



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

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

(11)



1-0039495

(51)^{2020.01} C07K 16/28; A61P 1/00; A61P 35/00; (13) B
C12N 5/10; C12N 15/13; C12N 15/63;
A61K 39/395; A61P 37/00

(21) 1-2020-04267

(22) 25/12/2018

(86) PCT/RU2018/050168 25/12/2018

(87) WO 2019/132738 04/07/2019

(30) 2017145662 25/12/2017 RU

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/03/2021 396

(73) JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD" (RU)

Liter A, bld. 34, Svyazi st., Strelna, Petrodvortsoviy district, 198515, St. Petersburg,
Russian Federation

(72) BRITANOVA, Olga Vladimirovna (RU); IZRAELSON, Mark Aleksandrovic (RU);
LUKYANOV, Sergey Anatolievich (RU).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu với họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vector biểu hiện, phương pháp tạo ra kháng thể này dùng để điều trị các bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến họ thụ thể tế bào T của người. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể có thể được sử dụng để loại bỏ các tế bào T mang thụ thể tế bào T của họ TRBV9, cụ thể là để điều trị bệnh viêm ruột sống dạng thấp, bệnh celiac, và các bệnh ung thư máu, trong sinh bệnh học mà các thụ thể tế bào T của họ TRBV9 có liên quan đến.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan lĩnh vực công nghệ sinh học và y sinh, cụ thể là đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, cũng như ứng dụng chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu với họ thụ thể tế bào T của người. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vector biểu hiện, phương pháp tạo ra kháng thể này dùng để điều trị các bệnh hoặc rối loạn liên quan đến họ thụ thể tế bào T của người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong quá trình điều trị các bệnh tự miễn ở người, các dược chất trên cơ sở kháng thể kháng lại các chất trung gian của quá trình viêm chủ yếu như TNF alpha, IL1, IL6, IL17, IL23 được sử dụng (van der Heijde D et al., Ann Rheum Dis., tháng 6 năm 2011; 70(6): 905-8, Baeten D, et al, N Engl J Med., ngày 24 tháng 12 năm 2015; 373(26): 2534-48). Các kháng thể đơn dòng với phức chất thụ thể CD3 và CD4, có đặc tính điều biến miễn dịch, được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng để điều trị các bệnh tự miễn (Kuhn C. and Weiner L., Immunotherapy, tháng 7 năm 2016; 8(8):889-906; Helling B. et al., Immunology and Cell Biology, tháng 4 năm 2015; 93(4):396-405; Konig M. et al., Front Immunol, ngày 25 tháng 1 năm 2016; 7:11). Tuy nhiên, đã chứng minh được rằng việc sử dụng các dược chất này, mặc dù dẫn đến làm giảm mức độ viêm nhưng không làm ngừng sự phát triển của bệnh và không tác dụng trực tiếp đến nguyên nhân gây bệnh, nghĩa là các tế bào lymphô T tự phản ứng (Haroon N et al., Arthritis Rheum., tháng 10 năm 2013; 65(10): 2645-54., Duarte J. et al., PloS One, ngày 10 tháng 5 năm 2010; 5(5): e10558; Konig M. et al., Front Immunol, ngày 25 tháng 1 năm 2016; 7:11).

Mặc dù có sự thành công trong việc điều trị triệu chứng của bệnh viêm đốt sống dạng thấp (ankylosing spondylitis: AS, bệnh Bekhterev) bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng, vẫn chưa có dược chất hữu hiệu cho phép ức chế chọn lọc

và trong thời gian dài đối với đáp ứng tự miễn và làm ngừng sự tiến triển của bệnh AS. Do đó, nhiệm vụ cấp bách là tạo ra kháng thể cho phép loại bỏ các dòng tế bào lymphô T tự phản ứng của cơ thể bệnh nhân, sự xuất hiện của nó có liên quan đến sự phát triển của bệnh.

Đã biết rằng sự tương tác giữa thụ thể tế bào T (T cell receptor: TCR) nhận biết kháng nguyên và các protein của phức hợp tương thích mô chính (main histocompatibility complex: MHC, HLA), là các peptit được xử lý của các protein trong tế bào hoặc các protein của các sinh vật gây bệnh trên bề mặt của nó, đóng vai trò quan trọng trong sự xuất hiện của các dòng tế bào lymphô T tự phản ứng. Nhiều bệnh tự miễn có liên quan với sự có mặt của biến thể gen HLA cụ thể ở người. Ví dụ, alen HLA-B27 có liên quan đến bệnh AS, bệnh viêm khớp phản ứng, và bệnh Crohn. Nguy cơ phát triển các bệnh tự miễn ở các thể mang của một số biến thể alen HLA có thể được giải thích bởi sự biểu hiện ưu tiên bởi các alen của một số peptit này là các tự kháng nguyên, đáp ứng miễn dịch kháng lại nó gây ra sự phát triển của bệnh tự miễn. Một trong số các cơ chế có thể có để khơi mào phản ứng tự miễn là sự biểu hiện bởi các phân tử tương thích mô của peptit từ các protein có nguồn gốc từ vi khuẩn hoặc virus tương đồng với peptit của chính sinh vật này, điều này có thể dẫn đến đáp ứng miễn dịch kháng lại kháng nguyên bản thân do khả năng phản ứng chéo.

Như đã biết trong lĩnh vực này, trình tự của thụ thể tế bào T (TCR) là dấu ấn cho phép nhận biết dòng tế bào lymphô T liên quan đến sinh bệnh học của bệnh tự miễn. Về mặt cấu trúc, các cấu trúc dưới phân tử của thụ thể tế bào T là thành viên của họ chung globulin miễn dịch và được tạo ra từ vài mảnh gen. Các vùng biến đổi của TCR tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên của TCR. Điều này có nghĩa là chúng đặc hiệu dòng, nghĩa là khác với các tế bào lymphô T về sự đáp ứng với các kháng nguyên khác biệt.

Liên quan đến tính tương đồng axit amin của các mảnh gen biến đổi (V) trong miền biến đổi của TCR, các thụ thể tế bào T được chia thành các họ khác nhau. Theo danh pháp IMGT, chuỗi beta được phân biệt thành 26 họ khác biệt, và chuỗi alpha được phân biệt thành 41 họ (Turner SJ et al., Nature Reviews Immunology 2006, V.6, 883–894). Để xác định họ chuỗi của TCR, có thể sử dụng

nhiều phương pháp đóng thẳng hàng trình tự của axit amin thử nghiệm và các trình tự chuỗi của TCR đã biết, thông tin về phương pháp này được tóm tắt trong cơ sở dữ liệu IMGT ("The international ImMunoGeneTics information system", Lefranc M-P., Nucl Acids Res 2001; 29:207-209) có sẵn trên internet ở trang web <http://www.imgt.org>. Multiple alignment and determination of TCR chain family can be performed using IgBlast software package.

Biến thể liên ứng của các thụ thể TCR tự miễn ở các bệnh nhân mắc bệnh AS đã được mô tả, đã chứng minh được rằng nó có mặt trong dịch hoạt dịch và máu ngoại vi của các bệnh nhân mắc bệnh AS và không có mặt ở cùng độ sâu khi phân tích ở người cho khỏe mạnh, bất kể trạng thái alen HLA*B27 của họ (Faham M. et al., Arthritis Rheumatol. 2017; 69(4):774-784; Komech E et al. 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; ngày 3-7 tháng 9 năm 2016; Strbske Pleso, Slovakia. Abstract book p. 39). Các thụ thể TCR này là thành viên của họ TRBV9 (theo danh pháp IMGT).

Đã chứng minh được rằng các thụ thể tế bào T mang các chuỗi beta của họ TRBV9 cũng có liên quan đến sự phát triển của bệnh tự miễn như bệnh celiac (Petersen J et al., J Immunol. 2015; 194(12): 6112-22). Ngoài ra, chúng được phát hiện trên bề mặt của các tế bào T bị ác tính hóa trong u lymphô tế bào T và bệnh bạch cầu tế bào T, bao gồm cả u lymphô tế bào T do virus Epstein-Barr gây ra (EBV) (Toyabe S et al., Clin Exp Immunol. 2003; 134(1): 92–97).

Các chất tương tự gần nhất của sáng chế là các kháng thể đơn dòng W112 và 2D1 với các vùng chuỗi beta của miền biến đổi của thụ thể tế bào T của người, chúng thuộc về họ TRBV5-3 TRBV8-1, được mô tả trong đơn sáng chế (Công bố đơn quốc tế số WO9006758) làm công cụ để chẩn đoán và điều trị bệnh viêm đa khớp dạng thấp. Các kháng thể đơn dòng này nhận biết từ 0,3 đến 5% tế bào lymphô T ngoại vi mang TRBV5-3 và từ 0,5 đến 13% tế bào lymphô T ngoại vi mang TRBV8-1, tương ứng. Kết quả của nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự liên quan của các tế bào lymphô T trong sinh bệnh học của bệnh viêm đa khớp dạng thấp dẫn đến việc sử dụng các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với các vùng chuỗi beta của thụ thể T. Cụ thể, số liệu của Brennan và các đồng tác giả, Clin Exp Immunol., tháng 9 năm 1988; 73(3): 417–423 đã chứng minh tỷ lệ % tế bào

lymphô T mang TRBV5 và TRBV8 tăng lên trong các mẫu hoạt dịch của bệnh nhân mắc bệnh viêm đa khớp dạng thấp so với người cho khỏe mạnh.

Ngoài ra, Công bố đơn quốc tế số WO9405801 mô tả các kháng thể đơn dòng dùng để chẩn đoán và điều trị bệnh viêm đa khớp dạng thấp tương tác với epitop của vùng biến đổi VB3.1 của thụ thể tế bào T của người, thụ thể này tương tác với phân họ TCR V(beta)3.1.

Nhược điểm chính của các phương pháp điều trị bệnh viêm đa khớp dạng thấp được mô tả trong các Công bố đơn quốc tế số WO9405801 và WO9006758 là không có bằng chứng thuyết phục về sự liên quan giữa sinh bệnh học và họ cụ thể của mảnh biến đổi chuỗi beta.

Các kháng thể đơn dòng nhận biết đặc hiệu chuỗi beta của họ thứ 13 của chuỗi TRC cũng đã được mô tả. Các mô hình động vật đã chứng minh rằng, với sự trợ giúp của các kháng thể này, có thể loại bỏ quần thể nhỏ của các tế bào T theo cách phòng ngừa, thụ thể T gồm chuỗi beta VB13 (các tế bào T VB13+), và đã chứng minh được rằng phương pháp này bảo vệ đối với sự phát triển của bệnh đái tháo đường typ I ở chuột của dòng dễ mắc bệnh đái tháo đường typ I, và cũng làm giảm đáng kể nguy cơ của sự phát triển bệnh đái tháo đường do virus gây ra (Zhijun Liu et al., Diabetes., tháng 5 năm 2012; 61(5): 1160–1168.). Đồng thời, sự cạn kiệt các tế bào T, thụ thể T của nó chứa họ chuỗi beta khác biệt (VB16), không khác biệt với kết quả thu được từ nhóm đối chứng. Điều quan trọng cần lưu ý là ngay cả khi sử dụng lần đầu, kháng thể đơn dòng kháng VB13 vẫn làm giảm 60% số lượng tế bào T VB13+ ở lách chuột.

Tất cả các chất tương tự đã mô tả đều không gắn kết với thụ thể TCR thuộc về họ TRBV9, và không thích hợp để điều trị bệnh AS và các bệnh khác có liên quan đến thụ thể TCR thuộc về họ TRBV9.

Các kháng thể đơn dòng thích hợp để loại bỏ các tế bào T mang thụ thể TCR của họ TRBV9, kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị bệnh AS và bệnh celiac, vẫn chưa được mô tả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến việc tạo ra các kháng thể có thể được sử dụng để loại

bỏ tế bào T mang các thụ thể TCR của họ TRBV9, cụ thể là dùng để điều trị bệnh AS, bệnh celiac và các bệnh về máu ác tính, sinh bệnh học của các bệnh liên quan đến thụ thể TCR của họ TRBV9.

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có khả năng gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta của họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người. Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc để điều trị bệnh tự miễn và các bệnh lý ung thư, sinh bệnh học của các bệnh liên quan đến thụ thể TCR thuộc về họ TRBV9, ví dụ, bệnh AS, bệnh celiac và một số bệnh u lymphô tế bào T và bệnh bạch cầu tế bào T.

Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế khác biệt ở chỗ

1) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của nó chứa 3 vùng siêu biến, HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó

HCDR 1 (theo cách đánh số Kabat) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1;

HCDR 2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

HCDR 3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6;

2) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của nó chứa 3 vùng siêu biến, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó:

LCDR 1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7;

LCDR 2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8;

LCDR 3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Trừ khi có quy định cụ thể theo cách khác, cách đánh số Kabat đã biết rõ được sử dụng ở đây để xác định vùng CDR của kháng thể.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người. Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế chứa các vùng ổn định và thành phần cấu trúc giống với của người, nhưng có miền biến đổi giống với của chuột.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, và miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID

NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể có trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như giống (ví dụ, tính đồng nhất ít nhất 90%) với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể có trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng gần như giống (ví dụ, tính đồng nhất ít nhất 90%) với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin gần như giống với trình tự SEQ ID NO: 29, và chuỗi nặng có trình tự axit amin gần như giống với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng của sáng chế là kháng thể IgG của người có chiều dài đầy đủ, ví dụ, IgG1 hoặc IgG2 hoặc IgG3 hoặc IgG4.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic mã hóa các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể theo sáng chế, axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể theo sáng chế và các mảnh chức năng của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất cát xét biểu hiện và vector biểu hiện chứa axit nucleic của sáng chế và các yếu tố điều hòa cần thiết để biểu hiện axit nucleic ở tế bào chủ được chọn. Vector hoặc cát xét biểu hiện này có thể có mặt trong tế bào chủ dưới dạng yếu tố ngoại nhiễm sắc thể hoặc được đính gắn vào hệ gen tế bào nhờ việc đưa (bằng cách chuyển nhiễm) cát xét biểu hiện hoặc vector nêu trên vào tế bào.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào và dòng tế bào ổn định chứa các axit nucleic, vector hoặc cát xét biểu hiện của sáng chế, và phương pháp tạo ra chúng.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ nêu trên trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện đảm bảo sự tạo ra kháng thể nêu trên. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước phân lập và tinh chế kháng thể tạo thành sau đó.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn do vùng chuỗi beta của họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người làm

trung gian gây ra, trong đó dược phẩm này chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng.

Theo một trong số các phương án, dược phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm: bệnh viêm loét ruột dạng thấp, bệnh celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T.

Sáng chế cũng đề xuất tổ hợp dược phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn do thụ thể tế bào T của người mang chuỗi beta của họ TRBV9 làm trung gian gây ra, trong đó tổ hợp này chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và ít nhất một hợp chất có hoạt tính điều trị khác.

Theo một trong số các phương án, tổ hợp dược phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm: bệnh viêm loét ruột dạng thấp, bệnh Celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T.

Theo một phương án, tổ hợp dược phẩm chứa hợp chất có hoạt tính điều trị khác được chọn từ hợp chất phân tử nhỏ, kháng thể hoặc các hormon steroid, như corticosteroid.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế hoạt tính sinh học của thụ thể tế bào T, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, ở đối tượng cần được ức chế hoạt tính này, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn do thụ thể tế bào T của người mang chuỗi beta của họ TRBV9 làm trung gian gây ra, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc dược phẩm nêu trên, với lượng có hiệu quả điều trị.

Theo một trong số các phương án của phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn, bệnh hoặc rối loạn này được chọn từ nhóm gồm: bệnh viêm loét ruột dạng thấp, bệnh celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc dược phẩm nêu trên để điều trị cho đối tượng cần điều trị bệnh hoặc rối loạn do thụ thể tế bào T của người mang chuỗi beta của họ TRBV9 làm trung gian gây ra.

Theo một trong số các phương án về việc sử dụng, bệnh được chọn từ nhóm

bao gồm: bệnh viêm ruột sống dạng thấp, bệnh celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T.

Giải pháp kỹ thuật của sáng chế tạo ra các kháng thể mới, gắn kết đặc hiệu với các thụ thể TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, và có thể được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn và bệnh lý ung thư, sinh bệnh học của các bệnh liên quan đến thụ thể TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9. Ngoài ra, giải pháp kỹ thuật này làm gia tăng hiệu quả của việc điều trị bệnh AS và/hoặc bệnh celiac, sự gia tăng này đạt được bằng cách tạo ra các kháng thể có khả năng tác dụng trực tiếp lên các tế bào lymphô T tự miễn, và để đạt được sự thuyên giảm kéo dài đối với bệnh AS.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.4 thể hiện biểu đồ phân bố hai thông số của các tế bào phân đoạn máu đơn nhân bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CD3 (trực tung) được đánh dấu bằng eFluor 405 và các kháng thể đơn dòng kháng TRBV9 (trực hoành) được đánh dấu bằng FITC: kháng thể kháng TRBV9-1 (Fig.1), kháng thể kháng TRBV9-2 (Fig.2), kháng thể kháng TRBV9-3 (Fig.3), kháng thể kháng TRBV9-4 (Fig.4). Mỗi biến thể của kháng thể đơn dòng kháng TRBV9 được sử dụng với hai nồng độ: 270ng (đồ thị phía trên) hoặc 27ng (đồ thị phía dưới) cho mỗi thử nghiệm. Hình chữ nhật nhỏ thể hiện quần thể cụ thể của CD3+TRBV9+.

Fig.5 thể hiện biểu đồ phân bố hai thông số của các tế bào phân đoạn máu đơn nhân bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CD3 (trực tung) được đánh dấu bằng eFluor 405 và các kháng thể đơn dòng kháng TRBV9 (trực hoành) được đánh dấu bằng FITC theo thử nghiệm độc tính tế bào: ủ với kháng thể kháng TRBV9-2 (thử nghiệm) và Remicade (đối chứng).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng được phân lập và các mảnh chức năng của chúng có khả năng gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta của họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa các kháng thể của sáng chế và các mảnh của chúng, cắt xét biểu hiện và vector

biểu hiện chứa axit nucleic của sáng chế và các yếu tố điều hòa cần thiết để biểu hiện axit nucleic ở tế bào chủ được chọn. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào và dòng tế bào ổn định chứa các axit nucleic, vector hoặc cát xét biểu hiện của sáng chế. Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc mảnh chức năng của nó, được phẩm và tổ hợp được phẩm chứa lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều tá được, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng, và phương pháp chẩn đoán và điều trị bệnh AS và các bệnh khác bằng cách sử dụng kháng thể của sáng chế.

Các định nghĩa

Sáng chế sẽ được hiểu dễ dàng hơn với định nghĩa của một số thuật ngữ cơ bản.

Cần hiểu rằng các nguyên liệu và phương pháp được đề xuất ở đây không chỉ giới hạn ở các chế phẩm và các bước của phương pháp cụ thể, do các nguyên liệu và phương pháp này có thể thay đổi. Cần phải lưu ý rằng khi được sử dụng trong bản mô tả này và trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều tương ứng, nếu ngữ cảnh không chỉ rõ theo cách khác.

Thuật ngữ "thụ thể tế bào T" của người, cũng được gọi là "TCR", "thụ thể T", là phức chất protein dị dime được tìm thấy trên bề mặt của tế bào lymphô T. Thụ thể này chỉ có mặt trên các tế bào lymphô T. Chức năng chính của thụ thể TCR là để nhận biết đặc hiệu các kháng nguyên đã xử lý được gắn kết với các phân tử của phức hợp tương thích mô chính (HLA).

Thụ thể TCR của người gồm hai cấu trúc dưới phân tử, chuỗi α và chuỗi beta, hoặc chuỗi γ và chuỗi δ , được liên kết bằng liên kết disulfua và được gắn trên màng tế bào. Mỗi chuỗi trong số các chuỗi TCR có miền biến đổi (V) ở đầu tận cùng N, miền liên kết, và miền ổn định (C) được liên kết với miền xuyên màng để gắn kết thụ thể trong màng sinh chất của tế bào lymphô T. Chiều dài miền ổn định của các chuỗi alpha và beta lần lượt là 91 và 129 axit amin. Chiều dài miền liên kết và miền xuyên màng của chuỗi alpha là 30 và 17 gốc axit amin (amino acid residue: AAR), và chiều dài của chuỗi beta là 21 và 22 gốc AAR. Chiều dài của các miền biến đổi của thụ thể T nằm trong khoảng từ 104 đến 125 gốc AAR.

Tỷ lệ nhỏ các tế bào lymphô T có thụ thể typ γ/δ . Chúng được sắp xếp tương tự với các thụ thể α/β , nhưng khác biệt về cấu trúc bậc một của chúng và có một số đặc tính chức năng. Chúng có tính biến dị thấp hơn nhiều (tính đặc hiệu dòng giới hạn), chúng nhận biết các kháng nguyên trong phức chất có các phân tử trình diện kháng nguyên (không phải MHC) "không cổ điển" hoặc thậm chí các kháng nguyên tự do.

Các thụ thể T phản ứng với phức hợp MHC/kháng nguyên qua sáu vùng quyết định tính hỗ trợ của nó (các vùng CDR): ba vùng chuỗi alpha và ba vùng chuỗi beta. Các vùng CDR này là các vùng siêu biến, các vòng của miền biến đổi của thụ thể tế bào T, là V α và V β .

Các thuật ngữ "TRBV9" hoặc "họ TRBV9" để chỉ họ thứ chín của các chuỗi beta của thụ thể tế bào T, như được phân biệt theo danh pháp IMGT, khác biệt ở chỗ, trình tự axit amin của miền biến đổi của nó chứa các motif đặc biệt của vùng CDR1 (có trình tự axit amin là S-G-D-L-S) và CDR2 (có trình tự axit amin là Y-Y-N-G-E-E). Thuật ngữ "thụ thể TCR của họ TRBV9" để chỉ thụ thể tế bào T, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9.

Thuật ngữ "bệnh học" liên quan đến các tế bào lymphô T hoặc thụ thể TCR có nghĩa là thụ thể TCR này hoặc tế bào lymphô T mang thụ thể TCR có liên quan đến bệnh hoặc bệnh lý và/hoặc gây ra bệnh và/hoặc góp phần vào sự phát triển của bệnh.

Thuật ngữ "tự miễn" liên quan đến thụ thể TCR có nghĩa là thụ thể TCR này có liên quan đến sự phát triển của bệnh tự miễn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" được dự định để chỉ phân tử globulin miễn dịch gồm bốn chuỗi polypeptit (hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L)) được liên kết bằng các liên kết disulfua. Các chuỗi nhẹ được phân loại thành chuỗi kappa hoặc lambda. Các chuỗi nặng được phân loại thành chuỗi gama, mu, alfa, delta hoặc epsilon; chúng quyết định isotyp của kháng thể như IgG, IgM, IgA, IgD và IgE tương ứng, và một số chuỗi trong số chúng có thể được phân loại tiếp thành các phân nhóm (isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2. Mỗi typ chuỗi nặng được đặc trưng bởi vùng ổn định cụ thể.

Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là

HCVR hoặc VH) và vùng ổn định chuỗi nặng. Vùng ổn định của chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH2, và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc VL) và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Vùng ổn định chuỗi nhẹ chứa một miền CL. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết tính tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR), được bao quanh bởi các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là vùng khung (framework region: FR). Mỗi vùng VH và VL gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Trong đơn sáng chế này, 3 vùng CDR của chuỗi nặng được gọi là "CDRH1, CDRH2 và CDRH3", trong khi 3 vùng CDR của chuỗi nhẹ được gọi là "CDRL1, CDRL2 và CDRL3". Các vùng CDR chứa phần lớn các gốc tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Các gốc CDR-amino trong vùng HCVR và LCVR của kháng thể theo sáng chế được đánh số và sắp xếp vị trí theo cách đánh số Kabat đã được biết rõ, trừ khi được chỉ rõ theo cách khác. Sáng chế bao gồm các mã chữ cái thông thường đối với các axit amin, trừ khi được chỉ rõ theo cách khác.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng TRBV9", "kháng thể với TRBV9", "kháng thể gắn kết đặc hiệu với chuỗi beta của họ TRBV9" và "kháng thể kháng chuỗi beta của họ TRBV9" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong ngữ cảnh của đơn sáng chế này và để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop của chuỗi-beta của họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người.

Các thuật ngữ "kháng thể" và "kháng thể đơn dòng" theo mục đích của đơn sáng chế này để chỉ kháng thể đơn dòng kháng lại thụ thể TCR của họ TRBV9. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" để chỉ kháng thể của bộ Gặm nhấm, động vật linh trưởng hoặc họ lạc đà *Camelidae*, tốt hơn là để chỉ kháng thể của chuột, khỉ macaca, lạc đà hoặc lạc đà không bướu, kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người có chiều dài đầy đủ, trừ khi được chỉ rõ theo cách khác.

Các vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Khi được sử dụng trong đơn sáng chế này, thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên", hoặc "vùng gắn kết kháng nguyên", hoặc "miền gắn

kết kháng nguyên" hoặc "vị trí gắn kết kháng nguyên" được sử dụng thay thế lẫn nhau để chỉ phần của phân tử kháng thể chứa các gốc axit amin tương tác với kháng nguyên và tạo ra tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể liên quan đến kháng nguyên này. Phần của kháng thể này bao gồm các gốc axit amin "khung" cần thiết để duy trì cấu dạng thích hợp của các gốc gắn kết kháng nguyên.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể của người" để chỉ kháng thể trong đó các trình tự của miền biến đổi và miền ổn định có nguồn gốc từ các trình tự của người. Các kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không là gốc điển hình của người (ví dụ, các đột biến được tạo ra bằng phương pháp gây đột biến đặc hiệu vị trí hoặc không được định hướng *in vitro* hoặc đột biến soma *in vivo*), ví dụ, trong vùng CDR, và cụ thể là trong vùng CDR3.

Thuật ngữ "kháng thể được làm cho giống với của người", khi được sử dụng liên quan đến kháng thể, để chỉ các kháng thể được đặc trưng bởi sự có mặt của các vùng ổn định và thành phần cấu trúc giống với của người, nhưng có các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) điển hình của globulin miễn dịch có nguồn gốc khác, hoặc các mảnh tương ứng của kháng thể được cải biến.

Thuật ngữ "thể khảm" liên quan đến kháng thể của sáng chế được dùng để chỉ kháng thể được đặc trưng bởi các vùng ổn định giống với của người nhưng có các vùng biến đổi có nguồn gốc khác. Trong các kháng thể này, các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng không có nguồn gốc từ người (ví dụ, có nguồn gốc từ chuột) được liên kết khi hoạt động với miền ổn định của các chuỗi tương ứng có nguồn gốc từ người.

Thuật ngữ "được liên kết khi hoạt động" hoặc thuật ngữ tương tự, khi được sử dụng để mô tả kháng thể, để chỉ các trình tự polypeptit ở vị trí về mặt vật lý (cộng hóa trị, nếu không được chỉ rõ theo cách khác) và mối liên quan về mặt chức năng với nhau. Theo các phương án được ưu tiên nhất, các chức năng của thành phần polypeptit của phân tử thể khảm không bị thay đổi so với các đặc tính chức năng của thành phần polypeptit được phân lập. Thuật ngữ "được liên kết khi hoạt động" hoặc thuật ngữ tương tự, khi được sử dụng để mô tả các axit nucleic, có nghĩa là các axit nucleic này được liên kết cộng hóa trị sao cho các khung đọc và codon kết thúc không có mặt ở các điểm mà chúng được liên kết. Như người có

hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, các trình tự nucleotit mã hóa protein thể khả chứa các thành phần "được liên kết khi hoạt động" (các protein, polypeptit, trình tự của nhóm liên kết, miền protein, v.v.) gồm các mảnh mã hóa các thành phần nêu trên, trong đó các mảnh này được liên kết cộng hóa trị sao cho protein thể khả có chiều dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể thể khả theo sáng chế, được tạo ra trong khi dịch mã và phiên mã trình tự nucleotit.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được phân lập" hoặc "có nguồn gốc" có nghĩa là phân tử hoặc tế bào có mặt trong môi trường khác với môi trường trong đó phân tử hoặc tế bào này tồn tại trong tự nhiên.

Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể của sáng chế là kháng thể tái tổ hợp, nghĩa là được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp", bao gồm tất cả các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương pháp tái tổ hợp, như kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp đưa vào tế bào chủ, kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể của người tổ hợp, tái tổ hợp, kháng thể được phân lập từ động vật là động vật chuyển gen đối với các gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, xem tài liệu: Taylor L.D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295). Theo một số phương án, kháng thể tái tổ hợp của người được đột biến *in vitro* (hoặc, khi động vật chuyển gen đối với các trình tự Ig của người được sử dụng, phương pháp đột biến soma *in vivo*) và do đó các trình tự axit amin của vùng VH và VL của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà trong khi có nguồn gốc từ và liên quan đến các trình tự vùng VH và VL dòng mầm của người, có thể không tồn tại trong tự nhiên trong danh mục dòng mầm kháng thể của người *in vivo*.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" được dự định để chỉ trường hợp trong đó một thành viên của cặp gắn kết đặc hiệu không gắn kết đáng kể với các phân tử không là (các) đối tác gắn kết đặc hiệu của nó. Thuật ngữ này cũng có thể sử dụng, ví dụ, khi miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế đặc hiệu với epitop cụ thể được mang bởi một số kháng nguyên; trong trường hợp này, kháng thể đặc hiệu chứa miền gắn kết kháng nguyên sẽ có khả năng gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác nhau mang epitop.

Theo đó, kháng thể đơn dòng của sáng chế gắn kết đặc hiệu với epitop của chuỗi-beta của họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người, trong khi nó không gắn kết đặc hiệu với chuỗi-beta của thụ thể TCR của các họ khác và chuỗi alpha của thụ thể TCR.

Thuật ngữ "epitop" để chỉ phần của phân tử có khả năng được nhận biết và gắn kết bởi kháng thể ở một hoặc nhiều vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Các epitop thường gồm nhóm các phân tử mà bề mặt có hoạt tính hóa học như các axit amin hoặc mạch bên của đường và có các đặc tính cấu trúc ba chiều cụ thể cũng như các đặc tính điện tích cụ thể.

Khi được sử dụng trong đơn sáng chế này, thuật ngữ "epitop", ngoài các nghĩa khác, để chỉ mảnh polypeptit, có hoạt tính kháng nguyên và/hoặc gây miễn dịch ở động vật, tốt hơn là ở động vật có vú, ví dụ, chuột, chuột nhắt hoặc người. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop kháng nguyên" là mảnh polypeptit có thể gắn kết đặc hiệu với kháng thể và có thể được phát hiện bằng kỹ thuật bất kỳ đã được biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch tiêu chuẩn. Các epitop kháng nguyên không nhất thiết phải gây miễn dịch, tuy nhiên, chúng có thể gây miễn dịch. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop gây miễn dịch" được định nghĩa là mảnh polypeptit kích thích sự đáp ứng của kháng thể ở động vật, khi được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. "Epitop không tuyến tính" hoặc "epitop cấu dạng" bao gồm các polypeptit (hoặc axit amin) không liên kế trong protein kháng nguyên gắn kết với kháng thể đặc hiệu epitop.

Thuật ngữ "đặc tính sinh học" hoặc "đặc điểm sinh học", hoặc các thuật ngữ "hoạt tính" hoặc "hoạt tính sinh học" liên quan đến kháng thể hoặc các mảnh chức năng của nó theo sáng chế được sử dụng thay thế lẫn nhau trong đơn sáng chế này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ái lực và tính đặc hiệu của epitop/kháng nguyên, khả năng làm trung hòa hoặc đối kháng hoạt tính của TCR bao gồm cả chuỗi beta thuộc về họ TRBV9.

Các đặc tính hoặc đặc điểm sinh học có thể nhận biết khác của kháng thể bao gồm, ví dụ, khả năng phản ứng chéo (nghĩa là, với các thể đồng dạng không phải của người của peptit đích, hoặc với các protein hoặc mô khác nói chung), và

khả năng bảo toàn sự biểu hiện ở mức cao của protein trong các tế bào của động vật có vú. Các đặc tính hoặc đặc điểm nêu trên có thể được quan sát, xác định, và/hoặc đánh giá bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được thừa nhận trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm ELISA, thử nghiệm ELISA cạnh tranh, phương pháp phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt KINEXA, các thử nghiệm ức chế *in vitro* hoặc *in vivo* mà không làm giới hạn, các thử nghiệm gắn kết thụ thể, các thử nghiệm về sự tiết ra và/hoặc tạo ra xytokin hoặc yếu tố sinh trưởng, và phương pháp tải nạp tín hiệu và hóa mô miễn dịch của lát cắt mô thu được từ các nguồn khác nhau, bao gồm người, động vật linh trưởng hoặc nguồn khác bất kỳ.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "ức chế" hoặc "làm trung hòa" đối với hoạt tính của kháng thể theo sáng chế để chỉ khả năng gần như đối kháng, ngăn chặn, ngăn ngừa, hạn chế, làm chậm, gây trở ngại, loại bỏ, làm ngừng, làm giảm, ví dụ, sự tiến triển hoặc mức độ nặng của bệnh cần được ức chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hoạt tính sinh học của kháng thể, hoặc thuộc tính, bệnh hoặc tình trạng bệnh.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể đột biến" hoặc "biến thể" để chỉ kháng thể được bộc lộ trong sáng chế này, trong đó một hoặc nhiều axit amin được bổ sung và/hoặc thay thế và/hoặc làm khuyết đoạn và/hoặc chèn vào ở đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C và/hoặc trong các trình tự axit amin tự nhiên của kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của nó. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể đột biến" cũng để chỉ phân tử axit nucleic mã hóa protein của thể đột biến. Ngoài ra, thuật ngữ "thể đột biến" để chỉ biến thể bất kỳ ngắn hơn hoặc dài hơn so với protein hoặc axit nucleic.

Thuật ngữ "tính tương đồng" được sử dụng để mô tả mối liên hệ của nucleotit hoặc các trình tự axit amin với nucleotit hoặc các trình tự axit amin khác, được quyết định bằng mức độ đồng nhất và/hoặc tương tự giữa các trình tự được so sánh nêu trên.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự axit amin hoặc nucleotit "gần như tương tự" hoặc "gần như giống" với trình tự tham chiếu nếu trình tự axit amin hoặc nucleotit có tính đồng nhất ít nhất 70% với trình tự cụ thể trong vùng được chọn để so sánh. Do đó, trình tự gần như tương tự bao gồm trình tự có tính

đồng nhất, ví dụ, ít nhất 75%, ví dụ, tính đồng nhất ít nhất 80%, tính đồng nhất ít nhất 85%, tính đồng nhất ít nhất 90% (ví dụ, tính đồng nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98% hoặc 99%). Hai trình tự giống nhau cũng là trình tự gần như tương tự.

Tính đồng nhất của trình tự được xác định dựa trên trình tự tham chiếu. Các thuật toán để phân tích trình tự là đã biết trong lĩnh vực này, như thuật toán IgBLAST được mô tả trong tài liệu: Ye et al. Nucleic Acids Res. 2013, W34-40. Nhằm mục đích của sáng chế, để xác định mức độ tính đồng nhất và tính tương tự giữa các trình tự nucleotit và trình tự axit amin, các trình tự nucleotit và trình tự axit amin này có thể được so sánh nhờ sự trợ giúp của gói phần mềm IgBLAST được cung cấp bởi Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) bằng cách sử dụng phương pháp đóng thẳng hàng có chèn khoảng trống với các thông số tiêu chuẩn. Để tính toán tỷ lệ % tính đồng nhất, chiều dài đầy đủ của trình tự tham chiếu, ví dụ, vùng biến đổi, được sử dụng.

Sự đề cập đến trình tự nucleotit "mã hóa" polypeptit có nghĩa là polypeptit này được tạo ra từ trình tự nucleotit trong quá trình dịch mã và phiên mã mRNA. Nhờ đó, cả chuỗi mã hóa giống với mRNA và thường được sử dụng trong danh mục các trình tự và chuỗi bổ trợ dùng làm khuôn để phiên mã có thể được chỉ rõ. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, thuật ngữ này cũng bao gồm các trình tự nucleotit thoái hóa bất kỳ mã hóa cùng trình tự axit amin. Các trình tự nucleotit mã hóa polypeptit bao gồm các trình tự chứa intron.

Kháng thể

Như đã nêu trên đây, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng được phân lập và các mảnh chức năng của chúng có khả năng gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta của họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người.

Các kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ

a) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của nó chứa 3 vùng siêu biến, HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó

Các kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ

a) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của nó chứa 3 vùng siêu biến, HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó

HCDR1 (theo cách đánh số Kabat) có trình tự axit amin DYLVH (SEQ ID NO: 1);

HCDR2 có trình tự axit amin WINTYTGTPTYADDFEG (SEQ ID NO: 2);

HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SWRRGLRGLGFDY (SEQ ID NO: 3), SWRRGLRGIGFDY (SEQ ID NO: 4), SWRRGIRGLGFDY (SEQ ID NO: 5), SWRRGIRGIGFDY (SEQ ID NO: 6);

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của nó chứa 3 vùng siêu biến, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó:

LCDR1 có trình tự axit amin KASKSINKYLA (SEQ ID NO: 7);

LCDR2 có trình tự axit amin DGSTLQS (SEQ ID NO: 8);

LCDR3 có trình tự axit amin QQHNEYPPT (SEQ ID NO: 9).

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và có thể được sử dụng làm thuốc để điều trị bệnh Bekhterev và các bệnh khác, sinh bệnh học của bệnh liên quan đến các thụ thể TCR thuộc về họ TRBV9, ví dụ, bệnh celiac hoặc u lymphô tế bào T.

Kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng, ví dụ, kỹ thuật tế bào lai đã được biết rõ trong lĩnh vực này, cũng như kỹ thuật tái tổ hợp, kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn, kỹ thuật tổng hợp hoặc tổ hợp của các kỹ thuật này hoặc các kỹ thuật khác đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" được sử dụng trong đơn sáng chế này để chỉ kháng thể thu được từ một bản sao hoặc dòng vô tính bao gồm, ví dụ, dòng có nhân điển hình, dòng không nhân hoặc dòng thể thực khuẩn bất kỳ, chứ không phải phương pháp sản xuất của chúng.

Có thể thu được kháng thể được làm cho giống với của người và kháng thể thể khảm bằng phương pháp tổng hợp peptit hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp như được mô tả trong phần "axit nucleic" dưới đây.

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế là kháng thể thể khảm và khác biệt ở chỗ chúng có các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng không có

nguồn gốc từ người (ví dụ, có nguồn gốc từ chuột hoặc chuột nhắt), và các miền ổn định có nguồn gốc từ người. Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế khác biệt ở chỗ, chúng có trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 11. Nhờ đó, theo các phương án được ưu tiên, kháng thể này chứa vùng ổn định của chuỗi nặng, như vùng ổn định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD của người. Tốt hơn là vùng ổn định chuỗi nặng là vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người. Ngoài ra, kháng thể có thể chứa vùng ổn định chuỗi nhẹ hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ kappa hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ lambda. Tốt hơn là kháng thể chứa vùng ổn định của chuỗi nhẹ kappa.

Ví dụ về các trình tự axit amin chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-1, kháng thể kháng TRBV9-2, kháng thể kháng TRBV9-3 hoặc kháng thể kháng TRBV9-4 theo sáng chế được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 21, 23, 25 và 27, tương ứng. Trình tự axit amin làm ví dụ của chuỗi nhẹ của kháng thể được thể hiện trong SEQ ID NO: 29.

Theo một số phương án, các trình tự axit amin vùng khung của miền biến đổi của kháng thể, hoặc các phần của nó, thường có nguồn gốc từ người và, do đó, là "kháng thể được làm cho giống với của người". "Việc làm cho giống với kháng thể của người" này được cho là hữu ích trong việc làm giảm tính gây miễn dịch của kháng thể nêu trên dùng cho mục đích điều trị ở bệnh nhân. Một số gốc axit amin được chọn trong vùng khung vẫn là của chuột, chứ không phải của người.

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm các miền biến đổi của chuỗi nhẹ, có các trình tự axit amin gần như giống với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, ví dụ, có tính đồng nhất ít nhất 90%, phổ biến hơn là có tính đồng nhất ít nhất 93%, điển hình là có tính đồng nhất 94% hoặc cao hơn (tốt hơn là có tính đồng nhất 95% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 96% hoặc cao hơn; có tính đồng nhất 97% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 98% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 99% hoặc cao hơn, hoặc có tính đồng nhất 99,5% hoặc cao hơn).

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế và các mảnh gắn kết kháng

nguyên của nó bao gồm các miền biến đổi của chuỗi nặng, các trình tự axit amin của miền biến đổi gần như tương tự với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19. Ví dụ, chúng có trình tự axit amin có tính đồng nhất ít nhất 90%, phổ biến hơn là có tính đồng nhất ít nhất 93%, điển hình là có tính đồng nhất 94% hoặc cao hơn (tốt hơn là có tính đồng nhất 95% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 96% hoặc cao hơn; có tính đồng nhất 97% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 98% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 99% hoặc cao hơn hoặc có tính đồng nhất 99,5% hoặc cao hơn) với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin có tính đồng nhất ít nhất 90% (ví dụ, có tính đồng nhất 93% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 94% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 95% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 96% hoặc cao hơn; có tính đồng nhất 97% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 98% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 99% hoặc cao hơn, hoặc có tính đồng nhất 99,5% hoặc cao hơn) so với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có tính đồng nhất ít nhất 90% (ví dụ, có tính đồng nhất 93% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 94% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 95% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 96% hoặc cao hơn; có tính đồng nhất 97% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 98% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 99% hoặc cao hơn hoặc có tính đồng nhất 99,5% hoặc cao hơn) so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:29.

Như đã biết trong lĩnh vực này, các đột biến có thể được đưa vào các trình tự của kháng thể bao gồm các miền biến đổi, mà gần như không làm thay đổi khả năng gắn kết của kháng thể với kháng nguyên. Kháng thể của sáng chế cũng có thể chứa các đột biến khác mà không dẫn đến sự mất khả năng gắn kết của kháng thể với chuỗi-beta của họ TRBV9 của thụ thể TCR, nhưng có thể dẫn đến làm giảm tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc sự tăng ái lực hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể. Cụ thể, như đã được biết rõ trong lĩnh vực này, sự thay thế axit amin bảo toàn có thể được thực hiện trong trình tự

của kháng thể. Khi được sử dụng trong đơn sáng chế này, thuật ngữ "sự thay thế bảo toàn" có nghĩa là sự thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có mạch bên tương tự. Họ các gốc axit amin có mạch bên tương tự là đã được biết rõ trong lĩnh vực này, chúng bao gồm các mạch bên có tính bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), các mạch bên có tính axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), các mạch bên phân cực không mang điện tích (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), các mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), các mạch bên có nhánh β (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin), và các mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Tốt hơn là các vùng CDR3 trong miền VL và/hoặc VH bao gồm không nhiều hơn năm sự thay thế axit amin bảo toàn, phổ biến hơn là không nhiều hơn ba sự thay thế axit amin bảo toàn. Thông thường, sự thay thế bảo toàn không được thực hiện ở các vị trí axit amin quan trọng đối với sự gắn kết epitop của chuỗi beta của họ TRBV9.

Các biến thể (thể đột biến) của các kháng thể theo sáng chế trên đây có thể được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp peptit hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp như được mô tả trong phần "axit nucleic" dưới đây.

Sáng chế cũng đề xuất các mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc "mảnh chức năng của kháng thể" hoặc "mảnh hoạt tính của kháng thể") để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Đã chứng minh được rằng chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bằng các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết được bao gồm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (a) mảnh Fab, mảnh hóa trị một gồm các miền VL, VH, CL và CH1; (b) mảnh F(ab)₂, mảnh hóa trị hai gồm hai mảnh Fab được liên kết bằng liên kết cầu disulfua ở vùng bản lề; (c) mảnh Fd gồm các miền VH và CH1; (d) mảnh Fv gồm các miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể; (e) mảnh dAb (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546) gồm miền VH, và (f) vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) được phân lập. Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh Fv, là VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được

liên kết, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng nhóm liên kết tổng hợp để cho phép chúng được tạo ra dưới dạng chuỗi protein đơn trong đó các vùng VL và VH ghép đôi để tạo thành các phân tử hóa trị một (được gọi là vùng Fv chuỗi đơn (scFv); ví dụ, xem tài liệu: Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được dự định bao gồm trong thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Chúng cũng bao gồm các dạng khác của kháng thể chuỗi đơn, như kháng thể hai mảnh. Kháng thể hai mảnh là kháng thể đặc hiệu kép, có hóa trị hai trong đó các miền VH và VL được biểu hiện trên chuỗi polypeptit đơn, nhưng bằng cách sử dụng nhóm liên kết quá ngắn để cho phép ghép đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, nhờ đó làm cho các miền này ghép đôi với các miền bổ trợ của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kết kháng nguyên (ví dụ, xem tài liệu: Holliger P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak R.J. et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Các mảnh kháng thể, như Fab và $F(ab')_2$, có thể thu được từ kháng thể toàn phần bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, như phương pháp phân giải kháng thể toàn phần bằng papain hoặc pepsin tương ứng. Ngoài ra, có thể thu được các kháng thể, mảnh kháng thể và các phân tử adhesin miễn dịch bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn.

Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có thể là một phần của các phân tử adhesin miễn dịch lớn hơn được tạo ra bằng sự liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị của kháng thể hoặc mảnh kháng thể với một hoặc nhiều protein hoặc peptit. Ví dụ về các phân tử adhesin miễn dịch bao gồm việc sử dụng vùng nhân streptavidin để tạo ra phân tử scFv tetrame (Kipriyanov S.M. et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) và sử dụng gốc cystein, peptit đánh dấu và đuôi polyhistidin ở đầu tận cùng C để tạo ra các phân tử sinh học scFv có kích thước giảm và hóa trị hai (Kipriyanov S.M. et al. (1994) *Mol. Immunol.*, 31:1047-1058). Các liên kết hóa học khác giữa các mảnh kháng thể cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các kháng thể và mảnh chức năng của chúng theo sáng chế có mặt ở dạng được phân lập, điều này có nghĩa là protein này gần như không có mặt các protein

khác hoặc các phân tử sinh học có trong tự nhiên khác, như các oligosacarit, các axit nucleic và các mảnh của chúng, v.v., trong đó thuật ngữ "gần như không" trong trường hợp này có nghĩa là chế phẩm nêu trên chứa protein được phân lập là phân tử sinh học có trong tự nhiên khác với lượng nhỏ hơn 70%, thường là nhỏ hơn 60%, và phổ biến hơn là nhỏ hơn 50%. Theo một số phương án, các protein nêu trên có mặt ở dạng gần như tinh khiết, trong đó thuật ngữ "dạng gần như tinh khiết" có nghĩa là độ tinh khiết bằng ít nhất 95%, thường là bằng ít nhất 97%, và phổ biến hơn là bằng ít nhất 99%.

Các phương pháp tinh chế kháng thể thu được bằng kỹ thuật tái tổ hợp hoặc kỹ thuật tế bào lai là đã được biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, quá trình tinh chế có thể được thực hiện bằng cách sắc ký (ví dụ, phương pháp sắc ký trao đổi ion, phương pháp sắc ký ái lực, đặc biệt là ái lực đối với các kháng nguyên đặc hiệu protein A và protein G, và phương pháp sắc ký cột theo kích thước), phương pháp ly tâm, phương pháp hòa tan riêng phần, hoặc kỹ thuật tiêu chuẩn khác bất kỳ để tinh chế protein. Ngoài ra, kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật theo sáng chế hoặc các mảnh của nó có thể được dung hợp với các trình tự polypeptit khác loại (ví dụ, đuôi histidin) để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tinh chế.

Ái lực của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phân tích tiêu chuẩn bằng cách xác định hằng số phân ly (KD). Hằng số KD được tính toán bằng cách sử dụng công thức $KD = kd/kon$, trong đó kd là hằng số tốc độ phân ly được tính toán theo thực nghiệm và kon là hằng số tốc độ kết hợp được tính toán theo thực nghiệm của phức hợp kháng thể-kháng nguyên.

Các kháng thể được ưu tiên là kháng thể gắn kết kháng nguyên của người với giá trị KD không lớn hơn khoảng 1×10^{-7} M; tốt hơn là không lớn hơn khoảng 1×10^{-8} M; phổ biến hơn là không lớn hơn khoảng 1×10^{-9} M; tốt hơn nữa là không lớn hơn khoảng 1×10^{-10} M, và tốt nhất là không lớn hơn khoảng 1×10^{-11} M, ví dụ, không lớn hơn khoảng 1×10^{-12} M.

Các kháng thể được ưu tiên bao gồm kháng thể kháng TRBV9-1, kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3 hoặc kháng TRBV9-4, khác biệt bởi trình tự CDR3 và được mô tả chi tiết trong phần thử nghiệm dưới đây.

Kháng thể và các mảnh của nó có thể được sử dụng trong các chế phẩm và

phương pháp theo sáng chế là kháng thể và các mảnh có hoạt tính sinh học, nghĩa là chúng có khả năng gắn kết epitop kháng nguyên mong muốn và có hiệu quả sinh học theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp.

Các kháng thể và mảnh chức năng của chúng theo sáng chế có khả năng gắn kết đặc hiệu với (vùng) epitop của chuỗi beta của họ TRBV9. Theo các phương án được ưu tiên, sự gắn kết đặc hiệu của nó với chuỗi beta của họ TRBV9 làm cho hoạt tính của các thụ thể TCR bao gồm cả chuỗi beta nêu trên được ức chế. Thông thường, tốt hơn là mức độ ức chế ít nhất khoảng 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% hoặc cao hơn.

Theo một số phương án, kháng thể kháng chuỗi beta của họ TRBV9 theo sáng chế hoặc mảnh của nó có thể loại bỏ các tế bào T mang TCR chứa chuỗi beta của họ TRBV9. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh của nó có thể tạo ra sự loại bỏ các tế bào lymphô T ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, hoặc khoảng 100%.

Axit nucleic

Sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế, các mảnh chức năng và miền biến đổi của nó, có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể thể khảm chứa các miền biến đổi của sáng chế được dung hợp khi hoạt động với các miền ổn định đã biết của kháng thể của người.

Theo các phương án được ưu tiên, axit nucleic của sáng chế mã hóa chuỗi nặng của kháng thể, miền biến đổi của nó chứa 3 vùng siêu biến là HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó

HCDR1 (theo cách đánh số Kabat) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1;

HCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2;

HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6;

Theo các phương án được ưu tiên, axit nucleic của sáng chế mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, miền biến đổi chứa 3 vùng siêu biến là LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó:

LCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7;

LCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8;

LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Phân tử axit nucleic mã hóa các thể tương đồng và thể đột biến của chuỗi kháng thể nêu trên, các mảnh chức năng và miền của chúng cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, miền biến đổi của nó chứa trình tự axit amin gần như giống với trình tự của SEQ ID NO: 11; ví dụ, chúng có tính đồng nhất ít nhất 90%, phổ biến hơn là có tính đồng nhất ít nhất 93%, điển hình là có tính đồng nhất 94% hoặc cao hơn (tốt hơn là có tính đồng nhất 95% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 96% hoặc cao hơn; có tính đồng nhất 97% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 98% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 99% hoặc cao hơn, hoặc có tính đồng nhất 99,5% hoặc cao hơn).

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của kháng thể, miền biến đổi của nó chứa trình tự axit amin gần như giống với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19; ví dụ, chúng có tính đồng nhất ít nhất 90%, phổ biến hơn là có tính đồng nhất ít nhất 93%, điển hình là có tính đồng nhất 94% hoặc cao hơn (tốt hơn là có tính đồng nhất 95% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 96% hoặc cao hơn; có tính đồng nhất 97% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 98% hoặc cao hơn, có tính đồng nhất 99% hoặc cao hơn hoặc có tính đồng nhất 99,5% hoặc cao hơn).

Theo một số phương án, các axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể chứa miền biến đổi, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 11 và chuỗi nặng của kháng thể chứa miền biến đổi, trình tự axit amin của nó được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa các miền biến đổi, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong các trình tự SEQ ID NO: 11, 13, 15, 19, có thể

được sử dụng để dung hợp khi hoạt động với các axit nucleic mã hóa miễn ổn định tương ứng của kháng thể.

Các loại cụ thể làm ví dụ của phân tử axit nucleic quan tâm được bộc lộ chi tiết hơn dưới đây trong phần thử nghiệm.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, phân tử axit nucleic là phân tử ADN, như phân tử ADN hệ gen hoặc phân tử cADN, hoặc phân tử ARN, như phân tử mARN. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic của sáng chế là phân tử ADN (hoặc cADN) chứa khung đọc mở mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể của sáng chế và trong các điều kiện thích hợp (ví dụ, điều kiện sinh lý trong tế bào), có thể được sử dụng để biểu hiện trong hệ biểu hiện khác loài.

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic của sáng chế được tạo ra bằng phương pháp kỹ thuật di truyền. Các phương pháp để tạo ra axit nucleic là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, tính khả dụng của thông tin về trình tự axit amin hoặc thông tin về trình tự nucleotit cho phép tạo ra phân tử axit nucleic được phân lập của sáng chế bằng cách tổng hợp oligonucleotit. Trong trường hợp thông tin về trình tự axit amin, nhiều axit nucleic khác nhau là do mã thoái hóa có thể được tổng hợp. Các phương pháp chọn lọc biến thể codon đối với vật chủ mong muốn là đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các oligonucleotit tổng hợp có thể được tạo ra bằng phương pháp phosphoramidit, và các cấu trúc tạo thành có thể được tinh chế theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này, như phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography: HPLC) hoặc các phương pháp khác như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, và theo các hướng dẫn được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: United States Dept. of HHS, National Institute of Health (NIH) *Guidelines for Recombinant DNA Research*. Các phân tử ADN sợi kép mạch dài của sáng chế có thể được tổng hợp theo cách sau đây: bằng cách tổng hợp một số mảnh nhỏ hơn có tính bổ trợ thích hợp chứa các đầu tận cùng thích hợp có khả năng kết dính với mảnh liền kề. Các mảnh liền kề có thể được liên kết bằng cách sử dụng ADN ligaza hoặc phương pháp trên cơ sở PCR.

Các phân tử axit nucleic của sáng chế cũng có thể được tách dòng từ các nguồn sinh học.

Sáng chế cũng bao gồm các axit nucleic có tính tương đồng, gần như giống nhau về tính đồng nhất với, hoặc có nguồn gốc từ các axit nucleic mã hóa polypeptit của sáng chế.

Các axit nucleic của sáng chế có mặt trong môi trường khác với môi trường mà trong đó chúng có mặt trong tự nhiên, ví dụ, chúng được phân lập, có mặt với lượng tăng lên, có mặt hoặc được biểu hiện trong hệ *in vitro* hoặc trong các tế bào hoặc sinh vật không phải môi trường mà trong đó chúng có mặt trong các điều kiện tự nhiên.

Các thay đổi hoặc khác biệt về trình tự nucleotit giữa các trình tự axit nucleic có liên quan chặt chẽ có thể là sự thay đổi nucleotit trong trình tự xuất hiện trong quá trình sao chép hoặc nhân đôi bình thường. Các thay đổi khác có thể được thiết kế đặc hiệu và được đưa vào trình tự nhằm mục đích cụ thể, như để thay đổi codon của các axit amin cụ thể hoặc trình tự nucleotit trong vùng điều hòa. Các thay đổi cụ thể này có thể được tiến hành *in vitro* bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật gây đột biến hoặc thu được ở các sinh vật chủ được cho vào các điều kiện chọn lọc cụ thể để cảm ứng hoặc chọn lọc các thay đổi này. Các biến thể trình tự được tạo ra theo cách đặc hiệu này có thể được gọi là "thể đột biến" hoặc "dẫn xuất" của trình tự ban đầu.

Có thể thu được các axit nucleic thể đột biến hoặc dẫn xuất trên axit nucleic khuôn được chọn từ các axit nucleic trên đây bằng cách cải biến, làm khuyết đoạn hoặc bổ sung một hoặc nhiều nucleotit trong trình tự khuôn, hoặc tổ hợp của chúng, để tạo ra biến thể của axit nucleic khuôn. Các bước cải biến, bổ sung hoặc làm khuyết đoạn có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem tài liệu: Gustin et al., *Biotechniques* (1993) 14: 22; Barany, *Gene* (1985) 37: 111-123; và Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* (1985) 199: 537-539, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989), CSH Press, pp. 15.3-15.108) bao gồm phương pháp PCR dễ mắc lỗi, phương pháp sắp xếp lại, phương pháp gây đột biến định hướng oligonucleotit, phương pháp PCR ghép, phương pháp gây đột biến PCR hữu tính, phương pháp gây đột biến *in vivo*,

phương pháp gây đột biến cát xét, phương pháp gây đột biến tập hợp đệ quy, phương pháp gây đột biến tập hợp theo hàm số mũ, phương pháp gây đột biến đặc hiệu vị trí, phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên, phương pháp tái lắp ráp gen, phương pháp gây đột biến bão hòa vị trí gen (gene site saturated mutagenesis: GSSM), phương pháp tái lắp ráp bằng cách gắn tổng hợp (synthetic ligation reassembly: SLR), hoặc tổ hợp của các phương pháp này. Các bước cải biến, bổ sung hoặc làm khuyết đoạn cũng có thể được thực hiện bằng phương pháp bao gồm bước tái tổ hợp, tái tổ hợp trình tự đệ quy, phương pháp gây đột biến ADN được cải biến bằng phosphothioat, phương pháp gây đột biến khuôn chứa uraxil, phương pháp gây đột biến cấu trúc sợi kép có chèn khoảng trống, phương pháp gây đột biến sửa chữa sự bắt cặp sai điểm, phương pháp gây đột biến chủng vật chủ sai hỏng hệ sửa chữa, phương pháp gây đột biến hóa học, phương pháp gây đột biến do phóng xạ, phương pháp gây đột biến làm khuyết đoạn, phương pháp gây đột biến chọn lọc giới hạn, phương pháp gây đột biến tinh chế giới hạn, phương pháp tổng hợp gen nhân tạo, phương pháp gây đột biến tập hợp, phương pháp tạo ra multime axit nucleic thể khảm, và tổ hợp của các phương pháp này.

Sáng chế cũng đề xuất các biến thể thoái hóa của axit nucleic mã hóa các protein của sáng chế. Các biến thể thoái hóa của axit nucleic bao gồm sự thay thế các codon của axit nucleic bằng các codon khác mã hóa cùng axit amin. Cụ thể, các biến thể thoái hóa của axit nucleic được tạo ra để làm gia tăng mức độ biểu hiện trong tế bào chủ. Theo phương án này, các codon của axit nucleic không được ưu tiên hoặc ít được ưu tiên trong các gen của tế bào chủ được thay thế bằng các codon được biểu hiện quá mức trong các trình tự mã hóa trong gen của tế bào chủ, trong đó các codon đã thay thế nêu trên mã hóa cùng axit amin. Phương pháp tối ưu hóa mã di truyền là đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các cải biến trên đây không làm thay đổi đáng kể các đặc tính của kháng thể hoặc các mảnh chức năng của chúng, nhưng có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự cuộn gập protein trong tế bào chủ, làm giảm khả năng kết tụ hoặc điều biến các đặc tính sinh học khác của protein, ví dụ, khoảng thời gian bán hủy. Theo một số phương án, các cải biến này không làm thay đổi các đặc tính sinh học của protein. Tất cả các phương pháp cải biến và đột biến đã chỉ rõ trên đây được thực hiện ở cấp

độ axit nucleic.

Các axit nucleic theo sáng chế có thể được phân lập và điều chế ở dạng gần như tinh khiết. Dạng gần như tinh khiết có nghĩa là các axit nucleic có độ tinh khiết ít nhất khoảng 50%, điển hình là có độ tinh khiết ít nhất khoảng 90% và thường là dạng "tái tổ hợp", nghĩa là nằm ở cạnh một hoặc nhiều nucleotit mà thường là không được liên kết trên nhiễm sắc thể có trong tự nhiên của cơ thể vật chủ tự nhiên của nó.

Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa protein dung hợp chứa protein của sáng chế, hoặc các mảnh của nó, được bàn luận chi tiết hơn dưới đây. Các axit nucleic mã hóa các miền biến đổi theo sáng chế có thể được liên kết khi hoạt động với các axit nucleic mã hóa các miền ổn định tương ứng của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể. Các axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể có thể được liên kết khi hoạt động với các axit nucleic mã hóa peptit dẫn đầu để tạo điều kiện thuận lợi cho sự vận chuyển các sản phẩm biểu hiện từ tế bào chủ. Peptit dẫn đầu gần như được loại bỏ trong quá trình trưởng thành của polypeptit.

Sáng chế cũng đề xuất các vector và cấu trúc axit nucleic khác chứa axit nucleic theo sáng chế. Thuật ngữ "vector" để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết khi hoạt động với. Một số vector có thể sao chép tự chủ trong các tế bào chủ mà chúng được đưa vào, trong khi các vector còn lại có thể được đính gắn vào hệ gen của tế bào chủ và sao chép cùng với hệ gen của vật chủ. Ngoài ra, một số vector có khả năng định hướng sự biểu hiện của các gen mà chúng được liên kết khi hoạt động với. Các vector này được gọi ở đây là "vector biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "vector biểu hiện"); các vector làm ví dụ là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các vector thích hợp bao gồm vector của virus và vector không phải của virus, các plasmit, cosmit, thể thực khuẩn, v.v., tốt hơn là các plasmit, và được sử dụng để tách dòng, khuếch đại, biểu hiện, vận chuyển, v.v. trình tự axit nucleic của sáng chế đến vật chủ thích hợp. Sự lựa chọn vector thích hợp là đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Axit nucleic có chiều dài đầy đủ hoặc phần của nó được chèn vào vector thường là bằng cách gắn ADN ligaza vào vị trí enzym giới hạn được phân giải

trong vector này. Theo cách khác, trình tự nucleotit mong muốn có thể được chèn vào bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng *in vivo*, thường là bằng cách gắn các vùng có tính tương đồng vào vector trên vùng rìa của trình tự nucleotit mong muốn. Các vùng có tính tương đồng được bổ sung bằng cách gắn các oligonucleotit, hoặc bằng phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng các đoạn mồi chứa, ví dụ, cả vùng có tính tương đồng và phần trình tự nucleotit mong muốn. Thông thường, các vector có nguồn gốc sao chép đảm bảo sự nhân giống của chúng trong các tế bào chủ nhờ việc đưa chúng vào tế bào làm yếu tố ngoài nhiễm sắc thể. Thông thường, vector này cũng có thể chứa các yếu tố điều hòa để đảm bảo sự biểu hiện của axit nucleic trong tế bào chủ và tạo ra polypeptit đích. Trong vector biểu hiện, axit nucleic nêu trên được liên kết khi hoạt động với trình tự điều hòa có thể bao gồm các gen khởi đầu, gen tăng cường, gen kết thúc, gen điều khiển, gen ức chế và tác nhân gây cảm ứng, cũng như codon khởi đầu của polypeptit. Theo một số phương án, axit nucleic của sáng chế còn được liên kết khi hoạt động với peptit dẫn đầu để đảm bảo sự phân lập sản phẩm biểu hiện ra khỏi tế bào chủ vào không gian ngoại bào.

Sáng chế cũng đề xuất cát xét hoặc hệ biểu hiện được sử dụng, ngoài các mục đích khác, để tạo ra polypeptit của sáng chế (ví dụ, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế) trên cơ sở đó hoặc dùng cho quá trình sao chép của phân tử axit nucleic theo sáng chế. Cát xét biểu hiện có thể tồn tại dưới dạng yếu tố ngoài nhiễm sắc thể hoặc có thể được đính gắn vào hệ gen của tế bào bằng cách đưa cát xét biểu hiện nêu trên vào tế bào. Để biểu hiện, sản phẩm protein được mã hóa bởi axit nucleic của sáng chế được biểu hiện trong hệ biểu hiện thuận tiện bất kỳ bao gồm, ví dụ, các hệ vi khuẩn, nấm men, côn trùng, động vật lưỡng cư, hoặc tế bào của động vật có vú. Trong cát xét biểu hiện, axit nucleic đích được liên kết khi hoạt động với trình tự điều hòa có thể bao gồm các gen khởi đầu, gen tăng cường, các trình tự kết thúc, gen điều khiển, gen ức chế và tác nhân gây cảm ứng, cũng như codon khởi đầu của polypeptit. Theo một số phương án, axit nucleic của sáng chế còn được liên kết khi hoạt động với peptit dẫn đầu để đảm bảo sự phân lập sản phẩm biểu hiện ra khỏi tế bào chủ vào không gian ngoại bào. Các phương pháp tạo ra cát xét hoặc hệ biểu hiện có khả năng biểu hiện sản phẩm mong muốn là đã

được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các hệ biểu hiện trên đây có thể được sử dụng trong vật chủ không nhân hoặc có nhân điển hình. Các tế bào chủ, như *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, tế bào côn trùng kết hợp với các vector của baculovirus, hoặc các tế bào của sinh vật bậc cao, mà không là các tế bào phôi của người, như nấm men, thực vật, động vật có xương sống, ví dụ, các tế bào CHO (ví dụ, ATCC CRL-9096), các tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào HEK293, tế bào COS (ví dụ, ATCC CRL-1650, CRL-1651) và HeLa (ATCC CCL-2), có thể được sử dụng để sản xuất protein.

Để tạo ra kháng thể của sáng chế, tế bào chủ được đồng biến nạp với vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể và vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của kháng thể. Theo một số phương án, vector biểu hiện đơn được sử dụng, mà các axit nucleic mã hóa cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được đưa vào đó.

Để biểu hiện chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, (các) vector biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được biến nạp (đồng biến nạp) vào tế bào chủ sao cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được biểu hiện trong tế bào chủ này và tốt hơn là được tiết vào môi trường, trong đó các tế bào chủ được nuôi cấy, và môi trường mà kháng thể có thể được phân lập từ đó. Nhiều sự giải thích khác nhau của thuật ngữ "sự biến nạp" được dự định bao gồm khoảng rộng các phương pháp thường được sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào tế bào chủ không nhân hoặc có nhân điển hình, ví dụ, phương pháp gây xung điện, phương pháp kết tủa bằng canxi phosphat, phương pháp chuyển nhiễm bằng DEAE-dextran, v.v., như được mô tả trong tài liệu: Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989; Ausubel F.M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates (1989).

Khi các vector biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic của kháng thể được đưa vào tế bào chủ, kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong một khoảng thời gian đủ để biểu hiện kháng thể này trong tế bào chủ, hoặc (tốt hơn nữa là) tiết ra kháng thể vào môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào chủ được sinh trưởng. Các kháng thể có thể được phân lập từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh chế protein tiêu chuẩn. Các điều kiện nuôi cấy tế bào là đã được

biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được mô tả trong tài liệu: Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. and Yamada K.M. (eds.) published by John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Nếu tế bào bất kỳ trong số các tế bào chủ trên đây hoặc các tế bào chủ khác hoặc các sinh vật thích hợp để sao chép và/hoặc biểu hiện axit nucleic của sáng chế được sử dụng, axit nucleic đã sao chép tạo thành, protein hoặc polypeptit đã biểu hiện đều nằm trong phạm vi của sáng chế dưới dạng sản phẩm của tế bào chủ hoặc sinh vật. Sản phẩm này có thể được phân lập bằng kỹ thuật thích hợp đã biết trong lĩnh vực này.

Các dòng tế bào biểu hiện ổn định các protein của sáng chế, có thể được chọn lọc bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, đồng chuyển nhiễm với gen đánh dấu có thể chọn lọc, như dhfr, gpt, neomycin, hygromycin, để cho phép nhận biết và phân lập các tế bào đã chuyển nhiễm chứa gen được đính gắn vào hệ gen).

Các phân tử axit nucleic của sáng chế cũng có thể được sử dụng để xác định mức độ biểu hiện gen trong mẫu sinh học. Phương pháp mà trong đó các tế bào được thử nghiệm về sự có mặt của các trình tự nucleotit cụ thể, như ADN hoặc ARN hệ gen, đã được thiết lập rõ ràng trong lĩnh vực này. Tóm lại, ADN hoặc mARN được phân lập từ mẫu tế bào. mARN có thể được khuếch đại bằng phản ứng RT-PCR, bằng cách sử dụng enzym transcriptaza ngược để tạo ra sợi ADN bổ trợ, sau đó khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu với trình tự ADN của sáng chế. Theo cách khác, mẫu mARN được tách ra bằng phương pháp điện di trên gel, được chuyển vào thể mang thích hợp, ví dụ, nitroxenluloza, nylon, v.v., và sau đó được dò bằng mảnh ADN của sáng chế làm đoạn dò. Các kỹ thuật khác, như các thử nghiệm gắn oligonucleotit, lai tại chỗ, và lai với đoạn dò ADN được cố định trên chip dạng rắn cũng có thể được sử dụng. Sự phát hiện mARN lai với trình tự của sáng chế là dấu hiệu của sự biểu hiện gen trong mẫu.

Sử dụng kháng thể của sáng chế trong điều trị

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh có hoạt tính của nó được sử dụng trong việc điều trị các rối loạn có liên quan đến hoạt tính của các tế bào lymphô T về mặt bệnh học mang thụ thể TCR của họ TRBV9 trên bề mặt, ví dụ, có hoạt tính của tế bào lymphô T tự miễn trong bệnh AS, bệnh celiac, u lymphô tế bào T.

Khi được sử dụng trong đơn sáng chế này, thuật ngữ "bệnh nhân" để chỉ động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuột, khỉ, người, động vật có vú là gia súc, các động vật có vú trong các môn thể thao và động vật có vú là vật nuôi trong nhà; tốt hơn là thuật ngữ này dùng cho người. Theo phương án cụ thể, bệnh nhân còn được đặc trưng bởi bệnh hoặc rối loạn, hoặc tình trạng bệnh, do sự có mặt của thụ thể TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, trong cơ thể của họ làm trung gian gây ra. Như đã biết trong lĩnh vực này, thụ thể TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, có liên quan đến bệnh AS và bệnh celiac. Ngoài ra, thụ thể TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, có thể có liên quan đến sự phát triển của nhiều bệnh về máu, như u lymphô tế bào T do virus Epstein-Barr gây ra.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "sử dụng đồng thời", "được sử dụng đồng thời" và "kết hợp với" để chỉ các kháng thể cùng với một hoặc nhiều chất điều trị khác, được cho là có nghĩa là dùng để chỉ và bao gồm các định nghĩa sau:

1) việc sử dụng đồng thời tổ hợp của kháng thể theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế cùng nhau thành dạng liều dùng đơn lẻ mà dạng này sẽ giải phóng các thành phần nêu trên ở thời điểm gần như đồng thời vào bệnh nhân nêu trên,

2) việc sử dụng đồng thời tổ hợp của kháng thể theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế riêng biệt với nhau thành các dạng liều dùng riêng rẽ, các dạng liều này được sử dụng gần như đồng thời bởi bệnh nhân nêu trên, sau đó các thành phần nêu trên được giải phóng gần như đồng thời vào bệnh nhân này,

3) việc sử dụng lần lượt tổ hợp của kháng thể theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế riêng biệt với

nhau thành các dạng liều dùng riêng rẽ, các dạng liều này được sử dụng ở các thời điểm liên nhau bởi bệnh nhân nêu trên với khoảng thời gian cách nhau đáng kể giữa mỗi lần sử dụng, sau đó các thành phần nêu trên được giải phóng ở các thời điểm khác nhau đáng kể vào bệnh nhân nêu trên; và

4) việc sử dụng lần lượt tổ hợp của kháng thể theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế cùng nhau thành dạng liều dùng đơn lẻ, dạng liều dùng này giải phóng các thành phần nêu trên theo cách có kiểm soát, sau đó chúng được giải phóng đồng thời, liên tiếp, hoặc cùng nhau ở các thời điểm giống nhau và/hoặc khác nhau vào bệnh nhân nêu trên, trong đó mỗi phần có thể được sử dụng qua đường sử dụng giống nhau hoặc khác nhau.

Kháng thể của sáng chế (ví dụ, kháng TRBV9-1, kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3 hoặc kháng TRBV9-4) có thể được sử dụng mà không sử dụng thêm phương pháp điều trị khác, nghĩa là dưới dạng liệu pháp độc lập. Ngoài ra, việc điều trị bằng kháng thể của sáng chế có thể bao gồm ít nhất một chất điều trị bổ sung (liệu pháp kết hợp). Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể này có thể được sử dụng đồng thời hoặc được bào chế với thuốc/độc chất khác để điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh lý ung thư khác, sinh bệnh học của các bệnh liên quan đến thụ thể TCR chứa chuỗi beta của TRBV9, ví dụ, bệnh AC, bệnh celiac, u lymphô tế bào T, bệnh bạch cầu tế bào T.

Liều dùng và đường sử dụng

Kháng thể theo sáng chế sẽ được sử dụng với lượng có hiệu quả trong việc điều trị tình trạng bệnh cần điều trị, nghĩa là với liều và trong khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh cụ thể cần được điều trị, độ tuổi, giới tính, và trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, và việc kháng thể này được sử dụng một mình hay kết hợp với một hoặc nhiều kỹ thuật điều trị ức chế miễn dịch hoặc kháng viêm bổ sung hay không.

Chế độ dùng liều có thể được điều chỉnh để tạo ra mức độ đáp ứng tối ưu. Ví dụ, một liều lớn có thể được sử dụng, vài liều chia nhỏ có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều dùng này có thể được giảm đi hoặc tăng lên tương ứng như

được chỉ định theo các tình huống điều trị. Đặc biệt có lợi nếu bào chế được phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa theo dạng liều dùng đơn vị để dễ sử dụng và tính đồng đều của liều lượng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, dạng liều dùng đơn vị được dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp làm liều dùng đơn vị cho các bệnh nhân/đối tượng cần được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hợp chất có hoạt tính được tính toán để thu được hiệu quả điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dùng mong muốn. Tiêu chuẩn kỹ thuật của các dạng liều dùng đơn vị theo sáng chế thường được quyết định theo và phụ thuộc trực tiếp vào (a) các đặc tính đặc biệt của chất hóa trị liệu và tác dụng phòng bệnh hoặc điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) các hạn chế vốn có trong lĩnh vực bào chế hợp chất có hoạt tính dùng để điều trị tính miễn cảm ở các đối tượng.

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được từ phần mô tả ở đây rằng các liều dùng và chế độ dùng liều được điều chỉnh theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực điều trị. Điều này có nghĩa là liều được dung nạp tối đa có thể được thiết lập dễ dàng, và lượng hữu hiệu để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn cho bệnh nhân cũng như các yêu cầu về thời gian sử dụng của mỗi chất để đạt được hiệu quả điều trị có thể nhận thấy cho bệnh nhân. Do đó, mặc dù một số liều dùng và chế độ dùng liều được đưa ra dưới dạng các ví dụ trong tài liệu này, các ví dụ này không làm giới hạn liều dùng và chế độ dùng liều có thể là cần thiết cho bệnh nhân trong khi thực hành sáng chế.

Cần lưu ý rằng các giá trị liều dùng có thể thay đổi theo loại và mức độ nặng của tình trạng cần được làm thuyên giảm và có thể bao gồm một hoặc nhiều liều. Cần hiểu thêm rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ dùng liều cụ thể cần được điều chỉnh theo thời gian tùy theo nhu cầu của đối tượng và sự đánh giá của chuyên gia y tế về việc sử dụng hoặc theo dõi việc sử dụng dược phẩm, và các khoảng liều dùng được đưa ra trong bản mô tả này chỉ là ví dụ và không dự định làm giới hạn phạm vi hoặc sự thực hành dược phẩm theo sáng chế. Ngoài ra, chế độ dùng liều với các dược phẩm của sáng chế có thể dựa trên nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm loại bệnh, độ tuổi, trọng lượng, giới tính, tình trạng sức khỏe của bệnh nhân, mức độ nặng của tình trạng bệnh, đường sử dụng và kháng thể cụ thể được sử dụng. Do đó, chế độ dùng liều này có thể thay đổi trong khoảng rộng, nhưng có thể

được xác định theo cách thông thường bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, các liều dùng có thể được điều chỉnh dựa trên các thông số dược động học hoặc dược lực học, các thông số này có thể bao gồm các hiệu quả lâm sàng như tác dụng gây độc và/hoặc giá trị trong phòng thí nghiệm. Do đó, sáng chế bao gồm cả sự tăng liều dùng ở bệnh nhân như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Việc xác định liều dùng và chế độ cần thiết là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ dựa vào các ý tưởng được bộc lộ trong tài liệu này.

Ví dụ về các phương pháp sử dụng thích hợp đã được nêu trên đây.

Dự định rằng liều dùng thích hợp của kháng thể theo sáng chế sẽ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 200 mg/kg, tốt hơn là từ 0,1 đến 100 mg/kg, bao gồm cả khoảng từ 0,5 đến 50 mg/kg, ví dụ khoảng từ 1 đến 20 mg/kg. Kháng thể này có thể được sử dụng, ví dụ, với liều ít nhất bằng 0,25 mg/kg, như ít nhất bằng 0,5 mg/kg, bao gồm cả liều dùng ít nhất bằng 1 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 1,5 mg/kg, như ít nhất bằng 2 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 3 mg/kg, bao gồm cả liều dùng ít nhất bằng 4 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 5 mg/kg; và ví dụ, liều dùng đến mức tối đa bằng 50 mg/kg, bao gồm cả liều dùng đến mức tối đa bằng 30 mg/kg, ví dụ, đến mức tối đa bằng 20 mg/kg, bao gồm cả liều dùng đến mức tối đa bằng 15 mg/kg. Việc sử dụng này sẽ thường được lặp lại trong các khoảng thời gian thích hợp, như mỗi tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần hoặc bốn tuần một lần, và miễn là trong khoảng thời gian được cho là thích hợp bởi bác sĩ điều trị mà trong một số trường hợp, có thể tăng hoặc giảm liều dùng, nếu cần.

Dược phẩm

Kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân. Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với chất mang, chất pha loãng, và/hoặc tá dược được dùng, ở dạng đơn liều hoặc đa liều. Các dược phẩm để sử dụng được thiết kế để thích hợp cho chế độ sử dụng được chọn, và các chất pha loãng, chất mang và/hoặc tá dược được dùng như các chất phân tán, chất đệm, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất hòa tan, chất đẳng trương, chất ổn định và chất tương tự được sử dụng, khi thích

hợp. Các dược phẩm nêu trên được thiết kế theo các phương pháp thông thường, ví dụ như trong tài liệu: Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, tài liệu này mô tả các kỹ thuật khác nhau để thu được dược phẩm như thường đã biết với bác sĩ thực hành.

Thuật ngữ "thuốc (dược chất)" – là hợp chất hoặc hỗn hợp của các hợp chất dưới dạng dược phẩm ở dạng viên nén, viên nang, bột, sản phẩm đông khô nhanh, thuốc tiêm, tiêm truyền, thuốc mỡ và các dạng sử dụng được ngay khác được dùng để phục hồi, cải thiện hoặc cải biến các chức năng sinh lý ở người và động vật, và để điều trị và phòng ngừa bệnh, để chẩn đoán, gây mê, tránh thai, mỹ phẩm và các mục đích khác. Phương pháp bất kỳ để sử dụng các peptit, protein hoặc các kháng thể đã được chấp nhận trong lĩnh vực này có thể được sử dụng theo cách thích hợp đối với kháng thể của sáng chế.

Thuật ngữ "dược dụng" để chỉ một hoặc nhiều thành phần dạng rắn hoặc lỏng tương hợp được, các thành phần này thích hợp để sử dụng ở động vật có vú, tốt hơn là ở người.

Thuật ngữ "tá dược" được sử dụng trong bản mô tả này để mô tả thành phần bất kỳ không phải các thành phần nêu trên của sáng chế. Các thành phần này là chất hữu cơ hoặc vô cơ được sử dụng trong khi sản xuất dược phẩm để tạo ra các sản phẩm dược chất có các đặc tính lý hóa cần thiết.

Thuật ngữ "chất đệm", "hỗn hợp chất đệm", "tác nhân đệm" để chỉ dung dịch có khả năng chống lại sự thay đổi độ pH nhờ tác dụng của các thành phần liên hợp axit-bazơ của nó, và cho phép dược chất là kháng thể chống lại sự thay đổi độ pH. Nói chung, tốt hơn là dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0. Ví dụ về các chất đệm được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dung dịch đệm axetat, phosphat, xitrat, histidin, succinat, v.v..

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "chất đẳng trương", "chất điều hòa áp lực thẩm thấu" hoặc "chất thẩm thấu" để chỉ tá dược có thể làm tăng áp suất thẩm thấu của dạng bào chế kháng thể dạng lỏng. Dược chất "đẳng trương" là dược chất có áp suất thẩm thấu tương đương với áp suất thẩm thấu trong máu của người. Các dược chất đẳng trương thường có áp suất thẩm thấu nằm trong

khoảng từ 250 đến 350 mOsm/kg. Các chất đẳng trương được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất polyol, sacarit và sucroza, axit amin, các muối kim loại, ví dụ, natri clorua, v.v..

Thuật ngữ "chất ổn định" để chỉ tá dược hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều tá dược để tạo ra tính ổn định lý học và/hoặc hóa học của chất có hoạt tính. Các chất ổn định bao gồm các axit amin, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, arginin, histidin, glyxin, lysin, glutamin, prolin; các chất hoạt động bề mặt, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, polysorbat 20 (tên thương mại: Tween 20), polysorbat 80 (tên thương mại: Tween 80), polyetylen-polypropylene glycol và các copolyme của chúng (tên thương mại: Poloxamer, Pluronic, natri dodecyl sulfat (SDS); các chất chống oxy hóa, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, methionin, axetylxcystein, axit ascorbic, monothioglycerol, các muối của axit sulfuric, v.v.; các chất chelat hóa, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), axit dietylenetriaminpentaaxetic (DTPA), natri xitrat, v.v..

Dược phẩm có tính "ổn định" nếu chất có hoạt tính vẫn giữ được tính ổn định lý học và/hoặc tính ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó trong khoảng thời hạn sử dụng cụ thể ở nhiệt độ bảo quản, ví dụ, nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C. Tốt hơn là chất có hoạt tính vẫn giữ được tính ổn định lý học và hóa học, cũng như hoạt tính sinh học. Khoảng thời gian bảo quản được điều chỉnh dựa trên kết quả thử nghiệm tính ổn định trong điều kiện gia tốc hoặc lão hóa tự nhiên.

Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân có nguyên nhân bệnh như được mô tả trong đơn sáng chế này bằng cách sử dụng các phương pháp sử dụng tiêu chuẩn, bao gồm sử dụng qua đường miệng, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, dưới da, đường phổi, qua chân bì, trong cơ, trong mũi, trong má, dưới lưỡi, hoặc sử dụng ở dạng thuốc đạn.

Tốt hơn là dược phẩm của sáng chế chứa hoặc có "lượng có hiệu quả điều trị" của kháng thể theo sáng chế. Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" được dự định để chỉ lượng có hiệu quả với liều dùng và trong các khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và trọng lượng cơ thể của đối tượng, và khả năng tạo ra sự đáp ứng mong muốn ở đối tượng

của kháng thể hoặc phần của nó. Lượng có hiệu quả điều trị cũng là lượng trong đó tác dụng về độc tính hoặc tác dụng có hại bất kỳ được bù lại bởi tác dụng có lợi về mặt điều trị của kháng thể. Thuật ngữ "lượng có hiệu quả phòng bệnh" được dự định để chỉ lượng có hiệu quả với liều dùng và trong các khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả phòng bệnh mong muốn. Do liều có tác dụng phòng bệnh được quy định cho các đối tượng trước khi hoặc ở giai đoạn sớm của bệnh, lượng có hiệu quả phòng bệnh có thể thường nhỏ hơn lượng có hiệu quả điều trị.

Lượng có hiệu quả điều trị hoặc lượng có hiệu quả phòng bệnh ít nhất bằng liều có hiệu quả điều trị tối thiểu, liều này nhỏ hơn liều gây độc của chất có hoạt tính cần thiết để tạo ra hiệu quả điều trị cho bệnh nhân. Mặt khác, lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể theo sáng chế là lượng làm giảm hoạt tính sinh học của các dòng tự miễn ở động vật có vú, tốt hơn là ở người, ví dụ, bằng cách gắn kết thụ thể TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, mà ở đó sự có mặt của các dòng này gây ra hoặc góp phần vào tác dụng bệnh lý không mong muốn, hoặc làm giảm thụ thể TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, tạo ra hiệu quả điều trị có lợi ở động vật có vú, tốt hơn là ở người.

Đường sử dụng của kháng thể theo sáng chế có thể là đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, đường hít hoặc khu trú. Tốt hơn là kháng thể theo sáng chế có thể được đưa vào được phẩm chấp nhận được để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ngoài đường tiêu hóa" bao gồm sử dụng qua đường trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, đường trực tràng, đường âm đạo hoặc trong màng bụng. Dạng tiêm qua đường trong tĩnh mạch, trong màng bụng hoặc dưới da là các đường sử dụng được ưu tiên. Các chất mang được dùng dùng cho thuốc tiêm là đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Như được mô tả trong phần hướng dẫn thích hợp, các dược phẩm sẽ là sản phẩm vô khuẩn và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản trong đồ chứa, được đựng trong, ví dụ, lọ nhỏ (ống tiêm) hoặc bơm tiêm được bịt kín. Do đó, dược phẩm có thể được khử khuẩn bằng cách lọc sau khi bào chế dược phẩm này, hoặc có thể được tạo ra theo cách thích hợp về mặt vi sinh học bằng kỹ thuật khác bất kỳ. Dược phẩm điển hình để tiêm truyền qua đường trong tĩnh mạch có thể chứa từ 250 đến 1000ml chất lỏng như dung dịch Ringer vô khuẩn, nước muối sinh lý,

dung dịch dextroza hoặc dung dịch nước muối Hank, và liều có hiệu quả điều trị của kháng thể cô đặc (ví dụ, từ 1 đến 100 mg/ml hoặc cao hơn). Các liều dùng có thể thay đổi tùy theo loại bệnh và mức độ nặng của bệnh. Đã biết rõ trong lĩnh vực y học rằng liều dùng cho bệnh nhân bất kỳ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm thể trạng, diện tích bề mặt cơ thể, độ tuổi của bệnh nhân, hợp chất cụ thể cần được sử dụng, giới tính, khoảng thời gian và đường sử dụng, tình trạng sức khỏe chung và các thuốc được sử dụng đồng thời khác. Ví dụ, liều dùng thông thường có thể nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1000 μ g; tuy nhiên, các liều dùng thấp hơn và cao hơn khoảng minh họa này được dự định, đặc biệt là dựa vào các thông số nêu trên. Chế độ dùng liều ngoài đường tiêu hóa hàng ngày có thể nằm trong khoảng từ 0,1 μ g/kg đến 100 μ g/kg của tổng trọng lượng cơ thể, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,3 μ g/kg đến 10 μ g/kg, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 μ g/kg đến 1 μ g/kg, đặc biệt tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10 μ g/kg trọng lượng cơ thể mỗi ngày. Quá trình điều trị có thể được theo dõi bằng cách đánh giá tình trạng sức khỏe của bệnh nhân theo định kỳ. Đối với việc sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh của bệnh nhân, việc điều trị được lặp lại cho đến khi đạt được mức độ đáp ứng mong muốn hoặc ức chế được các triệu chứng của bệnh. Tuy nhiên, các chế độ dùng liều khác không được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng. Liều dùng mong muốn của kháng thể có thể được sử dụng ở dạng sử dụng liều đơn mỗi lần, sử dụng liều lớn nhiều lần, hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục, tùy thuộc vào mẫu phân rã được động học mà bác sĩ thực hành mong muốn đạt được.

Các đặc tính giả định nêu trên của kháng thể phụ thuộc đáng kể vào quyết định của bác sĩ điều trị. Yếu tố quan trọng trong việc lựa chọn liều dùng và chế độ dùng liều thích hợp là kết quả mong muốn. Các yếu tố được xem xét ở đây bao gồm bệnh cần được điều trị, động vật có vú cần được điều trị, tình trạng lâm sàng của bệnh nhân, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí sử dụng kháng thể, loại kháng thể cụ thể, đường sử dụng, chế độ sử dụng và các yếu tố khác đã được biết rõ trong lĩnh vực y học.

Các chất điều trị của sáng chế có thể được đông lạnh hoặc đông khô nhanh và được hoàn nguyên trong chất mang vô khuẩn thích hợp trước khi sử dụng. Quá

trình sấy khô ở nhiệt độ thấp và hoàn nguyên có thể dẫn đến làm mất hoạt tính của kháng thể ở mức độ nhất định. Các liều dùng có thể được điều chỉnh để bù lại sự hao hụt này. Nói chung, độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8 là được ưu tiên đối với dược phẩm.

Vật phẩm (sản phẩm) và kit

Phương án khác của sáng chế là vật phẩm chứa sản phẩm được dùng để điều trị các bệnh tự miễn và tình trạng bệnh liên quan và các bệnh về máu ác tính, sinh bệnh học của các bệnh liên quan đến thụ thể TCR mang chuỗi beta của họ TRBV9. Các bệnh này bao gồm, ví dụ, bệnh AS, bệnh celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T và các bệnh khác.

Sản phẩm này là đồ chứa có gắn nhãn và tờ hướng dẫn sử dụng, sản phẩm này có thể ở trong vỉ bấm và/hoặc bao gói. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, lọ nhỏ, ống tiêm, bơm tiêm, v.v.. Các đồ chứa có thể được làm bằng nhiều vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc vật liệu polyme. Đồ chứa này chứa dược phẩm có hiệu quả điều trị bệnh nhất định và có thể có đường dẫn vô khuẩn. Ít nhất một thành phần hoạt tính trong dược phẩm là kháng thể theo sáng chế. Nhãn dán và tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng dược chất được sử dụng để điều trị bệnh nhất định. Nhãn dán và/hoặc tờ hướng dẫn sử dụng còn chứa các hướng dẫn sử dụng hỗn hợp kháng thể ở bệnh nhân, bao gồm cả chỉ định, tần suất, liều dùng, đường sử dụng, chống chỉ định và/hoặc lưu ý đối với các sản phẩm điều trị này. Theo một phương án, tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng dược phẩm được dự định dùng để điều trị bệnh.

Ngoài ra, vật phẩm có thể chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sản phẩm khác cần thiết cho mục đích thương mại hoặc cần thiết cho người tiêu dùng, như các dung môi, chất pha loãng, dụng cụ lọc, kim tiêm và bơm tiêm.

Sáng chế còn đề cập đến kit có thể được sử dụng cho các mục đích khác nhau, ví dụ, để đánh giá khả năng tiêu diệt tế bào T mang các thụ thể TCR của họ TRBV9, để tinh chế hoặc kết tủa miễn dịch thụ thể TRBV9 từ các tế bào. Để phân lập và tinh chế, kit này có thể chứa kháng thể được liên kết với các hạt (ví dụ, các hạt sepharosa). Kit này chứa đồ chứa, nhãn dán và tờ hướng dẫn sử dụng.

Sử dụng để chẩn đoán

Các kháng thể của sáng chế cũng được sử dụng trong các mục đích chẩn đoán (ví dụ, *in vitro*, *ex vivo*). Ví dụ, kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định nồng độ của tế bào lymphô T chứa các thụ thể TCR của họ TRBV9 trong các mẫu thu được từ bệnh nhân (ví dụ, mẫu mô hoặc mẫu dịch cơ thể, như dịch tiết do viêm, máu, dịch ruột, nước bọt hoặc nước tiểu). Các phương pháp thích hợp để phát hiện và xác định bao gồm các thử nghiệm miễn dịch, như phương pháp đếm tế bào theo dòng, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), thử nghiệm phát quang hóa học, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, và thử nghiệm mô miễn dịch. Sáng chế còn bao gồm các kit, ví dụ, kit để chẩn đoán chứa kháng thể được mô tả ở đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra để có thể hiểu sáng chế rõ hơn. Các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Tất cả các tài liệu công bố, bằng độc quyền sáng chế, và đơn sáng chế đã viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp vào đây để tham khảo. Mặc dù sáng chế nêu trên đã được mô tả trong một số chi tiết để minh họa và ví dụ nhằm mục đích hiểu rõ ràng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng hiểu rõ sáng chế dựa vào phần bộc lộ của nó, và có thể tiến hành một số thay đổi và cải biến mà vẫn nằm trong phạm vi của các phương án kèm theo.

Phân thử nghiệm

Ví dụ 1. Sản xuất và tinh chế kháng thể

Các axit nucleic (SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18) mã hóa miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể thu được bằng cách khuếch đại các mảnh ADN bằng cách sử dụng các đoạn mồi chồng lên nhau và polymeraza Q5 có độ tin cậy cao (NEB, Mỹ). Các axit nucleic thu được được tinh chế trên cột từ Quagen (Đức) bằng cách sử dụng kit thuốc thử (# 28104) và được tách dòng hướng đích vào các vector pFuse có bán trên thị trường chứa vùng ổn định của gen chuỗi nặng

(IgG1) và gen chuỗi nhẹ (kappa) của người (Invivogen, Mỹ). Các trình tự của mảnh đã tách dòng được được khẳng định bằng cách giải trình tự sử dụng phương pháp Sanger.

Kết quả là thu được các plasmit chứa trình tự mã hóa của bốn biến thể chuỗi nặng của kháng thể:

HV kháng TRBV9-1, các trình tự nucleotit và axit amin của nó được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 20 và 21;

HV kháng TRBV9-2, các trình tự nucleotit và axit amin của nó được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 22 và 23;

HV kháng TRBV9-3, các trình tự nucleotit và axit amin của nó được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 24 và 25;

HV kháng TRBV9-3, các trình tự nucleotit và axit amin của nó được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 26 và 27;

và đối với một biến thể chuỗi nhẹ của kháng thể, LV kháng TRBV9, (SEQ ID NO:28 và 29).

Tính đồng nhất với của người của chuỗi nặng của kháng thể là 72%, và của chuỗi nhẹ là 69%.

Để thu được kháng thể, các plasmit được chuyển nhiễm vào dòng tế bào HEK293F dạng hỗn dịch. Thuốc thử 293fectine (Thermo Fisher scientific, USA # 1234701) được sử dụng để chuyển nhiễm. 30 triệu tế bào được cho vào mỗi 30ml môi trường FreeStyle, 30µg plasmit pFuse mã hóa một trong số các biến thể chuỗi nặng của kháng thể, và 30µg plasmit pFuse mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể và 60µl 293fectine (Thermo Fisher scientific, USA # 12347019) được cho thêm vào đó. Các plasmit chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch đã hòa tan trong nước được thử nghiệm về hàm lượng nội độc tố (Quagen, Mỹ).

Các hỗn hợp phản ứng tạo thành được ủ ở nhiệt độ 37°C trên máy rung trong một tuần. Sau một tuần, dịch nổi bề mặt tế bào được thu hoạch, dịch này được sử dụng để phân lập kháng thể. Sau đó, dịch nổi bề mặt được ly tâm ba lần với tốc độ 10000 vòng/phút trong 10 phút, và phân đoạn chất lỏng được tinh chế bằng cách sử dụng cột HiTrap PrG 1ml (Thermo Fisher scientific, Mỹ). Để rửa giải, dung dịch đệm glyxin 0,1M, độ pH = 2,5 được sử dụng, được cho vào HCl. Chất

lượng phân lập được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp PAGE 12% trong điều kiện làm biến tính. Việc định lượng được thực hiện bằng cách xác định trên vi phổ quang kế NanoDrop2000 ở mức 280A. Sản phẩm tạo thành được bảo quản ở nhiệt độ +4°C.

Bảng 1 thể hiện các đặc tính của protein được phân lập.

Bảng 1. Các đặc tính của kháng thể

Tên	Trọng lượng phân tử (theo lý thuyết), kDa	Điểm đẳng điện	Hệ số tắt	Độ tinh khiết của protein, %	Nồng độ protein, mg/ml	Hệ số hấp thụ ở bước sóng 400 nm, l = 1 cm
TRBV9-1	146,3	8,35	1,52	98,3	2,58	0,005
TRBV9-2	146,5	8,35	1,52	98,7	1,91	0,003
TRBV9-3	146,5	8,35	1,52	97,8	1,83	0,003
TRBV9-4	146,5	8,35	1,52	98,9	1,56	0,004

Ái lực của kháng thể kháng TRBV9 được xác định bằng cách sử dụng thiết bị OctetRed 96 (sản phẩm của công ty ForteBio). Các kháng thể (trong Bảng 1) được cố định không đặc hiệu trên bề mặt của bộ cảm biến thể hệ thứ hai có khả năng phản ứng với amin (sản phẩm của AR2G) theo quy trình tiêu chuẩn được mô tả trong hướng dẫn của nhà sản xuất liên quan đến việc chuẩn bị và cố định của bộ cảm biến AR2G. Phép phân tích được tiến hành ở nhiệt độ 30°C bằng cách sử dụng nước muối đệm phosphat (phosphate-buffered saline: PBS) chứa Tween-20 0,1% và BSA 0,1% làm dung dịch đệm làm việc. Ái lực gắn kết của kháng thể kháng TRBV9 được phân tích bằng cách sử dụng dung dịch đệm làm việc từ nồng độ 126nM đến 2nM với số gia bằng 2. Các đường cong mức độ gắn kết, sau khi trừ đi tín hiệu tham chiếu, được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu Octet (phiên bản 7.0) theo quy trình tiêu chuẩn và bằng cách sử dụng mô hình tương tác theo tỷ lệ 1:1. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 2.

Bảng 2. Đánh giá ái lực của kháng thể

	Kháng nguyên: TRBV9+TRAV26				Kháng nguyên: TRBV9+TRAV38			
	kD, M	kon, 1/Ms	kdis, 1/s	R2	kD, M	kon, 1/Ms	kdis, 1/s	R2
TRBV9 -1	2,20E- 10	5,15E+ 05	1,13E- 04	0,9915	4,14E- 10	4,41E+ 05	1,83E- 04	0,9815
	2,78E- 10	6,58E+ 05	1,83E- 04	0,99	3,65E- 10	5,62E+ 05	2,05E- 04	0,9776
	2,04E- 10	5,59E+ 05	1,14E- 04	0,9841	5,29E- 10	3,71E+ 05	1,96E- 04	0,9877
TRBV9 -2	1,35E- 11	4,47E+ 05	6,02E- 06	0,9905	<1,0E- 12	3,97E+ 05	<1,0E- 07	0,9772
	<1,0E- 12	3,81E+ 05	<1,0E- 07	0,9861	<1,0E- 12	2,89E+ 05	<1,0E- 07	0,9894
TRBV9 -3	3,19E- 10	2,87E+ 05	9,16E- 05	0,9991	3,11E- 10	3,09E+ 05	9,61E- 05	0,9942
	5,82E- 10	1,68E+ 05	9,80E- 05	0,9998	4,00E- 10	2,29E+ 05	9,16E- 05	0,9962
TRBV9 -4	<1,0E- 12	8,65E+ 05	<1,0E- 07	0,9381	<1,0E- 12	7,13E+ 05	<1,0E- 07	0,9058
	<1,0E- 12	5,79E+ 05	<1,0E- 07	0,9546	<1,0E- 12	4,76E+ 05	<1,0E- 07	0,9512

Không quan sát được sự tương tác với kháng thể khi sử dụng các kháng nguyên TRBV7+TRAV38. Các kháng thể TRBV9-2 và TRBV9-4 có đặc tính tốt nhất.

Ví dụ 2. Sử dụng các kháng thể đơn dòng kháng TRBV9 để đánh dấu tế bào lympho T biểu hiện chuỗi beta của TCR thuộc về họ TRBV9

Các kháng thể đơn dòng (kháng TRBV9-1, kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3, kháng TRBV9-4, được xác định tính chất trong trình tự vùng CDR3 của

chuỗi nặng) được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 1. Để quan sát được các kháng thể bằng mắt thường, chúng được đánh dấu florescein bằng cách sử dụng thuốc thử florescein isothiocyanat (Sigma, Mỹ) theo quy trình của nhà sản xuất. Lượng nhóm huỳnh quang được cho phản ứng với các phân tử kháng thể được kiểm soát bằng tỷ lệ phủ hấp thụ ở bước sóng 495/280 nm. Các kháng thể đã đánh dấu được sử dụng để phát hiện các tế bào lymphô T biểu hiện chuỗi beta của thụ thể TCR của họ TRBV9 trong phân đoạn đơn nhân của máu của người.

Máu ngoại vi của 5 người cho khỏe mạnh được sử dụng để thu được phân đoạn này. Máu được lấy vào ống Vacuette EDTA (mỗi ống 2x9 ml), phân đoạn đơn nhân được phân lập theo quy trình tiêu chuẩn được mô tả (trong tài liệu: Kovalchuk L. V. et al. Immunology: Workshop - 2010. - 176 p.). Sau khi phân lập, các tế bào được chuyển vào nước muối đệm phosphat (PBS) chứa albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin: BSA) 0,5% và EDTA 2mM. Tổng số tế bào và khả năng sống của chúng được xác định bằng phương pháp nhuộm bằng thuốc nhuộm xanh trypan như được mô tả bởi Lang N.R. (Stimulation of lymphocytes M.: Medicine, 1976.-288 p.).

Để đánh dấu các tế bào lymphô T, các kháng thể kháng TRBV9-1, kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3, kháng TRBV9-4 trong dung dịch đệm PBS được bổ sung albumin huyết thanh bò (BSA) 0,5% và EDTA 2Mm, để nồng độ cuối bằng 5 ng/ μ l và 0,5 ng/ μ l, cũng như kháng thể đơn dòng kháng CD3-eFluor405 ((dòng OKT3, eBioscience);) ở nồng độ được khuyến cáo của nhà sản xuất, được bổ sung trong mỗi thử nghiệm vào phần phân ước của phân đoạn đơn nhân, mỗi phân đoạn chứa 500.000 tế bào (trong mỗi thử nghiệm).

Các hỗn hợp phản ứng tạo thành có thể tích 50 μ l PBS được bổ sung BSA 0,5%, EDTA 2mM được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó, các tế bào được rửa bằng dung dịch đệm PBS được bổ sung BSA 0,5%, EDTA 2mM, và các kết quả nhuộm được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng (FACSARIA III, Mỹ, các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.4). Đã chứng minh được rằng tất cả các biến thể tạo thành của các kháng thể đơn dòng đều nhận biết đặc hiệu phân đoạn của các tế bào CD3⁺ dương tính. Tuy nhiên, biến thể TRBV9-2 có mức độ nhuộm màu bền nhất, chứa 2,9% phân đoạn dương tính với CD3, ở cả hai nồng độ

kháng thể bằng 5 ng/μl và 0,5 ng/μl. Trong khi các biến thể của kháng thể khác (kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3, kháng TRBV9-4) có mức độ nhuộm với tỷ lệ của các tế bào lymphô TRBV9+ khác nhau ở cùng nồng độ. Ngoài ra, tính đặc hiệu của kháng thể kháng TRBV9-2 được xác định theo sự không có mặt của các tế bào âm tính với CD3 không đặc hiệu được nhuộm ở mức yếu, các tế bào này có mặt khi sử dụng các biến thể khác, và theo mức độ tách đáng kể của quần thể tế bào đặc hiệu ra khỏi các tế bào lymphô dương tính với CD3 khác có kết quả âm tính đối với TRBV9.

Do đó, đã phát hiện được rằng biến thể thứ hai (kháng TRBV9-2) có mức độ nhuộm của các tế bào lymphô T TRBV9+ T đặc hiệu ở mức cao và có hiệu quả nhất. Kháng thể này có thể được sử dụng cho mục đích chẩn đoán để phát hiện các tế bào lymphô T TRBV9+ với nồng độ 0,6 ng/μl.

Để đánh giá tính đặc hiệu của các kháng thể kháng TRBV9-1, kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3, kháng TRBV9-4, các phân đoạn máu đơn nhân thu được như đã mô tả trên đây từ 5 mẫu máu ngoại vi được nhuộm bằng kháng thể kháng TRBV9-FITC và kháng thể kháng-CD3-eFluor450 (eBioscience, Mỹ) như được mô tả trên đây, bằng cách sử dụng tỷ lệ như sau:

5 μl (1μg) kháng thể kháng-CD3-eFluor 450 (eBioscience, Mỹ) và 30ng (0,5 ng/μl) kháng thể kháng TRBV9-2 FITC được cho thêm vào 3 triệu tế bào của phân đoạn máu đơn nhân. Các hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, các tế bào được rửa bằng dung dịch đệm PBS có bổ sung BSA 0,5% và được phân loại trên máy tuyển tế bào (FACSARIA III, Mỹ) để phân lập quần thể tế bào CD3+TRBV9+, cũng như các tế bào CD3+TRBV9-. Chất lượng tuyển tế bào được kiểm soát bằng cách tuyển lại quần thể CD3+TRBV9+, kết quả tuyển lại tế bào cho thấy mức độ làm giàu của quần thể tế bào đích là 95%.

Các phân đoạn tế bào thu được được cho vào chất đệm RLT (Quagen, Đức), ARN được phân lập từ đó bằng cách sử dụng kit thuốc thử là kit mini Quiagen RNAeasy #217004 (Quagen) theo quy trình của nhà sản xuất. cADN được tổng hợp trên khuôn ARN được phân lập, các mảnh của chuỗi beta của thụ thể T được khuếch đại theo quy trình được mô tả trong tài liệu của Britanova và các đồng tác giả (J Immunol, 2016, 196(12) 5005-5013) bằng cách sử dụng kit tổng hợp Mint

cADN (Eurogen, Nga). Các thể thích ứng Illumina (Mỹ) được gắn vào các đơn vị siêu sao chép được tạo ra, việc giải trình tự được thực hiện trên thiết bị MiSeq Illumina theo quy trình của nhà sản xuất máy giải trình tự. Số liệu giải trình tự được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm MiGEC, MiXCR và VDJtools có sẵn trên internet ở trang web <https://milaboratory.com>. Kết quả phân tích số liệu cho thấy rằng 90% trình tự từ phân đoạn CD3+TRBV9+ thuộc về họ gen miền biến đổi của chuỗi beta của TRBV9. Đồng thời, không phát hiện được các mảnh chứa trình tự miền biến đổi của TRBV9 trong phân đoạn CD3+TRBV9-. Do đó, các kháng thể kháng TRBV9-1, kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3, kháng TRBV9-4 gắn kết đặc hiệu với chuỗi beta của họ TRBV9.

Ví dụ 3. Hoạt tính chức năng của kháng thể

Các kháng thể đơn dòng (kháng TRBV9-1, kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3, kháng TRBV9-4, được xác định tính chất trong trình tự CDR3 của chuỗi nặng) thu được như được mô tả trong Ví dụ 1. Phân đoạn đơn nhân của máu của người thu được như được mô tả trong Ví dụ 2.

Ngoài ra, các tế bào giết tự nhiên được phân lập từ phần phân đoạn đơn nhân bằng cách sử dụng kit thuốc thử phân lập tế bào NK của người # 130-092-657 (Miltenyi biotec, Mỹ). Quy trình của nhà sản xuất được sử dụng. Chất lượng của quá trình phân lập tế bào NK được đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng (BD FACS ARIA III, Mỹ) bằng cách sử dụng kháng thể đã đánh dấu CD16-FITC, CD56-PE, CD3-VioBlue. Mức độ làm giàu với tế bào NK là từ 85 đến 95%.

Để đánh giá độc tính tế bào, các kháng thể (kháng TRBV9-1, kháng TRBV9-2, kháng TRBV9-3, hoặc kháng TRBV9-4) được cho vào phần phân ước của phân đoạn đơn nhân chứa 1×10^6 tế bào để nồng độ cuối bằng 5 $\mu\text{g/ml}$. Kháng thể Remicade với cùng nồng độ như kháng thể kháng TRBV9 được sử dụng làm đối chứng âm. Không cho thêm kháng thể vào phần phân ước của tế bào đối chứng (đối chứng dương). Ngoài ra, 10^5 tế bào NK được cho thêm vào tất cả các hỗn hợp phản ứng. Thể tích cuối của hỗn hợp phản ứng là 100 μl .

Các hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ, sau đó các tế bào được rửa vài lần để loại bỏ kháng thể và được phân bố vào các lỗ của đĩa

đáy tròn có 96 lỗ, trên bàn.

Sau 6 ngày, các tế bào được thu hoạch từ các lỗ và được sử dụng để phân tích kiểu hình miễn dịch bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Các kháng thể sau đây được sử dụng để phát hiện các tế bào lymphô T: kháng thể kháng CD3-eFluor450 (dòng OKT3, eBioscience); kháng thể kháng CD8-PC7 (dòng SFCI21Thy2D3, Beckman Coulter, Mỹ); các kháng thể tạo thành là kháng thể kháng TRBV9-1, 2, 3, 4 được đánh dấu bằng Fitc. Sau khi nhuộm, các tế bào được rửa và phân tích trên thiết bị BD FACSARIA III. Không phát hiện thấy tế bào lymphô T CD3+TRBV9+ trong các mẫu được ủ với kháng thể kháng TRBV9 của sáng chế. Trái lại, vẫn phát hiện được các tế bào lymphô T dương tính kép với CD3+TRBV9+ trong mẫu đối chứng khi không có mặt kháng thể kháng TRBV9 ("đối chứng trống"), cũng như với kháng thể điều trị Remicade, điều này khẳng định sự loại bỏ đặc hiệu các tế bào T TRBV9+ sau khi cho thêm kháng thể kháng TRBV9. Fig.5 thể hiện kết quả điển hình của phương pháp đếm tế bào theo dòng. Trong mẫu đối chứng âm khác, trong đó kháng thể kháng-CD6 không có độc tính tế bào được sử dụng thay cho kháng thể kháng TRBV9 của sáng chế, không quan sát thấy sự thay đổi về quần thể CD3+CD6+ đích so với "đối chứng trống". Điều này cho thấy rằng không quan sát được sự sàng lọc epitop bằng kháng thể không được đánh dấu vào ngày thứ 6, và khẳng định khả năng loại bỏ các tế bào mang thụ thể TCR của họ TRBV9 của các kháng thể kháng TRBV9.

Ví dụ 4. Thiết kế dòng tế bào ổn định

Thu được dòng tế bào ổn định tạo ra kháng thể đơn dòng kháng TRBV9-2 bằng cách chuyển nhiễm dòng tế bào CHO-S dạng hỗn dịch với các cấu trúc vector gồm tỷ lệ tối ưu của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể. Các dòng vô tính duy trì ở nồng độ cao (cao hơn 100 mg/l) thu được bằng cách sử dụng thiết bị dạng robot ClonePix (Molecular Devices). Sản lượng của các dòng đã chọn được phân tích bằng hệ thống tự động dạng robot Biomek FX (Beckman Coulter), và hệ thống phân tích Octet RED96 (Pall Life Sciences). Sinh vật sản xuất được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường không chứa huyết thanh và cũng không chứa protein có nguồn gốc từ động vật. Sản phẩm BCD085 để nghiên cứu tiền lâm sàng được tạo ra

trong 200 lít chất lên men trong bình phản ứng sinh học sử dụng một lần HyClone (Thermoscientific).

Ví dụ 5. Tạo ra dược phẩm chứa kháng thể của sáng chế

Các thành phần của dược phẩm được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Nồng độ của các thành phần của dược phẩm

Thành phần	Nồng độ
Kháng thể kháng TRBV9-2	10-50 mg/ml
Dung dịch đệm xitrat 10mM để điều chỉnh độ pH	6,0-7,0
Natri clorua	50-150 mM
Sucroza, trehaloza	0,3-0,5%
Nước dùng để tiêm	tối đa 1ml

Ví dụ 6. Kit chứa dược phẩm với kháng thể

Để tạo ra kit với dạng liều dùng chứa hỗn hợp kháng thể kháng TRBV9-2, dược phẩm được tạo ra theo Ví dụ 5 được bịt kín trong ống tiêm hoặc bơm tiêm 1ml trong điều kiện vô khuẩn, được gắn nhãn và đóng gói vào đồ chứa bằng chất dẻo hoặc bìa các tông.

Ngoài ra, tờ hướng dẫn sử dụng được đưa vào đồ chứa ống tiêm.

Ví dụ 7. Biến thể của các kháng thể theo sáng chế

Các trình tự của thể đột biến HV kháng TRBV9-1 thu được bằng phương pháp gây đột biến định hướng vị trí bằng cách sử dụng "sự mở rộng gối nhau" của các sản phẩm PCR như được mô tả bởi Wurch và các đồng tác giả, *Methods in Molecular Biology*. 12 (9), 653 – 657 (2004). Polymeraza Q5 có độ tin cậy cao (NEB, Mỹ) được sử dụng cho phản ứng PCR, theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi khuếch đại, các mảnh thu được được tinh chế bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 1% và chiết thêm. Các mảnh ADN được phân lập trên gel chứa các đột biến được kết hợp vào cấu trúc hoàn chỉnh bằng phản ứng PCR mở rộng gối nhau (làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 12 giây; ghép ở nhiệt độ 55°C trong 2 phút; mở rộng ở nhiệt độ 72°C trong 1 phút, 8 chu trình PCR). Phương pháp này

giả định rằng các mảnh có mặt trong hỗn hợp phản ứng, có các vùng hỗ trợ với nhau được sử dụng làm khuôn và đoạn mồi. Toàn bộ cấu trúc được khuếch đại bằng phản ứng PCR tiêu chuẩn có bổ sung các đoạn mồi hỗ trợ vào các đầu của mảnh được khuếch đại. Các axit nucleic thu được được tinh chế trên cột Quagen (Đức) bằng cách sử dụng kit thuốc thử (# 28104) và được tách dòng vào vector pFuse như được mô tả trong Ví dụ 1. Các trình tự ADN của thể đột biến được kiểm tra bằng cách giải trình tự theo phương pháp Sanger. Các trình tự nucleotit và axit amin của miền biến đổi tạo thành được thể hiện như sau: biến thể 1 – trong trình tự SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO: 31; biến thể 2 – trong trình tự SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33. Khả năng gắn kết với các tế bào lymphô T biểu hiện chuỗi beta của thụ thể TCR thuộc về họ TRBV9 của các kháng thể thể đột biến được xác nhận như được mô tả trong Ví dụ 2. Đã chứng minh được rằng sự thay thế được đưa vào không làm ảnh hưởng đến tính đặc hiệu gắn kết.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta của họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người, bao gồm:

1) miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của HCDR 1-3, trong đó

HCDR 1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1,

HCDR 2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2,

HCDR 3 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6;

2) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của LCDR 1-3, trong đó

LCDR 1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7,

LCDR 2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8,

LCDR 3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

2. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19.

3. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19.

4. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

5. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11.

6. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm:

1) chuỗi nặng có trình tự axit amin có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ nhóm các trình tự SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27;

2) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29.

7. Kháng thể đơn dòng theo điểm 6, bao gồm:

1) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27;

2) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29.

8. Kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG có chiều dài đầy đủ.

9. Kháng thể đơn dòng theo điểm 8, trong đó kháng thể này liên quan đến isotyp của người được chọn từ nhóm gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

10. Axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta của họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người.

11. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 10.

12. Phương pháp tạo ra tế bào chủ để thu được kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, bao gồm bước biến nạp tế bào này với vector theo điểm 11, chứa axit nucleic theo điểm 10.

13. Tế bào chủ để thu được kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của

nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, chứa axit nucleic theo điểm 10.

14. Phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 13 trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện để đảm bảo sự tạo ra kháng thể nêu trên, sau đó phân lập và tinh chế kháng thể thu được.

15. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng.

16. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 và ít nhất một hợp chất có hoạt tính điều trị khác.

17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó hợp chất có hoạt tính điều trị khác được chọn từ hợp chất phân tử nhỏ, kháng thể hoặc các hormon steroid.

1/5

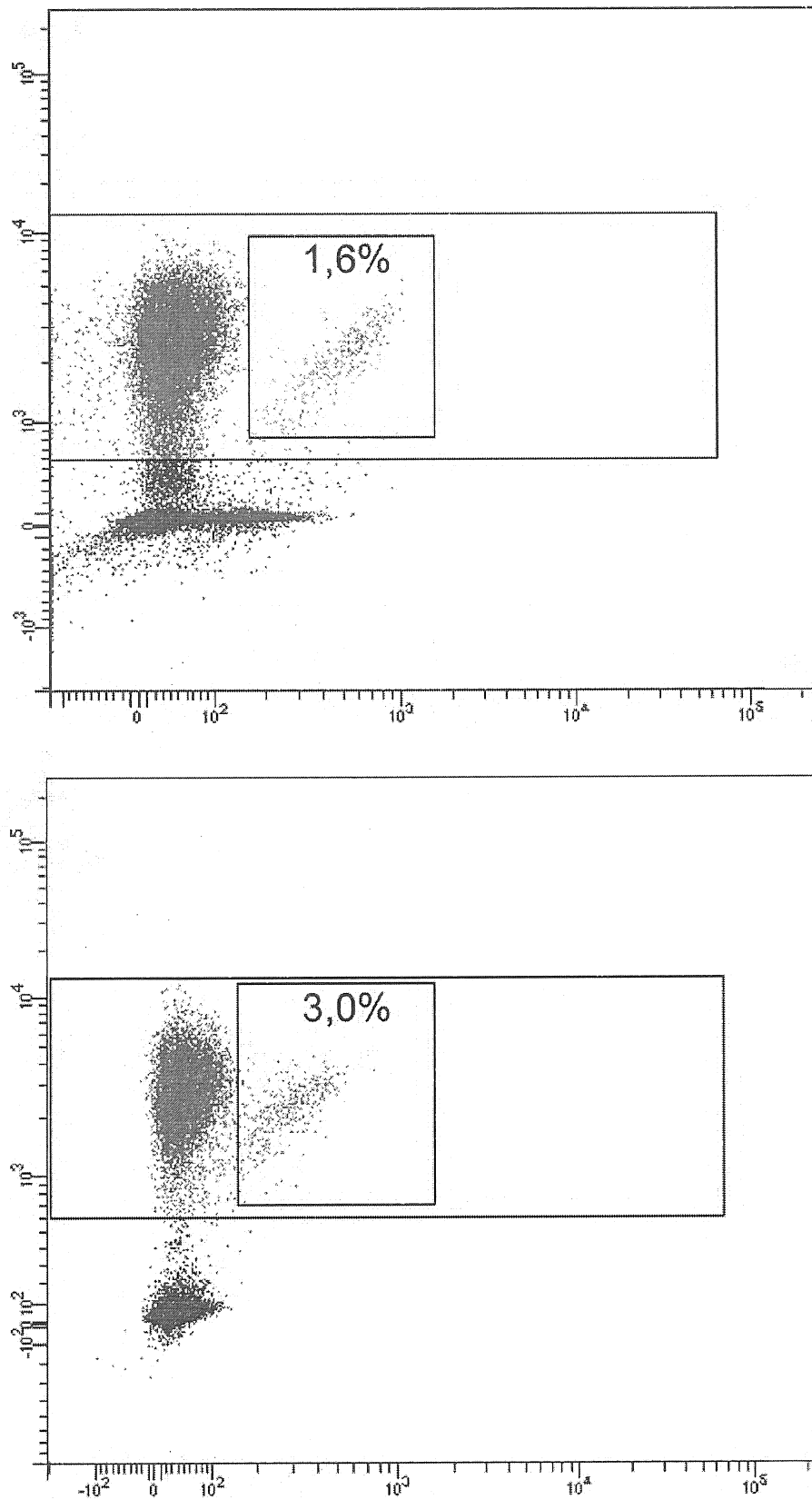


Fig. 1

2/5

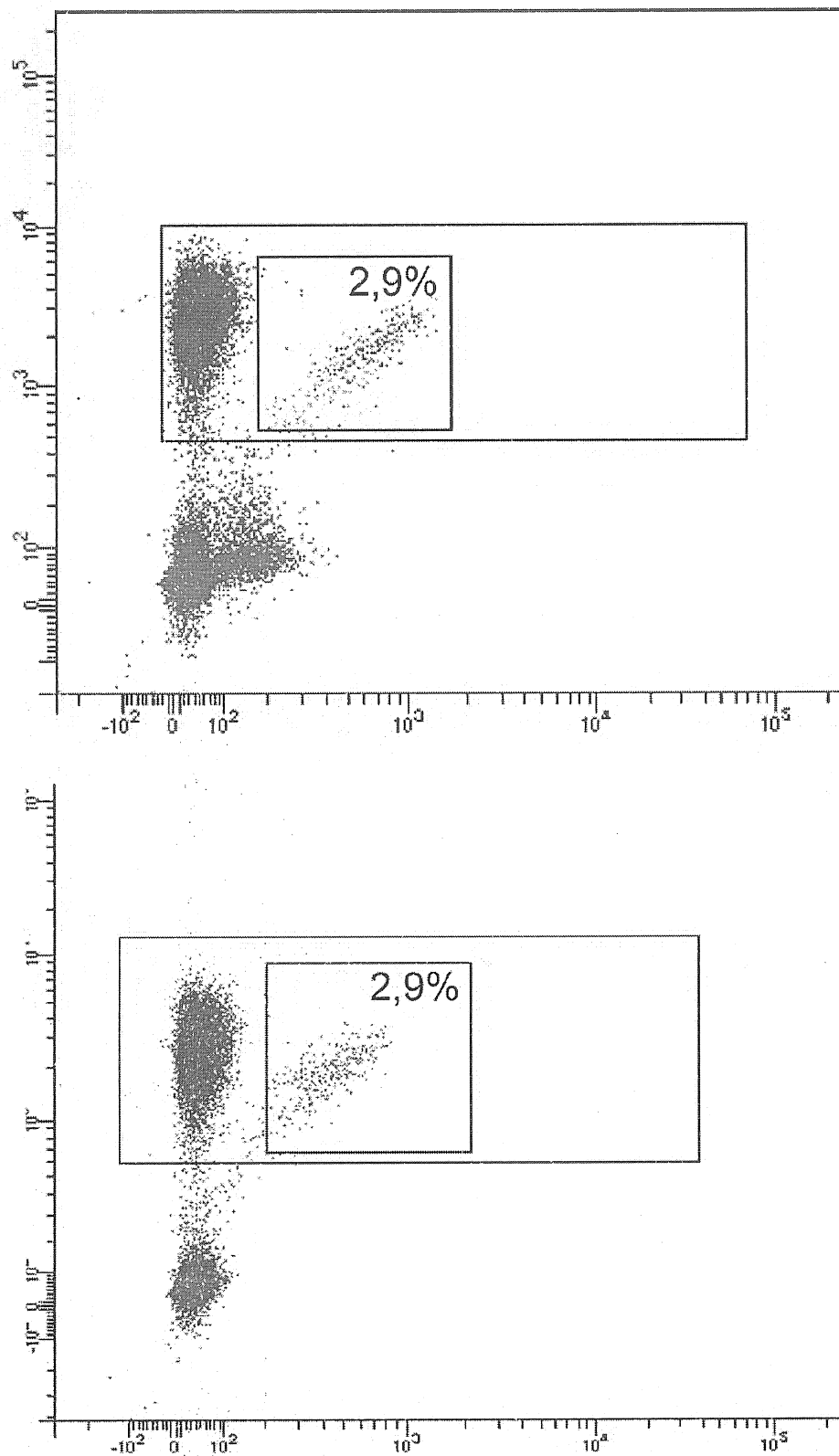


Fig. 2

3/5

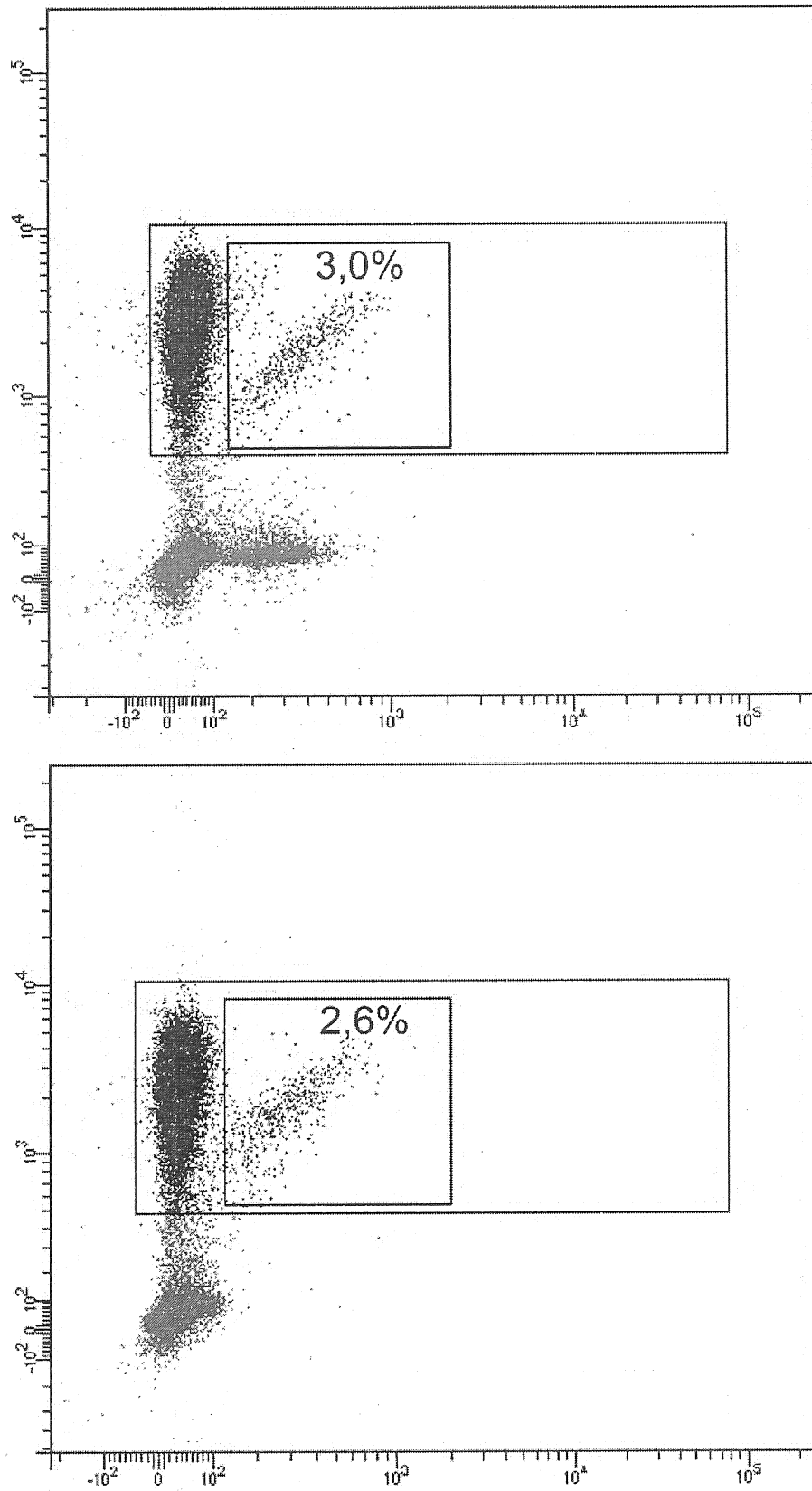


Fig. 3

4/5

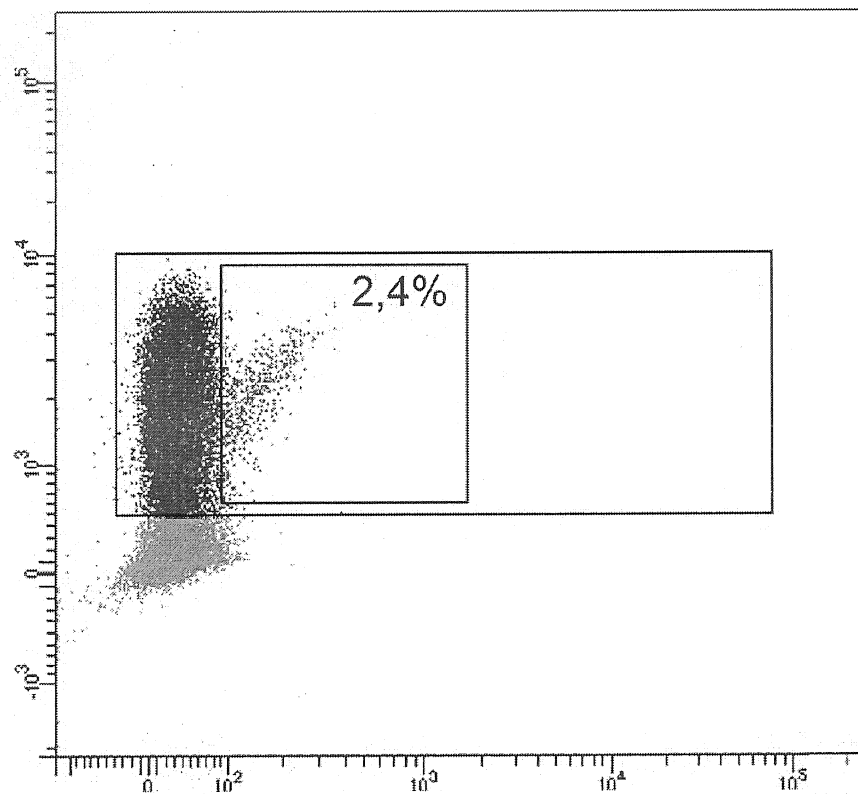
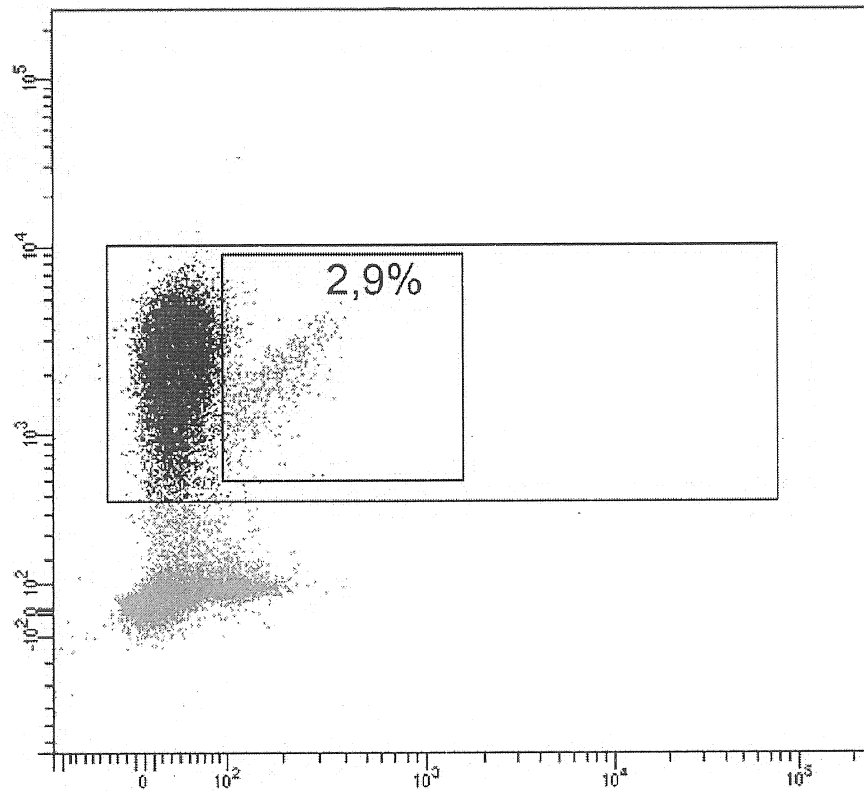
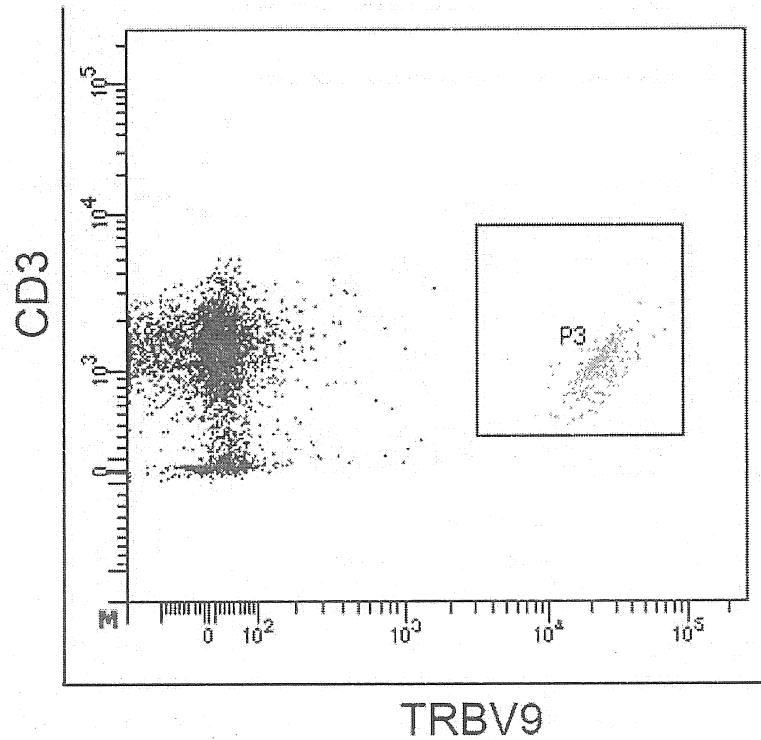


Fig. 4

5/5

REMICADE



Kháng TRBV9-2

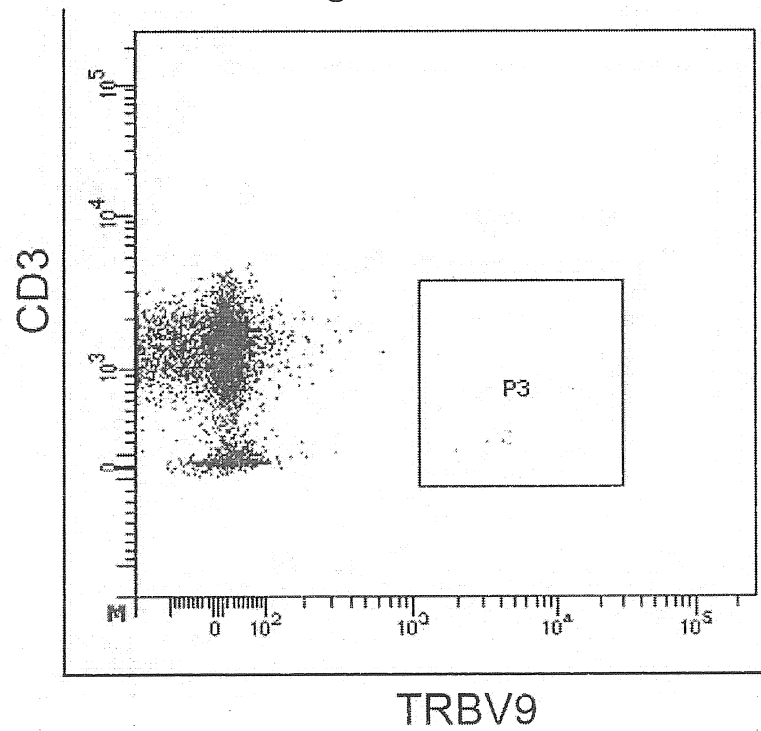


Fig. 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> JSC "BIOCAD"
- <120> Kháng thể đơn dòng, phương pháp tạo ra kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này
- <130> TCRB9.docx
- <160> 33
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Nhân tạo
- <220>
- <223> Trình tự axit amin HCDR1 (theo cách đánh số Kabat)
- <400> 1
- Asp Tyr Leu Val His
1 5
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Nhân tạo
- <220>
- <223> Trình tự axit amin HCDR2 (theo cách đánh số Kabat)
- <400> 2
- Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu
1 5 10 15
- Gly
- <210> 3
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Nhân tạo
- <220>
- <223> Trình tự axit amin HCDR3 (theo cách đánh số Kabat)
- <400> 3

Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin HCDR3 (theo cách đánh số Kabat)

<400> 4

Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin HCDR3 (theo cách đánh số Kabat)

<400> 5

Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin HCDR3 (theo cách đánh số Kabat)

<400> 6

Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin LCDR1 (theo cách đánh số Kabat)

<400> 7

Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin LCDR2 (theo cách đánh số Kabat)

<400> 8

Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin LCDR3 (theo cách đánh số Kabat)

<400> 9

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 10

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể

<400> 10

gacgtgcaga tgaccagtc cccctacaac ctggccgcct cccccggcga gtccgtgtcc 60

atcaactgca aggctccaa gtccatcaac aagtacctgg cctggtacca gcagaagccc 120

ggcaagccca acaagctgct gatctacgac ggctccaccc tgcagtcgg catcccctcc 180

aggttctccg gtcctggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagggg cctggagccc 240

gaggacttcg gcctgtacta ctgccagcag cacaacgagt accccccac cttcggcgcc 300

ggcaccaagc tggagctgaa g

321

<210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể

<400> 11

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Tyr Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 12

cagatccagc tgggtgcagtc cggccccgag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120

```

cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac      180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac      240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg      300
aggagggggcc tgaggggcct gggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg      360
tcctcc                                          366

```

<210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 13

```

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu
1              5              10              15

```

```

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
          20              25              30

```

```

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

```

```

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50              55              60

```

```

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65              70              75              80

```

```

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

```

```

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Trp
          100              105              110

```

```

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser
          115              120

```

<210> 14
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 14
 cagatccagc tggcgcagtc cggcccgag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
 cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacacctac 180
 gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac 240
 ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
 agggaggggcc tgaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg 360
 tcctcc 366

<210> 15
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 15
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 366
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 16
cagatccagc tggatgcagtc cggcccccag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg 60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tcctggagg cctccgcctc caccgccaac 240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
aggaggggca tcaggggcct gggcttcgac tactggggcc agggcggtgtt cgtgaccgtg 360
tcctcc 366

<210> 17
<211> 122
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 17

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 18
 cagatccagc tgggtgcagtc cggccccgag ctgagggagc cgggcgagtc cgtgaagctg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
 cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
 gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac 240
 ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
 aggaggggca tcaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg 360
 tcctcc 366

<210> 19
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 19

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

<211> 1365

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-1

<400> 20

cagatccagc tgggtgcagtc cggccccgag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120

cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180

gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac 240


```

ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg      300
aggagggggcc tgagggggcct gggcttcgac tactggggcc agggcgtggt cgtgaccgtg      360
tcctccgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc      420
tctggggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg      480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgtcctacag      540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc      600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt      660
gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc      720
ctgggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc      780
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag      840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag      900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg      960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa     1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc      1080
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc      1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg      1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag      1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac      1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaata gataa                      1365

```

<210> 21
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-1

<400> 21

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20	25	30
Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
50	55	60
Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn		
65	70	75
Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
225	230	235
		240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 22
 <211> 1365
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-2

<400> 22

cagatccagc tggatgcagtc cggcccccag ctgaggagc cggcgagtc cgtgaagctg	60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc	120
cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac	180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac	240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg	300
aggagggggc tgaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcggtgt cgtgaccgtg	360
tcctccgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc	420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgtcctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt	660
gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc	720
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc caaaaacca aggacaccct catgatctcc	780
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag	840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg	960
aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	1080
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc	1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	1200
cctcccgctg tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	1260

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1320

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gataa 1365

<210> 23

<211> 452

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-2

<400> 23

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370

375

380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 24
 <211> 1365
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-3

<400> 24
 cagatccagc tgggtgcagtc cggcccccag ctgagggagc cgggcgagtc cgtgaagctg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
 cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
 gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac 240
 ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
 aggaggggca tcaggggcct gggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg 360
 tcctccgcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 420
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660

```

gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720
ctgggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaata gataa 1365

```

<210> 25
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-3

<400> 25

```

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu
1           5           10          15

```

```

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
          20          25          30

```

```

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

```

```

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
          50          55          60

```

```

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65          70          75          80

```


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

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 26
 <211> 1365
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-4

<400> 26
 cagatccagc tgggtgcagtc cggccccgag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg 60

```

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
cccggaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac 240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
aggaggggca tcaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg 360
tcctccgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca cttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660
gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc 720
ctggggggac cgtcagtctt cctcttccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc 780
cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcacg tcctgcacca ggactggctg 960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gataa 1365

```

<210> 27
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể kháng TRBV9-4
 <400> 27

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210		215		220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu				
225		230		235
				240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu				
		245		250
				255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser				
		260		265
				270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu				
		275		280
				285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr				
		290		295
				300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn				
305		310		315
				320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro				
		325		330
				335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln				
		340		345
				350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val				
		355		360
				365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val				
		370		375
				380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro				
385		390		395
				400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr				
		405		410
				415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val				
		420		425
				430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 28
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng TRBV9-9

<400> 28
 gacgtgcaga tgaccagtc cccctacaac ctggccgcct cccccggcga gtcctgtgtcc 60
 atcaactgca aggcctccaa gtccatcaac aagtacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
 ggcaagccca acaagctgct gatctacgac ggctccaccc tgcaagtccgg catccccctcc 180
 aggtttctccg gctccggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagggg cctggagccc 240
 gaggacttcg gcctgtacta ctgccagcag cacaacgagt accccccac cttcggcgcc 300
 ggaccaagc tggagctgaa gcgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtcgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgtcctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagag 639

<210> 29
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng TRBV9

<400> 29

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Tyr Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Gly Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 30

<211> 333
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của biến thể của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 30
 cagatccagt tgggtgcagtc cggcccccag ctgaaggagc ccggcgagtc cgtgaagatc 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
 cccggcaagg gcatcaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
 gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccatcgagg cctccgcctc caccgccaac 240
 ctgcagatct ccaacatcaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
 aggagggggc tgaggggcct gggcttcgac tac 333

<210> 31
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của biến thể của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 31

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Glu Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Ile Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Ile Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr
 100 105 110

<210> 32
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của biến thể của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 32
 cagatccagt tgggtgcagtc cggcccccag ataaaggagc ccggcgagtc cgtgaagatc 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
 cccggcaagg gcatcaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
 gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccatcgagg cctccgcctc caccgccaac 240
 ctgcagatct ccaacatcaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
 aggagggggc tgaggggcct gggcttcgac tac 333

<210> 33
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của biến thể của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

<400> 33

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Ile Lys Glu Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Ile Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Ile Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr
100 105 110