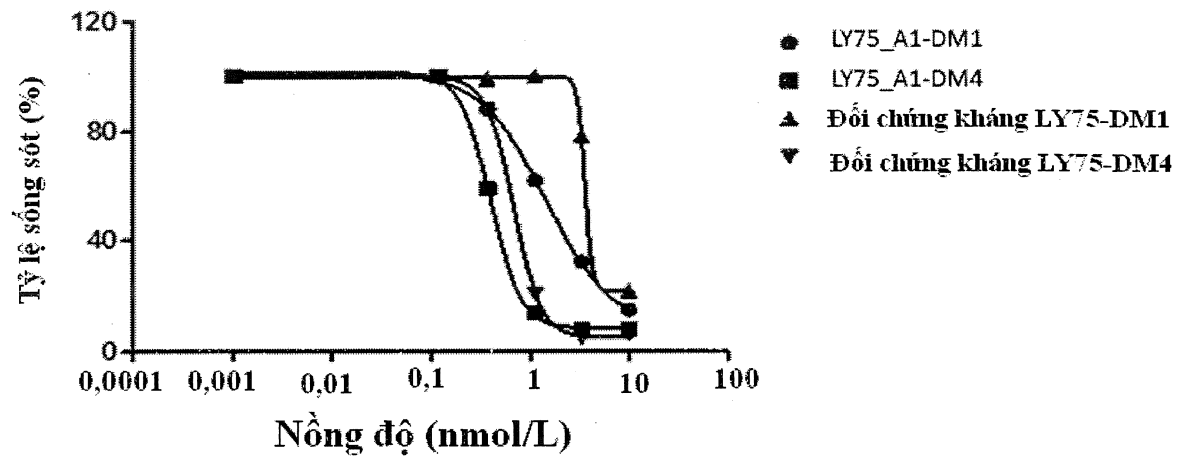
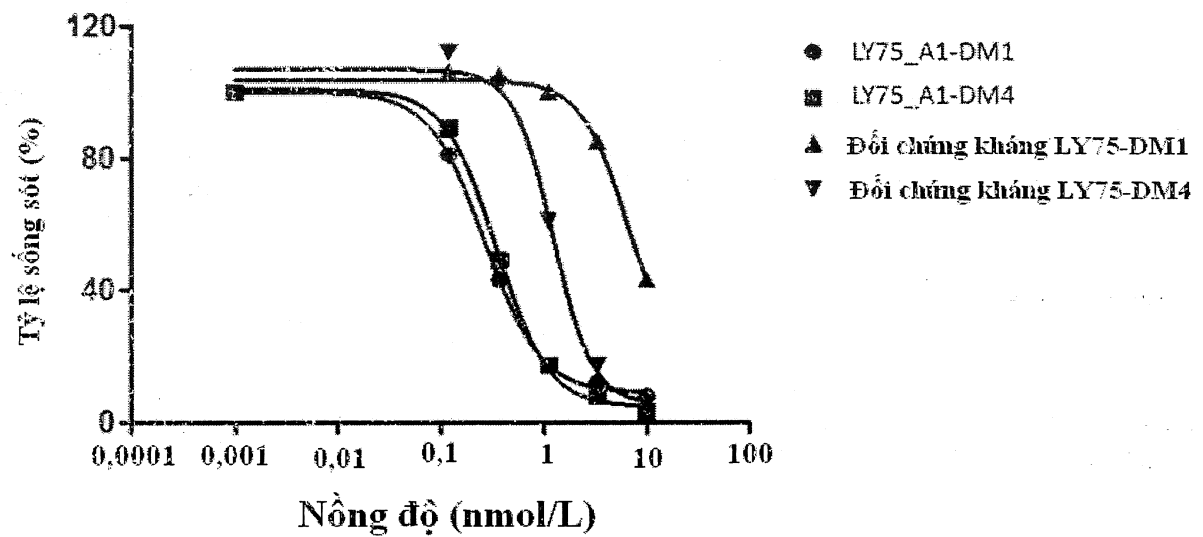


Fig.3a

**Fig.3b****Fig.3c**

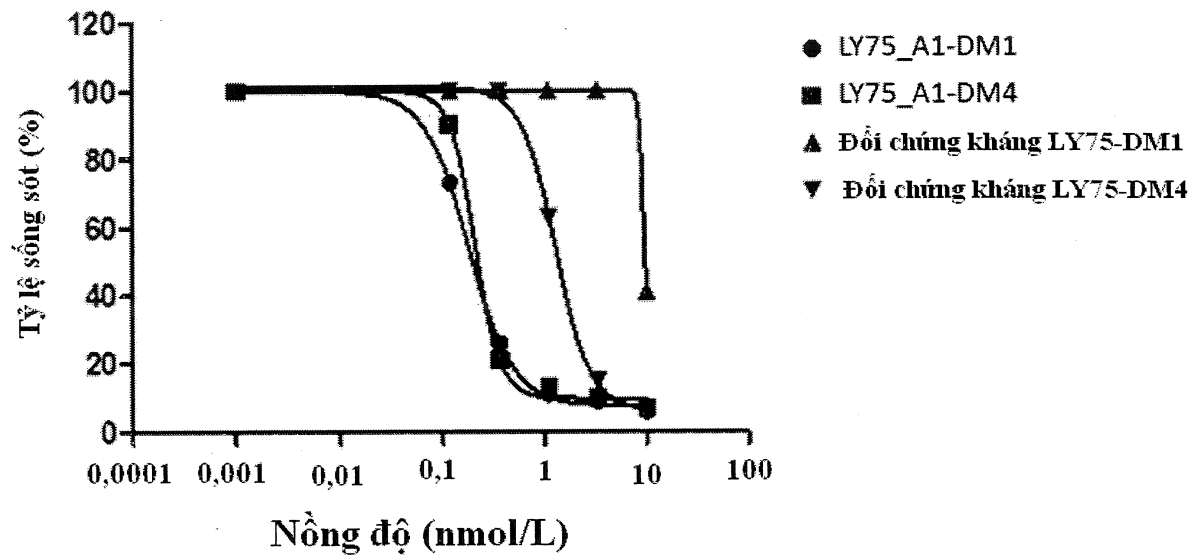


Fig.3d

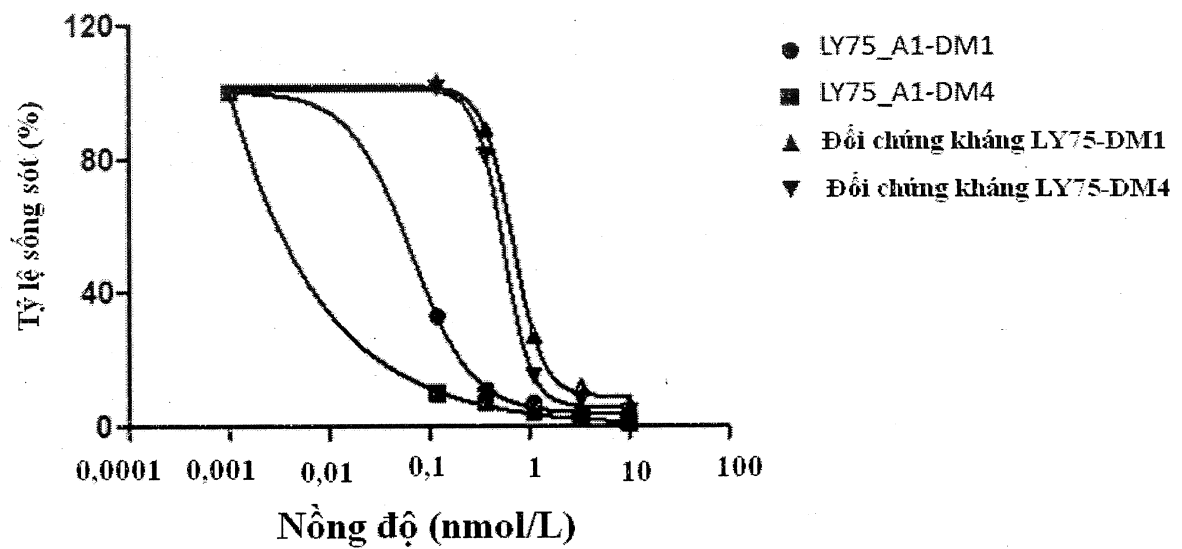
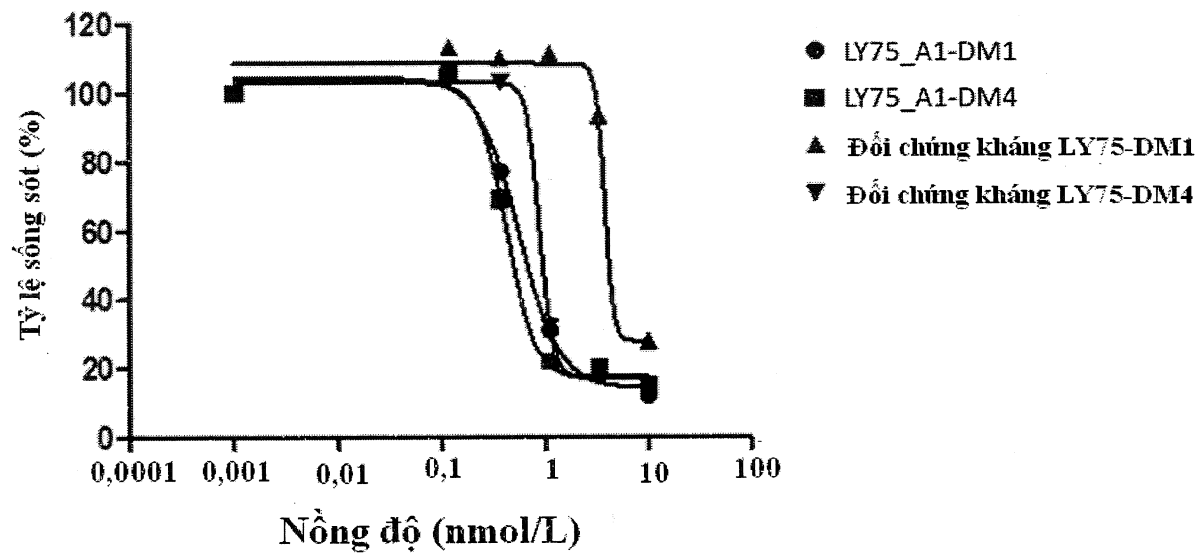
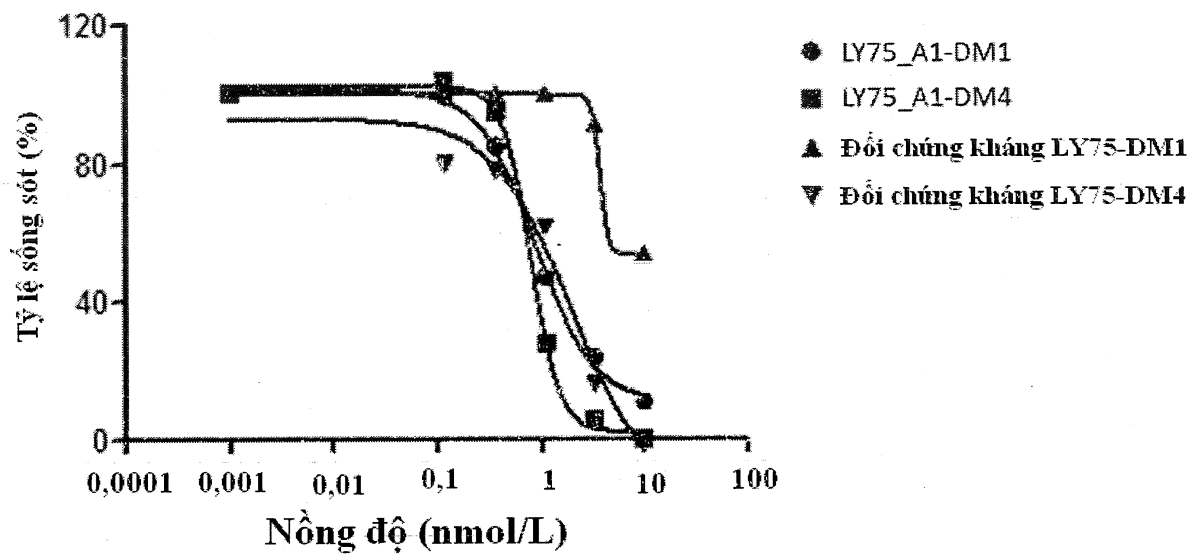


Fig.3e

**Fig.3f****Fig.3g**

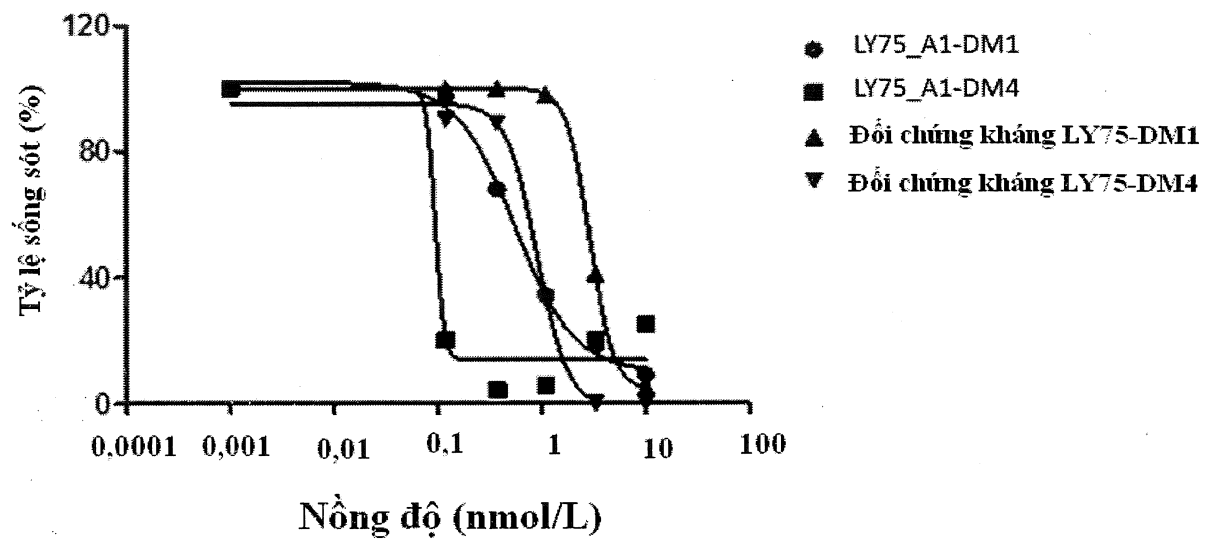


Fig.3h

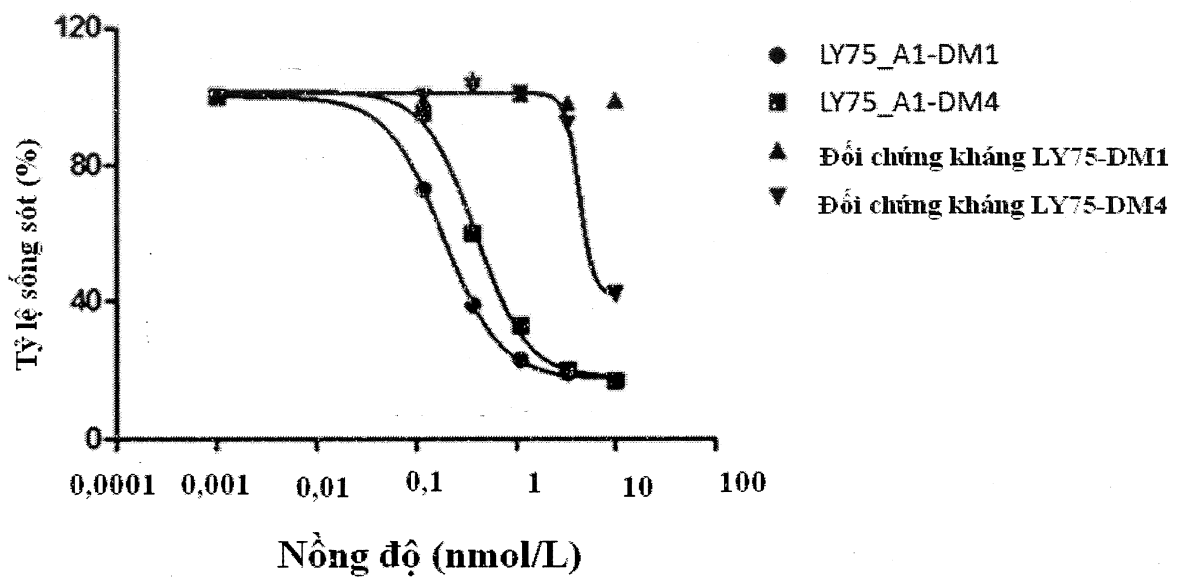


Fig.3i

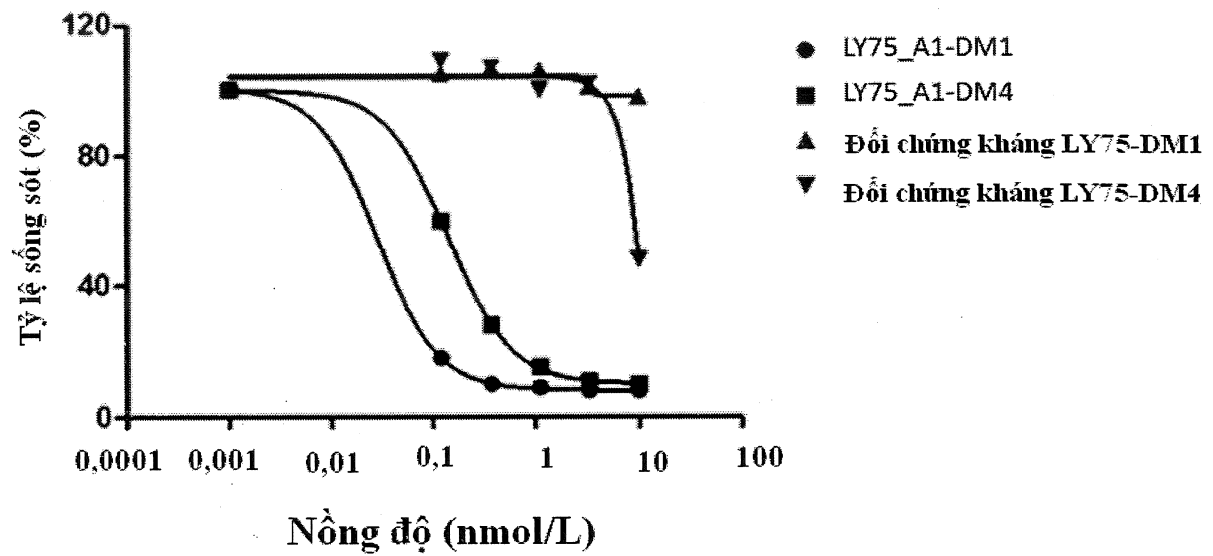


Fig.3j

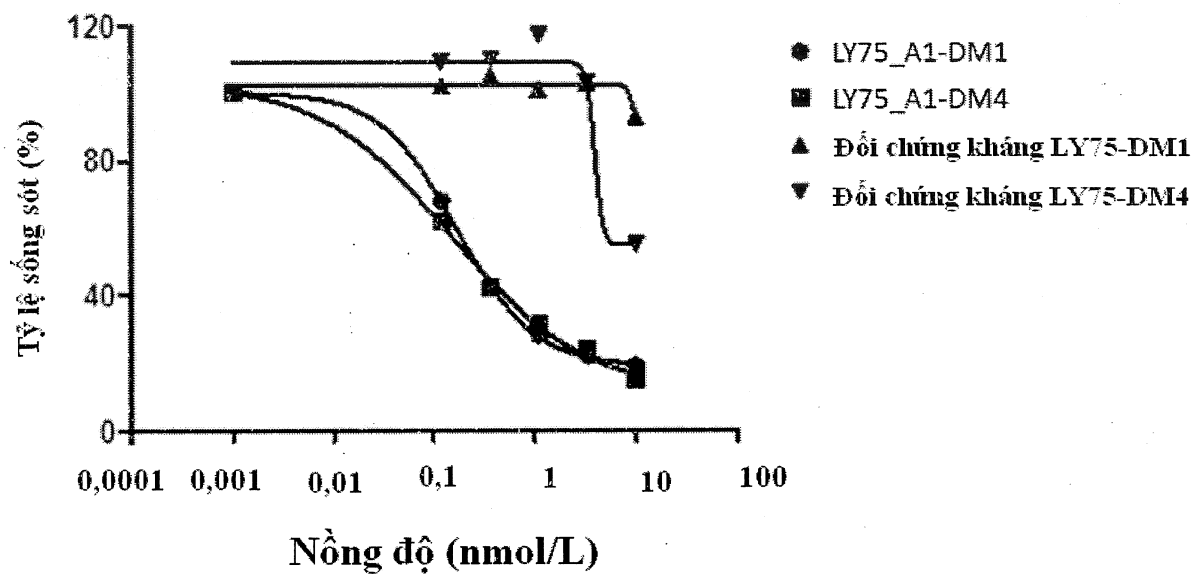
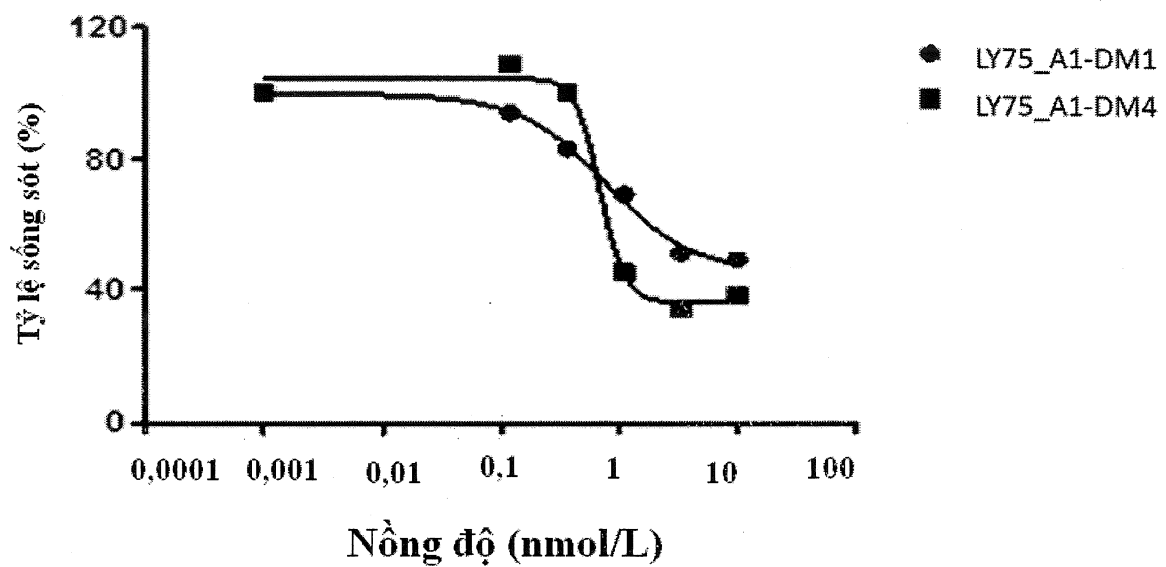
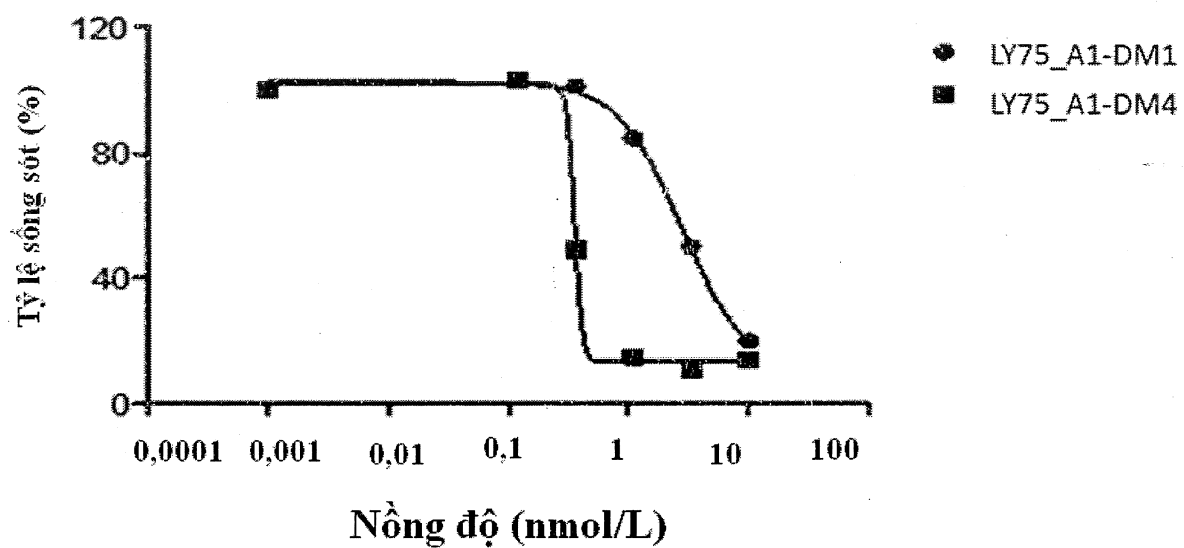
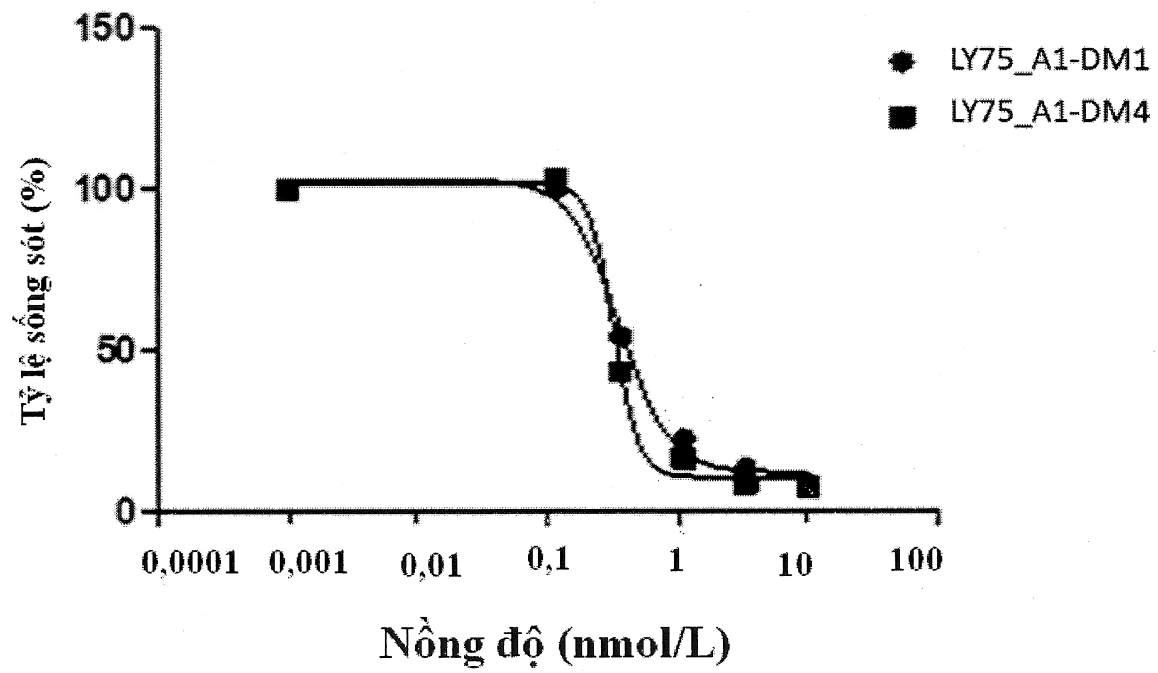
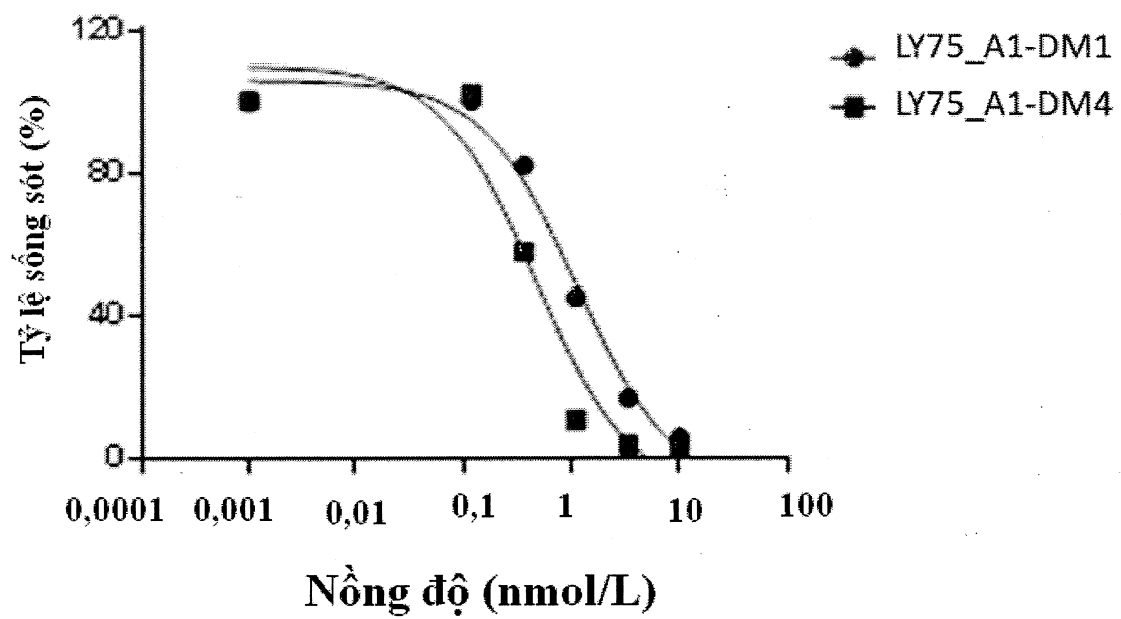
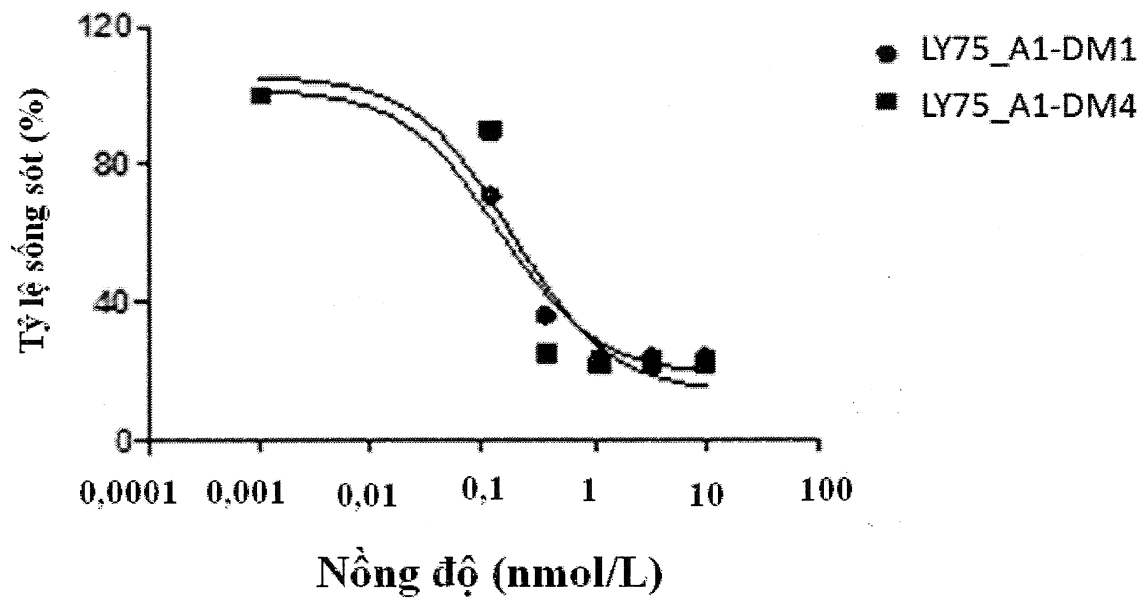
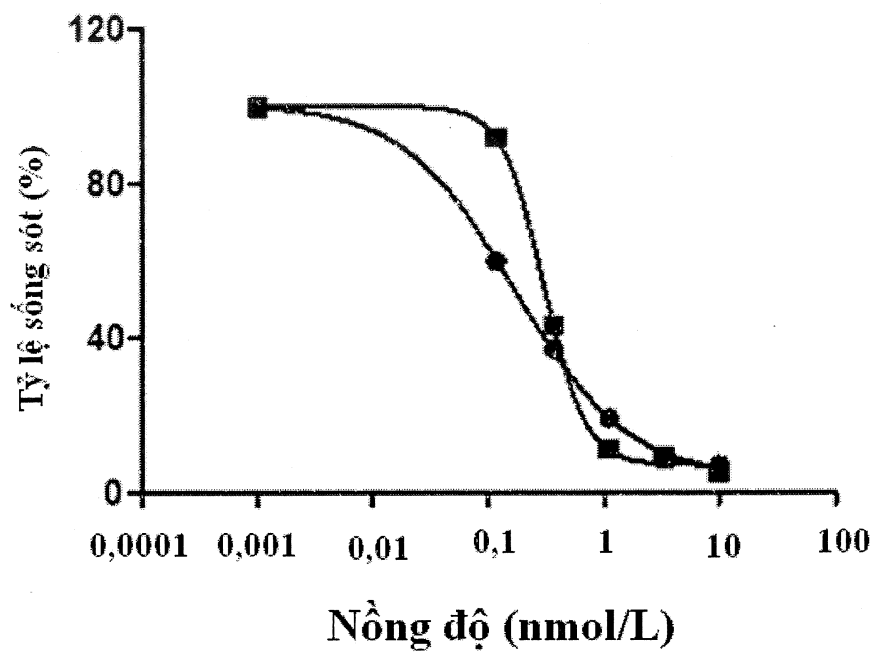
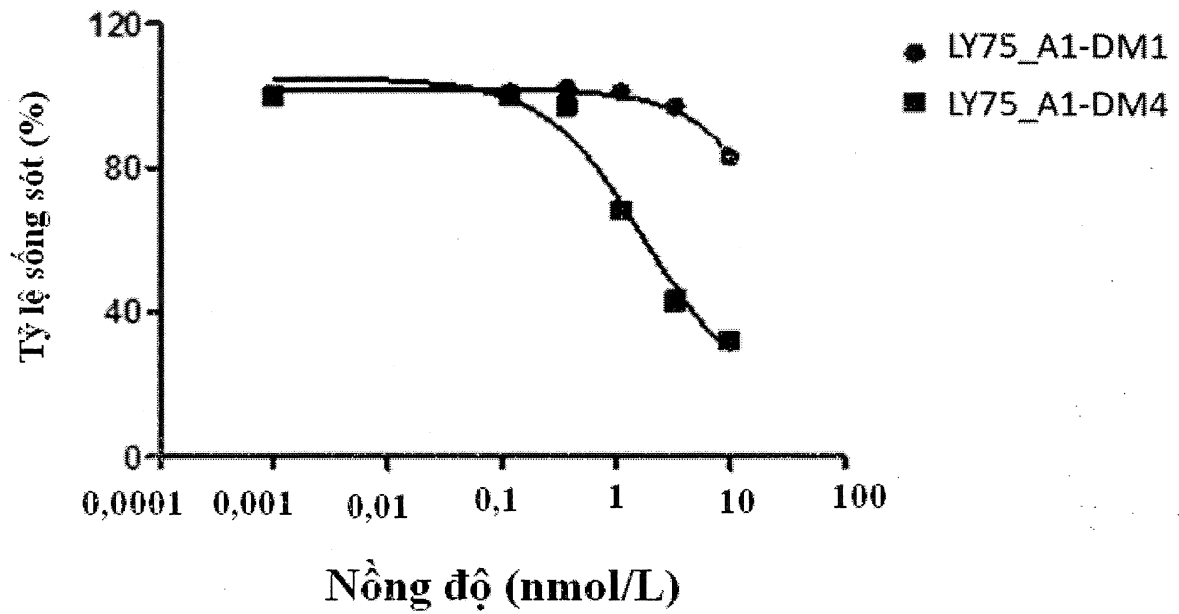
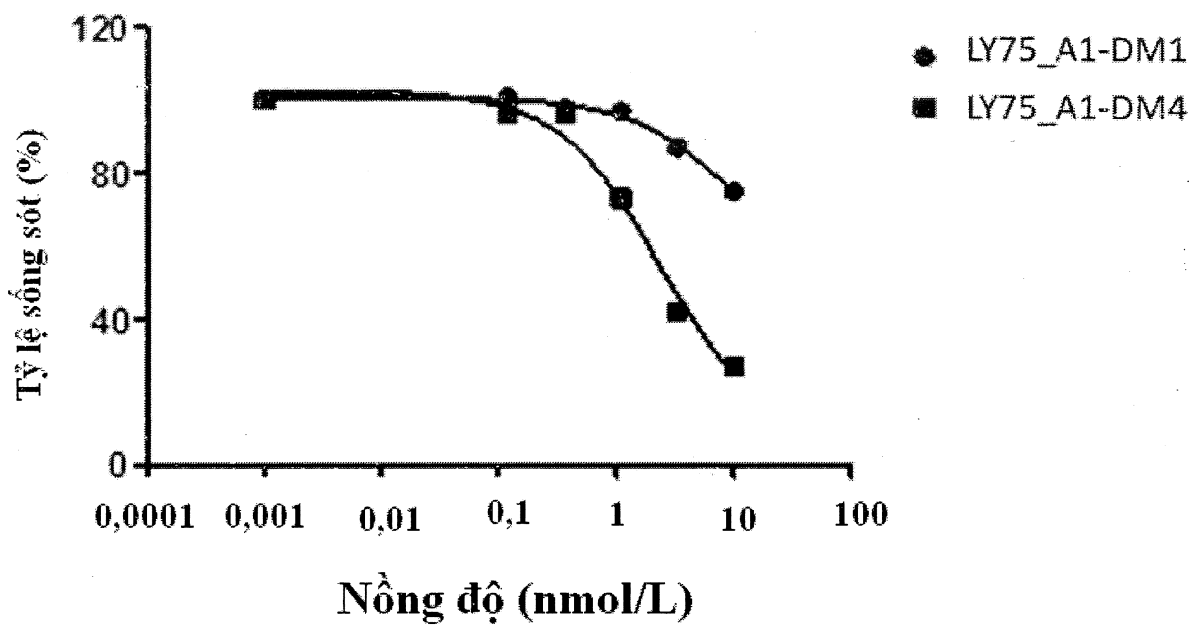


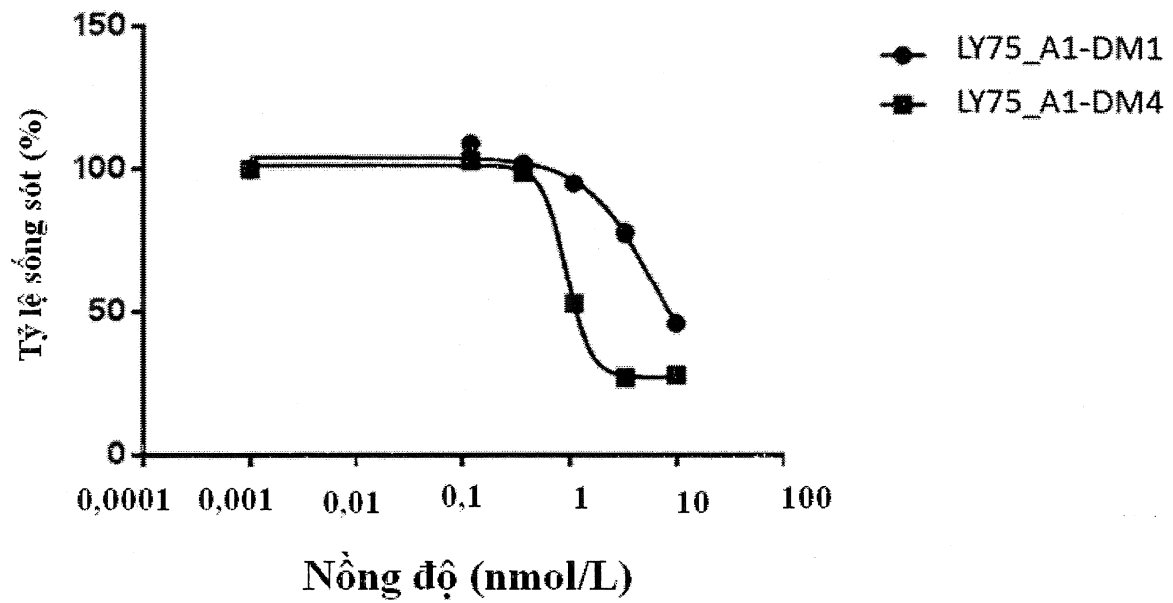
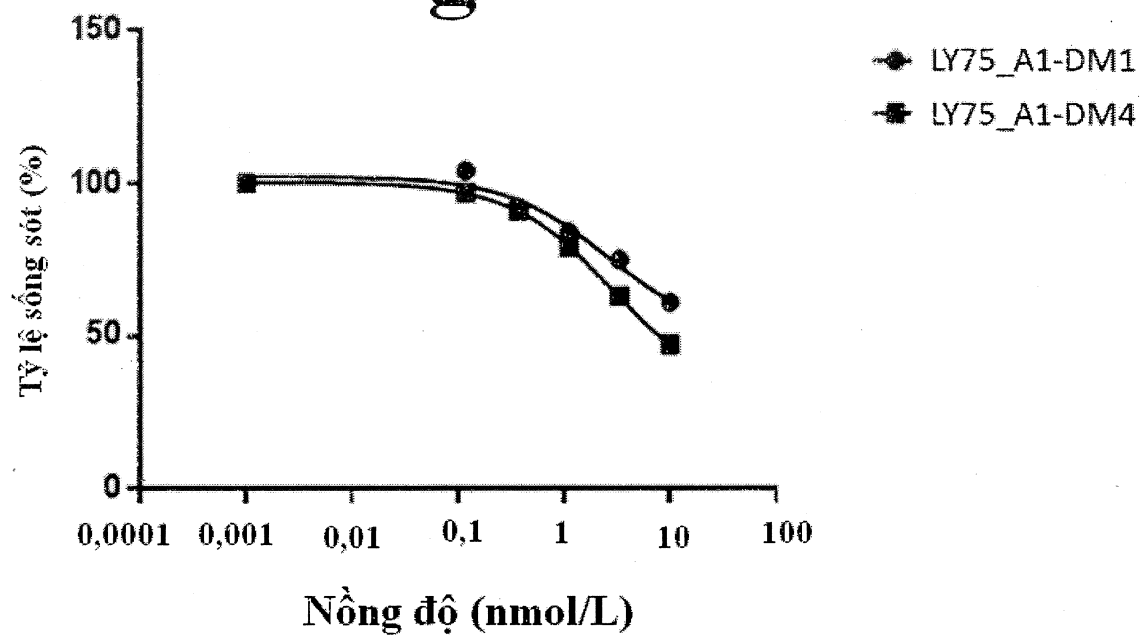
Fig.3k

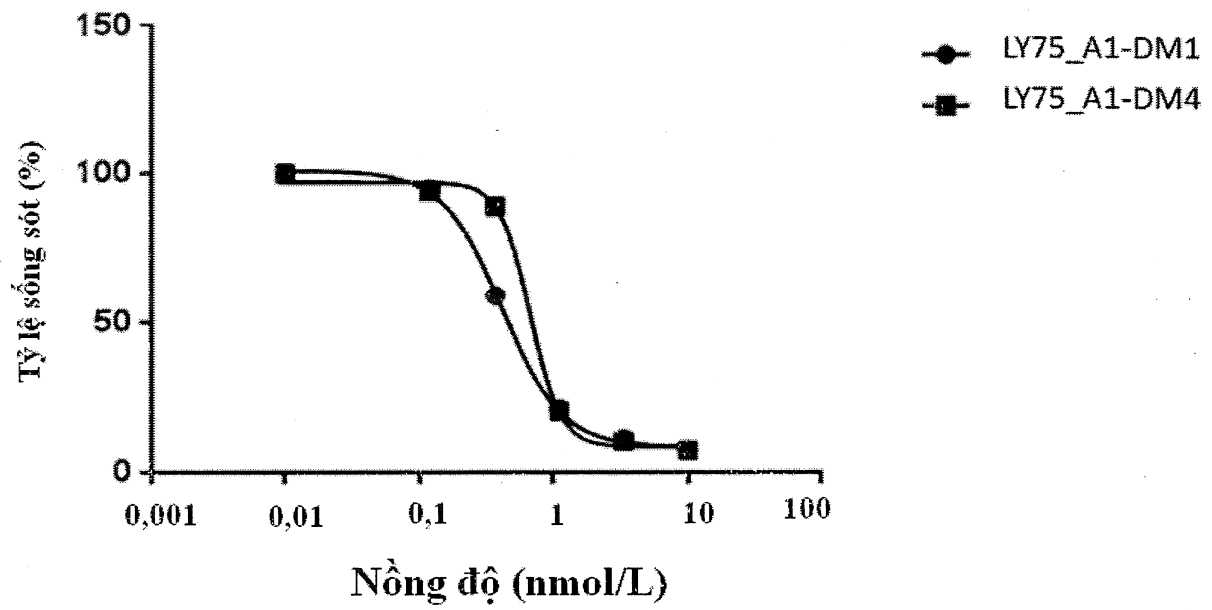
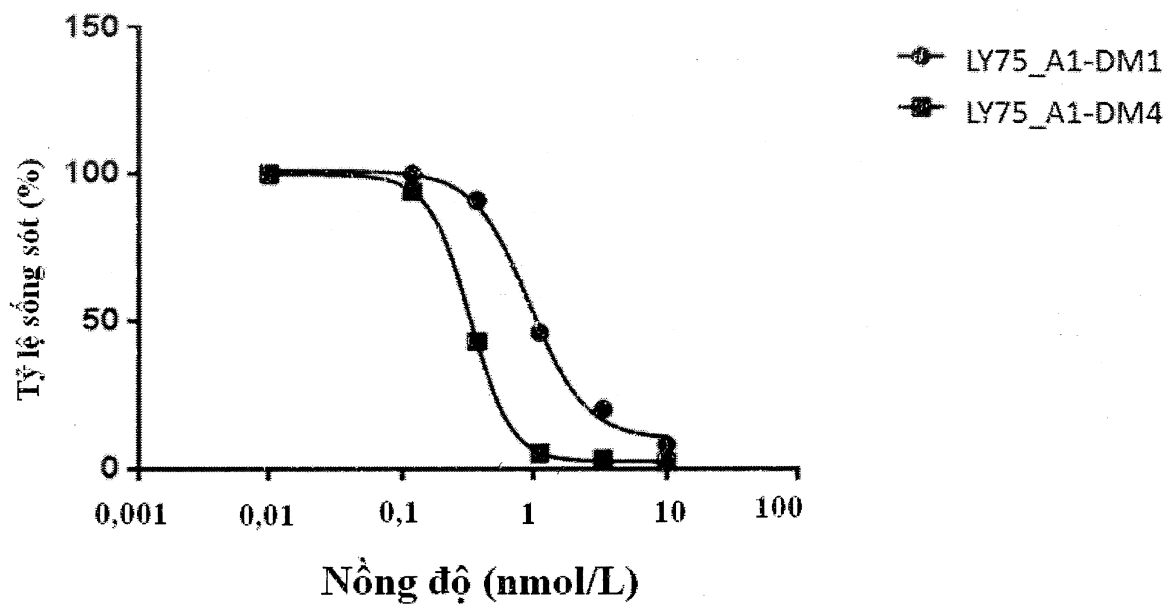
**Fig.3l****Fig.3m**

**Fig.3n****Fig.3o**

**Fig.3p****Fig.3q**

**Fig.3r****Fig.3s**

**Fig.3t****Fig.3u**

**Fig.3v****Fig.3w**

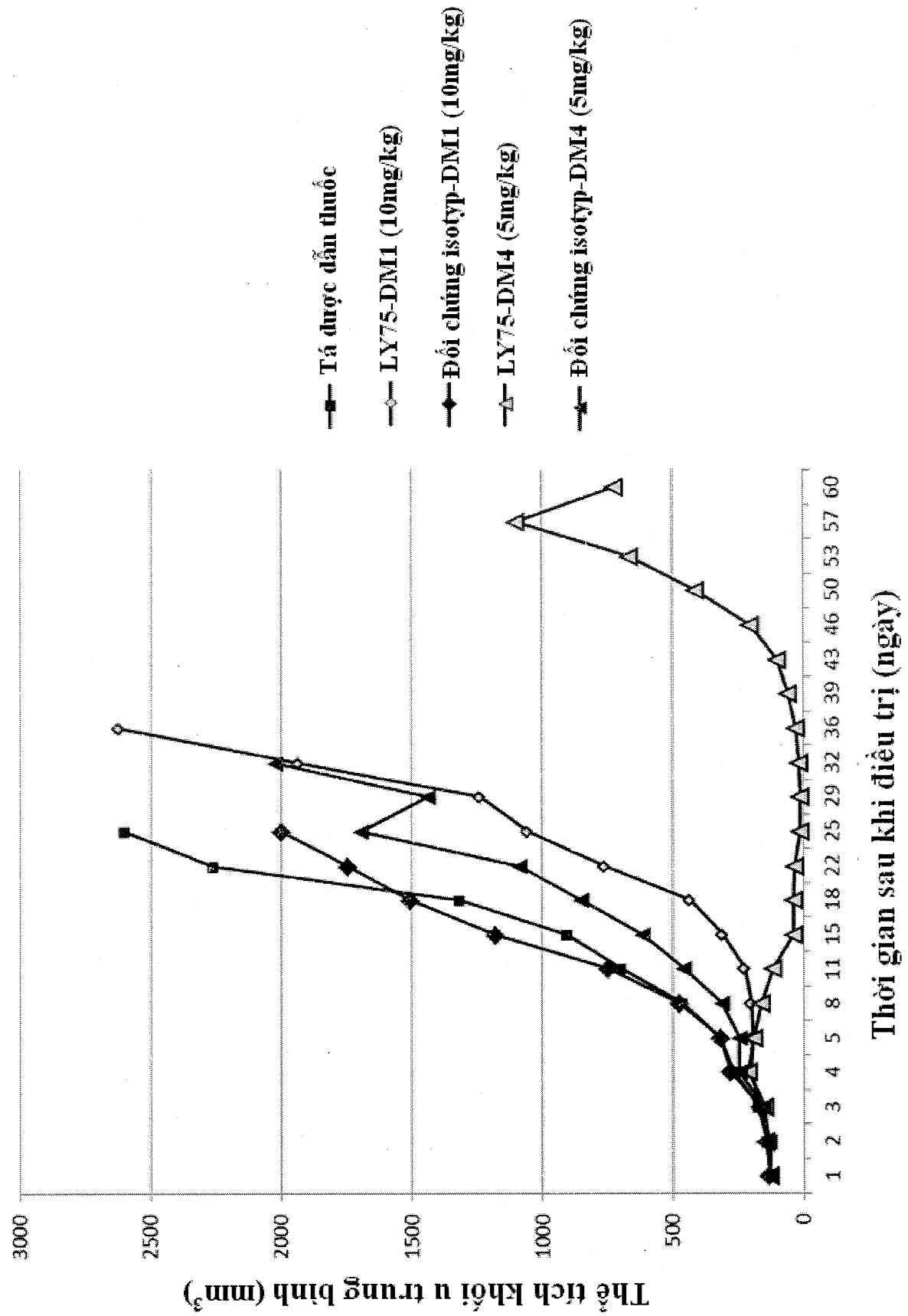


Fig.4a

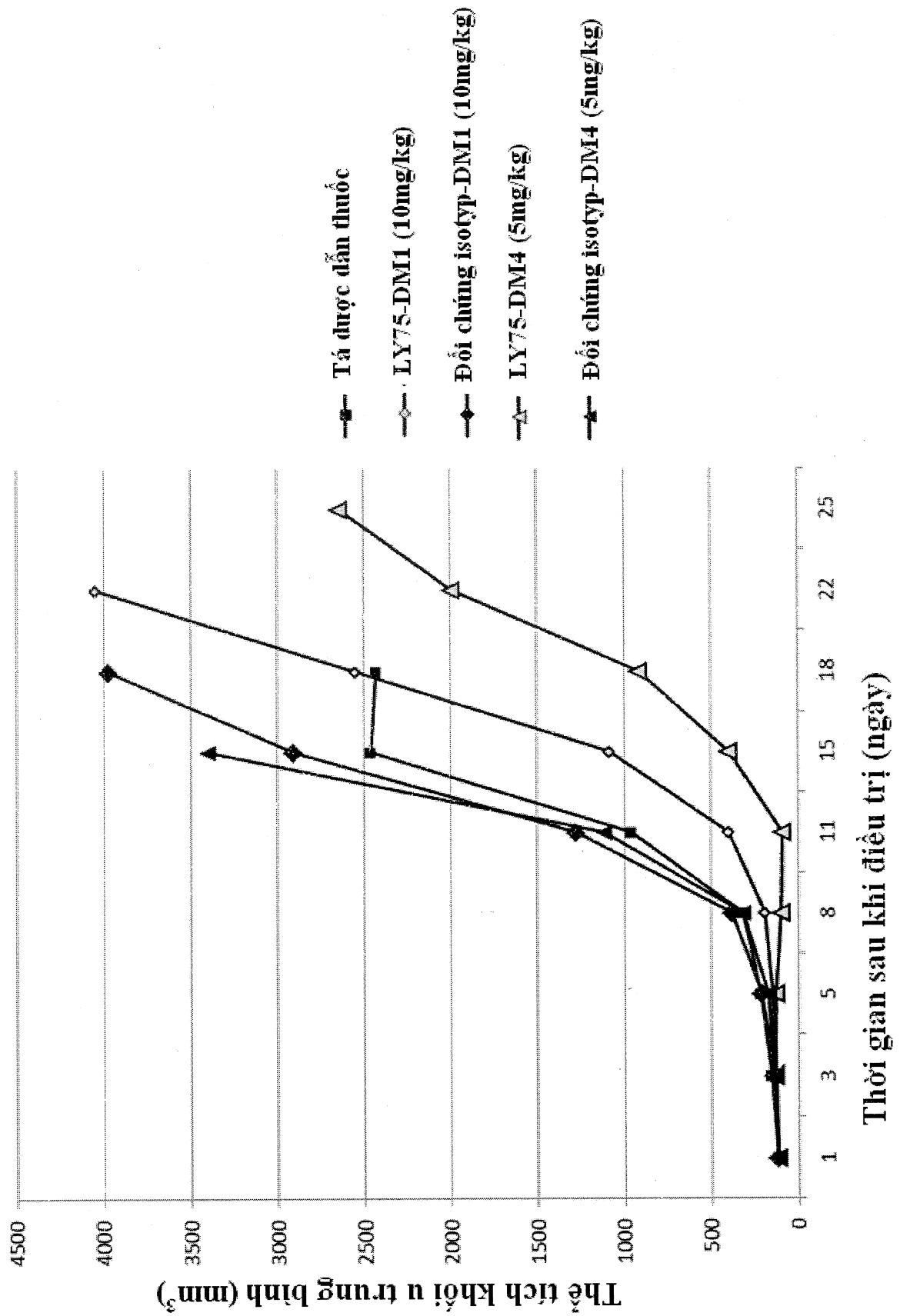


Fig.4b

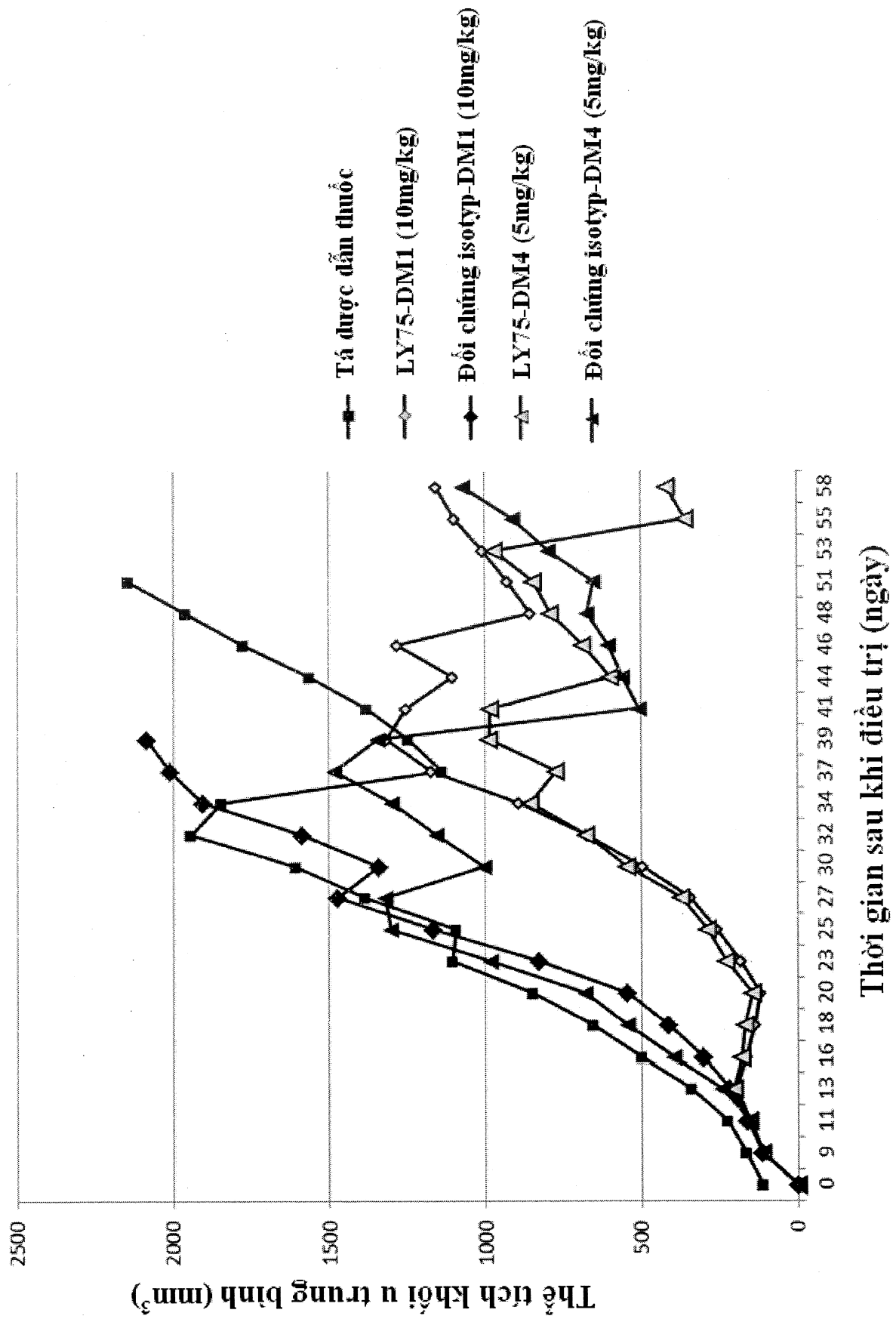


Fig.4c

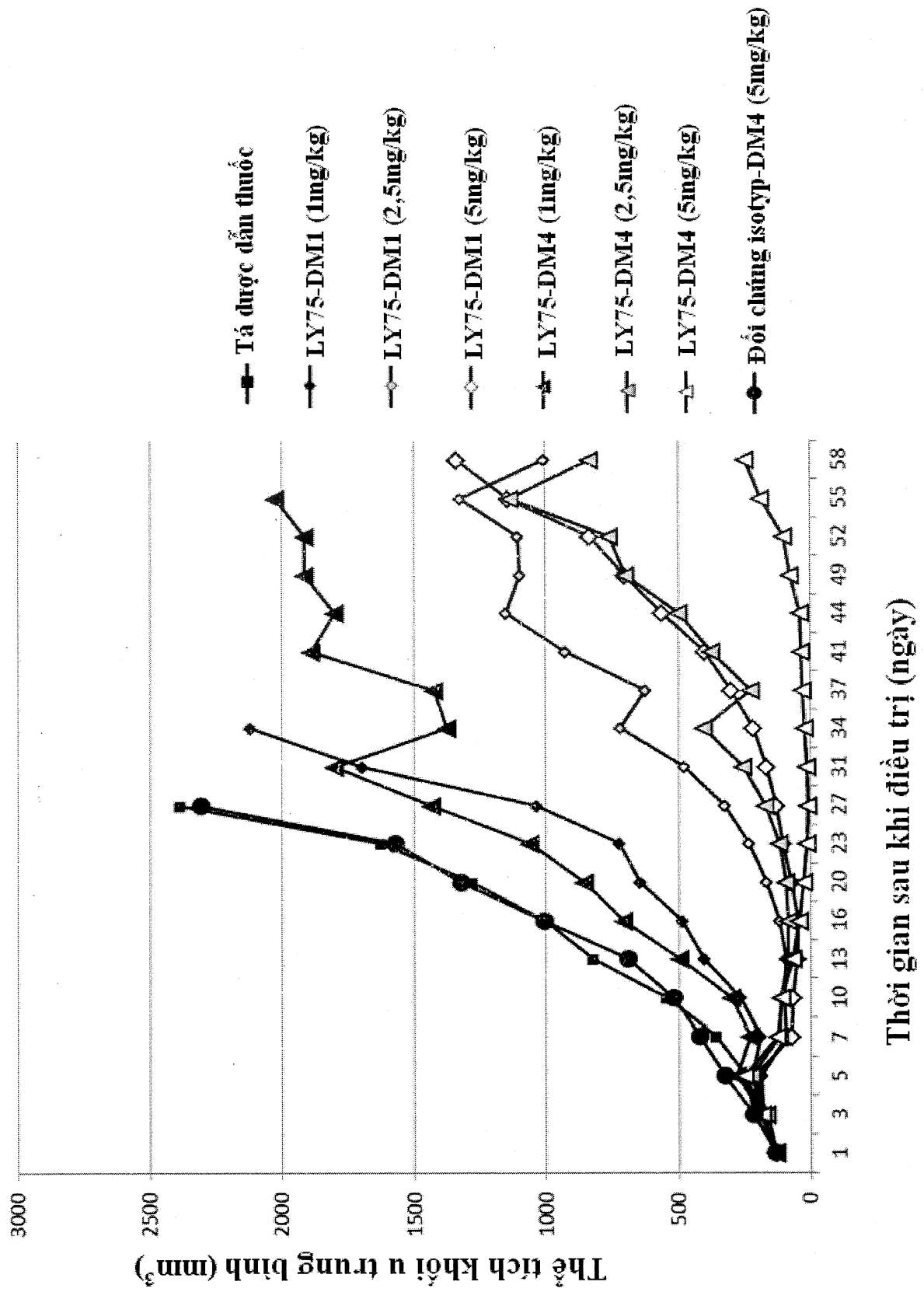


Fig.4d

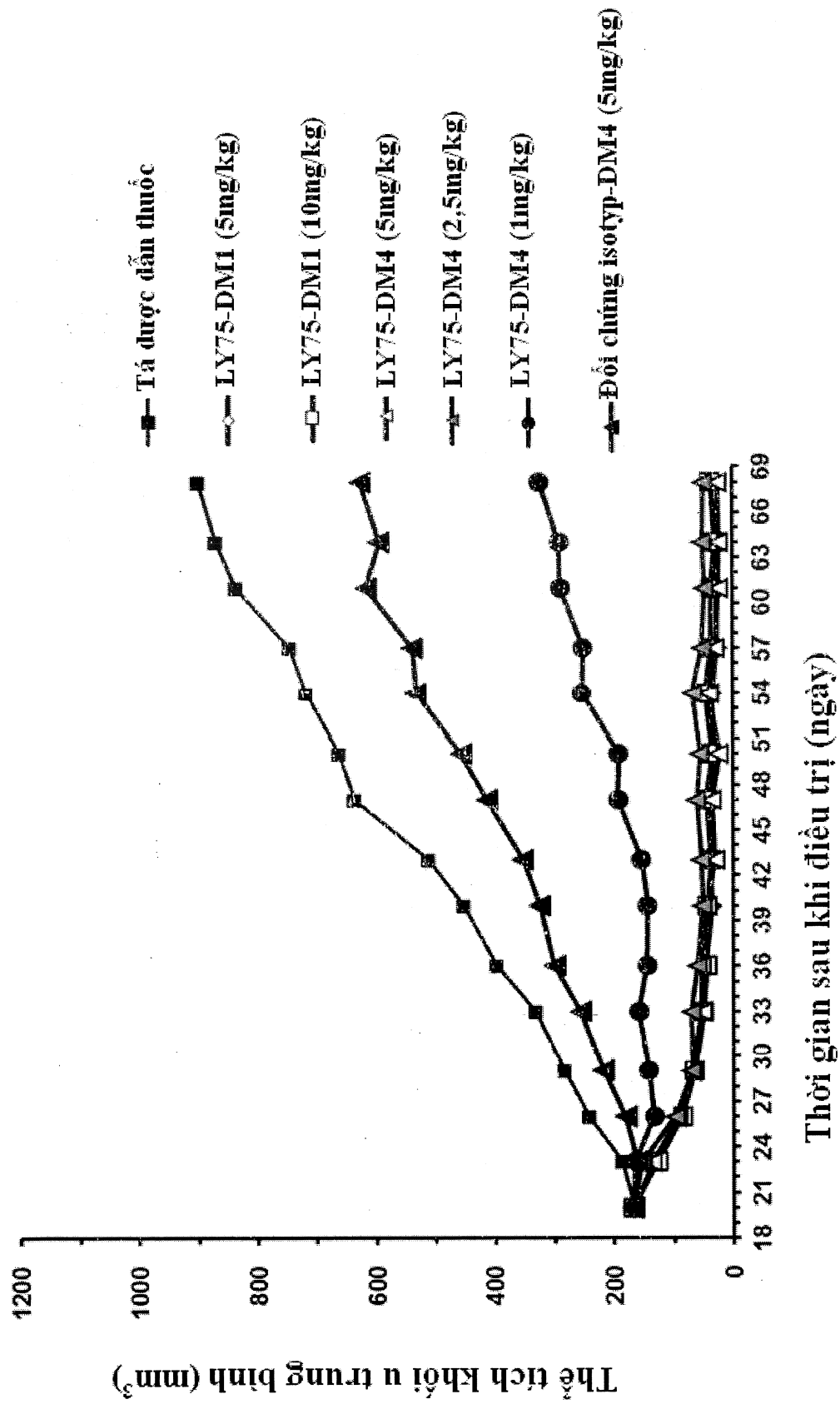


Fig.4e

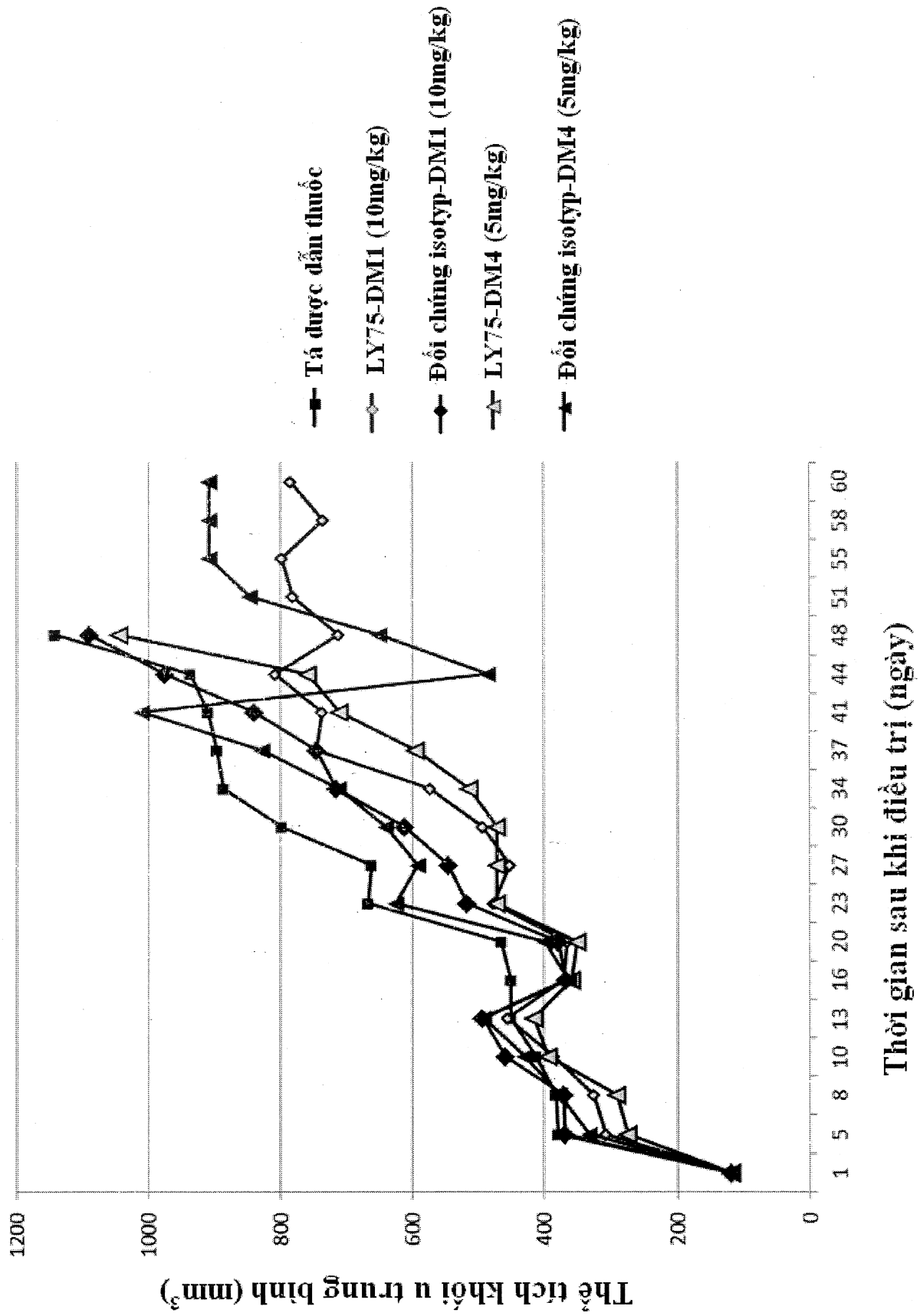


Fig.4f

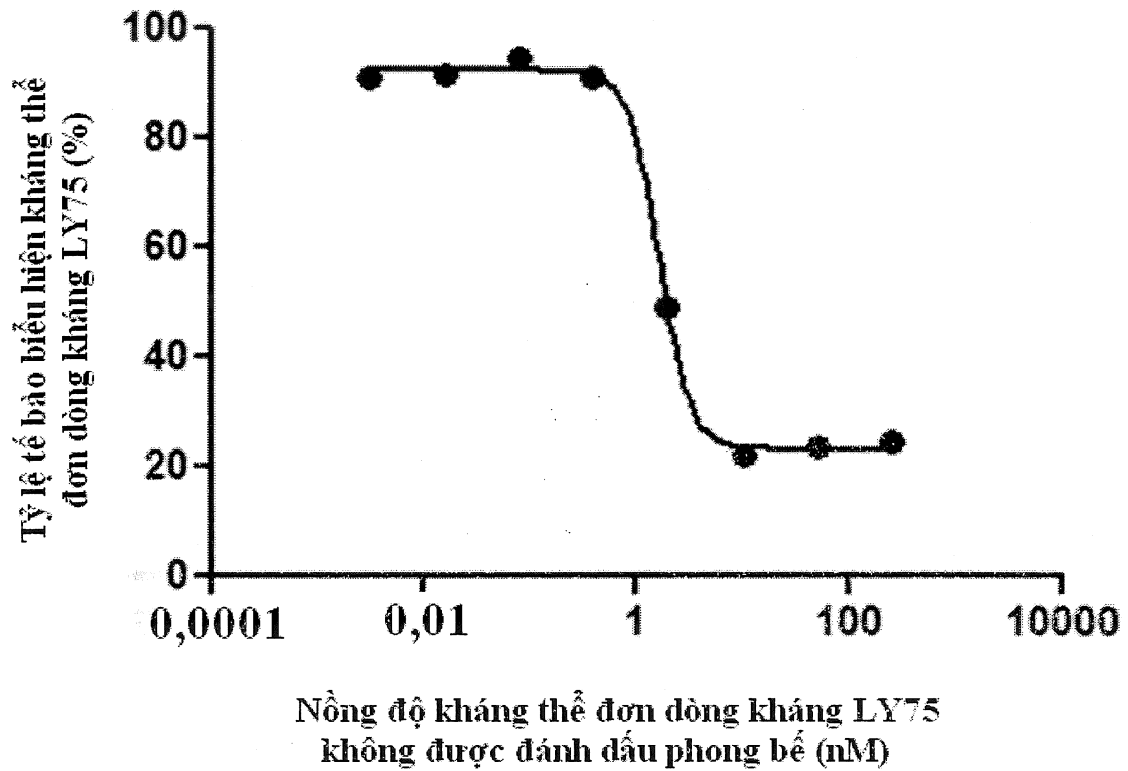


Fig.5a

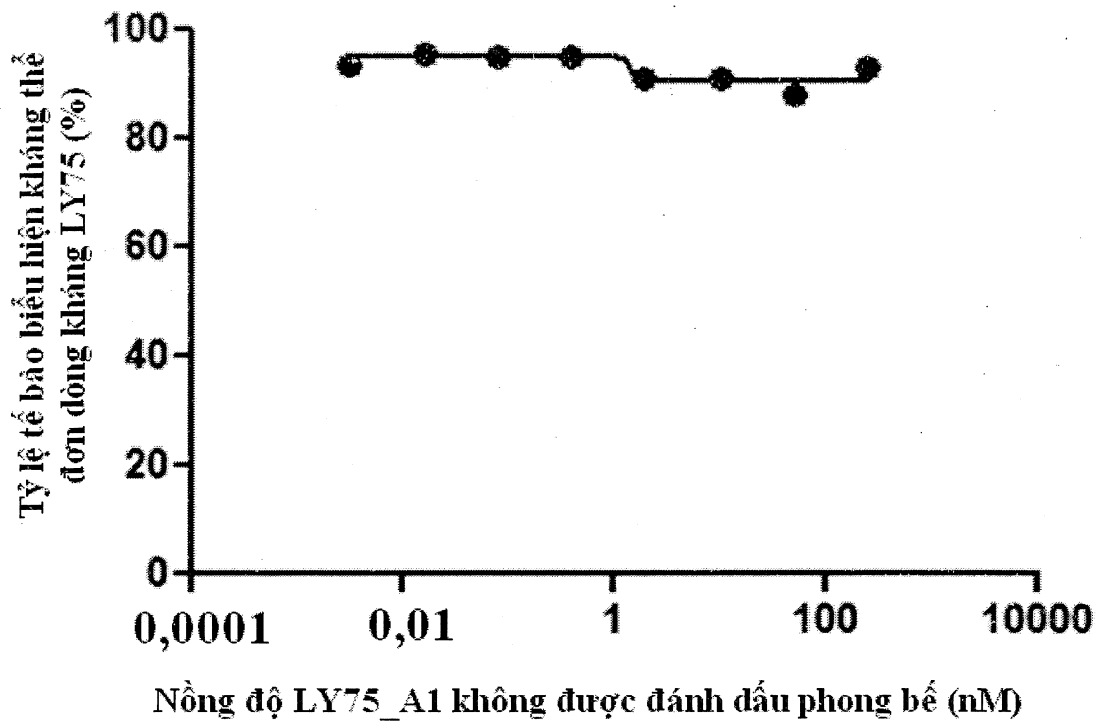
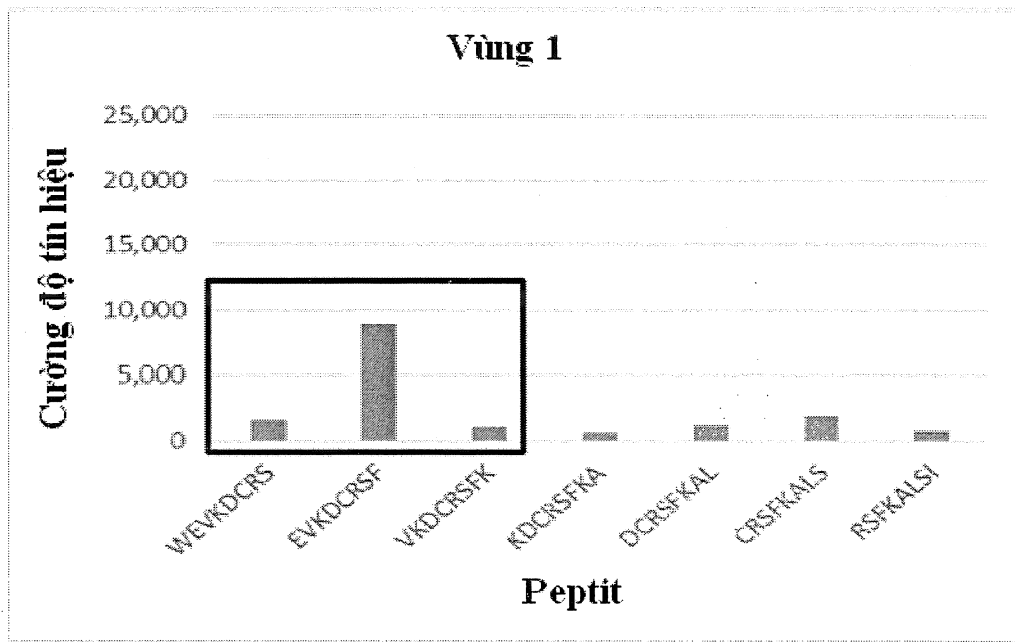
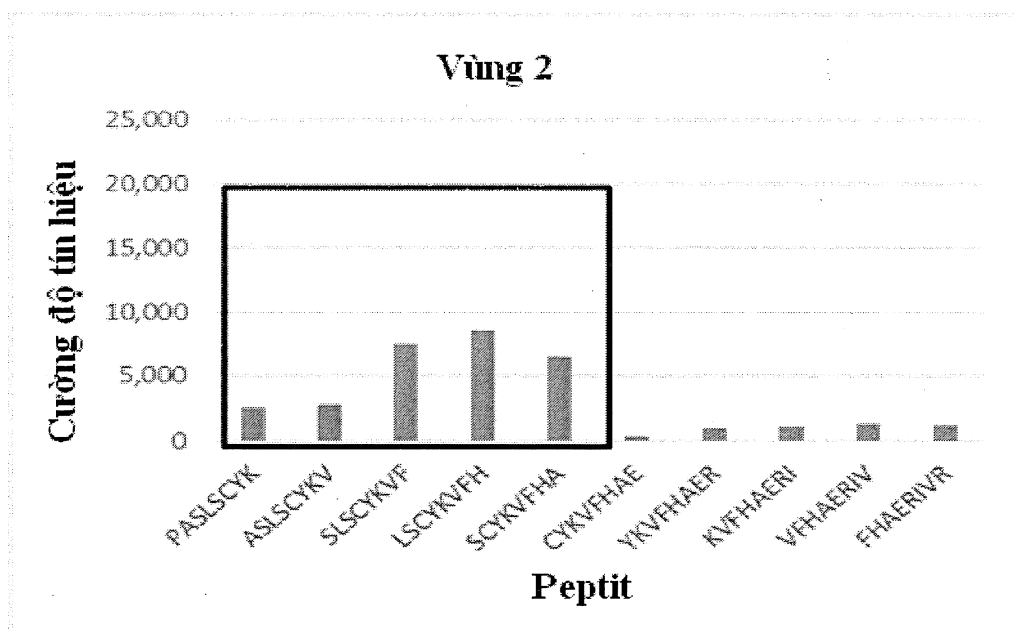


Fig.5b

**Fig.6a****Fig.6b**

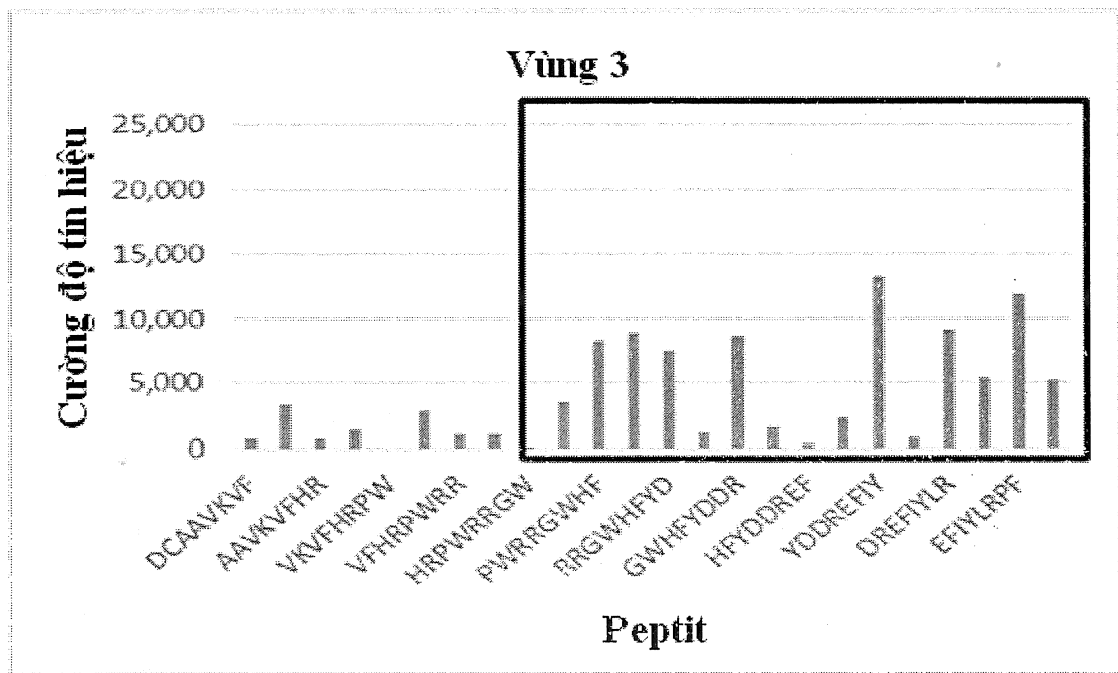


Fig.6c

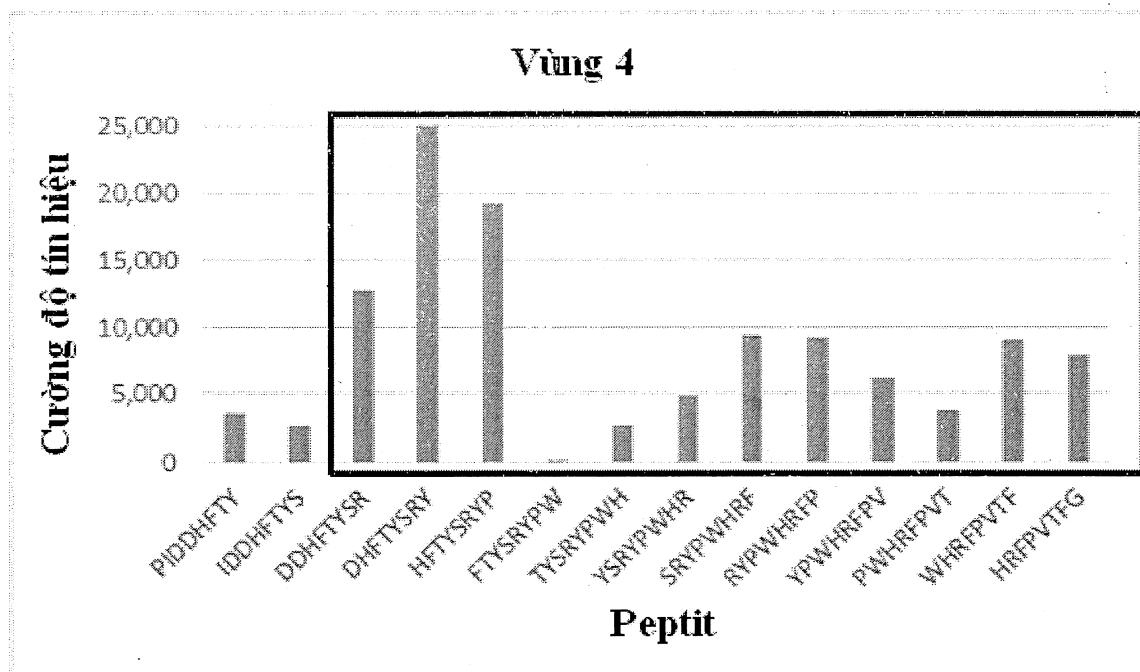
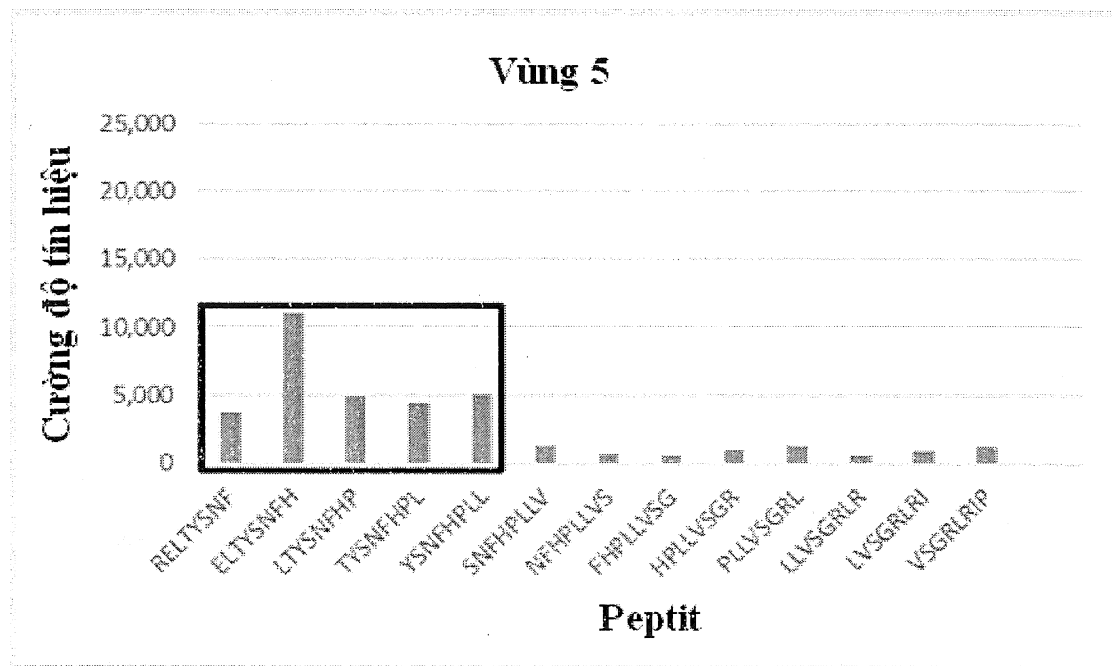
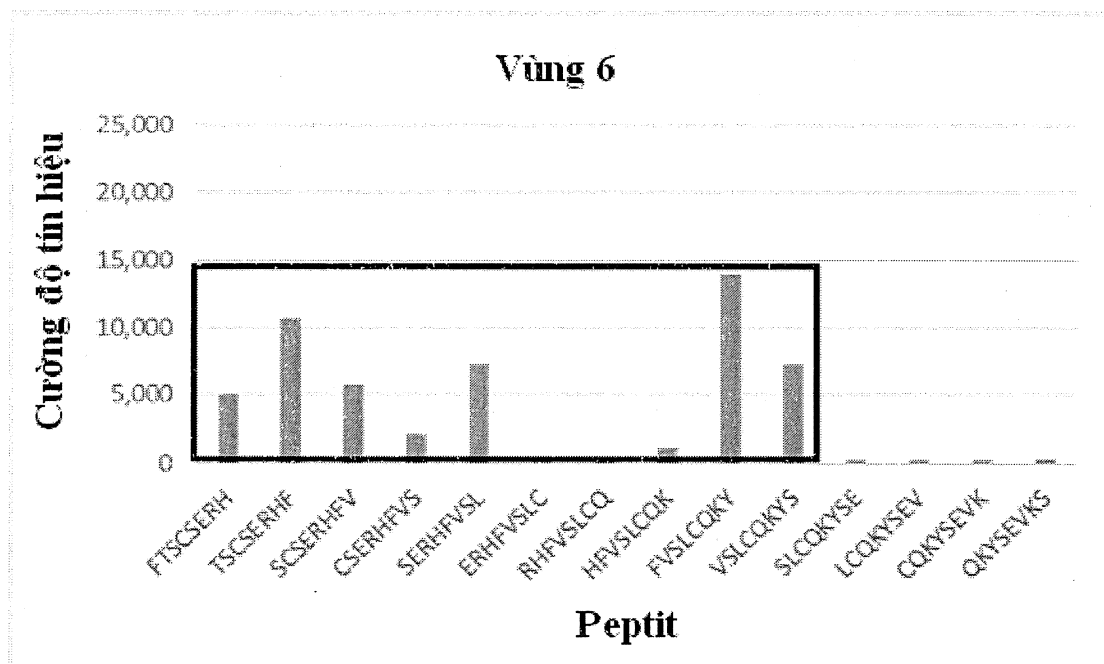


Fig.6d

**Fig.6e****Fig.6f**

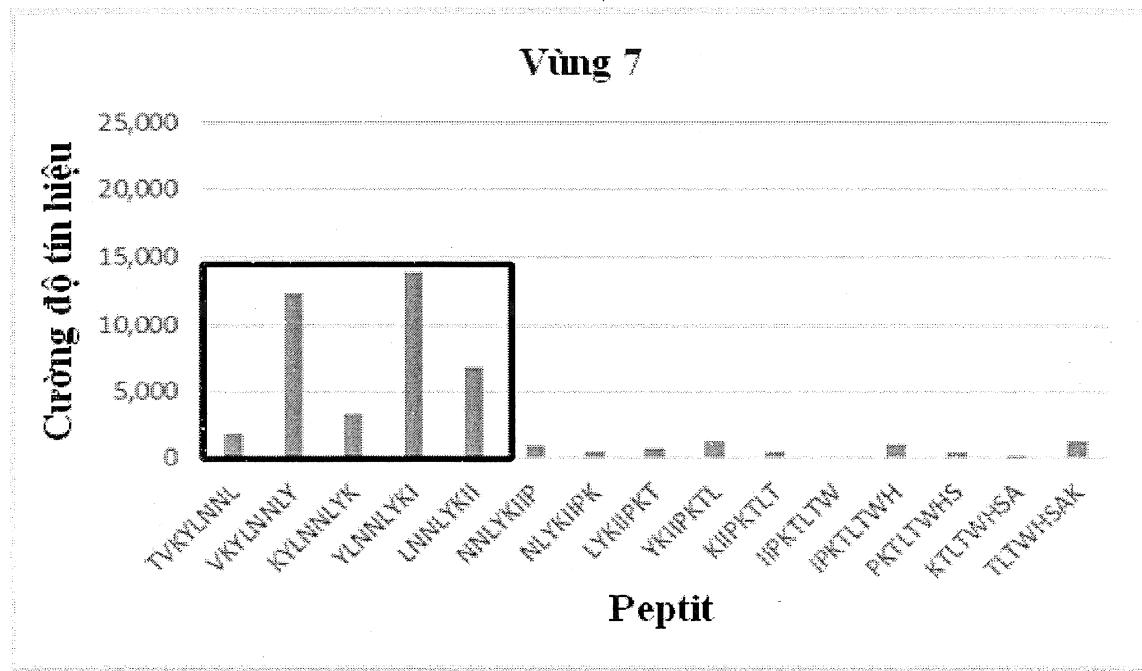


Fig.6g

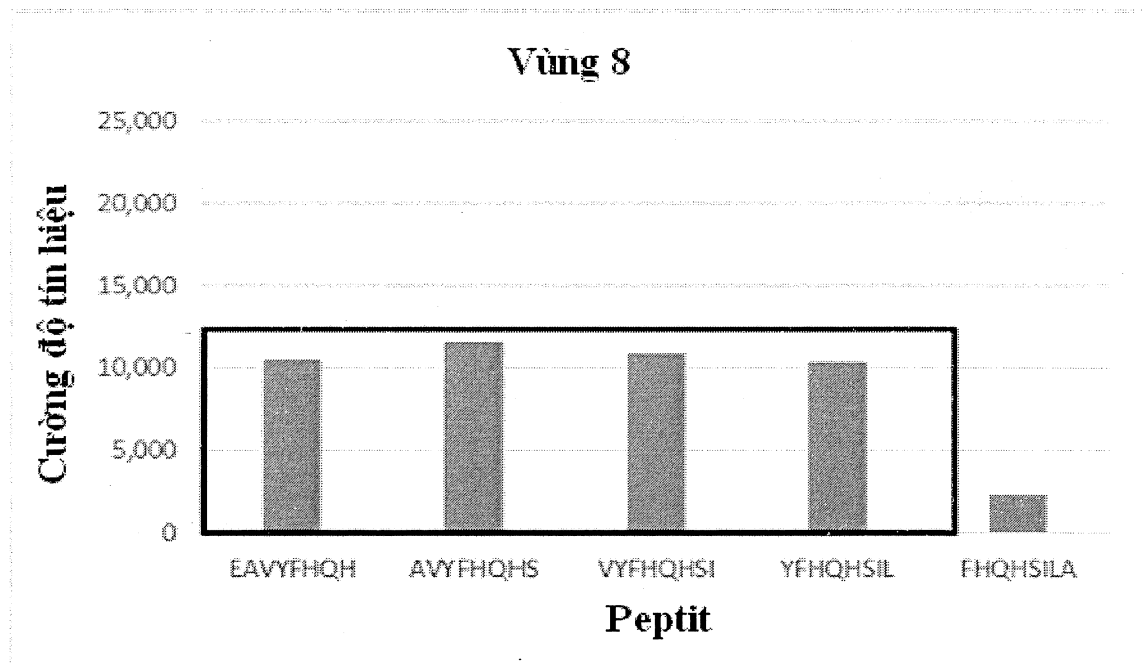
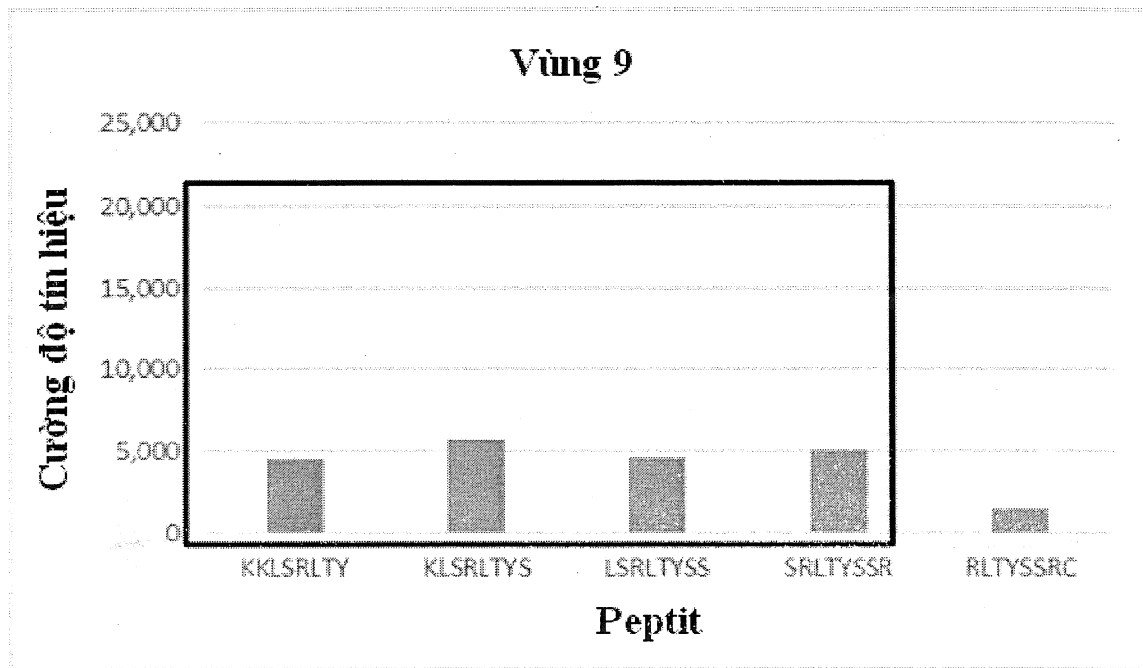
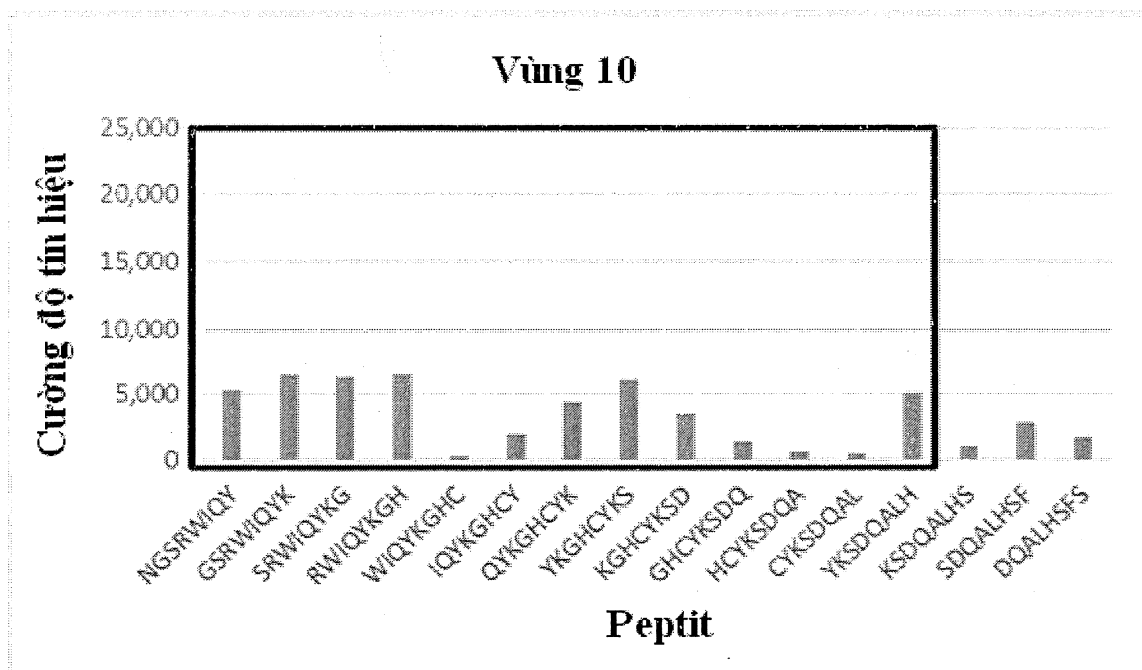


Fig.6h

**Fig.6i****Fig.6j**

sp O60449 LY75_Nguoi	MRTGWAI PRRPAGLLMLLFWEFFDLAEPSCGRAANDPFTIVHGNIGKCIKPVYGWIVADDCD 60
MS-Peptit_Rua giãila	-----CIKPVYGWIVADDCD
MS-Peptit_Rua giãilb	-----CIKPVYGWIVADDCD
MS-Peptit_Rua giãi2a	-----
MS-Peptit_Rua giãi2b	-----
LC-Peptit	-----
sp O60449 LY75_Nguoi	ETEDKLWKWVSQHRFLHLSQKCLGLDITKSVNELRMFSCDSSAMLNWKCEHHSLYGAAR 120
MS-Peptit_Rua giãila	ETEDKLWK-----CEHHSLYGAAR
MS-Peptit_Rua giãilb	ETEDKLWK-----
MS-Peptit_Rua giãi2a	-----
MS-Peptit_Rua giãi2b	-----
LC-Peptit	-----
sp O60449 LY75_Nguoi	YRLALKDGHGTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNVSYGRPCFPPFLIDGTWH 180
MS-Peptit_Rua giãila	-----DGHGTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-Peptit_Rua giãilb	-----KGGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-Peptit_Rua giãi2a	-----GGSEESLCDQPYHEIYTR-----
MS-Peptit_Rua giãi2b	-----GGSEESLCDQPYHEIYTR-----
LC-Peptit	-----DGHGTAISNASDVWK-----
sp O60449 LY75_Nguoi	HDCILDEDHSGFWCHATTILNVEYDRKNGICLKPENGCEDNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSW 240
MS-Peptit_Rua giãila	-----
MS-Peptit_Rua giãilb	-----WGICLKPENGCEDNWEK-----
MS-Peptit_Rua giãi2a	-----
MS-Peptit_Rua giãi2b	-----
LC-Peptit	-----
sp O60449 LY75_Nguoi	KEAVVSCQNGQADLLSINSAAELTYLKEKEGIKIEFWIGLNQLYSARGWEWSDHKPLNFL 300
MS-Peptit_Rua giãila	-----IFWIGLNQLYSAR-----
MS-Peptit_Rua giãilb	-----
MS-Peptit_Rua giãi2a	-----IFWIGLNQLYSAR-----
MS-Peptit_Rua giãi2b	-----
LC-Peptit	-----
sp O60449 LY75_Nguoi	NWDPRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCQAQLPYVCRKPLNNIVELTDVWTYS DTR 360
MS-Peptit_Rua giãila	-----
MS-Peptit_Rua giãilb	-----
MS-Peptit_Rua giãi2a	-----
MS-Peptit_Rua giãi2b	-----
LC-Peptit	-----
sp O60449 LY75_Nguoi	CDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKHAHAKCKAFSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEE 420
MS-Peptit_Rua giãila	-----LHNEDIKEE
MS-Peptit_Rua giãilb	-----LHNEDIKEE
MS-Peptit_Rua giãi2a	-----
MS-Peptit_Rua giãi2b	-----
LC-Peptit	-----
sp O60449 LY75_Nguoi	VWIGLKNINIFTLFQWSDGTEVTLTYWDENEPNVPYKNTPNVCSYLGELGQWKVQSCEEK 480
MS-Peptit_Rua giãila	VWIGLK-----TPNCVSYLGELGQWK-----
MS-Peptit_Rua giãilb	VWIGLK-----TPNCVSYLGELGQWK-----
MS-Peptit_Rua giãi2a	-----
MS-Peptit_Rua giãi2b	-----
LC-Peptit	-----

Fig.7a

```

sp|O60449|LY75_Nguo01      LKVVCKRKKGKELNDASSDKMCPPEDEGWRHGEICYKIYEDEVPFGTNCNLTIITSRFEQEY 540
MS-Peptit_R0a giã11a      -----
MS-Peptit_R0a giã11b      -----
MS-Peptit_R0a giã12a      -----
MS-Peptit_R0a giã12b      -----
LC-Peptit                  -----

sp|O60449|LY75_Nguo01      LMDLMKGYDKSLRKYFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGRRRAVTFSSNNWFLEPASPGGCVAM 600
MS-Peptit_R0a giã11a      -----YFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGR-----
MS-Peptit_R0a giã11b      -----YFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGR-----
MS-Peptit_R0a giã12a      -----YFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGR-----
MS-Peptit_R0a giã12b      -----YFWTGLRDVDSCGEYNWATVGGR-----
LC-Peptit                  -----

sp|O60449|LY75_Nguo01      SIGKSVGKWEVKDCRSFKALSICKKMSGFLGPFEASPKPDDPCPEGWQSFPAASLSCYKVF 660
MS-Peptit_R0a giã11a      ----SVGKWEVKDCR---ALSICKK-----
MS-Peptit_R0a giã11b      -----
MS-Peptit_R0a giã12a      -----
MS-Peptit_R0a giã12b      -----
LC-Peptit                  -----MEVKDCRSFK-----PASLSCYKVF

sp|O60449|LY75_Nguo01      HAERIVAKRNWEZAERFCQALGAHLSSFSHWDEIKEFLHFLTDQFSGQHWWLWIGLNKRSP 720
MS-Peptit_R0a giã11a      -----RIWEEAER-----RSP
MS-Peptit_R0a giã11b      -----RNWEEAER-----RSP
MS-Peptit_R0a giã12a      -----
MS-Peptit_R0a giã12b      -----
LC-Peptit                  HA-----

sp|O60449|LY75_Nguo01      DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYDIRDCAAVKVTHRPWRGWHFYDDREFIYLRPF 780
MS-Peptit_R0a giã11a      -----TPVSTIIMPNEFQQDYDIR-----
MS-Peptit_R0a giã11b      DLQGSWQWSDRTPVSTIIMPNEFQQDYDIR-----
MS-Peptit_R0a giã12a      -----GWHFYDDR-----
MS-Peptit_R0a giã12b      -----
LC-Peptit                  -----PWRGWHFYDDREFIYLRPF

sp|O60449|LY75_Nguo01      ACDTKLEWVCQIPKGRTPKTPDWYNPDRAINGPPLIIEGSEYWFVADLHLNVEEAVLYC 840
MS-Peptit_R0a giã11a      -----
MS-Peptit_R0a giã11b      -----
MS-Peptit_R0a giã12a      -----
MS-Peptit_R0a giã12b      -----
LC-Peptit                  -----

sp|O60449|LY75_Nguo01      ASNRSFLATITISFVGLKAIKNKIANISGDGQKWWIRISEWPIDDHFTYSRYFVHRRFPVTF 900
MS-Peptit_R0a giã11a      -----ISEWPIDDHFTYSR-----FPVTF
MS-Peptit_R0a giã11b      -----ISEWPIDDHFTYSR-----
MS-Peptit_R0a giã12a      -----
MS-Peptit_R0a giã12b      -----
LC-Peptit                  -----DDHFTYSRYFVHRRFPVTF
                                *****

sp|O60449|LY75_Nguo01      GEECLYMSAKTWLIDLKGKPTDCSTIKLPFICEKYNWSSLEKYSFDSAQVQCSEQWIPFQN 960
MS-Peptit_R0a giã11a      GEECLYMSAKTWLIDLKGKPTDCSTK-----YNVSSLEK-----VQCSEQWIPFQN
MS-Peptit_R0a giã11b      -----TWLIDLKGKPTDCSTK-----YNVSSLEK-----VQCSEQWIPFQN
MS-Peptit_R0a giã12a      -----TWLIDLKGKPTDCSTK-----
MS-Peptit_R0a giã12b      -----TWLIDLKGKPTDCSTK-----
LC-Peptit                  G-----

sp|O60449|LY75_Nguo01      KCFLKIKPVSLTFSQASDTCCHSYGGTILPSVLSQIEQDFITISLLPDMETLWIGLRWTAYE 1020
MS-Peptit_R0a giã11a      -----

```

Fig. 7b

MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

sp|O60449|LY75_Nguoi
MS-Peptit_Rua giãila
MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

sp|O60449|LY75_Nguoi
MS-Peptit_Rua giãila
MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

sp|O60449|LY75_Nguoi
MS-Peptit_Rua giãila
MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

sp|O60449|LY75_Nguoi
MS-Peptit_Rua giãila
MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

sp|O60449|LY75_Nguoi
MS-Peptit_Rua giãila
MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

sp|O60449|LY75_Nguoi
MS-Peptit_Rua giãila
MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

sp|O60449|LY75_Nguoi
MS-Peptit_Rua giãila
MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

sp|O60449|LY75_Nguoi
MS-Peptit_Rua giãila
MS-Peptit_Rua giãilb
MS-Peptit_Rua giãi2a
MS-Peptit_Rua giãi2b
LC-Peptit

KINKWTDNRELTYSNFHELLVSGRLRIPENFFFEESRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSC 1090

K-----ELTYSNFHELLVSGRLRIPENFFFEESRYHCALILNLQK-----

K-----YHCALILNLQK-----

-----RELTYSNFHELL-----FTSC

SERHFVSLCQKYESEVKSQTLQNASETVKYLNNLYKIIPTLTWHSAMRECLKSNMQLVS 1140

---HFVSLCQK---QTLQNASETVK---TLTWHSAM

---HFVSLCQK---QTLQNASETVK---TLTWHSAM

SERHFVSLCQKYS-----TVKYLNNLYKII

ITDPYQQAFLSVQALLHNSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHFSRWAEETNGQLEDVCVVL 1200

DTDGFWKTVDCNDNQPSAICYYSGNETEKEVKPVDVVKCPSPVLTNPWIPFQNCOCYMFII 1260

TKNRHMATTQDEVHTKQKLNPKSHILSIRDEKENNFVLEQLLYFNMYMASWVHLGITYRN 1320

-----SHILSIR-----

--NRHMATTQDEVHTK-----SHILSIR--

KSLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIOTFRVIEEAVYFHQHSILAC 1380

-SLMWFDKTPLSYTHWR-

-SLMWFDK-

-SLMWFDK-

-----EAVYFHQHSIL--

KIEMVDYKEEYNTILPQFMPEYEDGIYSVIOKKVITWYEALNMCSQSGGHLASVHMQNGQLF 1440

LEDIVRDRDGFPLVGLSSHDGSESSFEWSDGSTIFDYIPWKGQISPGNCVLLDPKGTWKHE 1500

Fig.7c

sp O60449 LY75_Người	KNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPPAAKENGSRWIOYKGHGYKSDQALHSFSEAK 1560
MS-Peptit_Rửa giã1a	-----
MS-Peptit_Rửa giã1b	-----
MS-Peptit_Rửa giã12a	-----
MS-Peptit_Rửa giã12b	-----
LC-Peptit	-----KKLSRLTYSS-C-----NGSRWIOYKGHGYKSDQALH-----
sp O60449 LY75_Người	KLCSEKHDHSATIIVSIKDEDEENKFFVSRIMRENNNITMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVI 1620
MS-Peptit_Rửa giã1a	-----HDHSATIIVSIKDEDEENKFFVSR-----
MS-Peptit_Rửa giã1b	-----HDHSATIIVSIKDEDEENKFFVSR-----
MS-Peptit_Rửa giã12a	-----HDHSATIIVSIKDEDEENKFFVSR-----
MS-Peptit_Rửa giã12b	-----
LC-Peptit	-----
sp O60449 LY75_Người	FVKWENKSKSGVGRCMSMLIASNETWKKVECEHGFGRVVKVPLGPDYTAIAIIVATLSIL 1680
MS-Peptit_Rửa giã1a	-----VECEHGFGR-----
MS-Peptit_Rửa giã1b	-----VECEHGFGR-----
MS-Peptit_Rửa giã12a	-----
MS-Peptit_Rửa giã12b	-----
LC-Peptit	-----
sp O60449 LY75_Người	VLMGGLIWFLFQRHRLHLAGFSSVRYAQGVNEDEIMLPSTFD 1722
MS-Peptit_Rửa giã1a	-----
MS-Peptit_Rửa giã1b	-----
MS-Peptit_Rửa giã12a	-----
MS-Peptit_Rửa giã12b	-----
LC-Peptit	-----

Fig.7d