



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

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

(11)



1-0041254

(51)⁷ A61K 39/00; A61P 35/00; C07K 16/28; (13) B
A61P 11/00

(21) 1-2016-01090

(22) 26/08/2014

(86) PCT/EP2014/068050 26/08/2014

(87) WO 2015/028455 A1 05/03/2015

(30) 1315487.7 30/08/2013 GB

(45) 25/09/2024 438

(43) 27/06/2016 339A

(73) UCB Biopharma SRL (BE)

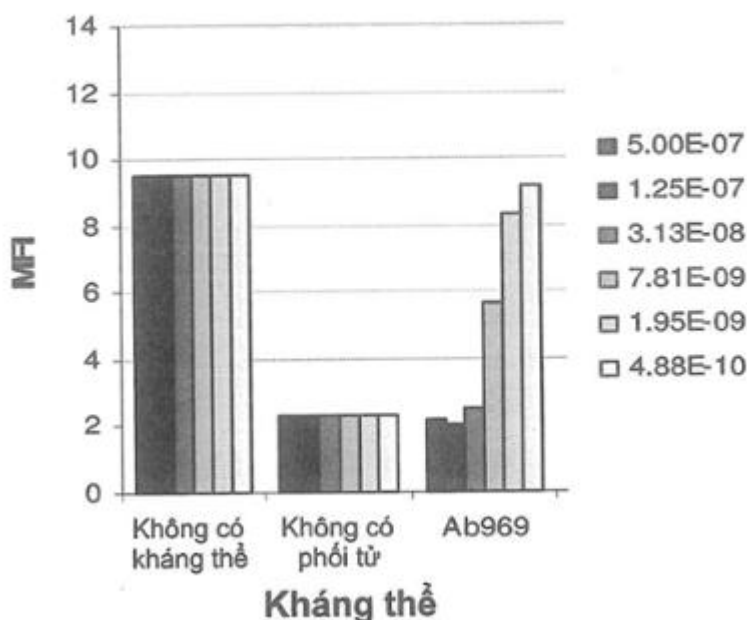
60 Allée de la Recherche, B-1070 Brussels, Belgium

(72) CRAGGS, Graham (GB); HERVÉ, Karine Jeannine Madeleine (FR); MARSHALL, Diane (GB).

(74) Công ty TNHH Dịch vụ Sở hữu trí tuệ KENFOX (KENFOX IP SERVICE CO.,LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CSF-1R, TRÌNH TỰ ADN PHÂN LẬP, VECTƠ TÁCH DÒNG HOẶC VECTƠ BIỂU HIỆN, TẾ BÀO CHỦ BAO GỒM VECTƠ NÀY, QUY TRÌNH TẠO RA KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R và các mảnh liên kết của kháng thể này, trình tự ADN mã hóa kháng thể này, tế bào chủ có trình tự ADN này và phương pháp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh liên kết trong tế bào chủ. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của kháng thể nêu trên.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R và các mảnh liên kết của kháng thể này, trình tự ADN mã hóa kháng thể này, tế bào chủ có trình tự ADN này và phương pháp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh liên kết trong tế bào chủ. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết của kháng thể này và việc sử dụng kháng thể, mảnh liên kết và các chế phẩm bao gồm chế phẩm chứa chúng dùng để điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Yếu tố kích thích tạo dòng 1 (Colony Stimulating Factor 1 - CSF-1), cũng được biết đến là yếu tố kích thích tạo dòng đại thực bào (Macrophage Colony Stimulating Factor - M-CSF) là một xytokin được tạo ra bởi nhiều tế bào khác nhau, bao gồm đại thực bào, các tế bào nội mô và nguyên bào xơ. CSF-1 gồm hai polypeptit “monome”, tạo thành protein CSF-1 đối xứng hai bên có hoạt tính sinh học. CSF-1 tồn tại trong ít nhất ba dạng trưởng thành do cắt nối có chọn lọc RNA (tham khảo, Cerretti và cộng sự, 1988, Molecular Immunology, 25:761). Ba dạng của CSF-1 được dịch mã từ các tiền chất mRNA khác nhau, mã hóa các monome polypeptit từ 256 đến 554 axit amin, có trình tự tín hiệu axit amin 32 ở các đầu amin và một vùng xuyên màng giả định của xấp xỉ 23 axit amin gần đầu cacboxyl. Các peptit tiền chất được điều trị sau đó bởi đầu amin và đầu cacboxyl của các phân tách protein phân giải để giải phóng CSF-1 trưởng thành. Gốc từ 1-149 của tất cả ba dạng trưởng thành của CSF-1 đều tương đồng nhau và được cho là có chứa trình tự cần thiết cho hoạt tính sinh học của CSF-1. Các monome CSF-1 in vivo được đường hóa và nhị trùng hóa thông qua liên kết disulfit. CSF-1 thuộc nhóm chất chủ vận sinh học để thúc đẩy sản xuất các tế bào

máu. Đặc biệt, chất này hoạt động như là một chất hoạt hóa tăng trưởng và biệt hóa cho các tế bào gốc tủy xương của dòng thực bào đơn nhân. Ngoài ra, CSF-1 kích thích khả năng sống sót, sự tăng sinh và chức năng của đại thực bào thông qua một thụ thể đặc hiệu trên các tế bào hồi đáp.

Thụ thể CSF-1(CSF-1R) cũng được gọi là sản phẩm gen c-fms hoặc CD115. CSF-1R là một glycoprotein TM típ 1 165kDa thuộc họ tyrosin kinaza thụ thể típ III. Ngoài CSF-1, đồng dạng cấu trúc nhưng trình tự phân tử không liên quan IL-34 cũng được biết đến là một phối tử cho CSF-1R (Lin, và cộng sự, 2008, Science 320:807-811). Biểu hiện của CSF-1R bị giới hạn trong các tế bào của dòng tế bào đại thực bào-bạch cầu đơn nhân, cả tập hợp các mô lưu thông và tập hợp các mô nội trú, và tế bào hủy xương. Ngoài ra, còn được biểu hiện trong một số các tế bào thuộc hệ sinh sản ở đồng nhất cái bao gồm noãn bào, tế bào màng rụng và nguyên bào nuôi phôi.

Sự liên kết của phối tử CSF-1 đến thụ thể CSF-1 dẫn đến quá trình phosphoryl hóa của thụ thể trên một hoặc nhiều gốc tyrosin, thông qua hoạt động của vùng kinaza tyrosin. Quá trình phosphoryl hóa này có thể được tìm thấy do kháng thể có sẵn bám vào thụ thể chỉ sau quá trình phosphoryl hóa (Ví dụ như kháng thể thụ thể Phospho-M-CSF (Tyr546) #3083 từ công nghệ phát tín hiệu tế bào).

Sự biểu hiện của CSF-1 và CSF-1R tương quan với sự phát triển của khối u và sự chuẩn đoán yếu kém đối với nhiều loại bệnh ung thư. Đại thực bào liên quan đến khối u (Tumour-Associated Macrophage - TAM) có thể là một chế phẩm chính của u mô đệm và mức độ cao của CSF-1 và CSF-1R liên quan đến sự thâm nhiễm TAM cao và sự chuẩn đoán yếu kém đối với một số loại u.

Kháng thể có CSF-1R đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sherr, C.J. và cộng sự, 1989, Blood 73:1786-1793 đề cập đến kháng thể chống lại CSF-1R ức chế hoạt tính của CSF-1 (Sherr, C.J. và cộng sự, 1989, Blood 73:1786-1793). WO2009/026303 đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R bám vào CSF-1R ở người và in vivo mẫu u ở chuột bằng cách sử dụng kháng thể kháng chuột CSF-1R. WO2011/123381 đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R tiếp nhận CSF-1R và có hoạt

tính ADCC. WO2011/123381 cũng đề cập đến in vivo mẫu u ở chuột bằng cách sử dụng kháng thể kháng chuột CSF-1R. WO2011/140249 đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R chặn liên kết của CSF-1 đến CSF-1R và được cho rằng hữu ích trong điều trị ung thư. WO2009/112245 đề cập đến kháng thể IgG1 kháng CSF-1R ức chế CSF-1 liên kết với CSF-1R và được cho rằng hữu ích trong điều trị ung thư, viêm đường ruột và viêm khớp dạng thấp. WO2011/131407 đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R ức chế CSF-1 liên kết với CSF-1R và được cho rằng hữu ích trong điều trị loãng xương và ung thư. WO2011/107553 đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R ức chế CSF-1 liên kết với CSF-1R được cho là hữu ích trong điều trị loãng xương và ung thư. WO2011/070024 đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R bám vào mảnh kháng thể delD4 của CSF-1R ở người.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này, xuất hiện nhu cầu cung cấp các kháng thể mới chống CSF-1R thích hợp cho các ứng dụng trị liệu. Trong khi ứng dụng trị liệu của kháng thể kháng CSF-1R trong điều trị ung thư được mô tả trước đây, vẫn có nhu cầu cung cấp các ứng dụng trị liệu mới cho các kháng thể này.

Thuật ngữ “bệnh xơ hóa” đề cập đến một phản ứng để làm lành vết thương khác thường trong đó sợi mô liên kết thừa được tạo ra trong nội tạng hoặc mô. Sự tích tụ và trầm lắng của các chế phẩm ma trận ngoại bào dư thừa, chẳng hạn như collagen và fibronectin, dẫn đến mô bị xơ hóa và sẹo hóa để cuối cùng dẫn đến chứng suy đa cơ quan.

Ví dụ về bệnh xơ hóa bao gồm chứng xơ hóa phổi, chẳng hạn như xơ hóa phổi tự phát và xơ nang, xơ thận, xơ gan, chai gan, viêm xơ đường mật, xơ gan mật nguyên phát, xơ hóa vách ngăn tim, xơ hóa trung thất, xơ tủy nguyên phát, xơ hóa sau phúc mạc, xơ khối tiến triển, xơ hóa toàn thân do thận, bệnh Crohn, sẹo lồi, nhồi máu cơ tim, xơ cứng bì toàn thân, xơ cứng bì và xơ khớp.

Vết thương dẫn đến việc đông máu ngay lập tức và phản ứng đông máu với sự tăng trưởng của chất nền ngoại bào (Extracellular Matrix - ECM) tạm thời. Sự kết tụ và kích hoạt tiêu cầu giúp thúc đẩy phản ứng viêm được đặc trưng bởi sự giãn mạch

máu và tăng độ tinh thẩm mạch máu cho phép sự tăng lực của các tế bào miễn dịch khác nhau bao gồm neutrophil, đại thực bào, eosinophil và các tế bào lympho. Neutrophil và đại thực bào cắt bỏ mô hoại tử của vết thương làm giảm nguy cơ nhiễm trùng và cùng với việc kích hoạt các tế bào lympho tiết ra một loạt các yếu tố hoạt hóa tăng trưởng và xytokin được sử dụng để khuếch đại hơn nữa phản ứng viêm. Các phân tử chẳng hạn như TGF β , PDGF, IL-13 hoạt hóa đại thực bào và tạo ra sự tăng lực, sự tăng sinh và hoạt hóa của nguyên bào xơ ở vết thương. Kích hoạt nguyên bào xơ hoặc nguyên bào xơ cơ, được đặc trưng bởi biểu hiện của actin cơ trơn α và tiết ra collagen và các chế phẩm ECM khác. Kích hoạt nguyên bào xơ, co rút collagen lưới, kéo căng cạnh của vết thương đến phần trung tâm. Biểu mô và các tế bào nội mô tăng lên và di chuyển qua ma trận tạm thời để tái tạo các mô bị tổn thương hoàn thành việc chữa trị vết thương.

Chấn thương hoặc thương tổn mô hoặc rối loạn theo quá trình chữa trị dẫn đến phản ứng không phù hợp của vết thương. Sự kết tủa quá mức và siêu liên kết ngang của collagen và ECM diễn ra dẫn đến chất cấu tạo thừa và làm xơ cứng mô sẹo ở vị trí cấu trúc tế bào mô thông thường.

Nguyên nhân của bệnh xơ hóa có thể phụ thuộc vào cơ quan nội tạng hoặc mô có liên quan đến và chưa được biết đến trong một số bệnh chẳng hạn như xơ hóa phổi tự phát (Idiopathic Pulmonary Fibrosis - IPF). Xơ gan và chai gan giai đoạn đầu là kết quả từ quá trình tổn thương gan mãn tính kéo dài qua tiếp xúc với một loạt các yếu tố bao gồm yếu tố về môi trường và yếu tố ăn uống hoặc các tác nhân lây nhiễm. Nhiễm viêm gan B và viêm gan C dài hạn có thể dẫn đến xơ gan. Việc sử dụng quá nhiều đồ uống có cồn hoặc chế độ ăn có hàm lượng chất béo/đường cao duy trì liên tục trong một thời gian dài cũng có thể dẫn đến bệnh xơ gan. Tương tự như vậy, bệnh tiểu đường có thể gây tổn thương và tạo sẹo ở thận dẫn đến mất chức năng.

IPF là một trong bảy bệnh phổi mô kẽ mà nguyên nhân chưa được biết đến. Các yếu tố về môi trường chẳng hạn như tiếp xúc với bức xạ hoặc các hạt bức xạ có thể đóng vai trò là nguyên nhân. Những người hút thuốc lá cũng có thể có nguy cơ bị

mắc bệnh cao. Một khi đã được chuẩn đoán là mắc bệnh, thì tuổi thọ của bệnh nhân là rất ngắn với tỷ lệ sống sót trung bình là khoảng 2-5 năm.

Việc điều trị bệnh xơ hóa thường bao gồm thuốc kháng viêm và thuốc ức chế miễn dịch nhưng những loại thuốc này cũng chỉ đem lại một số tác dụng nhỏ cho bệnh nhân. Phương pháp điều trị thiếu hiệu quả góp phần cho việc xem xét lại IPF và bệnh xơ hóa nói chung, như là một phản ứng bất thường để làm lành vết thương và không phải là trạng thái dễ bị viêm. Pirfenidon là một phân tử thuốc nhỏ đã được chấp nhận sử dụng để điều trị IPF ở Nhật Bản năm 2008 và ở Châu Âu năm 2011, có khả năng điều trị thông qua nhiều cơ chế hoạt động. Cho đến nay, các phương pháp điều trị không trúng đích và liệu pháp điều trị không bằng kháng thể được chấp nhận để cho các chỉ định về xơ hóa.

Do vậy, hiện nay có nhu cầu về y tế chưa được đáp ứng đối với việc cải thiện khả năng điều trị bệnh xơ hóa. Ví dụ như, đối với IPF, tỷ lệ sống sót 3 năm là 50% và tỷ lệ sống 5 năm chỉ là 20% và cần cấy ghép trong khoảng 20% các trường hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này bao gồm một chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm ít nhất một CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:4 cho CDR-H1, CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:5 cho CDR-H2 và CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:6 cho CDR-H3, ví dụ như trong đó CDR-H1 là SEQ ID Số: 4, CDR-H2 là SEQ ID Số: 5 và CDR-H3 là SEQ ID Số: 6.

Theo một khía cạnh, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể liên kết theo sáng chế bao gồm một chuỗi nhẹ trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:1 cho CDR-L1, CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:2 cho CDR-L2 và CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:3 cho CDR-L3, ví dụ như trong đó CDR-L1 là SEQ ID Số: 1, CDR-L2 là SEQ ID Số: 2 và CDR-L3 là SEQ ID Số: 3.

Kháng thể theo sáng chế có ái lực cao cho CSF-1R, có khả năng chặn liên kết của phối tử đến CSF-1R, không hoạt hóa CSF-1R và không gây ra quá trình tiếp nhận của CSF-1R.

Sáng chế cũng đề cập đến chuỗi polynucleotit, chẳng hạn như ADN, mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ bao gồm chuỗi polynucleotit.

Phương pháp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh liên kết của kháng thể này được đề xuất trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc các mảnh liên kết của kháng thể này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bao gồm việc cung cấp một lượng kháng thể có hiệu quả điều trị bệnh, mảnh kháng thể hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể, mảnh kháng thể liên kết hoặc chế phẩm theo sáng chế để sử dụng trong điều trị, cụ thể là trong điều trị bệnh ung thư và/hoặc bệnh xơ hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế được mô tả thêm chỉ để minh họa trong các ví dụ dưới đây kết hợp với các hình vẽ kèm theo:

Fig.1A đến 1F thể hiện trình tự amino axit và trình tự polynucleotit nhất định.

Fig.2A và Fig.2B thể hiện sự liên kết của các trình tự nhất định.

Fig.3 thể hiện trình tự phân ngoại bào CSF-1R ở người được mã hóa bằng chuỗi polynucleotit dùng để chuyển nạp các tế bào và biểu hiện protein trên bề mặt của tế bào. Các tế bào sau đó dùng để gây miễn dịch cho động vật chủ.

Fig.4 thể hiện sự ức chế của CSF-1 liên kết với các tế bào THP-1 bằng kháng thể Ab969.

Fig.5a thể hiện sự ức chế của CSF-1 kích thích sự sống còn và sự tăng sinh

bằng bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người bằng kháng thể Ab969.

Fig.5b thể hiện sự ức chế của IL-34 kích thích sự sống còn và sự tăng sinh bằng bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người bằng kháng thể Ab969.

Fig.6 thể hiện sự ức chế của CSF-1 kích thích sự sống còn và sự tăng sinh bằng bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở chuột bằng kháng thể Ab535.

Fig.7 thể hiện mức độ của bề mặt tế bào CSF-1R trên các tế bào THP-1 ủ với b969, CSF-1 ở người và đối chứng đồng vị.

Fig.8 thể hiện mức độ tương đối của bề mặt tế bào CSF-1R trên các tế bào THP-1 được điều trị với b969 so với đối chứng đồng vị.

Fig.9 thể hiện mức độ của bề mặt tế bào CSF-1R trên các tế bào RAW264.7 được ủ với b535, CSF-1 và đối chứng đồng vị.

Fig.10 thể hiện mức độ tương đối của bề mặt tế bào CSF-1R trên các tế bào RAW264.7 được điều trị với b535 so với đối chứng đồng vị.

Fig.11 thể hiện mức độ của quá trình phosphoryl hóa CSF-1R trên các tế bào HEK293F bị truyền nhiễm bằng CSF-R khi được kích thích bằng CSF-1 hoặc điều trị với b969.

Fig.12 thể hiện mức độ tiết ra MCP-1 từ bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người khi ủ với b969 và với CSF-1.

Fig.13 thể hiện tác dụng ức chế của bạch cầu đơn nhân trung gian CSF-1 còn sống bằng kháng thể được nhân hóa 969.g5 so với chimeric Ab969.g0.

Fig.14 thể hiện tác dụng ức chế bạch cầu đơn nhân trung gian CSF-1 còn sống bởi các kháng thể mô ghép đã nhân hóa khác nhau của Ab969.

Fig.15a thể hiện nồng độ của CSF-1 trong các mẫu huyết thanh được lấy từ khi mồm chó đã xử lý với 7 mg/kg liều tiêm tĩnh mạch đơn Ab969.g2.

Fig.15b thể hiện nồng độ của CSF-1 trong các mẫu huyết thanh được lấy từ khi mồm chó được điều trị với 1,5 mg/kg liều tiêm tĩnh mạch đơn Ab969.g2.

Fig.15c thể hiện tác dụng của việc sử dụng kháng thể Ab969.g2 cho khi mồm chó với chế độ liều là 7 mg/kg và 1,5 mg/kg trong lưu thông trên quá trình lưu thông

của bạch cầu đơn nhân không cổ điển ở các thời điểm khác nhau.

Fig.16 thể hiện tác dụng chống khối u của kháng thể Ab535 so với kháng thể đối chứng, đối chứng dương tính và chất dẫn làm đối chứng trong các con chuột không lông suy giảm miễn dịch mang vật cấy của mô hình cấy ghép bệnh ung thư vú ở người dưới da MCF-7.

Fig.17 thể hiện tác dụng của việc chống khối u của kháng thể Ab535 so với kháng thể đối chứng, đối chứng dương tính và chất dẫn làm đối chứng trong mẫu ung thư tuyến tiền liệt đúng vị trí PC-3.

Fig.18a thể hiện tác dụng của việc điều trị xơ hóa phổi do bleomycin với Ab535 trên nồng độ collagen BALF so với đối chứng đồng vị.

Fig.18b thể hiện tác dụng của việc điều trị xơ hóa phổi do bleomycin với Ab535 trên bệnh xơ hóa của mẫu phổi đo bằng số điểm Ashcroft so với đối chứng đồng vị.

Fig.18c thể hiện tác dụng của việc điều trị xơ hóa phổi do bleomycin với Ab535 trên nồng độ albumin trong huyết tương so với đối chứng đồng vị.

Fig.18d một số đại thực bào trong dung dịch BAL của chuột bị xơ hóa phổi do bleomycin được nghiên cứu và thể hiện rằng việc điều trị xơ hóa phổi do bleomycin bằng Ab535 làm giảm một số đại thực bào trong dung dịch BAL so với đối chứng đồng vị đã điều trị trên động vật. Dữ liệu thể hiện theo nghĩa là $\pm$ SEM; * Biểu thị sự khác biệt đáng kể từ đồng vị chứa muối; # biểu thị sự khác biệt đáng kể từ liều điều trị cho chuột với kháng thể đối chứng đồng vị ($p \leq 0,05$)

Fig.19 các hình vẽ biểu thị phân tích mô bệnh học của phổi từ salin đối chứng, bleomycin với đối chứng đồng vị và bleomycin với Ab535 điều trị cho động vật.

Fig.20a thể hiện tác dụng của việc điều trị sự thiếu ADA do xơ hóa phổi gây ra ở chuột với Ab535 trên nồng độ collagen BALF so với điều trị bằng đối chứng đồng vị.

Fig.20b thể hiện tác dụng của việc điều trị sự thiếu ADA do xơ hóa phổi gây ra ở chuột với Ab535 trên bệnh xơ hóa từ mẫu phổi đo bằng số điểm Ashcroft so với

điều trị bằng đối chứng đồng vị.

Fig.20c thể hiện tác dụng của việc điều trị sự thiếu ADA do xơ hóa phổi gây ra ở chuột với Ab535 trên nồng độ albumin trong huyết tương so với điều trị bằng đối chứng đồng vị.

Fig.20d thể hiện một số đại thực bào trong dịch BAL của chuột theo mẫu thiếu ADA do chứng xơ hóa phổi và thể hiện việc điều trị sự thiếu ADA do xơ hóa phổi gây ra ở chuột với Ab535 làm giảm một số đại thực bào trong dịch BAL.

Fig.21 thể hiện các hình vẽ biểu thị phân tích mô bệnh học của phổi từ những con chuột có (ADA+) bình thường và chuột bị thiếu ADA bị xơ hóa phổi (ADA-), tất cả được điều trị bằng đối chứng đồng vị hoặc Ab535.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, kháng thể được đề xuất bởi sáng chế có khả năng chặn phối tử liên kết đến CSF-1R. Việc ngăn chặn ở đây là ngăn chặn về mặt vật lý chẳng hạn như bằng cách hút giữ các thụ thể nhưng cũng sẽ bao gồm để trong đó các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể liên kết epitop mà gây ra, ví dụ như sự thay đổi về hình dạng có nghĩa là phối tử tự nhiên với thụ thể không có liên kết dài (được đề cập đến trong bản mô tả này là chất chặn dị lập thể hoặc chất ức chế dị lập thể). Theo một phương án, kháng thể trong bản mô tả sáng chế liên kết tất cả các đồng vị của CSF-1R, ví dụ với những biến thể trong vùng ECD, chẳng hạn như V23G, A245S, H247P, V279M và sự kết hợp của hai, ba hoặc bốn biến thể này.

Các thử nghiệm thích hợp để xác định khả năng của kháng thể nhằm ngăn chặn CSF-1R được mô tả trong các Ví dụ thực hiện sáng chế. CSF-1 và IL-34 cả hai đều là phối tử cho CSF-1R và kháng thể của sáng chế tốt nhất là ức chế hoạt tính của cả CSF-1 và IL-34 trong màn chức tế bào. Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế cũng không gây ra hoạt tính của CSF-1R và/hoặc quá trình tiếp nhận CSF-1R. Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế cũng làm tan có chọn lọc lượng bạch cầu đơn nhân không cổ điển in vivo.

Các bạch cầu đơn nhân không cổ điển thường đề cập đến các bạch cầu đơn nhân có biểu hiện CD14 thấp và biểu hiện CD16 cao. Số lượng này của các bạch cầu đơn nhân được cho là các tiền chất của các đại thực bào liên quan đến khối u.

Các phân tử kháng thể theo sáng chế thích hợp có ái lực liên kết cao. Ái lực có thể đo được bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các kỹ thuật chẳng hạn như cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ như BIAcore, như được mô tả trong các ví dụ trong bản mô tả này, bằng cách sử dụng biện pháp cách ly tự nhiên hoặc tái tổ hợp CSF-1R hoặc protein/polypeptit dung hợp thích hợp. Theo một ví dụ, ái lực được đo bằng cách sử dụng vùng ngoại bào CSF-1R tái tổ hợp ở người như được mô tả trong các ví dụ của bản mô tả này. Trong một ví dụ như vùng ngoại bào CSF-1R tái tổ hợp ở người được sử dụng là một monome. Thích hợp là các phân tử kháng thể theo sáng chế có ái lực liên kết để cách ly người với CSF-1R với khoảng 1nM hoặc ít hơn 1nM. Theo một phương án phân tử kháng thể của sáng chế có ái lực liên kết với khoảng 500pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án, phân tử kháng thể của sáng chế có ái lực liên kết với khoảng 250pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án, phân tử kháng thể của sáng chế có ái lực liên kết khoảng với 200pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R có ái lực liên kết với khoảng 100pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R đã nhân hóa có ái lực liên kết với khoảng 100pM hoặc thấp hơn, tốt hơn là khoảng 10pM hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là khoảng 5pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R đã nhân hóa có ái lực liên kết với khoảng 100pM hoặc thấp hơn, tốt hơn là khoảng 10pM hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là khoảng 5pM hoặc thấp hơn.

Trị số số học của ái lực càng thấp thì ái lực của kháng thể hoặc mảnh kháng thể cho kháng nguyên càng cao.

Kháng thể CSF-1R ở người được dùng trong bản mô tả này đề cập đến tên protein ở người CSF-1R hoặc mảnh kháng thể có hoạt tính sinh học kháng thể của chúng, ví dụ như được đưa ra trong SEQ ID Số: 39 hoặc ghi nhận trong UniProt theo

số P07333. Tất nhiên là được biểu hiện protein trưởng thành không bao gồm trình tự tín hiệu do phần sau được phân cắt sau khi dịch mã.

Sáng chế đề xuất kháng thể các kháng thể kháng CSF-1R mới, bao gồm các kháng thể được nhân hóa. Kháng thể được tạo ra từ sự miễn dịch hóa của chuột nhắt với nguyên bào xơ ở chuột nhắt chuyển nạp với vector biểu hiện vùng ngoại bào của CSF-1R. Sàng lọc sơ bộ trên bề mặt cho liên kết CSF-1R ở người của kháng thể CSF được xác định là khoảng 1000 giếng chứa kháng thể có hoạt tính CSF-1R. Sàng lọc thứ cấp cho kháng thể có khả năng kháng người CSF-1 liên kết với CSF-1R ở người đã xác định với 88 giếng dương tính. Sàng lọc giai đoạn ba cho kháng thể có khả năng ngăn chặn CSF-1 phụ thuộc vào sự sống sót của bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người đã xác định với 18 giếng dương tính. Vùng biến đổi của 18 giếng dương tính đã được tách dòng, mà dẫn đến việc tách dòng thành công của 14 kháng thể và sự biểu hiện sau đó cho rằng 9 kháng thể chimeric kháng CSF-1R biểu hiện mức độ vừa đủ và có khả năng ức chế liên kết của CSF-1R. Chín kháng thể này được xác định trình tự và tìm thấy tất cả đều có trình tự duy nhất và được sử dụng để nghiên cứu thêm.

Chín kháng thể chimeric kháng CSF-1R được đánh giá cho hoạt tính ngăn chặn phối tử và khả năng ức chế sự sống của bạch cầu đơn nhân trung gian IL-34 hoạt tính. Bốn trong số các kháng thể được ưu tiên để nghiên cứu thêm vì chúng được chứng minh là ức chế hoàn toàn CSF-1 liên kết với và mức độ ức chế sự sống của bạch cầu đơn nhân cao. 4 kháng thể chimeric kháng CSF-1R này được kiểm nghiệm cho hoạt tính của chúng trong một số in vitro các thử nghiệm để đánh giá ái lực, sự ức chế của liên kết CSF-1, phản ứng chéo với khỉ nâu, khỉ mồm chó và CSF-1R ở chó, quá trình tiếp nhận CSF-1R và hoạt tính của CSF-1R. Bốn kháng thể kháng thể kháng CSF-1R cũng được nhân hóa và đo ái lực của mô ghép được nhân hóa. Sự nhân hóa của hai trong số các kháng thể kháng CSF-1R tạo ra kháng thể được nhân hóa hoàn toàn (không tồn tại gốc cho của chuột nhắt) gốc với ái lực (K_D) tương đương với kháng thể chimeric bố mẹ và T_m để chỉ ra kháng thể có nhiệt độ ổn định phù hợp. Ngược lại,

hai kháng thể kháng CSF-1R đã nhân hóa khác có ái lực giảm cho CSF-1R, liên quan đến kháng thể chimeric, và T_m thấp hơn. Vì thế, chỉ mô ghép đã nhân hóa hoàn toàn của hai trong số các kháng thể để duy trì ái lực được biểu hiện ở quy mô lớn hơn để phân tích thêm.

Việc phân tích thêm các mô ghép đã nhân hóa hoàn toàn mô ghép đã nhân hóa của hai kháng thể được tiến hành và nghiên cứu ức chế MCP-1, trong đó sự ức chế của CSF-1R báo hiệu bằng kháng thể chặn liên kết CSF-1 khiến mức độ tiết ra MCP-1 giảm. Thử nghiệm này đã bất ngờ cho thấy mô ghép đã nhân hóa hoàn toàn thể hiện hoạt tính giảm so với kháng thể chimeric. Một loạt các thí nghiệm trên một hoặc nhiều kháng thể ưu tiên, đã chỉ định Ab969, được tiến hành để tiết lộ xem tại sao mô ghép đã nhân hóa hoàn toàn hoạt tính có hoạt tính giảm. Một số mô ghép đã nhân hóa trung gian của Ab969 được tạo ra và kiểm nghiệm trong thử nghiệm ức chế MCP-1. Điều đã được nhận thấy là các mô ghép bao gồm gốc cho của chuỗi nhẹ biến đổi Y71 thể hiện hoạt tính trong thử nghiệm ức chế MCP-1 có thể so sánh với hoạt tính của chimeric Ab969. Điều đã được giả thuyết là sự khác biệt về hoạt tính của các mô ghép kháng thể khác nhau trong thử nghiệm ức chế MCP-1 do sự thay đổi trong tốc độ ghép của kháng thể h (giảm K_a) so với Ab969.

Việc so sánh kết quả phân tích về tính ổn định nhiệt của Ab969 với các kháng thể kháng CSF-1R khác nhau, ví dụ như kháng thể kháng CSF-1R Ab970, cho thấy là Ab969 có thể ổn định hơn.

Việc phân tích sinh học thêm đối với các mô ghép đã nhân hóa của Ab969 cho thấy rằng một số mô ghép kết tủa khi kháng thể được cô đặc. Điều được thể hiện là sự thể của gốc lizin ở vị trí 38 trong chuỗi nhẹ, ví dụ glutamin, dẫn đến độ ổn định vật lý được cải thiện.

Theo đó, mô ghép kháng thể của Ab969, Ab969.g2 (cũng được gọi là Ab969), được chọn lọc cho in vitro các nghiên cứu thêm về đặc tính. Ngoài lợi thế về ái lực liên kết mạnh đến CSF-1R, thì nhiệt độ ổn định lớn và độ ổn định vật lý của kháng thể lớn chứng minh được sự ức chế tốt của hoạt tính bạch cầu đơn nhân phụ thuộc IL-

34 và cũng được thấy là có khả năng liên kết các biến thể SNP của CSF-1R. Ab969.g2 cũng được sử dụng cho phân tích đánh dấu được lực học ở khi mồm chó đã đề cập đến để liên kết CSF-1R, chặn liên kết CSF-1 và làm tan có chọn lọc số lượng bạch cầu đơn nhân không cổ điển ở khi mồm chó in vivo, là các tế bào tiền thân của các đại thực bào liên quan đến khối u.

Do vậy, theo một phương án, sáng chế tạo ra một kháng thể bao gồm một chuỗi nặng và/ hoặc một chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một CDR được dẫn xuất từ kháng thể kháng CSF-1R 969.2.

Ab969.2 là một phân tử IgG4 đã nhân hóa có độ dài hoàn chỉnh; chuỗi nhẹ bao gồm một chuỗi kappa ở người trong vùng hằng định (Km3 alotyp) và chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng gamma-4 ở người trong vùng hằng định với khớp nối ổn định đột biến S241P (Angal và cộng sự, 1993). Kiểu đồng phân hóa DG tiềm năng có trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ ở vị trí kết nối của CDR-L2 và cấu trúc của CDR-L2. Trình tự của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong kháng thể đầy đủ Ab969.2 được đưa ra trong SEQ ID Số: 27 và 19.

Gốc trong vùng biến đổi của kháng thể được đánh số theo quy ước của hệ thống được tạo ra bởi Kabat và cộng sự, 1987. Hệ thống này được đưa ra bởi Kabat và cộng sự, 1987, trong tài liệu “Sequences of Protein of Immunological Interest”, US Department of Health và Human Services, NIH, USA (dưới đây gọi là “Kabat và cộng sự (đề cập trên đây)”). Hệ thống đánh số này được sử dụng trong bản mô tả này trừ khi được quy định khác đi.

Các ký hiệu gốc Kabat luôn không tương ứng trực tiếp với cách đánh số tuyến tính của gốc axit amin. Trình tự axit amin tuyến tính trong thực tế có thể chứa ít hơn hoặc bổ sung thêm axit amin trong phương pháp đánh số Kabat nghiêm ngặt tương ứng với việc rút bớt, hoặc chèn vào, hợp phần cấu tạo, bất kể là trong cấu trúc hay trong vùng quyết định bổ cứu (Complementarity Determining Region - CDR), của cấu trúc vùng biến đổi cơ bản. Việc đánh số Kabat chính xác cho các gốc có thể được xác định cho kháng thể bằng cách sắp xếp các gốc có tính đồng đẳng trong trình tự

của kháng thể với trình tự đánh số Kabat “tiêu chuẩn”.

Các CDR của chuỗi nhẹ trong vùng biến đổi được bố trí ở các gốc 31-35 (CDR-H1), các gốc 50-65 (CDR-H2) và các gốc 95-102 (CDR-H3) theo hệ thống đánh số Kabat. Tuy nhiên, theo Chothia (Chothia, C. và Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), vòng ghép kín tương đương với CDR-H1 kéo dài từ gốc 26 đến gốc 32. Do vậy trừ khi có quy định khác đi, ‘CDR-H1’ được dùng trong bản mô tả này nhằm mục đích tham khảo gốc 26 đến 35, như được mô tả trong sự kết hợp của hệ thống đánh số Kabat và định nghĩa vòng tô pô của Chothia.

Các CDR của chuỗi nhẹ trong vùng biến đổi được bố trí ở các gốc 24-34 (CDR-L1), các gốc 50-56 (CDR-L2) và các gốc 89-97 (CDR-L3) theo hệ thống đánh số Kabat.

Kháng thể để sử dụng trong sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Polypeptit/protein CSF-1R bao gồm các protein dung hợp, các tế bào (tái tổ hợp hoặc một cách tự nhiên) biểu hiện polypeptit có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể để đặc biệt phát hiện ra CSF-1R. Polypeptit có thể là polypeptit “trưởng thành” hoặc mảnh hoạt tính sinh học hoặc dẫn xuất hoạt tính sinh học của chúng. Protein ở người được ghi nhận trong UniProt theo số P07333.

Các polypeptit, sử dụng để gây miễn dịch cho vật chủ, có thể được điều chế bằng những quy trình đã biết trong lĩnh vực này từ các tế bào chủ đã được điều trị gen bao gồm việc biểu hiện các hệ thống hoặc có thể được thu hồi từ nguồn sinh học tự nhiên. Theo sáng chế, thuật ngữ “polypeptit” bao gồm các peptit, polypeptit và protein. Các thuật ngữ này sử dụng để thế cho nhau trừ khi có quy định khác. Polypeptit CSF-1R trong một số trường hợp có thể là một phần chuỗi protein lớn hơn chẳng hạn như protein dung hợp, ví dụ như, được dung hợp vào thể ái lực hoặc dạng tương tự.

Kháng thể được tạo ra để chống lại polypeptit CSF-1R có thể thu được, trong đó tạo miễn dịch cho động vật là cần thiết, bằng cách sử dụng polypeptit cho động

vật, tốt hơn là cho động vật không phải là người, bằng cách sử dụng các quy trình đã biết hoặc thông thường, xem, ví dụ như, tài liệu Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (tái bản), Tập 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Động vật máu nóng, chẳng hạn như thỏ, chuột, chuột nhắt, cừu, bò, lạc đà hoặc lợn có thể được gây miễn dịch. Tuy nhiên, chuột, thỏ, lợn và chuột nhắt thường là thích hợp nhất.

Kháng thể đơn bào có thể được điều chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này chẳng hạn như kỹ thuật hybridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), kỹ thuật trioma, kỹ thuật hybridoma tế bào B ở người (Kozbor và cộng sự, 1983, Immunology Today, 4:72) và kỹ thuật hybridoma EBV (Cole và cộng sự, 1985, Monoclonal Antibodies và Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc.).

Kháng thể cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp kháng thể đơn bào lympho bằng cách tách dòng và biểu hiện CDNA trong vùng biến đổi của globulin miễn dịch đã tạo ra từ các tế bào đơn bào lympho chọn để sản xuất kháng thể đặc hiệu bằng, Ví dụ như, các phương pháp đã mô tả trong Babcook, J. và cộng sự, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848; WO92/02551; WO04/051268 và Công bố Đơn quốc tế số WO04/106377.

Việc sàng lọc kháng thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các thử nghiệm để đo độ liên kết với CSF-1R ở người và/hoặc các thử nghiệm để đo khả năng chặn phối tử liên kết với thụ thể. Các ví dụ về các thử nghiệm thích hợp được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Nội dung cụ thể ở đây nhằm đề cập đến kháng thể chỉ công nhận kháng nguyên mà nó là đặc hiệu hoặc một kháng thể có ái lực liên kết cao hơn đáng kể đến kháng nguyên mà nó là đặc hiệu so với liên kết đến các kháng nguyên không phải là đặc hiệu ví dụ ái lực liên kết cao hơn ít nhất ít nhất 5, 6, 7, 8, 9, 10 lần.

Trình tự axit amin và trình tự polynucleotit của một số kháng thể theo sáng chế đề cập đến trên Fig.1 và Fig.2.

Theo một khía cạnh của sáng chế, kháng thể là kháng thể kháng CSF-1R hoặc

mảnh liên kết của kháng thể này bao gồm một chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm ít nhất một CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 4 cho CDR-H1, CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:5 cho CDR-H2 và CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:6 cho CDR-H3. Tốt hơn là, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 4 cho CDR-H1, trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:5 cho CDR-H2 và trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:6 cho CDR-H3.

Trong khía cạnh thứ hai của sáng chế, kháng thể là kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này, bao gồm một chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 1 cho CDR-L1, CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:2 cho CDR-L2 và CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:3 cho CDR-L3. Tốt hơn là, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:1 cho CDR-H1, trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:2 cho CDR-H2 và trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:3 cho CDR-H3.

Theo một phương án, kháng thể của sáng chế là kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này bao gồm một chuỗi nặng đã nêu trên và còn bao gồm một chuỗi nhẹ trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 1 cho CDR-L1, CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:2 cho CDR-L2 và CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:3 cho CDR-L3. Tốt hơn là, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:1 cho CDR-L1, trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:2 cho CDR-L2 và trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:3 cho CDR-L3.

Theo một phương án, ít nhất một axit amin được thay bằng với phép thế bảo toàn một hoặc nhiều CDR được chọn từ nhóm gồm riêng:

bất kỳ một trong số CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3;

bất kỳ một trong số các tổ hợp CDR-H1 và H2, CDR-H1 và H3, CDR-H1 và

L1, CDR-H1 và L2, CDR-H1 và L3, CDR-H2 và H3, CDR-H2 và L1, CDR-H2 và L2, CDR-H2 và L3, CDR-H3 và L1, CDR-H3 và L2, CDR-H3 và L3, CDR-L1 và L2, CDR-L1 và L3, CDR-L2 và L3;

CDR-H1, H2 và H3, CDR-H1, H2 và L1, CDR-H1, H2 và L2, CDR-H1, H2 và L3, CDR-H2, H3 và L1, CDR-H2, H3 và L2, CDR-H2, H3 và L3, CDR-H3, L1 và L2, CDR-H3, L1 và L3, CDR-L1, L2, L3;

bất kỳ một trong số các tổ hợp CDR-H1, H2, H3 và L1, CDR-H1, H2, H3 và L2, CDR-H1, H2, H3 và L3, CDR-H2, H3, L1 và L2, CDR-H2, H3, L2 và L3, CDR-H3, L1, L2 và L3, CDR-L1, L2, L3 và H1, CDR-L1, L2, L3 và H2, CDR-L1, L2, L3 và H3, CDR-L2, L3, H1 và H2,

CDR-H1, H2, H3, L1 và L2, CDR-H1, H2, H3, L1 và L3, CDR-H1, H2, H3, L2 và L3, CDR-L1, L2, L3, H1 và H2, CDR-L1, L2, L3, H1 và H3, CDR-L1, L2, L3, H2 và H3; và

tổ hợp CDR-H1, H2, H3, L1, L2 và L3.

Theo một phương án, vùng của chuỗi nặng được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm trình tự với 1, 2, 3 hoặc 4 phần thể axit amin bảo toàn, ví dụ như trong đó các phần thể là nằm trong cấu trúc.

Theo một phương án, cấu trúc của chuỗi nặng trong vùng biến đổi bao gồm 1, 2, 3, hoặc 4 axit amin trong đó được chèn, khuyết, thể hoặc sự kết hợp của chúng. Theo một phương án, axit amin thể tương ứng với axit amin từ kháng thể thể cho.

Theo một phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm trình tự với 1, 2, 3 hoặc 4 phần thể axit amin bảo toàn, ví dụ như trong đó các phần thể là nằm trong cấu trúc.

Theo một phương án, cấu trúc của chuỗi nhẹ trong vùng biến đổi bao gồm 1, 2, 3 hoặc 4 axit amin được chèn, xóa, thể hoặc sự kết hợp của chúng. Theo một phương án, amino được thể là axit amin tương ứng từ kháng thể cho.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng bao

gồm ba CDR và trình tự của CDR-H1 tương đồng hoặc tương tự ít nhất 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95% so với trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:4, trình tự của CDR-H2 tương đồng hoặc tương tự ít nhất 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95% so với trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:5 và trình tự của CDR-H-3 tương đồng hoặc tương tự ít nhất 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95% so với trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:6. Tốt hơn là, kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này, còn bao gồm một chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm ba CDR và trình tự của CDR-L1 tương đồng hoặc tương tự ít nhất 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95% so với trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:1, trình tự của CDR-L2 tương đồng hoặc tương tự ít nhất 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95% so với trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:2 và trình tự của CDR-L3 tương đồng hoặc tương tự ít nhất 60% so với trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:3.

Theo một phương án, vùng biến đổi được đề xuất tương đồng hoặc tương tự ít nhất 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95% so với trình tự vùng biến đổi được đề cập trong bản mô tả. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R để cạnh tranh với liên kết của kháng thể hoặc mảnh kháng thể của sáng chế đối với liên kết cho thụ thể CSF-1R, tốt hơn là, vùng ngoại bào của thụ thể CSF-1R, đặc biệt là thụ thể CSF-1R của SEQ ID Số:35, 36, 37, 38 và/hoặc 39 hoặc trình tự trong mục dữ liệu UniProt P07333, cụ thể là vùng ngoại bào của thụ thể CSF-1R của SEQ ID Số: 36 hoặc 498 axit amin của vùng ngoại bào bộc lộ trong mục dữ liệu UniProt P07333 (axit amin 20 đến axit amin 517 của P07333).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R chặn chéo liên kết của kháng thể bao gồm 6 CDR được đưa ra trong trình tự SEQ ID Số:1 cho CDR-L1, SEQ ID Số:2 cho CDR-L2, SEQ ID Số:3 cho CDR-L3, SEQ ID Số:4 cho CDR-H1, SEQ ID Số:5 cho CDR-H2 và SEQ ID Số:6 cho CDR-H3, ví dụ như với ái lực 100pM hoặc ít hơn, cụ thể là trong đó việc chặn ngang là dị lập thể.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này ức chế hoặc chống lại với liên kết của CSF-1

và/hoặc IL-34 đến vùng ngoại bào của thụ thể CSF-1R.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R để chặn chéo liên kết của kháng thể bao gồm 6 CDR được đưa ra trong trình tự SEQ ID Số:1 cho CDR-L1, SEQ ID Số:2 cho CDR-L2, SEQ ID Số:3 cho CDR-L3, SEQ ID Số:4 cho CDR-H1, SEQ ID Số:5 cho CDR-H2 và SEQ ID Số:6 cho CDR-H3, ví dụ với ái lực 100pM hoặc ít hơn, cụ thể trong đó kháng thể chặn chéo liên kết bằng cách liên kết epitop tương đồng như kháng thể mà nó chặn.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết của kháng thể này, trong đó gốc đầu C của trình tự kháng thể được phân cắt, ví dụ gốc đầu C của một trình tự của chuỗi nặng, ví dụ như đầu lyzin. Theo một phương án, axit amin được phân cắt từ một trình tự được đề cập trong bản mô tả. Nhìn chung, mức độ phân cắt gây ra bởi những biến đổi sau dịch mã của các kháng thể được biểu hiện hoặc mảnh kháng thể liên kết.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R của bất kỳ phương án nào trong số các phương án trên hoặc dưới đây, trong đó đầu lyzin C của trình tự chuỗi nặng đã đề cập đến trong SEQ ID Số: 27 hoặc SEQ ID Số: 29 đang thiếu hoặc khuyết. Lyzin đầu C bị thiếu hoặc khuyết, ví dụ như ở vị trí 453 của SEQ ID Số: 27 hoặc vị trí 472 của SEQ ID Số: 30 có thể xảy ra, ví dụ qua biểu hiện của kháng thể kháng CSF-1R trong hệ thống biểu hiện mà không cần mã hóa đầu lyzin. Theo lựa chọn, việc khuyết gốc đầu C, chẳng hạn như lyzin, có thể bị ảnh hưởng như một biến đổi sau dịch mã.

Theo một phương án, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể liên kết theo sáng chế được nhân hóa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể được nhân hóa” đề cập đến kháng thể hoặc phân tử kháng thể trong đó chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có chứa một hoặc nhiều CDR (bao gồm, nếu muốn, một hoặc nhiều CDR biến đổi) từ kháng thể thể cho (ví dụ như trong kháng thể đơn bào của chuột) ghép vào trong chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ trong cấu trúc vùng biến đổi của chất nhận kháng thể

(ví dụ như trong kháng thể của người) (xem, ví dụ như, tài liệu US 5,585,089; WO91/09967). Để kiểm nghiệm lại, xem tài liệu của Vaughan và cộng sự, *Nature Biotechnology*, **16**, 535-539, 1998. Theo một phương án thay cho toàn bộ CDR đang được chuyển đến, chỉ một hoặc nhiều gốc đã xác minh có tính đặc hiệu từ bất kỳ một trong các CDR đã mô tả trên đây được chuyển đến cấu trúc kháng thể ở người (xem, ví dụ như, tài liệu của như, tài liệu của Kashmiri và cộng sự, 2005, *Methods*, 36:25-34). Theo một phương án chỉ gốc đã xác minh có tính đặc hiệu từ một hoặc nhiều CDR đã mô tả trên đây được chuyển đến cấu trúc kháng thể ở người. Theo một phương án, chỉ gốc đã xác minh có tính đặc hiệu từ mỗi CDR đã mô tả trên đây được chuyển đến cấu trúc kháng thể ở người. Khi CDR hoặc gốc đã xác minh có tính đặc hiệu được ghép nối, bất kỳ trình tự trong cấu trúc vùng biến đổi của chất nhận có thể được sử dụng liên quan đến nhóm/loại kháng thể thể cho từ CDR có nguồn gốc, bao gồm từ chuột, động vật linh trưởng và các vùng cấu trúc ở người.

Thích hợp là, kháng thể được nhân hóa theo sáng chế có vùng biến đổi bao gồm chất nhận ở người trong vùng cấu trúc cũng như một hoặc nhiều CDR đã tạo ra cụ thể trong bản mô tả này. Do vậy, theo một phương án, kháng thể được nhân hóa liên kết CSF-1R ở người trong đó vùng biến đổi bao gồm chất nhận ở người trong vùng cấu trúc và CDR thể cho không phải từ người CDR.

Ví dụ về các cấu trúc ở người có thể được sử dụng trong sáng chế là KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY và POM (Kabat và cộng sự, đề cập trên đây). Ví dụ như, KOL và NEWM có thể được sử dụng cho chuỗi nặng, REI có thể được sử dụng cho chuỗi nhẹ và EU, LAY và POM có thể được sử dụng cho cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Theo lựa chọn, có thể sử dụng trình tự dòng tinh ở người, như được thể hiện tại: <http://vbaza.mrc-cpe.cam.ac.uk/>.

Ở kháng thể được nhân hóa theo sáng chế, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong chất nhận không nhất thiết cần phải có nguồn gốc từ kháng thể tương đồng nhau và có thể, nếu muốn, bao gồm các chuỗi tổng hợp có các vùng cấu trúc có nguồn gốc các chuỗi khác nhau.

Theo một phương án, cấu trúc ở người bao gồm 1, 2, 3, hoặc 4 phần thể, bổ sung hoặc khuyết axit amin, ví dụ như 1, 2, 3 hoặc 4 phần thể axit amin bảo toàn hoặc phần thể của các gốc cho.

Theo một phương án, trình tự được sử dụng như một cấu trúc ở người tương tự hoặc tương đồng 80%, 85%, 90%, 95% hoặc hơn thế so với trình tự được đề cập trong bản mô tả.

Vùng cấu trúc thích hợp cho chuỗi nặng của kháng thể được nhân hóa theo sáng chế như vậy dẫn xuất từ phân nhóm VH2 ở người với trình tự 3-1 2-70 ở vùng JH3 J (SEQ ID Số: 33).

Do vậy, theo một ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 4 cho CDR-H1, trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 5 cho CDR-H2 và trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 6 cho CDR-H3, trong đó vùng cấu trúc chuỗi nặng được đưa ra từ phân nhóm VH3 ở người với trình tự 1-3 3-07 cùng vùng JH4.

Theo một ví dụ, vùng biến đổi của chuỗi nặng trong kháng thể bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 23.

Vùng cấu trúc thích hợp cho chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa theo sáng chế như vậy dẫn xuất từ phân nhóm dòng tinh ở người VK1 2-1-(1) O12 cùng vùng JK4 J (SEQ ID Số: 31).

Do vậy, theo một ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 1 cho CDR-L1, trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 2 cho CDR-L2 và trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 3 cho CDR-L3, trong đó vùng cấu trúc chuỗi nhẹ được đưa ra từ phân nhóm VK1 2-1-(1) O12 ở người cùng vùng JK4 J.

Theo một ví dụ, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 15.

Trong một kháng thể được nhân hóa của sáng chế, các vùng cấu trúc không cần phải có trình tự tương đồng nhau chính xác của kháng thể cho thụ thể. Ví dụ như, gốc

không bình thường có thể được thay đổi gốc xảy ra thường xuyên hơn đối với nhóm hoặc loại chuỗi của chất nhận. Theo lựa chọn, gốc đã chọn trong vùng cấu trúc của chất nhận có thể được thay đổi sao cho tương ứng với gốc đã tìm thấy ở vị trí tương đồng nhau trong kháng thể thể cho (xem tài liệu của Reichmann và cộng sự, 1998, *Nature*, 332:323-324). Nhưng thay đổi này nên được giữ ở mức cần thiết tối thiểu để khôi phục ái lực trong kháng thể thể cho. Quy chuẩn để lựa chọn gốc trong vùng cấu trúc của chất nhận gốc có thể cần thay đổi được đưa ra trong tài liệu WO91/09967.

Do vậy, theo một ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa, trong đó gốc ít nhất ở vị trí 78 của vùng biến đổi của chuỗi nặng (kiểu đánh số Kabat) là gốc cho. Theo một phương án, gốc 78 của vùng biến đổi của chuỗi nặng được thay bằng alanin.

Gốc cho được dùng trong bản mô tả này đề cập đến dạng gốc của kháng thể không phải ở người (ví dụ như kháng thể của chuột) đã cho các CDR.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng không gốc chứa bất kỳ gốc cho nào.

Do vậy, theo một ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa, trong đó ít nhất một gốc ở vị trí 38, 71 và 87 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (kiểu đánh số Kabat) là gốc cho. Theo một phương án, một trong gốc chọn ra từ gốc ở vị trí 38, 71 và 87 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (kiểu đánh số Kabat) là gốc cho. Theo một phương án, hai trong số gốc chọn ra từ gốc ở vị trí 38, 71 và 87, ví dụ như 38 và 71; hoặc 38 và 87; hoặc 71 và 87, thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (kiểu đánh số Kabat) là gốc cho. Theo một phương án, ba gốc ở vị trí 38, 71 và 87 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (kiểu đánh số Kabat) là gốc cho.

Theo một phương án, gốc 38 trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thay bằng lyzin. Theo một phương án khác, gốc 38 trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thay bằng glutamin.

Theo một phương án, gốc 71 trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thay bằng tyrosin.

Theo một phương án, gốc 87 trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thay bằng phenylalanin.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa trong đó chỉ gốc 71 trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là một người cho gốc, tốt hơn là, tyrosin.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này có chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của trình tự chuỗi nặng đã đề cập đến trong SEQ ID Số: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của trình tự chuỗi nhẹ đã đề cập đến trong SEQ ID Số: 15.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này tạo ra liên kết CSF-1R, tốt hơn là vùng ngoại bào của CSF-1R, tốt nhất là, vùng ngoại bào của CSF-1R ở người, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của SEQ ID Số: 15 và vùng biến đổi của chuỗi nặng của SEQ ID Số: 23, tốt hơn là, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết của kháng thể này là một kháng thể đơn bào, là một kháng thể dạng IgG1-IgG2-, IgG4, là một Fab, Fab biến đổi, Fab', Fab' biến đổi, F(ab')₂, Fv, kháng thể vùng đơn (ví dụ như trong VH hoặc VL hoặc VHH), scFv, kháng thể hóa trị hai, hóa trị ba hoặc hóa trị bốn, Bis-scFv, dạng tổ hợp diabody, triabody hoặc tetrabody.

Theo một phương án, sáng chế tạo ra một trình tự kháng thể tương tự hoặc tương đồng 80% so với trình tự được đề cập trong bản mô tả này, ví dụ như 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với một phần hoặc toàn bộ trình tự liên quan. Theo một phương án, trình tự có liên quan là SEQ ID Số: 15. Theo một phương án, trình tự có liên quan là SEQ ID Số: 23.

"Tương đồng", như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là ở bất kỳ vị trí cụ thể nào trong chuỗi liên kết, có gốc axit amin là tương đồng nhau giữa các trình tự. "Tương tự", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ ra rằng, ở bất kỳ vị trí cụ thể nào trong chuỗi liên kết, có gốc axit amin thuộc loại tương tự nhau giữa các trình tự. Ví dụ như, leucin có thể được thế cho isoleucin hoặc valin. Axit amin khác mà có thể thường được thế cho một axit khác bao gồm nhưng không giới hạn ở:

- phenylalanin, tyrosin và tryptophan (axit amin có chuỗi bên thơm);
- lyzin, arginin và histidin (axit amin có chuỗi bên bazo);
- aspartat và glutamat (axit amin có chuỗi bên axit);
- asparagin và glutamin (axit amin có chuỗi bên amid); và
- xystein và methionin (axit amin có chuỗi bên chứa sunphua).

Độ tương đồng và tương tự có thể dễ dàng tính được (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics và Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, A.M., và Griffin, H.G., tái bản, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. và Devereux, J., tái bản, M Stockton Press, New York, 1991, phần mềm BLAST™ sẵn có từ NCBI (Altschul, S.F. và cộng sự, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & Stats, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. và cộng sự, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. và cộng sự, 1997, Axit nucleicRes. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

Các phân tử kháng thể của sáng chế có thể bao gồm một phân tử kháng thể đầy đủ có chiều dài chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn chỉnh hoặc mảnh liên kết của kháng thể này và có thể, nhưng không giới hạn Fab, Fab biến đổi, Fab', Fab' biến đổi, F(ab')₂, Fv, kháng thể vùng đơn (ví dụ như trong VH hoặc VL hoặc VHH), scFv, kháng thể hóa trị hai, hóa trị ba hoặc hóa trị bốn, Bis-scFv, các dạng tổ hợp diabody, triabody, tetrabody và các mảnh kháng thể liên kết epitop của bất kỳ chất ở trên (xem, ví dụ như, tài liệu của Holliger và Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair và Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Onlin 2(3), 209-217). Các phương pháp để tạo ra và sản xuất các mảnh kháng thể đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ như, tài liệu của Verma và cộng sự, 1998, Journal of Immunological Methods, 216:165-181). Các mảnh kháng thể khác sử dụng trong sáng chế bao gồm các mảnh kháng thể Fab và Fab' đã mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế WO05/003169, WO05/003170

và WO05/003171. Kháng thể đa hóa trị có thể gồm nhiều đặc tính, ví dụ như đặc hiệu kép hoặc có thể được đặc hiệu đơn (xem, ví dụ như, tài liệu của WO92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 và WO2010/035012).

Mảnh kháng thể liên kết của một kháng thể dùng trong bản mô tả này đề cập đến mảnh kháng thể có khả năng liên kết kháng nguyên với ái lực để biểu hiện đặc điểm của mảnh kháng thể là riêng biệt cho kháng nguyên.

Theo một phương án, kháng thể trong mô tả sáng chế tạo ra là CSF-1R liên kết protein dung hợp kháng thể bao gồm một nửa globulin miễn dịch, ví dụ mảnh kháng thể Fab hoặc mảnh kháng thể Fab', và một hoặc hai kháng thể vùng đơn (dAb) liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với nó, ví dụ như được mô tả trong tài liệu WO2009/040562, WO2010/035012, WO2011/030107, WO2011/061492 và WO2011/086091 mà nội dung được đưa vào đây để tham chiếu.

Theo một phương án, protein dung hợp bao gồm hai vùng kháng thể, ví dụ như ghép cặp chuỗi nặng biến đổi (variable heavy - VH) và chuỗi nhẹ biến đổi (variable light - VL), liên kết tùy ý bằng liên kết disunphua.

Theo một phương án, nguyên tố Fab hoặc Fab' của protein dung hợp tương đồng hoặc tương tự về độ đặc hiệu với kháng thể vùng đơn hoặc kháng thể. Theo một phương án, Fab hoặc Fab' có độ đặc hiệu khác với kháng thể vùng đơn hoặc kháng thể, điều đó có nghĩa là protein dung hợp là đa hóa trị. Theo một phương án, protein dung hợp đa hóa trị theo sáng chế có điểm bám albumin, ví dụ cặp VH/VL trong đó có tạo ra điểm bám albumin.

Các vùng định của phân tử kháng thể theo sáng chế, nếu có, có thể được chọn để có liên quan đến chức năng được đề xuất của phân tử kháng thể, và cụ thể là chức năng tác động có thể được yêu cầu. Ví dụ như, vùng hằng định là vùng IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM ở người. Cụ thể là, có thể sử dụng vùng hằng định IgG ở người, đặc biệt là các đồng vị IgG1 và IgG3 khi phân tử kháng thể sử dụng để chữa bệnh và yêu cầu chức năng tác động của kháng thể. Theo lựa chọn, các lớp kháng thể IgG2 và IgG4 có thể được sử dụng khi phân tử kháng thể dùng cho mục đích chữa bệnh và các

chức năng tác động của kháng thể không được yêu cầu.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể của sáng chế là kháng thể IgG2 hoặc IgG4.

Cần hiểu rằng các trình tự biến thể trong vùng hằng định cũng có thể được sử dụng. Ví dụ như, các phân tử IgG4 trong đó serin nằm ở vị trí 241 có được thay bằng prolin như được mô tả trong Angal và cộng sự, 1993, *Molecular Immunology*, 1993, 30:105-108 có thể được sử dụng. Do vậy, theo một phương án trong đó kháng thể là kháng thể IgG4, kháng thể có thể bao gồm S241P đột biến.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng cũng sẽ hiểu rằng kháng thể có thể diễn ra một loạt biến đổi sau dịch mã. Loại và mức độ biến đổi thường phụ thuộc vào dòng tế bào chủ sử dụng để biểu hiện kháng thể cũng như điều kiện nuôi cấy. Các biến đổi này có thể bao gồm các thay đổi trong quá trình đường hóa, ôxi hóa methionin, tạo thành diketopiperazin, đồng phân hóa aspartat và khử amit cho asparagin. Một biến đổi thường xuyên đó là làm mất gốc bazơ ở đầu cacboxy (chẳng hạn như lyzin hoặc arginin) do hoạt động của cacboxipeptitaza (như được mô tả trong tài liệu của Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). Do vậy, có thể hấp thụ lyzin đầu C trong chuỗi nặng của kháng thể có thể không có mặt.

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể bao gồm vùng CH1 và chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm vùng CL, hoặc kappa hoặc lambda.

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể bao gồm vùng CH1, vùng CH2 và vùng CH3 và chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm vùng CL, hoặc kappa hoặc lambda.

Kháng thể được đề xuất bởi sáng chế có một chuỗi nặng bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 27 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 19. Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh liên kết của kháng thể này, trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương đồng hoặc tương tự ít nhất 80% (tốt hơn là, 85%, 90%, 95% hoặc 98%) so với chuỗi nặng bao gồm trình tự được

đưa ra trong SEQ ID Số: 27 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 19. Theo một phương án, chuỗi nhẹ có hoặc bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 19 và chuỗi nặng có hoặc bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 27. Theo một phương án khác, chuỗi nhẹ có hoặc bao gồm trình tự SEQ ID Số: 19 và chuỗi nặng có hoặc bao gồm trình tự SEQ ID Số: 27, trong đó axit amin lyzin ở vị trí 453 của SEQ ID Số: 27 thiếu hoặc khuyết.

Sáng chế cũng đề xuất vùng đặc hiệu hoặc epitop của CSF-1R ở người được liên kết thông qua kháng thể đã tạo ra theo sáng chế, cụ thể là kháng thể 969.g2 bao gồm trình tự chuỗi nặng gH2 (SEQ ID Số: 27) và/hoặc trình tự chuỗi nhẹ gL7 (SEQ ID Số: 19).

Vùng đặc hiệu hoặc epitop này của polypeptit CSF-1R ở người có thể được xác định bởi bất kỳ phương pháp lập bản đồ epitop thích hợp đã biết trong lĩnh vực này kết hợp với bất kỳ một trong các kháng thể được tạo ra từ sáng chế. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm việc sàng lọc các peptit có độ dài khác nhau từ CSF-1R để liên kết với kháng thể của sáng chế với các mảnh kháng thể nhỏ nhất có thể liên kết đặc hiệu với kháng thể có chứa trình tự epitop đã được công nhận bởi các kháng thể (ví dụ như peptit trong vùng có khoảng 5 đến 20, tốt hơn là khoảng 7 axit amin theo chiều dài). Peptit CSF-1R có thể được sản xuất đồng bộ hoặc theo khả năng tiêu hóa protein phân giải của polypeptit CSF-1R. Peptit liên kết kháng thể có thể được xác định bằng, Ví dụ như, phân tích khối phổ. Theo một ví dụ khác, khối phổ NMR hoặc tinh thể học X-ray có thể được sử dụng để xác định epitop liên kết bằng kháng thể của sáng chế. Một khi đã xác định, mảnh epitopic liên kết kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng, nếu cần, một chế phẩm gây miễn dịch để thu thêm kháng thể liên kết epitop tương đồng nhau.

Các phân tử sinh học, chẳng hạn như kháng thể hoặc các mảnh kháng thể, có chứa axit và/hoặc các nhóm chức cơ bản, vì thế làm cho phân tử có tổng điện tích là dương hoặc âm. Số lượng của tổng thể các điện tích có thể “quan sát được sẽ phụ thuộc vào trình tự axit amin tuyệt đối của thực thể, môi trường cục bộ của các nhóm điện tích trong cấu trúc 3D và trong điều kiện môi trường của phân tử. Điểm đẳng

điện (pI) là độ pH mà ở đó một phân tử cụ thể hoặc bề mặt tiếp xúc dung môi của chúng không mang tổng điện tích. Theo một ví dụ, kháng thể CSF-1R và các mảnh kháng thể của sáng chế có thể được sản xuất để có điểm đẳng nhiệt thích hợp. Điều này có thể khiến kháng thể và/hoặc các mảnh kháng thể với các đặc tính mạnh hơn, cụ thể là có độ hòa tan thích hợp và/hoặc biến dạng ổn định và/hoặc đặc tính làm sạch được cải thiện.

Do vậy, theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể CSF-1R đã nhân hóa được sản xuất để có điểm đẳng nhiệt khác với điểm đẳng nhiệt của kháng thể đã xác định ban đầu. Kháng thể có thể, ví dụ được sản xuất bằng cách thế một gốc axit amin, chẳng hạn như thế gốc axit amin có tính axit với một hoặc nhiều gốc axit amin cơ bản. Theo lựa chọn, gốc axit amin cơ bản có thể được đưa vào hoặc gốc axit amin có tính axit có thể bị loại bỏ. Theo lựa chọn, nếu phân tử có một gốc axit có trị số pI cao ở mức không thể chấp nhận được, thì gốc có tính axit có thể được đưa vào để giảm pI, theo yêu cầu. Điều quan trọng đó là khi điều khiển việc bảo quản pI phải được thực hiện để giữ lại hoạt tính mong muốn của kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Do vậy, theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được sản xuất có hoạt tính tương đồng nhau hoặc tương đồng nhau đáng kể là kháng thể hoặc mảnh kháng thể “chưa biến đổi”.

Các chương trình chẳng hạn như ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html, và http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html có thể được sử dụng để dự đoán điểm đẳng điện của kháng thể hoặc mảnh kháng thể.

Cần phải hiểu rằng ái lực của kháng thể được tạo ra theo sáng chế có thể bị thay đổi bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực này. Sáng chế cũng đề cập đến các thay đổi khác của phân tử kháng thể theo sáng chế, có một ái lực đã được cải thiện cho CSF-1R. Các thay đổi này có thể thu được bằng quy chuẩn của sự trưởng thành ái lực bao gồm việc gây đột biến CDR (Yang và cộng sự, 1995, J. Mol. Biol., 254:392-403), chuỗi xáo trộn (Marks và cộng sự, 1992,

Bio/Technology, 10:779-783), sử dụng chủng đột biến của *E. coli* (Low và cộng sự, 1996, *J. Mol. Biol.*, 250:359-368), ADN xáo trộn (Patten và cộng sự, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:724-733), hiển thị siêu vi (Thompson và cộng sự, *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) và PCR giới tính (Cramer và cộng sự, 1998, *Nature*, 391:288-291). Vaughan và cộng sự (đề cập trên đây) thảo luận về các phương pháp của sự trưởng thành ái lực.

Nếu muốn, kháng thể sử dụng trong sáng chế có thể được liên hợp đến một hoặc nhiều (các) phân tử tác động. Cần phải hiểu rằng phân tử tác động có thể bao gồm phân tử tác động đơn hoặc hai hoặc nhiều phân tử này để liên kết hình thành bán phần đơn mà có thể gắn vào kháng thể theo sáng chế. Trong đó, nếu muốn thu được một mảnh kháng thể liên kết với phân tử tác động, thì có thể điều chế được thông qua quá trình hóa học đạt tiêu chuẩn hoặc quá trình tái tổ hợp ADN trong đó mảnh kháng thể được liên kết hoặc là trực tiếp hoặc là thông qua chất kết hợp đến phân tử tác động. Các kỹ thuật để tiếp hợp các phân tử tác động này đến kháng thể đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem, Hellstrom và cộng sự, *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson và cộng sự, tái bản, 1987, pp. 623-53; Thorpe và cộng sự, 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 và Dubowchik và cộng sự, 1999, *Pharmacology và Therapeutics*, 83, 67-123). Quy trình hóa học cụ thể bao gồm, ví dụ như, được mô tả trong các công bố đơn quốc tế WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, WO89/01476 và WO03/031581. Theo lựa chọn, trong đó phân tử tác động là một protein hoặc polypeptit, liên kết có thể đạt được bằng cách sử dụng quy trình tái tổ hợp ADN, ví dụ như được mô tả trong các tài liệu WO86/01533 và EP0392745.

Thuật ngữ phân tử tác động như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm, Ví dụ như, các chất chống ung thư, thuốc, độc dược, protein có hoạt tính sinh học, ví dụ các enzym, các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể khác, các polyme tổng hợp nhân tạo hoặc tự nhiên, axit nucleic và các mảnh kháng thể của chúng ví dụ như trong ADN, RNA và các mảnh kháng thể của chúng, nuclit phóng xạ, cụ thể là, isot phóng xạ, đồng vị phóng xạ, kim loại cồng hóa, hạt nano và nhóm chất chỉ thị, chẳng hạn

như chế phẩm huỳnh quang hoặc các chế phẩm có thể được phát hiện thông qua quang phổ NMR hoặc ESR.

Ví dụ về các phân tử tác động có thể bao gồm độc tố tế bào hoặc các chất độc tố tế bào bao gồm bất kỳ tác nhân nào gây tổn hại đến (ví dụ như gây chết) các tế bào. Ví dụ như, bao gồm combrestatin, dolastatin, epothilon, staurosporin, maytansinoid, spongistatin, rhizoxin, halichondrin, roridin, hemiasterlin, taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidi bromua, emetin, mitomycin, etoposid, tenoposid, vincristin, vinblastin, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dion, mitoxantron, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosteron, glucocorticoid, procain, tetracain, lidocain, propranolol, và puromycin và tương tự hoặc chất đồng đẳng của chúng.

Các phân tử tác động cũng bao gồm, nhưng không giới hạn, chất chống chuyển hóa (ví dụ như trong methotrexat, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, cytarabin, 5-fluorouracil decarbazin), chất alkyl hóa (ví dụ như trong mechlorethamin, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustin (BSNU) và lomustin (CCNU), cyclophosphamid, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, và cis-dichlorodiamin platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclin (ví dụ như trong daunorubicin (trước đây gọi là daunomycin) và doxorubicin), kháng sinh (ví dụ như trong dactinomycin (trước đây gọi là actinomycin), bleomycin, mithramycin, anthramycin (AMC), calicheamicin hoặc duocarmycin), và chất chống gián phân (ví dụ như trong vincristin và vinblastin).

Các phân tử tác động khác có thể bao gồm nuclit phóng xạ tạo cang chẳng hạn như ^{111}In và ^{90}Y , Lu^{177} , Bismut 213 , Californi 252 , Iridi 192 và Tungsten 188 /Rheni 188 ; hoặc thuốc chẳng hạn như nhưng không giới hạn, alkyl phosphocholin, chất ức chế topoisomerase I, taxoid và suramin.

Các phân tử tác động khác bao gồm protein, peptit và các enzym. Các enzym đáng quan tâm bao gồm, nhưng không giới hạn, các proteolytic, hydrolaza, lyaza, isomerase, transferaza. Protein, polypeptit và peptit đáng quan tâm bao gồm, nhưng

không giới hạn, globulin miễn dịch, độc dược chẳng hạn như abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, hoặc độc tố bạch hầu, protein chẳng hạn như insulin, nhân tố hoại tử khối u, α -interferon, β -interferon, yếu tố phát triển thần kinh, yếu tố tăng trưởng dẫn xuất từ tiểu cầu hoặc chất hoạt hóa plasminogen của mô, thuốc tan huyết khối hoặc thuốc kháng phát sinh mạch, ví dụ như trong angiostatin hoặc endostatin, hoặc, tác nhân làm cải biến đáp ứng sinh học chẳng hạn như lymphokin, interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), yếu tố phát triển thần kinh (NGF) hoặc yếu tố phát triển khác và globulin miễn dịch.

Các phân tử tác động khác có thể bao gồm các chất hữu ích có thể phát hiện ra được, ví dụ như trong chuẩn đoán. Ví dụ về các chất có thể phát hiện ra được bao gồm các enzyme, các nhóm ngoại, vật liệu huỳnh quang, vật liệu phát quang, vật liệu phát quang sinh học, nuclit phóng xạ, kim loại phóng xạ positron (sử dụng trong chụp cắt lớp bằng positron), và ion kim loại có tính thuận từ không phóng xạ. Xem Patent Mỹ số 4,741,900 đối với các ion kim loại có thể được liên hợp với kháng thể để dùng trong chuẩn đoán. Các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza củ cải ngựa, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, hoặc acetylcholinesterase; các nhóm thêm thích hợp bao gồm streptavidin, avidin và biotin; vật liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferone, fluorexine, fluorexine isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorexine, dansyl chloride và phycoerythrin; vật liệu phát quang thích hợp bao gồm luminol; vật liệu phát quang thích hợp sinh học bao gồm luciferase, luciferin, và aequorin; và nuclit phóng xạ thích hợp bao gồm ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In và ^{99}Tc .

Theo một ví dụ khác, phân tử tác động có thể làm tăng chu kỳ bán rã của kháng thể *in vivo*, và/hoặc giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể và/hoặc tăng cường việc cung cấp kháng thể qua rào chắn biểu mô đến hệ thống miễn dịch. Ví dụ các phân tử tác động thích hợp của loại này bao gồm các polyme, albumin, các protein liên kết albumin hoặc các chế phẩm liên kết albumin chẳng hạn như các chất được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO05/117984.

Theo một phương án, chu kỳ bán rã tạo ra bằng phân tử tác động độc lập với

CSF-1R là có lợi.

Nhìn chung, trong đó phân tử tác động là polyme có thể, diễn ra quá trình polyme hóa tự nhiên hoặc nhân tạo, ví dụ chuỗi polyalkylen thẳng hoặc mạch nhánh được tùy ý thể, polyalkenylen hoặc polyme polyoxyalkylen hoặc polysaccharit mạch nhánh hoặc không có nhánh, ví dụ như trong polysaccharit cùng loại homo- hoặc polysaccharit khác loại.

Các phân thể cụ thể tùy chọn có thể hiện có trên polyme tổng hợp nêu trên bao gồm một hoặc nhiều hydroxy, metyl hoặc các nhóm metoxy.

Ví dụ cụ thể về polyme tổng hợp bao gồm chuỗi poly(etylenglycol), poly(propylenglycol) poly(vinylalcohol) mạch thẳng hoặc mạch nhánh có thể tùy ý thể hoặc các dẫn xuất của chúng, cụ thể là có thể tùy ý thể poly(etylenglycol), chẳng hạn như metoxypoly(etylenglycol) hoặc các dẫn xuất của chúng.

Quá trình polyme hóa tự nhiên cụ thể bao gồm lactoza, amylose, dextran, glycogen hoặc các dẫn xuất của chúng.

Theo một phương án, polyme là albumin hoặc mảnh kháng thể của chúng, chẳng hạn như albumin huyết thanh ở người hoặc mảnh kháng thể của chúng.

“Các dẫn xuất” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ bao gồm các dẫn xuất phản ứng, ví dụ các nhóm phản ứng chọn lọc thiol chẳng hạn như maleimit và hoặc chất tương tự. Nhóm phản ứng có thể được liên kết trực tiếp hoặc thông qua đoạn liên kết với polyme. Cần phải hiểu rằng gốc của nhóm trong một số trường hợp sẽ tạo thành một phần của chế phẩm với vai trò là nhóm liên kết giữa mảnh kháng thể và polyme.

Kích thước của polyme có thể được thay đổi như mong muốn, nhưng thông thường sẽ trong phạm vi trọng lượng phân tử từ 500Da đến 50000Da, ví dụ từ 5000Da đến 40000Da, chẳng hạn như từ 20000Da đến 40000Da. Kích thước polyme được chọn lọc cụ thể trên cơ sở được dự tính sử dụng cho chế phẩm, ví dụ có khả năng để định vị các mô nhất định, chẳng hạn như khối u hoặc mở rộng lưu thông chu kỳ bán rã (xem tài liệu của Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54,

531-545). Do vậy, ví dụ như, trong đó chế phẩm được tạo thành để tách ra khỏi vòng tuần hoàn và xuyên vào mô, ví dụ sử dụng trong việc điều trị các khối u, có thể sử dụng thuận lợi trọng lượng phân tử polyme, ví dụ như với trọng lượng phân tử khoảng 5000Da. Đối với các ứng dụng trong đó chế phẩm vẫn trong quá trình lưu thông, thuận lợi để sử dụng cho trọng lượng phân tử polyme, ví dụ như có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 20000Da đến 40000Da.

Các polyme thích hợp bao gồm polyme polyalkylen, chẳng hạn như poly(etylenglycol) hoặc, đặc biệt là, metoxypoly(etylenglycol) hoặc dẫn xuất của chúng, và đặc biệt là với trọng lượng phân tử nằm trong phạm vi từ khoảng 15000Da đến khoảng 40000Da.

Trong một ví dụ, kháng thể sử dụng theo sáng chế được gắn vào gốc poly(etylenglycol) (PEG). Theo một ví dụ cụ thể, kháng thể là một mảnh kháng thể và các phân tử PEG có thể được gắn thông qua bất kỳ mạch bên axit amin có sẵn hoặc nhóm chức axit amin đầu được định vị trong mảnh kháng thể, ví dụ bất kỳ amino, imino, thiol, hydroxyl hoặc nhóm cacboxyl tự do. Axit amin này có thể xảy ra một cách tự nhiên trong mảnh kháng thể hoặc có thể được đưa vào mảnh kháng thể bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp ADN (xem, ví dụ như, các tài liệu US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). Trong một ví dụ, phân tử kháng thể của sáng chế là một mảnh kháng thể có Fab biến đổi trong đó việc biến đổi bổ sung phía đầu C của chuỗi nặng trong một hoặc nhiều axit amin để cho phép các phần đính kèm của các phân tử tác động. Thích hợp là, axit amin bổ sung tạo ra vùng bản lề đã biến đổi chứa một hoặc nhiều gốc xystein để có thể gắn vào phân tử tác động. Dùng nhiều cạnh để gắn hai hoặc nhiều phân tử PEG.

Thích hợp là, các phân tử PEG được liên kết đồng hóa trị thông qua nhóm thiol của ít nhất một gốc xystein đã định vị trong mảnh kháng thể. Mỗi phân tử polyme gắn vào mảnh kháng thể đã biến đổi có thể liên kết đồng hóa trị với nguyên tử sunphua của gốc xystein đã định vị trong mảnh kháng thể. Liên kết cộng hóa trị thường sẽ là liên kết disunphua hoặc, cụ thể là, một liên kết cacbon sunphua. Trong đó nhóm thiol

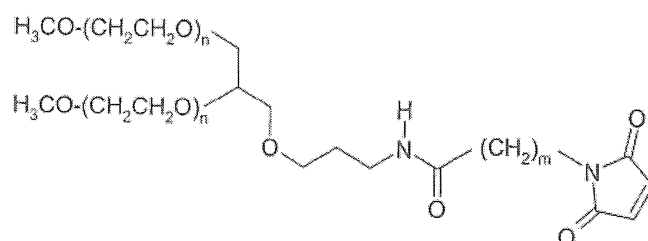
được sử dụng làm một điểm kết nối phù hợp kích hoạt các phân tử tác động, ví dụ các dẫn xuất chọn lọc thiol chẳng hạn như các dẫn xuất maleimide và các dẫn xuất cysteine có thể được sử dụng. Polyme kích hoạt có thể được sử dụng như là vật liệu ban đầu trong điều chế mảnh kháng thể biến đổi polyme như được mô tả ở trên. Polyme kích hoạt có thể là polyme bất kỳ có chứa một nhóm phản ứng thiol chẳng hạn như axit α -halocacboxylic hoặc este α -halocacboxylic, ví dụ như trong iodoacetamide, imide, ví dụ như trong maleimide, vinyl sulphone hoặc disulfide. Vật liệu ban đầu có thể lấy được từ ngoài thị trường (ví dụ từ Nektar, trước đây là Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) hoặc có thể được điều chế từ vật liệu ban đầu sẵn có trên phương diện thương mại bằng cách sử dụng quy trình hóa học thông thường. Cụ thể là, các phân tử PEG bao gồm 20K methoxy-PEG-amine (thu được từ Nektar, formerly Shearwater; Rapp Polymers; và SunBio) và M-PEG-SPA (thu được từ Nektar, trước đây gọi là Shearwater).

Theo một phương án, kháng thể là mảnh kháng thể Fab, mảnh kháng thể Fab' biến đổi hoặc diFab mà là PEGylated, tức là có PEG (poly(etyleneglycol)) kết nối cộng hóa trị vào đó, ví dụ như theo phương pháp đã đề cập đến trong EP 0948544 hoặc EP1090037 [xem "Poly(etyleneglycol) Chemistry, Biotechnical và Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(etyleneglycol) Chemistry và Biological Applications", 1997, J. Milton Harris và S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC và "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam và A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. Trong một ví dụ, PEG được gắn vào cysteine trong vùng bản lề. Theo một ví dụ, mảnh kháng thể Fab biến đổi PEG có nhóm maleimide liên kết đồng hóa trị với nhóm thiol đơn dòng trong vùng bản lề đã cải biến. Gốc lysine có thể được liên kết đồng hóa trị với nhóm maleimide và với mỗi các nhóm amine trên gốc lysine có thể được gắn polyme methoxypoly(etyleneglycol) có trọng lượng phân tử xấp xỉ 20.000Da. Tổng trọng lượng phân tử của PEG gắn vào mảnh kháng thể Fab có thể

xấp xỉ 40.000Da.

Các phân tử PEG cụ thể bao gồm 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etyl amit của lyzin đã cải biến N,N'-bis(metoxypoly(etylen glycol) MW 20.000), cũng được biết đến như là PEG2MAL40K (thu được từ Nektar, trước đây gọi là Shearwater).

Các nguồn thế của liên kết PEG bao gồm NOF cung cấp GL2-400MA3 (trong đó m trong cấu trúc dưới đây là 5) và GL2-400MA (trong đó m là 2) và n xấp xỉ 450:

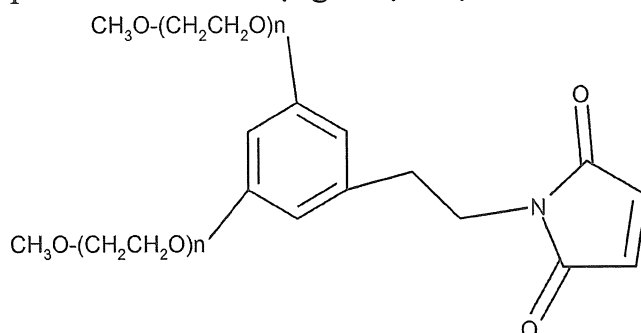


m là 2 hoặc 5

Điều đó có nghĩa là mỗi PEG là khoảng 20.000Da.

Do vậy, theo một phương án, PEG là 2,3-Bis(methylpolyoxyetylen-oxy)-1-{[3-(6-maleimido-1-oxohexyl)amino]propyloxy} hexan (hai nhánh PEG, -CH₂)₃NHCO(CH₂)₅-MAL, Mw 40.000 được biết đến là SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Các phân tử PEG tác động thuộc loại sau:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất một kháng thể, chẳng hạn như một kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh, mà là PEGylatd (ví dụ với PEG được đề cập trong bản mô tả này), gắn thông qua một gốc axit amin xystein thuộc hoặc thuộc khoảng axit amin 226 trong chuỗi, ví dụ axit amin 226 của chuỗi nặng (bằng cách đánh số

theo thứ tự).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử Fab'PEG bao gồm một hoặc nhiều polyme PEG, ví dụ như 1 hoặc 2 polyme, chẳng hạn như polyme hoặc các polyme 40kDa.

Các phân tử Fab-PEG theo sáng chế có thể đặc biệt thuận lợi ở chỗ chúng có chu kỳ bán rã độc lập với mảnh kháng thể Fc.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất một scFv liên hợp với polyme, chẳng hạn như phân tử PEG, phân tử tinh bột hoặc phân tử.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên hợp với phân tử tinh bột, ví dụ như để làm tăng chu kỳ bán rã. Các phương pháp tiếp hợp protein như được mô tả trong US 8,017,739 được đưa vào đây để tham chiếu.

Phân tử chỉ thị được dùng trong bản mô tả này là một phân tử có khả năng phát hiện ra được, ví dụ như thuốc nhuộm huỳnh quang, dấu phóng xạ hoặc vật thể có thể phát hiện ra được khác.

Sáng chế cũng đề xuất trình tự ADN phân lập mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của một phân tử kháng thể theo sáng chế. Thích hợp là, trình tự ADN mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể theo sáng chế. Trình tự ADN theo sáng chế có thể bao gồm sự tổng hợp ADN, ví dụ như được sản xuất bằng quá trình hóa học, cADN, hệ gen ADN hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Trình tự ADN mã hóa phân tử kháng thể theo sáng chế có thể thu được bằng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng này đã biết. Ví dụ như, trình tự ADN mã hóa một phần hoặc toàn bộ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được tổng hợp như mong muốn từ trình tự ADN đã xác định hoặc trên cơ sở xác định trình tự axit amin tương ứng.

Việc mã hóa ADN cho các trình tự cấu trúc của chất nhận phổ biến rộng rãi đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng và có thể được tổng hợp dễ dàng trên cơ sở xác định các trình tự axit amin đã biết của chúng.

Các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn có thể được sử dụng để chuẩn bị trình

tự ADN mã hóa cho phân tử kháng thể theo sáng chế. Trình tự ADN mã hóa phân tử kháng thể theo sáng chế. Trình tự ADN mong muốn có thể được tổng hợp hoàn toàn hoặc một phần bằng cách sử dụng các kỹ thuật tổng hợp oligonucleotid. Thiết kế mỗi tạo đột biến điểm và kỹ thuật phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR) có thể được sử dụng thích hợp.

Ví dụ về các trình tự ADN thích hợp được thể hiện trên Fig.1.

Sáng chế cũng đề cập đến việc tách dòng hoặc vector biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều trình tự ADN của sáng chế. Do vậy, tạo việc tách dòng hoặc vector biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều trình tự ADN mã hóa kháng thể của sáng chế. Theo một phương án, vector bao gồm các trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số: 28 và/hoặc SEQ ID Số: 20. Thích hợp là, việc tách dòng hoặc vector biểu hiện bao gồm hai ADN các trình tự, mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của phân tử kháng thể của sáng chế, tốt hơn là, SEQ ID Số: 28 và SEQ ID Số: 20, các trình tự tín hiệu tương ứng và thích hợp. Trong một ví dụ vector bao gồm trình tự giữa các gen giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (xem công bố đơn quốc tế WO03/048208).

Các phương pháp chung để các vector có thể được thiết kế, các phương pháp chuyển nạp và các phương pháp nuôi cấy đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Trong khía cạnh này, sự tham chiếu được thực hiện đối với “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F. M. Ausubel (tái bản), Wiley Interscience, New York và Maniatis Manual được xuất bản bởi Cold Spring Harbor Publishing.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều vector tách dòng hoặc biểu hiện có một hoặc nhiều trình tự ® mã hóa kháng thể theo sáng chế. Bất kỳ tế bào chủ/hệ vector thích hợp cũng có thể được sử dụng cho biểu hiện của trình ®ADN mã hóa phân tử kháng thể của sáng chế. Các hệ vi khuẩn, ví dụ E. coli, và các hệ vi sinh vật nào khác có thể được sử dụng hoặc nhân chuẩn, ví dụ như ở động vật có vú, hệ biểu hiện tế bào chủ cũng có thể được sử dụng. Các tế bào chủ ở động vật có vú thích hợp bao gồm CHO, u tủy hoặc các tế bào lai.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình tạo ra phân tử kháng thể theo sáng chế bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ có chứa vector của sáng chế trong các điều kiện thích hợp để mang lại biểu hiện của prote@tử ADN mã hóa phân tử kháng thể theo sáng chế, và tách phân tử kháng thể.

Phân tử kháng thể có thể chỉ bao gồm polypeptide chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, trong trường hợp này chỉ trình tự mã hóa chuỗi nặng hoặc trình tự mã hóa chuỗi nhẹ cần được sử dụng để chuyển nạp các tế bào chủ. Để sản xuất chế phẩm có chứa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Dòng tế bào có thể được chuyển nạp với hai vector, vector thứ nhất mã hóa một chuỗi nhẹ polypeptit và vector thứ hai mã hóa một chuỗi nặng polypeptit. Theo lựa chọn, có thể sử dụng vector đơn, vector bao gồm các trình tự mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ polypeptit.

Kháng thể và các mảnh kháng thể theo sáng chế được biểu hiện ở mức độ tốt từ tế bào chủ. Do vậy các đặc tính của kháng thể và/hoặc các mảnh kháng thể liên kết thích hợp để biểu hiện trên quy mô thương mại.

Do vậy, sáng chế đề xuất quy trình nuôi cấy tế bào chủ và biểu hiện kháng thể hoặc mảnh kháng thể của chúng, tách phần sau và có thể tinh chế tùy ý cùng phần sau để tạo ra kháng thể đã tách hoặc mảnh kháng thể. Theo một phương án, quy trình còn bao gồm bước tiếp hợp phân tử tác động với kháng thể được tách hoặc mảnh kháng thể, ví dụ như tiếp hợp với polyme PEG, cụ thể như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất quy trình để tinh lọc kháng thể (cụ thể là, kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế) bao gồm việc thực hiện sắc ký trao đổi ion trong chế độ không liên kết sao cho các tạp chất được giữ lại trên cột và kháng thể được rửa giải.

Theo một phương án, việc tinh chế sử dụng khả năng thu ái lực trên cột CSF-1R.

Theo một phương án, tinh chế sử dụng cibacron màu xanh hoặc tương tự để tinh chế dung hợp albumin hoặc tiếp hợp các phân tử.

Nhựa trao đổi ion thích hợp sử dụng trong quy trình bao gồm nhựa Q.FF (được

cung cấp bởi GE-Healthcare). Ví dụ như, có thể tiến hành bước này ở độ pH là khoảng 8.

Quy trình có thể còn bao gồm bước thu đầu tiên sử dụng sắc ký trao đổi ion, Ví dụ như, tiến hành ở độ pH khoảng từ 4 đến 5, chẳng hạn như 4,5. Ví dụ như, sắc ký trao đổi ion có thể sử dụng nhựa, chẳng hạn như nhựa CaptoS hoặc SP sepharose FF (được cung cấp bởi GE-Healthcare). Kháng thể hoặc mảnh kháng thể sau đó có thể được rửa giải từ nhựa bằng cách sử dụng dung dịch muối ion, chẳng hạn như natri clorua, ví dụ ở nồng độ 200mM.

Do vậy, bước hoặc các bước sắc ký có thể bao gồm một hoặc nhiều bước làm sạch, khi thích hợp.

Quá trình tinh lọc cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều bước lọc, chẳng hạn như bước bổ sung dung môi.

Do vậy, theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đã tinh chế chống lại CSF-1R hoặc mảnh kháng thể, ví dụ như kháng thể hoặc mảnh kháng thể được nhân hóa, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế, hầu như là được tinh chế từ, cụ thể như là nội độc tố tự do hoặc nửa tự do và/hoặc protein tế bào ® hoặc ADN.

Dạng tinh chế như được sử dụng trên đây là độ tinh khiết ít nhất là 90%, chẳng hạn như 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% w/w hoặc tinh khiết hơn.

Nói chung, gần như không chứa nội độc tố là để chỉ hàm lượng độc tố 1 EU trên mỗi mg kháng thể hoặc ít hơn, chẳng hạn như 0,5 hoặc 0,1 EU trên mỗi mg chế phẩm.

Nhìn chung, gần như không chứa tế bào chủ p®ein hoặc ADN là để chỉ tế bào chủ protein và/®c hàm lượng ADN 400µg trên mỗi mg của kháng thể hoặc ít hơn chẳng hạn như 100µg trên mỗi mg hoặc ít hơn, cụ thể 20µg trên mỗi mg, nếu cần.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng CSF-1R (hoặc các dược phẩm có khả năng tương tự) theo sáng chế để sử dụng nhằm bào chế thuốc.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng CSF-1R (hoặc các dược phẩm có khả năng tương tự) để điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng CSF-1R (hoặc dược phẩm có khả năng tương tự) để sản xuất thuốc dùng điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng là người bị hoặc có nguy cơ bị bệnh ung thư, phương pháp bao gồm bước đưa vào đối tượng một lượng hữu hiệu kháng thể kháng CSF-1R theo sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư xương, u tủy, ung thư đại trực tràng, ung thư bạch cầu, ung thư hạch bạch huyết, ung thư da chẳng hạn như ung thư tế bào hắc tố melanoma, ung thư thực quản, ung thư dạ dày, ung thư tế bào hình sao, ung thư nội mạc tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư bàng quang, ung thư thận, ung thư phổi, ung thư gan, ung thư tuyến giáp, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến tụy và ung thư buồng trứng.

Theo một phương án, bệnh ung thư là ung thư di căn từ bất kỳ các bệnh ung thư ban đầu đã liệt kê ở trên, cụ thể là ung thư xương.

Điều bất ngờ được chứng minh là kháng thể kháng CSF-1R ức chế hoạt tính của CSF-1R được sử dụng trong điều trị các bệnh xơ hóa. Cụ thể là, có thể chứng minh được là kháng thể kháng CSF-1R được dùng trong in vivo ở động vật mắc chứng xơ hóa phổi.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng CSF-1R (hoặc các dược phẩm chứa kháng thể này) để điều trị bệnh xơ hóa.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng CSF-1R (hoặc dược phẩm chứa kháng thể này) để sản xuất thuốc dùng điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh xơ hóa.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng là người bị hoặc có nguy cơ bị bệnh xơ hóa, phương pháp bao gồm việc đưa vào đối tượng một lượng hữu hiệu kháng thể kháng CSF-1R theo sáng chế.

Theo sáng chế, thuật ngữ "bệnh xơ hóa" bao gồm các bệnh được đặc trưng bởi

phản ứng bất thường để làm lành vết thương trong đó sợi mô liên kết thừa được tạo ra trong cơ quan nội tạng hoặc mô. Các bệnh xơ hóa minh họa bao gồm nhưng không giới hạn ở chứng xơ hóa phổi chẳng hạn như xơ hóa phổi tự phát và xơ nang, xơ thận bao gồm việc teo ống thận và xơ hóa mô kẽ, xơ gan, chai gan, viêm xơ đường mật, xơ gan mật nguyên phát, xơ hóa vách ngăn tim, xơ hóa trung thất, xơ tủy nguyên phát, xơ hóa sau phúc mạc, xơ khối tiến triển, xơ hóa toàn thân do thận, bệnh Crohn, sẹo lồi, nhồi máu cơ tim, xơ cứng bì, xơ cứng bì toàn thân và xơ khớp.

Theo một phương án, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể theo sáng chế được dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư hoặc các bệnh xơ hóa.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh viêm nhiễm, các bệnh tương tự, Ví dụ như, viêm thấp khớp, xơ vữa động mạch, đa xơ cứng, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, viêm loét đại tràng, viêm đốt sống dạng thấp, viêm cột sống dính khớp, viêm khớp, viêm khớp vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm xương khớp, bệnh chàm, viêm da tiếp xúc, bệnh vẩy nến, hội chứng sốc độc, nhiễm khuẩn huyết, sốc nhiễm trùng huyết, sốc nội độc tố, bệnh suyễn, viêm phổi mãn tính, bệnh bụi phổi, bệnh sarcoidosis ở phổi, bệnh xương xốp, hẹp van tim tái phát, thương tổn tái tưới máu ở tim và thận, chứng huyết khối, viêm cầu thận, bệnh tiểu đường, ghép với vật chủ, đa xơ cứng, thoái hóa cơ bắp, loạn dưỡng cơ, bệnh Alzheimer và đột quỵ.

Kháng thể và các mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh.

Phân tử kháng thể của sáng chế cũng có thể được sử dụng trong chuẩn đoán, ví dụ như trong chuẩn đoán in vivo và hình ảnh về trạng thái bệnh bao gồm CSF-1R.

Kháng thể của sáng chế hữu ích trong điều trị và/hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh lý, Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm dược phẩm hoặc chuẩn đoán có chứa phân tử kháng thể theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất làm loãng, chất mang dược dụng. Do vậy, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể của sáng chế để sản xuất thuốc, chế phẩm thường sẽ được dùng như một phần của các dược phẩm vô trùng thường bao gồm chất mang dược dụng. Dược phẩm theo sáng chế có thể còn

bao gồm tá dược được dụng.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình điều chế dược phẩm hoặc chế phẩm chuẩn đoán bao gồm việc bổ sung hoặc trộn phân tử kháng thể của sáng chế với một hoặc nhiều tá dược, chất làm loãng, chất mang được dụng.

Phân tử kháng thể có thể là chế phẩm hoạt chất duy nhất trong chế phẩm hoặc chuẩn đoán. Theo lựa chọn, kháng thể có thể được sử dụng kết hợp, như đồng thời, lần lượt hoặc riêng lẻ với một hoặc nhiều hoạt chất trị liệu. Theo phân tử kháng thể trong chế phẩm dược phẩm hoặc chuẩn đoán có thể đi kèm các chế phẩm hoạt tính khác bao gồm các chế phẩm kháng thể khác, ví dụ như các thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR, HER-2), thụ thể của yếu tố tăng trưởng mạch máu nội mô (VEGFR), kháng thể có yếu tố tăng trưởng dẫn xuất từ tiểu cầu thụ thể (PDGFR), các thành phần không phải là kháng thể chẳng hạn như imatinib, dasatinib, nilotinib, basutinib, gefitinib, erlotinib, temsirolimus, vandetanib, vemurafenib, crizotinib, vorinostat, romitpsin, bortezomib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, regorafenib, cabozantinib, Perfenidon, steroid hoặc các loại thuốc khác, cụ thể là các loại thuốc có chu kỳ bán rã độc lập với liên kết CSF-1R.

Thành phần hoạt chất được dùng trong bản mô tả này đề cập đến thành phần có tác dụng dược lý, chẳng hạn như tác dụng điều trị, với một liều lượng có liên quan.

Dược phẩm thích hợp bao gồm kháng thể với một lượng điều trị hiệu quả theo sáng chế. Thuật ngữ “lượng điều trị hiệu quả” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến lượng chế phẩm có tác dụng trị liệu cần để điều trị, giảm nhẹ hoặc chống lại các bệnh hoặc điều kiện chỉ định, hoặc để tạo ra tác dụng cải thiện, dược học hoặc có tác dụng ngăn ngừa. Đối với bất kỳ kháng thể, lượng điều trị hiệu quả có thể dự đoán được từ đầu hoặc trong thử nghiệm nuôi cấy tế bào hoặc ở động vật, thường là ở các loài động vật gần gũi, thỏ, chó, lợn hoặc động vật linh trưởng. Thử nghiệm ở động vật cũng có thể được sử dụng để chứng minh khoảng lượng cần thiết thích hợp và cách sử dụng. Thông tin này sau đó có thể được sử dụng để chứng minh liều lượng hữu ích và cách sử dụng ở người.

Lượng điều trị hiệu quả chính xác cho đối tượng là người sẽ phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, tình hình sức khỏe chung của đối tượng, độ tuổi, cân nặng và giới tính của đối tượng, chế độ ăn uống, thời gian và liệu trình sử dụng, phối hợp (các) thuốc, độ nhạy phản ứng và độ dung nạp/ phản ứng để điều trị. Có thể xác định liều lượng bằng thí nghiệm thông thường và theo chỉ định của bác sĩ. Thông thường, lượng có tác dụng điều trị sẽ là từ 0,01 mg/kg đến 500mg/kg, ví dụ 0,1mg/kg đến 200mg/kg, chẳng hạn như 100mg/kg.

Các dược phẩm có thể ở dạng liều đơn vị để thuận tiện chứa một lượng hoạt chất đã định trước theo sáng chế cho mỗi liều.

Các liều chữa bệnh của kháng thể theo sáng chế không thể hiện rõ ràng hoặc giới hạn các tác động độc hại in vivo.

Các chế phẩm có thể được sử dụng riêng rẽ cho bệnh nhân hoặc có thể được được sử dụng kết hợp (ví dụ như đồng thời, lần lượt hoặc riêng lẻ) với các chất, thuốc hoặc hoocmôn khác.

Theo một phương án, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể liên kết theo sáng chế được sử dụng với một hoặc nhiều phương pháp điều trị ung thư khác nhau, ví dụ như, hóa trị liệu, xạ trị hoặc phẫu thuật. Nếu áp dụng hóa trị liệu, kháng thể có thể được dùng trước hoặc sau khi sử dụng hóa chất trị liệu hoặc trong cùng một thời gian. Điều trị bằng hóa trị liệu có thể sử dụng kết hợp với protein liên kết kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn các chất gây phá hủy AND/alkyl hóa (ví dụ như carboplatin, cisplatin), chất chống chuyển hóa (ví dụ như capecitabin, gemcitabin, 5-fluorouracil), chất ức chế nguyên phân (ví dụ như trong paclitaxel, vincristin).

Kháng thể được sử dụng để điều trị các bệnh viêm khác nhau cũng có thể sử dụng riêng hoặc kết hợp với các loại thuốc kháng viêm khác nhau.

Kháng thể được sử dụng để điều trị các bệnh xơ hóa khác nhau có thể sử dụng riêng hoặc kết hợp với nhiều chất chống xơ hóa. Ví dụ về chất như thế là thuốc Perfedidon.

Các liều trong đó phân tử kháng thể của sáng chế được sử dụng phụ thuộc vào

bản chất của tình trạng điều trị, tình trạng vật chủ hiện tại và trên bất kỳ kháng thể đang được dùng để phòng bệnh hoặc để điều trị trong điều kiện hiện tại.

Tần suất liều dùng sẽ phụ thuộc vào chu kỳ bán rã của phân tử kháng thể và thời gian ảnh hưởng. Nếu phân tử kháng thể có chu kỳ bán rã ngắn (ví dụ như từ 2 đến 10 tiếng) có thể cần thiết để cung cấp một hoặc nhiều liều mỗi ngày. Theo lựa chọn, nếu phân tử kháng thể có chu kỳ bán rã dài) ví dụ như từ 2 đến 15 ngày) và/hoặc biên dạng dược lực học (PD) kéo dài, điều chỉ có thể là cần thiết để cung cấp một liều một lần một ngày, một lần một tuần hoặc thậm chí cứ 1 hoặc 2 tháng một lần.

Chu kỳ bán rã được dùng trong bản mô tả này để chỉ thời gian của phân tử trong quá trình tuần hoàn, ví dụ trong huyết thanh/huyết tương.

Dược lực học được dùng trong bản mô tả này đề cập đến hình dạng và khoảng thời gian tác động sinh học cụ thể của phân tử theo sáng chế.

Chất mang dược dụng sẽ không tự tạo ra các kháng thể để tiếp nhận riêng các chế phẩm và không bị nhiễm độc. Chất mang thích hợp có thể lớn, các đại phân tử chuyển hóa chậm chẳng hạn như protein, polypeptit, hạt mỡ, tinh bột, axit polylactic, axit polyglycolic, axit amin polymeic, axit amin copolime và virus không hoạt động hoặc các hạt bức xạ.

Muối dược dụng có thể được sử dụng, ví dụ như muối cộng axit, chẳng hạn như hydroclorua, hydrobromua, phosphat và sulphat, hoặc muối của axit hữu cơ, chẳng hạn như axetat, propionat, malonat và benzoat.

Chất mang dược dụng trong các chế phẩm điều trị có thể chứa thêm chất lỏng chẳng hạn như nước, nước muối, glyxerin và ethanol. Theo lựa chọn, chất phụ trợ, chẳng hạn như các chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa hoặc các chất đệm pH, có thể có trong các hợp chất. Các chất mang này cho phép các dược phẩm để tạo ra dưới dạng viên nén, viên tròn, viên bao đường, viên nang, dịch lỏng, gel, si rô, hỗn dịch đặc và hỗn dịch cho bệnh nhân sử dụng.

Các dạng thích hợp để dùng bao gồm các dạng thích hợp để sử dụng ngoài

đường tiêu hóa, ví dụ như bằng cách qua hoặc truyền, như là bằng cách qua liều lớn hoặc truyền liên tục. Trong đó chế phẩm để qua hoặc truyền, có thể ở dạng huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong dầu hoặc chất dẫn trong nước và có thể chứa các chất dùng trong bào chế, chẳng hạn như chất tạo huyền phù, chất bảo quản, làm ổn định và/hoặc phân tán. Theo lựa chọn, phân tử kháng thể có thể ở dạng khô, để hòa tan trước khi sử dụng với một chất lỏng vô trùng thích hợp.

Khi được bào chế, các chế phẩm theo sáng chế có thể sử dụng trực tiếp cho đối tượng. Đối tượng được điều trị có thể là động vật. Tuy nhiên, theo một hoặc nhiều phương án, các chế phẩm để làm thích ứng để dùng cho đối tượng là người.

Thích hợp đối với các chế phẩm theo sáng chế là độ pH của chế phẩm cuối cùng không tương đồng với trị số của điểm đẳng điện trong kháng thể hoặc mảnh kháng thể, ví dụ nếu độ pH của chế phẩm là 7 sau đó pI là từ 8-9 hoặc có thể thích hợp như trên. Trong khi không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, có thể hiểu rằng việc này cuối cùng có thể cung cấp công thức hóa sau cùng có tính ổn định hơn, ví dụ như kháng thể hoặc mảnh kháng thể còn lại trong dung dịch.

Theo một ví dụ, chế phẩm được có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0 bao gồm: 1 đến 200mg/mL của kháng thể theo sáng chế, 1 đến 100mM dung dịch đệm, 0,001 đến 1% chất hoạt động bề mặt, a) 10 đến 100mN chất ổn định, b) 10 đến 500mM chất ổn định và 5 đến 500 mM chất tương lực, hoặc c) 5 đến 500 nM chất tương lực.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng qua một số cách bất kỳ bao gồm, nhưng không giới hạn, dùng qua đường miệng, qua tĩnh mạch, vào trong cơ, qua động mạch, qua tủy sống, qua nội tủy mạc, qua não thất, áp da, xuyên qua da (Ví dụ như, xem WO98/20734), dưới da, qua màng bụng, trong mũi, qua đường ruột, bằng cách đắp, dùng dưới lưỡi, qua âm đạo hoặc qua đường trực tràng. Ống phun (hypospray) cũng có thể được sử dụng đối với các dược phẩm theo sáng chế. Thông thường, các chế phẩm điều trị có thể được điều chế dưới dạng thuốc tiêm, hoặc dạng dung dịch lỏng hoặc huyền phù. Cũng có thể điều chế theo dạng rắn thích hợp đối với

dung dịch, hoặc huyền phù, chất mang dạng lỏng trước khi tiêm.

Nói chung, việc truyền trực tiếp các chế phẩm sẽ được thực hiện bằng cách tiêm, dưới da, trong màng bụng, qua tĩnh mạch hoặc qua cơ, hoặc truyền qua khoảng hở của mô. Cũng có thể sử dụng các chế phẩm vào trong tổn thương. Các liệu điều trị có thể là một lộ trình điều trị một liều hoặc kế hoạch điều trị nhiều liều.

Cần phải hiểu rằng chế phẩm hoạt tính trong chế phẩm sẽ là phân tử kháng thể. Như vậy, sẽ nhạy cảm để thoái biến trong đường tiêu hóa. Do vậy, nếu chế phẩm được sử dụng qua đường tiêu quá, chế phẩm sẽ cần phải chứa các chất để bảo vệ kháng thể khỏi thoái biến nhưng giải phóng kháng thể khi đã hấp thụ từ đường tiêu hóa.

Thông tin chi tiết về các chất mang được dùng được đề cập đến trong 'ài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Theo một phương án, chế phẩm được tạo ra dưới dạng một chế phẩm để sử dụng khu trú bao gồm việc hít vào.

Các chế phẩm hít vào được thích hợp bao gồm bột có thể hít, sol khí định lượng chứa khí đẩy hoặc dung dịch có thể hít vào mà không chứa khí đẩy. Bột có thể hít theo sáng chế chứa hoạt chất có thể bao gồm toàn các hoạt chất đã đề cập đến ở trên hoặc hỗn hợp của các hoạt chất đã đề cập đến ở trên với tá dược về mặt sinh lý.

Bột có thể hít có thể bao gồm monosacarit (ví dụ như trong glucoza hoặc arabinoza), disacarit (ví dụ như trong lactoza, sacaroza, mantoza), oligo- và polisaccarit (ví dụ như trong destran), rượu đa chức (ví dụ như trong socbitol, manitol, xylitol), muối (ví dụ như trong natri clorua, canxi cacbonnat) hoặc hỗn hợp của chúng với một chất khác. Mono- hoặc disacarit được sử dụng thích hợp, việc sử dụng lactoza hoặc glucoza, đặc biệt nhưng không phải là duy nhất dưới dạng hydrat.

Các hạt bức xạ để lắng phủ trong phổi yêu cầu kích thước hạt nhỏ hơn 10 micron, chẳng hạn như 1-9 micron ví dụ từ 0,1 đến 5 μm , cụ thể từ 1 đến 5 μm . Kích thước hạt của chế phẩm hoạt tính (chẳng hạn như kháng thể hoặc mảnh kháng thể) có tầm quan trọng hàng đầu.

Khí đẩy có thể được sử dụng để điều chế sol khí có thể hít phải đã biết trong lĩnh vực này. Khí đẩy thích hợp được chọn từ giữa các hydrocacbon chẳng hạn như n-propan, n-butan hoặc isobutan và halohydrocacbon chẳng hạn như clo hóa và/hoặc flo hóa các dẫn xuất của metan, etan, propan, butan, xyclopropan hoặc xyclobutan. Khí đẩy đã đề cập ở trên có thể được sử dụng riêng hoặc trong các hỗn hợp của chúng.

Khí đẩy đặc biệt thích hợp là các dẫn xuất halogen hóa ankan chọn ra từ các TG 11, TG 12, TG 134a và TG227. Các hydrocacbon được halogen hóa, TG134a (1,1,1,2-tetrafloroetan) và TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafloropropan) và hỗn hợp của chúng đề cập đến trên đây là đặc biệt thích hợp.

Sol khí có thể hít có chứa khí đẩy cũng có thể chứa các chất khác, chẳng hạn như chất đồng dung môi, chất ổn định, chất có hoạt tính bề mặt (chất hoạt động bề mặt), chất chống oxy hóa, chất làm trơn và các chất để điều chỉnh độ pH. Tất cả các thành phần này đã biết đến trong lĩnh vực này.

Sol khí có thể hít phải có chứa khí đẩy theo sáng chế có thể chứa đến 5 % theo trọng lượng của hoạt chất. Sol khí theo sáng chế có chứa, Ví dụ như, 0,002 đến 5 % theo trọng lượng, 0,01 đến 3 % theo trọng lượng, 0,015 đến 2 % theo trọng lượng, 0,1 đến 2 % theo trọng lượng, 0,5 đến 2 % theo trọng lượng hoặc 0,5 đến 1 % theo trọng lượng của hoạt chất.

Theo lựa chọn, việc sử dụng khu trú ở phổi cũng có thể là sử dụng dung dịch lỏng hoặc chế phẩm dạng huyền phù, ví dụ như sử dụng thiết bị chẳng hạn như ống phun, Ví dụ như, ống phun nối với máy nén (ví dụ như ống phun[®]ari LC-Jet Plus(R) được nối với[®]áy nén Pari Master(R) được sản xuất bởi Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

Kháng thể của sáng chế có thể được đưa vào phân tán trong dung môi, ví dụ như dưới dạng dung dịch hoặc huyền phù. Nó có thể được tạo huyền phù bằng dung dịch sinh lý học tương ứng, ví dụ như dung môi được dụng hoặc các dung dịch đệm. Dung dịch đệm đã biết trong lĩnh vực này có thể chứa 0,05 mg đến 0,15 mg disodium edetat, 8,0 mg đến 9,0 mg NaCl, 0,15 mg đến 0,25 mg polysorbat, 0,25 mg đến 0,30

mg axit xitric khan, và 0,45 mg đến 0,55 mg natri xitrat trên 1 ml nước để đạt được độ pH khoảng 4,0 đến 5,0. Huyền phù có thể sử dụng, ví dụ như, kháng thể đông khô.

Các thể huyền phù hoặc chế phẩm dung dịch dung dịch dùng để điều trị bệnh cũng có thể chứa một hoặc nhiều tá dược. Tá dược đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm dung dịch đệm (ví dụ như dung dịch đệm xitrat, dung dịch đệm photphat, dung dịch đệm axetat và dung dịch đệm bicacbonat), axit amin, urê, rượu, axit ascorbic, photpholipit, protein (ví dụ như anbumin huyết thanh), EDTA, natri clorua, hạt mỡ, manitol, socbitol, và glyxerin. Dung dịch hoặc huyền phù có thể được bao nang trong hạt mỡ hoặc tiểu cầu phân hủy sinh học. Nhìn chung là, chế phẩm sẽ được tạo ra hầu như dưới dạng vô trùng bằng cách sử dụng quy trình sản xuất vô trùng.

Quy trình này có thể bao gồm việc sản xuất và khử trùng bằng cách lọc dung dịch/dung môi đệm dùng cho chế phẩm, huyền phù vô trùng của kháng thể trong dung dịch/dung môi đệm khử trùng, và định lượng chế phẩm vào trong chai đựng bằng các phương pháp thường đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng biết đến.

Chế phẩm có thể phun theo sáng chế có thể được tạo ra, ví dụ như, là đơn vị liều duy nhất. Mỗi lọ chứa một đơn vị liều trong một thể tích, ví dụ như 2ml dung môi/dung dịch đệm.

Kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thích hợp để truyền bằng cách phun.

Cũng dự tính rằng kháng thể theo sáng chế có thể được dùng bằng cách sử dụng liệu pháp gen. Để đạt được điều này, trình tự mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ADN của phân tử kháng thể dưới sự kiểm soát của các phân tử ADN đưa vào bệnh nhân sao cho chuỗi kháng thể được biểu hiện từ trình tự ADN và được ghép tại chỗ.

Theo một phương án, sáng chế bao gồm việc sử dụng kháng thể hoặc các mảnh kháng thể của chúng như một chất phản ứng hoặc chuẩn đoán, ví dụ liên hợp với một phân tử chỉ thị. Do vậy, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế được dán nhãn. Theo một phương án, sáng chế đề xuất một cột bao gồm một

kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế.

Do vậy, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CSF-1R hoặc mảnh kháng thể để sử dụng làm chất phản ứng cho các mục đích sử dụng sau:

1) tinh chế protein CSF-1R (hoặc mảnh liên kết của kháng thể này) – liên hợp với ma trận và sử dụng là cột ái lực, hoặc (là dạng cải biến của chất kháng CSF-1R) như là một chất kết tủa (ví dụ như dạng cải biến với vùng được công nhận bởi chất phản ứng kháng Fc);

2) phát hiện và/hoặc xác định CSF-1R trên các tế bào hoặc trong các tế bào, còn sống hoặc cố định (các tế bào in vitro hoặc trong mô hoặc trong các phần tế bào). Việc sử dụng phương pháp này có thể bao gồm việc xác định CSF-1R như một dấu ấn sinh học, theo tác dụng của phương pháp điều trị kháng CSF-1R. Đối với mục đích này, đối tượng phải được sử dụng dưới dạng cải biến (ví dụ như bằng cách thêm gốc khác, làm protein dung hợp gen hoặc liên hợp hóa học, chẳng hạn như thêm phân tử thông báo, ví dụ sử dụng một miếng huỳnh quang nhằm mục đích để phát hiện ra được);

3) tinh chế hoặc phân loại các tế bào có CSF-1R đã đánh dấu bằng cách liên kết với các đối tượng đã cải biến bởi các cách đã minh họa trong (1) và (2).

“Bao gồm” trong ngữ cảnh của bản mô tả này có nghĩa là “bao gồm”.

Trong đó trường hợp cần thiết về mặt kỹ thuật, các phương án của sáng chế có thể được kết hợp với nhau.

Các phương án được mô tả trong sáng chế bao gồm đặc tính/dấu hiệu nhất định. Sáng chế cũng bao gồm các phương án riêng biệt gồm hoặc về cơ bản gồm các đặc tính/dấu hiệu này.

Tài liệu tham khảo kỹ thuật, chẳng hạn như các bằng độc quyền sáng chế và các đơn sáng chế, được đưa vào đây để tham chiếu.

Bất kỳ phương án nào được viện dẫn cụ thể và rõ ràng trong bản mô tả này có thể tạo ra cơ sở cho việc từ bỏ riêng hoặc trong sự kết hợp với một hoặc nhiều phương án khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 – Tạo ra kháng thể kháng CSF-1R

Miễn dịch hóa

Loài chuột nhắt Female Sprague Dawley được miễn dịch với nguyên bào xơ ở chuột có RFL6 cùng loại được chuyển nhiễm nhanh chóng bằng vector biểu hiện phần ngoại bào CSF-1R ở người liên kết với phân tử glycosylphosphatidyl-inositol (GPI). Fig.3 thể hiện SEQ ID Số: 39 là trình tự ngoại bào CSF-1R ở người dùng trong miễn dịch hóa ở chuột nhắt.

Chuột nhắt được tiêm chủng ngừa dưới da năm lần trong khoảng thời gian ba tuần với các tế bào chuyển nhiễm $3-9 \times 10^6$ trên mỗi động vật. Freund's Complete Adjuvant (50% trong PBS) được tiêm vào vị trí liền kề tế bào miễn dịch đầu tiên. Hai tuần gây miễn dịch sau cùng, thu được tế bào máu đơn nhân thuộc vùng ngoại vi (PBMCs) và các tế bào lách.

Sàng lọc sơ bộ các phù nổi kháng thể

Các phù nổi kháng thể được sàng lọc ban đầu cho khả năng liên kết CSF-1R ở người được biểu hiện trên các tế bào chuyển nhiễm HEK293 theo công nghệ phân tích vi thể tích huỳnh quang (Fluorescence Microvolume Assay Technology - FMAT).

Khoảng 1000 giếng với hoạt tính kháng CSF-1R được xác định trong màn hình FMAT sơ bộ của đĩa cỡ 600 x 96 giếng. Tổng cộng, các tế bào xấp xỉ 3×10^8 B (tế bào đơn nhân tách ở chuột) được sàng lọc để sản xuất kháng thể liên kết CSF-1R bằng FMAT.

Sàng lọc thứ cấp các phù nổi kháng thể

Thử nghiệm vừa qua được tạo ra để xác định các giếng dương tính-FMAT bao gồm việc trung hòa hoạt tính kháng CSF-1R, tức là kháng thể có khả năng ngăn chặn CSF-1R liên kết với thụ thể CSF-1R ở người. Ủ các phù nổi kháng thể với các tế bào THP-1 biểu hiện CSF-1R trước khi ủ với CSF-1 ở người. Mức độ CSF-1 liên kết với

các tế vào THP-1 được đo bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy sử dụng kháng thể polyclonal kháng CSF-1. Không thích hợp các phù nổi kháng thể dùng như một đối chứng âm tính.

Sàng lọc thứ cấp được áp dụng cho các phù nổi từ 779 giếng kháng thể và 88 giếng này chứng minh hoạt tính chặn CSF-1 có thể dò được.

Sàng lọc giai đoạn ba của phù nổi kháng thể

Phù nổi kháng thể thể hiện việc vô hiệu hóa hoạt tính trong tấm chắn thứ hai đã được kiểm nghiệm đối với khả năng chặn CSF-1 phụ thuộc còn sống của bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người. Bạch cầu đơn nhân được tinh chế từ máu người và các tế bào 1×10^4 các tế bào ủ với mỗi kháng thể dịch nổi với sự có mặt của 20ng/ml CSF-1 ở người. Sau 72 giờ ủ, một số bạch cầu đơn nhân còn sống được đo bằng thử nghiệm CellTiter Glo.

Sàng lọc lần ba được áp dụng cho phù nổi từ 59 trong số các giếng kháng thể đã xác định trong tấm chắn thứ hai và 18 giếng đã chứng minh được khả năng làm giảm khả năng sống của bạch cầu đơn nhân qua trung gian CSF-1.

Tách dòng kháng thể trong các khu vực biến đổi và phân tích lại hoạt tính chặn

Thử tiến hành tách dòng trong vùng biến đổi (vùng V) từ 18 giếng kháng thể chứng tỏ việc trung hòa hoạt tính CSF-1. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch trong vùng V được khuếch đại bằng RT-PCR sử dụng các đoạn mồi cụ thể vào khu vực ổn định kháng thể của chuột nhắt và đoạn mồi dư thừa được thiết lập để nung các trình tự mã hóa của đoạn peptit dẫn đường globulin miễn dịch ở chuột nhắt. Các gen trong vùng V được thu hồi từ 14 kháng thể và tách dòng vào chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong các vector biểu hiện IgG4 ở người.

Cặp vector kháng thể được chuyển nhiễm nhanh vào các tế bào HEK293F và môi trường điều hòa được kiểm nghiệm để trung hòa hoạt tính CSF-1 trên các tế bào THP-1 (như đã đề cập ở trên). Chín trong số các kháng thể có khả năng ức chế một phần hoặc ức chế toàn phần CSF-1 liên kết với so với môi trường điều hòa đối chứng. Phân tích trình tự của chín kháng thể kháng CSF-1R trung hòa

Chín kháng thể trung hòa được xác định trình tự để đánh giá tính đa dạng của trình tự. Tất cả chỉ có duy nhất chín kháng thể. Các kháng thể này được tách dòng và biểu hiện cho các nghiên cứu định hình khác.

Ví dụ 2 – Các đặc tính in vitro của chimeric CSF-1R kháng người Ab969 và CSF-1R kháng chuột Ab535.

i) Biểu hiện chimeric Ab969

Các vùng biến đổi của chín kháng thể trung hòa đã xác định trong ví dụ 1 được tách dòng vào các vector biểu hiện của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tách biệt và biểu hiện kháng thể IgG4 có chiều dài hoàn chỉnh ở người.

Các gen VH được tách dòng vào vector pVhg4FL(V19H), chứa ADN mã hóa đoạn dẫn đầu tự nhiên và chuỗi nặng gamma-4 ở người trong vùng hằng định với khớp nối của đột biến ổn định S241P. Các gen VL (kappa) đã được tách dòng vào vector pKH10.1(V4L), chứa ADN mã hóa đoạn dẫn đầu tự nhiên và chuỗi kappa ở người trong vùng hằng định (Km3 alotyp).

Kháng thể được biểu hiện bằng cách chuyển nạp đồng thời nhanh để khớp các cặp vector chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và các tế bào CHO-K1. Thực hiện việc tinh chế kháng thể vào PBS pH 7,4 sao cho mức độ tổng hợp trong quá trình điều chế cuối cùng nhỏ hơn 1%.

Mỗi mảnh của chín kháng thể bao gồm một kháng thể được ký hiệu là kháng thể 969. Kháng thể chimeric bao gồm các khu vực biến đổi ở chuột nhất và chuỗi nặng gamma-4 ở người trong vùng hằng định và chuỗi kappa ở người trong vùng hằng định được đề cập đến là kháng thể 969 hoặc kháng thể 969cHcL hoặc kháng thể 969.g0 trong ví dụ dưới đây.

ii) Thử nghiệm chặn phối tử

Khả năng của mỗi trong số chín kháng thể để ức chế CSF-1 liên kết với các tế bào Các tế bào THP-1 được đánh giá bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy. Ủ các tế bào THP-1 với mỗi kháng thể ở 0,5; 0,125; 0,031; 0,0078 và 0,00195µg/ml trong 30 phút. Kháng thể IgG4 không thích hợp làm đối chứng đồng vị. Sau khi làm

sạch, ủ các tế bào với CSF-1 0,5 μ g/ml ở người trong 30 phút. Sau khi làm sạch thêm, phát hiện liên kết CSF-1 bằng cách ủ lần lượt với kháng thể chống CSF-1 được biotin hóa và streptavidin liên hợp Alexa488. Phôi tử liên kết thụ thể được đo bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy và cường độ trung bình huỳnh quang (MFI) đã thể hiện.

Thử nghiệm này xác định bốn kháng thể, bao gồm Ab969, cao so với phần còn lại của kháng thể đã kiểm nghiệm, chứng tỏ sự ức chế hoàn toàn của CSF-1 liên kết ở nồng độ 31,3ng/ml. Các kết quả của Ab969 được thể hiện trên Fig.4.

iii) Sự ức chế sự sống sót của bạch cầu đơn nhân trung gian CSF-1 & IL-34
CSF-2R kháng người:

Các kháng thể CSF-1R kháng người đã tinh chế được kiểm nghiệm khả năng ức chế CSF-1 và IL-34 kích thích sự sống còn và khả năng tăng sinh của bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người. Trong mỗi thử nghiệm, sử dụng tác nhân gây phân bào (CSF-1 hoặc IL-34) ở nồng độ kích thích tối đa của bạch cầu đơn nhân.

Điều chế PBMC ở người từ máu người mới trên gradien Ficoll và bạch cầu đơn nhân tinh chế bằng cách chọn lựa dương tính. Ủ bạch cầu đơn nhân với 0,25 μ g/ml kháng thể và 20ng/ml CSF-1 trong 72 giờ và số lượng các tế bào còn sống tương đối được chứng minh bằng cách sử dụng phân tích CellTiter Glo. Đầu đọc phát quang tương quan với số lượng các tế bào còn sống. Kết quả được thể hiện ở Fig.5a.

Điều chế PBMC ở người từ máu người mới trên gradien Ficoll và bạch cầu đơn nhân tinh chế bằng cách chọn lựa dương tính. Ủ bạch cầu đơn nhân với 0,25 μ g/ml kháng thể và 20ng/ml CSF-1 trong 72 giờ và số lượng các tế bào còn sống tương đối được chứng minh bằng cách sử dụng phân tích CellTiter Glo. Đầu đọc phát quang tương quan với số lượng các tế bào còn sống. Kết quả được thể hiện ở Fig.5b.

Bốn trong số các kháng thể có Ab969 chứng minh được mức độ ức chế cao của bạch cầu đơn nhân còn sống so với các kháng thể còn lại cho sự kích thích của cả CSF-1 (Fig.5a) và IL-34 (Fig.5b), phù hợp với các hoạt tính ức chế phôi tử của chúng.

Kháng CSF-1R ở chuột:

Tinh chế các bạch cầu đơn nhân nguyên phát CD11b⁺ ở chuột từ lá lách của chuột. Ủ các bạch cầu đơn nhân với chuẩn độ của CSF-1 (mCSF-1) ở chuột trong 24 giờ. Sự giải phóng MCP-1 vào môi trường tế bào được đo bằng ELISA và sự giải phóng phụ thuộc vào liều của MCP-1 bằng mCSF-1 đã chứng minh. Theo một phương án nghiên cứu, 10µg/ml chống CSF-1R Ab535 ở chuột được bổ sung cùng với sự chuẩn độ mCSF-1. Sự giải phóng MCP-1 hoàn thành ức chế bằng Ab535 ở tất cả các nồng độ của CSF-1 đã kiểm nghiệm (Fig.6).

Tiến hành thử nghiệm giải phóng MCP-1 bằng cách sử dụng bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở chuột với 100 ng/ml nồng độ CSF-1 bất biến và chuẩn độ Ab535. Ức chế phụ thuộc vào liều của giải phóng MCP-1 được chứng minh và tính toán IC₅₀. IC₅₀ trung bình của Ab535 từ hai thí nghiệm độc lập đã chứng minh được là 8,08 ng/ml.

Kết luận: việc điều trị bạch cầu đơn nhân ở chuột với CSF-1 gây ra sự giải phóng phụ thuộc vào liều của MCP-1, ức chế hoàn toàn bằng cách điều trị với 10 µg/ml Ab535. Ab535 ức chế theo CSF-1 giải phóng MCP-1 từ các bạch cầu đơn nhân của chuột theo cách phụ thuộc vào liều, với IC₅₀ là 8,08 ng/ml (n=2). Trị số IC₅₀ tương tự với trị số được thể hiện bởi kháng thể CSF-1R kháng người.

iv) Ái lực

Kháng thể đã được kiểm nghiệm về khả năng liên kết CSF-1R trong thử nghiệm BIAcore bằng cách đo liên kết động học với CSF-1 tái tổ hợp đã tinh chế của protein dung hợp R/Fc.

Dạng thử nghiệm thu nạp kháng thể kháng CSF-1R bằng cách cố định IgG, F(ab')₂ kháng người, sau đó đến chuẩn độ của hCSF-1R/Fc trên bề mặt thu được. Tiến hành BIA (Phân tích tương tác sinh học phân tử) bằng cách sử dụng BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Tất cả các thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C. Mảnh F(ab')₂ tinh sạch bằng ái lực trong IgG kháng người của dê, mảnh kháng thể đặc hiệu F(ab')₂ được giữ cố định trên Cảm biến CM5 (GE Healthcare Bio-

Sciences AB) qua khớp nối hóa học amincó mức độ của đơn vị phản ứng ~5000 (RU). Dung dịch đệm HBS-EP (10mM HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,005% Chất hoạt động bề mặt P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) được sử dụng làm dung dịch đệm vận hành với tỷ lệ vận hành là 10 μ l/phút. Việc tiêm kháng thể kháng CSF-1R được tiến hành để đưa ra mức thu nạp khoảng 100 RU trên IgG,F(ab)₂ kháng người cố định.

CSF-1R ở người tái tổ hợp/Fc (Các hệ thống R&D) vượt qua kháng thể kháng CSF-1R đã thu ở 5nM trong 30 phút cho giai đoạn phân ly. Tiến hành tiêm ở 5nM hai lần tương ứng với dung dịch đệm đối chứng. Sơ đồ cảm biến được sử dụng để tạo ra tỷ lệ phân ly. CSF-1R ở người tái tổ hợp/Fc được chuẩn độ trên kháng thể kháng CSF-1R đã thu ở 2,5mM theo tỷ lệ vận hành là 30ul/phút trong 5 phút tiếp theo bằng giai đoạn phân ly 10 phút. Sơ đồ cảm biến được sử dụng để tạo ra tỷ lệ kết hợp. Tái tạo bề mặt theo tỷ lệ vận hành 10ul/phút bằng cách tiêm 10ul của 40mM HCl kế tiếp là bằng cách tiêm 5ul của 10mM NaOH. Tính toán các đường cong liên kết đã trừ đi nhiễu tham chiếu đôi bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá BIA (phiên bản 4.1) theo quy trình tiêu chuẩn. Các thông số Kintic được xác định theo thuật toán thích hợp.

Ba trong bốn kháng thể đã kiểm nghiệm có ái lực (K_D) nhỏ hơn 10pM. Điều này so sánh thuận lợi với chất phản ứng song song kháng chuột CSF-1R, Ab535. Kết quả cho Ab969 và Ab553 được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Kháng thể	Tốc độ ghép K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	Tốc độ tách K_d (s^{-1})	Ái lực K_D (M)	Ái lực K_D (pM)
Ab969	$2,58 \times 10^6$	$2,49 \times 10^{-5}$	$9,65 \times 10^{-12}$	9,6
Ab535	$2,24 \times 10^6$	$1,06 \times 10^{-5}$	$4,73 \times 10^{-12}$	4,7

Ái lực của kháng thể cũng được đo bằng thử nghiệm trên cơ sở tế bào bằng cách sử dụng các tế bào THP-1. Kháng thể được đánh dấu trực tiếp với thuốc nhuộm

huỳnh quang Alexa-488 và ái lực được đo bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy định lượng. Phép phân tích BIAcore khác nữa khẳng định rằng việc kết hợp huỳnh quang của kháng thể không làm thay đổi ái lực với protein tái tổ hợp CSF-1R. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Các trị số ái lực tuyệt đối thu được từ hai phương pháp khác nhau và sự khác biệt này thường được quan sát khi so sánh hai hệ thống. Tuy nhiên, phương pháp trên cơ sở tế bào đã chứng minh được rằng kháng thể liên kết CSF-1R với ái lực cao.

Bảng 2

Kháng thể	Ái lực dựa trên tế bào $K_D \pm S.D.$ (nM)	Ái lực BIAcore K_D (pM)
Ab969	$2,20 \pm 0,19$	4,80

v) Sự ức chế liên kết CSF-1 (IC_{50})

Bốn kháng thể được phân tích bằng cách đo hiệu lực tương đối của chúng khi ức chế CSF-1 liên kết với các tế bào THP-1. Tất cả bốn kháng thể thể hiện độ ứng chế cao của CSF-1 liên kết với các trị số IC_{50} nhỏ hơn 5ng/ml (~30pM) trong dạng thức thử nghiệm này.

Bảng 3

Kháng thể	$IC_{50} \pm S.D.$ (ng/ml) trung bình
Ab969	$2,89 \pm 1,22$

vi) Kháng thể phản ứng chéo

Kiểm nghiệm bốn kháng thể cho phản ứng chéo với CSF-1R có chiều dài hoàn chỉnh ở khi nâu, khi mõm chó và chó. Tất cả bốn kháng thể liên kết với CSF-1R ở khi nâu và khi đuôi dài ngoài CSF-1 ở người, thể hiện rõ ràng liên kết trên mức đối chứng đồng vị.

Bảng 4

Kháng thể	Phản ứng chéo		
	Khi đuôi dài	Khi mõm chó	Chó

Ab969	Có	Có	Không
-------	----	----	-------

vii) Sự tiếp nhận CSF-1R

Ab969:

Ủ các tế bào THP-1 với Ab969 trong 0 giờ, 0,5 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 24 giờ và 48 giờ. Các tế bào cũng được điều trị với CSF-1 ở người và đối chứng đồng vị lần lượt làm đối chứng dương tính và đối chứng âm tính. Tại mỗi thời điểm, mức độ bề mặt tế bào CSF-1R được đo bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy (Fig.7). Mức độ tương đối của bề mặt tế bào CSF-1R trên các tế bào được điều trị với Ab969 so với đối chứng đồng vị đã phân tích và thể hiện trên Fig.8.

Việc điều trị các tế bào THP-1 với CSF-1 tái tổ hợp gây ra sự sụt giảm nhanh chóng và liên tục theo mức độ của bề mặt tế bào CSF-1R; phối tử tự nhiên liên kết với thụ thể cùng gốc và khởi động quá trình tiếp nhận của phức thụ thể phối tử.

Các tế bào THP-1 được điều trị với Ab969 thể hiện các mức độ cao hơn của biểu hiện CSF-1R trên bề mặt tế bào so với các tế bào chưa được điều trị và các tế bào đã điều trị bằng đối chứng đồng vị trong suốt toàn bộ chu trình thời gian 48 giờ. Dữ liệu này cho thấy rằng việc điều trị các tế bào với Ab969 không gây ra quá trình tiếp nhận của bề mặt tế bào biểu hiện hCSF-1R cho đến 48 giờ sau điều trị.

Khi thời gian tiếp diễn, có sự gia tăng đáng chú ý trong bề mặt tế bào biểu hiện CSF-1R trên các tế bào đã được điều trị và các tế bào đã điều trị với THP-1, theo sự biểu hiện của tế bào đã điều trị bằng CSF-1. Điều này có thể là do sự biểu hiện thay đổi trong suốt quá trình phát triển tế bào trong khoảng thời gian 48 giờ thí nghiệm và có thể dẫn đến phản ứng căng thẳng.

Để đưa ra thêm bằng chứng chứng minh rằng Ab969 không có khả năng tạo ra quá trình tiếp nhận thụ thể, và cũng loại trừ khả năng dòng tế bào THP-1 không thích hợp về mặt sinh tế, các bạch cầu đơn nhân nguyên phát cũng được sử dụng trong thử nghiệm về quá trình tiếp nhận. Dữ liệu từ thử nghiệm này cũng chứng minh rằng Ab969 không gây ra quá trình tiếp nhận nhanh chóng của bề mặt CSF-1R trên các bạch cầu đơn nhân của người nguyên thủy khỏe mạnh.

Ab535:

Dòng tế bào leukaemic bạch cầu đơn nhân/đại thực bào RAW264.7 ở chuột thể hiện mức độ cao CSF-1R (mCSF-1R) ở chuột và thể hiện hệ thống trên cơ sở tế bào thích hợp để kiểm nghiệm đủ kháng thể chống chuột CSF-1R Ab535 có thể kích thích quá trình tiếp nhận thụ thể.

Các tế bào RAW264.7 được ủ với Ab535 trong 0 giờ, 0,5 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 24 giờ và 48 giờ. Các tế bào cũng được điều trị với CSF-1R ở người và đối chứng đồng vị lần lượt làm đối chứng dương tính và đối chứng âm tính. Tại mỗi thời điểm, mức độ CSF-1R trên bề mặt tế bào được đo bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy (Fig.9). Mức độ tương đối của bề mặt tế bào CSF-1R so với đối chứng đồng vị được tính toán và đề cập đến trên Fig.10.

Dữ liệu cho thấy rằng việc điều trị các tế bào THP-1 với CSF-1 tái tổ hợp dẫn đến sự suy giảm đột biến và nhanh chóng theo mức độ bề mặt tế bào CSF-1R.

Sự giảm mức độ mCSF-1R rõ ràng trên bề mặt tế bào được quan sát trên RAW264.7 các tế bào được điều trị với CSF-1 ở người trong 2 giờ liên quan đến các tế bào không được điều trị và các tế bào được điều trị bằng cách kiểm soát lớp kháng thể. Việc giảm này được duy trì trong 48 giờ nghiên cứu. Điều này chứng tỏ rằng CSF-1 ở người tạo ra quá trình tiếp nhận mCSF-1R và hợp thức hóa hệ thống thử nghiệm để theo dõi quá trình tiếp nhận thụ thể.

Các tế bào RAW264.7 được điều trị với Ab535 có các mức độ tương tự bề mặt tế bào mCSF-1R so với các tế bào chưa được điều trị và các tế bào đối chứng đồng vị trong suốt toàn bộ chu trình 48 giờ. Quá trình tiếp nhận thụ thể trung gian kháng thể sẽ được kỳ vọng xảy ra trong khung thời gian, dữ liệu này cho thấy rằng Ab535 không tạo ra quá trình tiếp nhận mCSF-1R.

Để tạo ra thêm bằng chứng chứng tỏ rằng Ab535 không có khả năng xảy ra quá trình tiếp nhận thụ thể, đại thực bào bạch cầu đơn nhân nguyên phát CD11b⁺ ở chuột dùng trong thử nghiệm tiếp nhận. Điều này cũng chứng minh được là việc điều trị bằng đại thực bào bạch cầu đơn nhân ở chuột với b535 không gây ra quá trình tiếp

nhận của bề mặt tế bào biểu hiện mCSF-1R cho đến 24 giờ sau điều trị.

viii) Hoạt hóa CSF1-R

CSF-1 liên kết với CSF-1R, dẫn đến sự hình thành của thụ thể dimer, tạo ra quá trình phosphoryl hóa thụ thể bằng cách kéo các vùng kinaza lại với nhau trong vùng khép kín. Điều này sau đó dẫn đến quá trình tiếp nhận thụ thể và hoạt tính của một số chu trình tải nạp các đặc trưng bao gồm chu trình Ras-MAPK. Có thể thấy rằng kháng thể kháng CSF-1R có thể kích thích thụ thể phân nhóm và dẫn phát tăng tín hiệu hạ lưu. Đây có thể là một đặc tính không mong muốn cho kháng thể có thể ức chế khả năng truyền tín hiệu của thụ thể, vì vậy chất chủ vận của thụ thể bằng Ab969 được kiểm nghiệm bằng cách sử dụng hai in vitro dạng thử nghiệm độc lập.

Ở dạng thử nghiệm thứ nhất, kháng thể được ủ với các tế bào đã chuyển nhiễm với CSF-1R ở người có chiều dài hoàn chỉnh và quá trình phosphoryl hóa của thụ thể và các phân tử truyền tín hiệu hạ lưu được theo dõi bằng phép thấm tách Tây.

Dòng tế bào THP-1 biểu thị điểm khởi đầu cho việc theo dõi trạng thái hoạt động của CSF-1R. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của CSF-1R trong dòng tế bào này tương đối thấp khiến cho việc tiến hành phân tích sinh hóa khó khăn. Vì thế, hệ thống thử nghiệm được tạo ra để sao cho mức độ của quá trình phosphoryl hóa CSF-1R có thể phát hiện ra được tại hai gốc tyrosin, Y723 và Y809. Ngoài ra, quá trình phosphoryl hóa của p44/42 MAPK (Erk1/2) tại T202 và Y204 được đo là đầu đọc độc lập cho hoạt tính CSF-1R. Khi được kích thích với CSF-1 bao gồm một đối chứng dương tính trong tất cả các thí nghiệm.

Các tế bào HEK293F được chuyển nhiễm với vector plasmid biểu hiện CSF-1R có độ dài hoàn chỉnh. Sau 24 giờ ủ trong trạng thái huyết tương tự do, các tế bào được kích thích từ 100µg/ml đến 0,001µg/ml của Ab969.g0 trong 5 phút. Các tế bào cũng được điều trị với 500ng/ml CSF-1 tái tổ hợp để tạo ra đối chứng dương tính. Các tế bào không được điều trị bao gồm đối chứng âm tính. Dịch thủy phân protein từ các tế bào đã xử lý và không xử lý được tách ra bằng phương pháp điện di polyacrylamit SDS và thấm vào nitrocellulose. Tiến hành phương pháp thấm miễn dịch cầu Tây

bằng cách sử dụng kháng thể cho photpho-Y723 CSF-1R (Công nghệ Phát tín hiệu Tế bào #3151), photpho-Y809 (Công nghệ Phát tín hiệu Tế bào #3154), toàn bộ CSF-1R (Công nghệ Phát tín hiệu Tế bào #3152) và photpho-ERK1/2 (p44/42 MAPK) (Công nghệ Phát tín hiệu Tế bào #5301).

Các tế bào HEK293F chuyển nhiễm CSF-1R không được kích thích có mức cơ bản của quá trình phosphoryl hóa CSF-1R thấp. Kích thích các tế bào với CSF-1 tạo ra trong quá trình phosphoryl hóa CSF-1R ở gốc Y723 và Y809 mà quan sát được dễ dàng bằng phép phân tích thẩm tách Tây (Fig.11). Kích thích rõ rệt quá trình phosphoryl hóa ERK1/2 bằng cách điều trị CSF-1. Việc điều trị bằng các tế bào HEK293F đã chuyển mạch với kháng thể Ab969.g0 không kích thích quá trình hóa CSF-1R hoặc tiềm tàng hoạt tính ERK1/2.

Trong thử nghiệm thứ hai, kháng thể Ab969 (monomeic và liên kết ngang) được ủ với bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người và sự tiết MCP-1 được dùng như một dấu hiệu của hoạt tính CSF-1R. Việc điều trị CSF-1 bằng bạch cầu đơn nhân ở người khiến chúng giải phóng protein hoá hướng động tế bào đơn nhân-1 (MCP-1). Nếu kháng thể kháng CSF-1R có khả năng để hoạt hóa thụ thể CSF-1R trên các bạch cầu đơn nhân, giải phóng MCP-1 có thể xảy ra.

Các thử nghiệm hóa sinh đã mô tả chỉ sử dụng kháng thể kháng CSF-1R đơn thể. Tuy nhiên, có thể thấy là IgG1 liên kết ngang có thể tăng cường khả năng đem các phân tử CSF-1R vào trạng thái khép kín và dẫn đến quá trình phosphoryl hóa tyrosin và tín hiệu hạ lưu. Để đánh giá điều này, tiến hành thử nghiệm MCP-1 bằng cách sử dụng Ab969.g0 để liên kết ngang với kháng thể kháng người.

Bạch cầu đơn nhân ở người được điều chế hoàn toàn từ máu người như sau: 60-100 ml máu người lấy từ các ống BD Vacutainr 10 ml Lithium Heparin 171 IU. Máu được chia thành 3-4 ống Leucosep Ficoll (Greiner Bio-One) và làm đầy với PBS. Các ống được ly tâm ở 1000g, 20°C trong 10 phút, không dừng lại, và thu gom lớp PBMC. Các tế bào bị kết vón và các bạch cầu đơn nhân sau đó được tách ra bằng cách sử dụng chọn lựa dương tính các hạt CD14 ở người (Miltenyi Biotec 130-050-

201) theo Quy chuẩn của nhà sản xuất. Kháng thể Ab969.g0 được liên kết ngang bằng cách bổ sung kháng thể chống người IgG ở dê (các hệ thống R&D G-102-C) theo tỷ lệ 2:1 Ab969.g0:Fc. Các bạch cầu đơn nhân được đặt trong 20.000 tế bào trên mỗi lỗ trong nhiều mô trường với sự có mặt của liều chuẩn độ kháng thể Ab969.g0 hoặc Ab969.g0 đã liên kết ngang (loạt pha loãng nửa logarit bao gồm 16 nồng độ, tối đa là 10µg/ml). Lỗ kiểm nghiệm không chứa kháng thể, có và không có của 100ng/ml CSF-1, có và không có kháng thể Fc kháng người (ở nồng độ đồng nhất nhau có mặt trong nồng độ đỉnh của kháng thể Ab969.g0 (5µg/ml)). Các tế bào được ủ trong 24 giờ, các đĩa được quay để kết vón các tế bào, và dịch nổi được thu lại. MCP-1 tiết ra được đo bằng MSD (K151AYB-2) theo quy chuẩn của nhà sản xuất.

Kết quả từ thí nghiệm đề cập đến trên Fig.12. Phát hiện ra là không làm tăng nồng độ MCP-1 cho bất kỳ phương pháp điều trị Ab969.g0 nào, dưới dạng monome hoặc liên kết ngang, nồng độ MCP-1 trong môi trường của các tế bào đã được xử lý đồng nhất với các tế bào chưa được xử lý. Như mong đợi, các tế bào được xử lý với CSF-1 cho thấy sự gia tăng đáng kể trong tái sản xuất ở các nồng độ MCP-1.

Ví dụ 3 – Sự nhân hóa kháng thể 969 và sự chọn lựa mô ghép được nhân hóa

Bốn kháng thể kháng CSF-1R được chọn cho nhân hóa trên cơ sở ái lực và các đặc tính đã đo của chúng trong Ví dụ 2.

i) Sự tạo ra mô ghép được nhân hóa

Kháng thể 969 và 970 được nhân hóa bằng cách ghép các CDR từ kháng thể ở chuột nhất vào kháng thể dòng tinh ở người trong cấu trúc vùng V.

Các CDR được ghép từ thể cho vào trình tự thụ thể đã xác định được bằng Kabat (Kabat và cộng sự, 1987), ngoại trừ CDR-H1 trong đó sử dụng phương pháp xác định Chothia/Kabat đã kết hợp (xem Adair và cộng sự, 1991 Humanised antibodies. WO91/09967).

Vùng V ở người VK1 2-1-(1) O12 và vùng J JK4 (V BAZA, <http://vbaza.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) được chọn làm chất nhận cho chuỗi nhẹ của CDR. Vùng V H2 3-1 2-70 ở người và vùng J JH3 (V BAZA, <http://vbaza.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) được chọn

làm chất nhận cho chuỗi nặng của CDR.

Một số gốc cấu trúc từ vùng V ở chuột được duy trì trong các trình tự đã nhân hóa, như đã đề cập đến trong Bảng 1.

Các gen mã hóa các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong vùng V ở người, lần lượt gọi là gL1 và gH1 được cấu tạo và cấu trúc bằng phương pháp tổng hợp tự động. Hơn nữa các biến thể khác của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong vùng V được tạo ra bằng cách cải biến các gen gL1 và gH1 thông qua kỹ thuật đột biến trực tiếp oligonucleotid.

Các gen VK (gL1 to gL9) đã được tách dòng vào của chuỗi nhẹ ở người trong vector biểu hiện pKH10.1, có chứa ADN mã hóa chuỗi Kappa trong vùng hằng định (Km3 alotyp). Các gen VH (gH1 và gH2) đã được tách dòng vào chuỗi nặng gamma 4 ở người trong vector biểu hiện pVhy4P FL, có chứa ADN mã hóa chuỗi nặng gamma 4 trong vùng hằng định với khớp nối ổn định đột biến khớp S241P (Angal và cộng sự, 1993, Mol Immunol. 30:105-8). Sự kết hợp khác nhau của các plasmit mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng biến đổi được cùng chuyển nhiễm vào HEK293F, dẫn đến biểu hiện của các kháng thể 969 đã nhân hóa, các kháng thể 969 tái tổ hợp.

Ba kháng thể kháng CSF-1R khác cũng được đã nhân hóa bằng cách tạo ra mô ghép bảo toàn chứa gốc của thể cho trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được dự đoán là có tầm quan trọng và mô ghép đã nhân hóa hoàn toàn không chứa gốc của thể cho.

ii) Ái lực của các kháng thể được nhân hóa

Mỗi mô ghép được nhân hóa được đánh giá cho (i) ái lực liên kết CSF-1R ở người bằng BIAcore và (ii) nhiệt độ nóng chảy (T_m) được đo bằng phân tích Nhiệt huỳnh quang, cả hai đều liên quan đến kháng thể chimeric khởi đầu. Nhiệt độ nóng chảy được cho là tạo ra dấu hiệu ban đầu của phân tử kháng thể ổn định, với các kháng thể không ổn định thường có T_m nhỏ hơn 75,0°C.

Các mô ghép thể hiện các giai đoạn nhân hóa của Ab969 đề cập đến trong Bảng 5. Bảng 5 cũng thể hiện kháng thể chimeric Ab696 (969cHcL). Mô ghép bảo toàn (969gH1gL1) có ái lực bất biến (K_D) với 2,4pM, vì thế không có thiệt hại về ái

lực so với kháng thể chimeric ở chuột (969cHcL). Tm của mô ghép bảo toàn 969gH1gL1 là 78,8°C và do đó trị số ngưỡng 75,0°C ở trên. Sự thể gốc A78 của thể cho vào chuỗi nặng V78 để tạo ra 969gH2gL1 không làm giảm ái lực của kháng thể ($K_D=2,3\text{pM}$). Sau khi thể từng bước bằng gốc K38, Y71 và F87 của thể cho, lần lượt vào Q38, F71 và Y87, trong ái lực được quan sát. Mô ghép được nhân hóa cuối cùng 969gH2gL8 không chứa gốc của thể cho có ái lực tương tự kháng thể chimeric ban đầu (4,1 pM).

Bảng 5

Mô ghép kháng thể	Gốc cho VK	Gốc cho VH	$k_a (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_d (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{pM})$
969cHcL	Không có	Không có	2,31E+06	7,99E-06	3,5
969gH1gL1	K38, y71, f87	A78	2,04E+06	5,00E-06	2,4
969gH1gL2	Y71, F87	A78	1,46E+06	5,00E-06	3,4
969gH1gL3	K38, F87	A78	1,80E+06	5,00E-06	2,8
969gH1gL4	K38, Y71	A78	2,39E+06	5,00E-06	2,1
969gH1GL3	F87	A78	9,26E+05	6,11E-06	6,6
969gH1gL6	K38	A78	1,15E+06	5,00E-06	4,4
969gH1gL7	Y71	A78	1,50E+06	5,00E-06	3,3
969gH1gL8	-	A78	1,17E+06	5,00E-06	4,3
969gH2gL1	K38, Y71, F87	-	2,27E+06	5,23E-06	2,3
969gH2gL2	Y71, F87	-	1,78E+06	6,11E-06	3,4
969gH2gL3	K38, F87	-	2,12E+06	7,29E-06	3,4
969gH2gL4	K38, Y71	-	2,20E+06	9,64E-06	4,4
969gH2gL5	F87	-	7,68E+05	5,00E-06	6,5
969gH2gL6	K38	-	1,40E+06	6,23E-06	4,4
969gH2gL7	Y71	-	1,40E+06	5,00E-06	3,6
969gH2gL8	-	-	1,23E+06	5,00E-06	4,1

Ab969 có kiểu đồng phân hóa DG tiềm ẩn ở đoạn tiếp hợp CDE-L2 và cấu trúc. Gốc axit aspartic DG này trong các mô ghép 969gH2gL7 và 969gH2gL8 được gây đột biến thành serin để đưa ra trình tự SG trơ. Ái lực với CSF-1R được đo bằng

BIAcore và không có thiết hai về ái lực đã tìm thấy (Bảng 6). Ngoài ra, mô ghép 969H2gL7(SG) và 969gH2gL8(SG) cuối cùng đã duy trì ở T_m cao với lần lượt là 80,5°C và 79,9°C.

Bảng 6

Mô ghép kháng thể	Gốc cho VK	Gốc cho VH	$k_a (M^{-1} s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
969cHcL	Không có	Không có	4,35E+06	8,35E-06	2,0
969gH2gL7 DG	Y71	-	2,56E+06	7,16E-06	2,8
969gH2gL7 SG	Y71	-	2,54E+06	5,00E-06	2,0
969gH2gL8 DG	-	-	2,18E+06	5,00E-06	2,3
969gH2gL8 SG	-	-	3,22E+06	5,00E-06	1,6

Sự nhân hóa Ab969 và kháng thể kháng CSF-1R Ab970 khác tạo ra kháng thể được nhân hóa hoàn chỉnh (không có gốc cho ở chuột) với ái lực (K_D) tương đương với kháng thể chimeric ban đầu và T_m cho thấy dự đoán ban đầu về độ ổn định phân tử. Phiên bản đã nhân hóa hoàn toàn của Ab969 (969gH2gL8 SG)) được đổi tên thành Ab969.g5. Theo đó, phiên bản chimeric của Ab969 sẽ được gọi là Ab969.g0.

Ái lực của mô ghép chimeric đã tinh chế và mô ghép đã nhân hóa của kháng thể Ab9609 vào tái tổ hợp CSF-1R được đo lại bằng cách sử dụng phân tích BIAcore. Các thí nghiệm BIAcore trước đó đã tiến hành trong suốt quá trình nhân hóa được thực hiện bằng cách sử dụng các phù nổi của tế bào thô thay cho kháng thể đã tinh chế. Nhận thấy sự giảm nhẹ trong ái lực với các trị số K_D tăng xấp xỉ từ 4pM đến 5pM.

Bảng 7

Kháng thể	Thí nghiệm	$k_a (M^{-1} s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
969.g0	1	2,16E+06	9,49E-06	4,4

	2	2,16E+06	9,10E-06	4,2
	Trung bình	2,16E+06	9,30E-06	4,3
969.g5	1	1,63E+06	8,13E-06	5,0
	2	1,50E+06	7,96E-06	5,3
	Trung bình	1,57E+06	8,05E-06	5,1

iii) Sự ức chế khả năng sống của bạch cầu đơn nhân trung gian CSF-1 bằng Ab969.g0 và Ab969.g5

CSF-1 cần thiết cho hoạt hóa và bạch cầu đơn nhân còn sống trong môi trường; nếu CSF-1 được loại bỏ sau khi bạch cầu đơn nhân trải qua sự chết tế bào theo chương trình. Thử nghiệm được tạo ra để MCP-1 đã sử dụng protein hoá hướng động tế bào đơn nhân-1; cũng được biết đến như là CCL2, phối tử kiểu C-C chemokin 2) như đọc ra. Khi kích thích CSF-1, MCP-1 tiết ra bạch cầu đơn nhân ở người, mà có thể được dò tìm trong các lớp tế bào nổi bằng ELISA, thông thường trong 24 giờ sau khi kích thích. Sự ức chế CSR-1R báo hiệu rằng kháng thể chặn liên kết CSF-1 khiến làm giảm MCP-1 tiết ra.

Điều chế PBMC ở người từ máu toàn phần của người mới trên gradien Ficoll và các bạch cầu đơn nhân CD14⁺ đã tinh chế bằng chọn lựa dương tính. Toàn bộ các bạch cầu đơn nhân 2×10^4 ủ với loạt pha loãng nửa logarit với 10 µg/ml vào 0,35 pg/ml kháng thể với sự có mặt của 100 ng/ml CSF-1 ở người trong 24 giờ. Đối chứng bao gồm “không kháng thể, không CSF-1” và “không kháng thể, có CSF-1” tạo ra các trị số giải phóng MCP-1 tối thiểu và trị số giải phóng MCP-1 tối đa. Sau 24 giờ ủ, các tế bào kết vón lại bằng ly tâm và dịch nổi được gom lại. Đo nồng độ MCP-1 bằng cách sử dụng ELISA CCL2/MCP-1 DuoSet (R&D Các hệ thống DY279) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Từ đây trở đi, thử nghiệm này được gọi là “thử nghiệm ức chế MCP-1”.

Thực hiện thử nghiệm ức chế MCP-1 để so sánh hoạt tính của 969.g5 đã nhân hóa với chimeric Ab969.g0. Tiến hành năm thử nghiệm độc lập bằng cách dùng bốn người cho bạch cầu đơn nhân khác nhau. Trong tất cả các thử nghiệm, mô ghép được

nhân hóa Ab969.g5 có hoạt tính thấp hơn bất ngờ so với kháng thể chimeric ban đầu 969.g0. Thí nghiệm biểu thị duy nhất được thể hiện trên Fig.13. IC_{50} cho 969.g0 trong thử nghiệm bạch cầu đơn nhân là 24,6ng/ml, so với 333,0ng/ml cho 969.g5. Điều này cho thấy rằng việc giảm ba lần trong hiệu lực kháng thể khi so sánh cả hai kháng thể bằng cách sử dụng dạng thức thử nghiệm này.

Thực hiện một loạt thí nghiệm bằng cách sử dụng Ab969 để tiết lộ vì sao kháng thể được nhân hóa có hoạt tính giảm trong thử nghiệm về ức chế MCP-1. Dữ liệu cho thấy rằng hoạt tính mất đi của Ab969.g5 được quan sát thấy trong thử nghiệm về ức chế MCP-1 là do thứ tự trong đó kháng thể và các phối tử được thêm vào các tế bào mục tiêu. Hoạt tính của cả Ab969.g0 và Ab969.g5 đều bị giảm khi áp dụng dạng thức thử nghiệm cạnh tranh, nhưng quan trọng hơn là, tìm thấy một sự khác biệt lớn trong hoạt tính ngăn chặn của chúng. Tiến hành phân tích “tốc độ ghép” thấp hơn của Ab969 nhân hóa có thể gây ra việc sụt giảm hiệu quả của phép phân tích BIAcore. Dữ liệu này xác định rằng, trong khi K_D của Ab969.g0 và Ab969.g5 tương tự nhau, K_a thấp hơn cho Ab969.g5, ở $1.57 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ so với $2.16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ cho 969.g0 (xem Bảng 5). Trong một thử nghiệm cạnh tranh, trong đó CSF-1 và kháng thể kháng CSF-1R cạnh tranh để liên kết với các thụ thể tương đồng nhau, kháng thể theo tỷ lệ chậm hơn có thể làm giảm hoạt tính ức chế nếu tốc độ ghép cho phối tử cũng cao và có phối tử trong nồng độ cao. Đã biết rằng CSF-1 ở người có tốc độ ghép đặc biệt cao là $2.19 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ tương tự với kháng thể, và thực hiện thử nghiệm với nồng độ CSF-1 cao (250ng/ml).

Để tạo ra thêm bằng chứng chứng tỏ rằng giảm 969.g5 trong hoạt tính ức chế được tiến hành trên đặc tính tự nhiên của kháng thể, phát triển ELISA để đo CSF-1 liên kết với CSF-1R. Phương pháp được gọi là “thử nghiệm chặn phối tử ELISA”. Tiến hành thử nghiệm này bằng cách sử dụng liên kết cạnh tranh, trong đó CSF-1 và kháng thể được kết hợp từ trước trước khi ứng dụng vào ranh giới màng CSF-1R. Thử nghiệm cũng có thể được thực hiện để đánh giá tác động của nồng độ CSF-1 trong hoạt tính của kháng thể.

Khi đo IC_{50} của 969.g0 và 969.g5 trong ELISA chặn phối tử bằng cách sử dụng 1ng/ml nồng độ CSF-1, cả hai kháng thể cho thấy hoạt tính tương tự với lần lượt IC_{50} của 12,83ng/ml với IC_{50} của 19,65ng/ml. Khi sử dụng nồng độ của 10ng/ml CSF-1 trong thử nghiệm, IC_{50} của cả Ab969.g0 và Ab969.g5 tăng, nhưng quan trọng hơn là, sự khác biệt giữa chúng về việc tăng thêm lần lượt đến 79,29ng/ml với 268,10ng/ml. Tiếp tục xu hướng trong thử nghiệm bằng cách sử dụng 100ng/ml CSF-1, trong đó Ab969.g0 và Ab969.g5 cho các trị số IC_{50} lần lượt là 828,70ng/ml và 3947,00ng/ml. Thử nghiệm về tính cạnh tranh chứng minh rằng Ab969.g5 hoạt động ít hơn Ab969.g0 trong việc ngăn CSF-1 liên kết với CSF-1R. Việc giảm tính hiệu lực trở nên rõ rệt hơn khi tăng nồng độ CSF-1.

iv) Nhận dạng các mô ghép đã nhân hóa của Ab969 với hoạt tính tương tác với chimeric Ab969 trong thử nghiệm ức chế MCP-1

Một mảnh của các mô ghép trung gian đã nhân hóa Ab969 được điều chế bằng biểu hiện lướt qua sao cho in vitro hoạt tính có thể so sánh được (Bảng8). Kháng thể chimeric (Ab969.g0) tương ứng và mô ghép được nhân hóa hoàn toàn (Ab969.g5) cũng có biểu hiện thoáng qua sao cho việc so sánh trực tiếp các đặc tính của kháng thể có thể được tiến hành trong cùng một lô.

Bảng 8

Kháng thể	Mô ghép	Gốc cho VK	Gốc cho VH
969.g0	969cHcL	Không có	Không có
969.g7	969gH2gL4	K38, Y71	-
969.g9	969gH2gL6	K38	-
969.g02	969gH2gL7	Y71	-
969.g05	969gH2gL8(SG)	-	-

Hoạt tính in vitro của mỗi kháng thể được kiểm nghiệm trong thử nghiệm về sự ức chế của MCP-1. Dạng thức thử nghiệm này sử dụng chuẩn độ CSF-1 với nồng độ riêng của kháng thể đã chọn lựa, dạng cho phép sàng lọc nhanh mảnh kháng thể lớn và nêu bật bất kỳ hoạt tính ngăn CSF-1R khác nhau. Trong thử nghiệm này, MCP

giải phóng phụ thuộc liều từ bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người được dò tìm và khả năng tương đối của mỗi kháng thể để ngăn hoạt tính CSF-1R đã đo bằng nồng độ CSF-1 trong đó MCP-1 đã được giải phóng. Đặt các tế bào đơn nhân trong 20.000 tế bào trên mỗi giếng trong nhiều môi trường với sự có mặt của việc chuẩn độ CSF-1 tái tổ hợp ở người (loạt pha loãng gấp hai lần bao gồm 18 nồng độ, tối đa là 500ng/ml). Bổ sung 1µg/ml kháng thể liều đơn. Ủ các tế bào trong 24 giờ và phù nổi được gom lại. MCP-1 tiết ra được đo bằng ELISA. Thử nghiệm ức chế MCP-1 cho thấy rằng kháng thể Ab969.g2 và Ab969.g7 duy trì hoạt tính chặn CSF-1 ở mức độ cao, cả hai thực thể đều có khả năng ức chế hoàn toàn sự tiết ra MCP-1 khi bổ sung CSF-1 vào các bạch cầu đơn nhân ở nồng độ lớn hơn là 100ng/ml (Fig.14). Trong thử nghiệm này, nhận thấy hoạt tính bị mất đi ở Ab969.g5, mà có thể chỉ ức chế MCP tiết ra đến 10ng/ml nồng độ CSF-1. Tương tự như vậy, kháng thể Ab969.g9 có hoạt tính ức chế CSF-1R giảm so với Ab969.g2 và Ab969.g7.

IC₅₀ của mô ghép được nhân hóa Ab969 chọn lọc được đo trong thử nghiệm MCP-1 để đưa ra đánh giá kỹ lưỡng hơn về khả năng tương đối của chúng để ức chế hoạt tính của bạch cầu đơn nhân trung gian CSF-1. Điều được xem là quan trọng để đánh giá hoạt tính của kháng thể bằng cách dùng từ nhiều người cho khác nhau mà không tổng hợp từ nguồn gồm hỗn hợp bạch cầu đơn nhân. Bảng 9 thể hiện các trị số IC₅₀ của kháng thể đã tích lũy từ các thử nghiệm tiến hành trên Ab969 bằng cách dùng từ 6 thể cho khác nhau.

Cả hai mô ghép được nhân hóa Ab969.g2 và Ab969.g7 có IC₅₀ tương đối tương thích với kháng thể chimeric Ab969.g0. Ngược lại hoàn toàn, Ab969.g5 có hiệu lực thấp hơn (tỷ lệ chimeric/mô ghép IC₅₀ trung bình là 19,6).

Bảng 9

Kháng thể	Gốc cho VK	Gốc cho VH	IC ₅₀ (ng/ml)							
			Thể cho 1	Thể cho 2	Thể cho 3	Thể cho 4	Thể cho 5	Thể cho 6	trung bình ± S.E.	Chimeric/mô ghép trung bình
969.g0	K/C	K/C	31,0	5,7	59,4	41,7	20,9	7,1	27,6 +/- 8,5	Không có (K/C)

969.g7	K38, Y71	-	46,3 (1,5)	6,1 (1,1)	K/C	K/C	K/C	K/C	26,2 +/- 14,2	1,3
969.g2	Y71	-	N/A	N/A	80,6 (1,4)	42,2 (1,0)	22,3 (1,1)	14,4 (2,0)	39,9 +/- 14,8	1,3
969.g5	-(SG)	-	667,1 (21,5)	100,3 (17,6)	K/C	K/C	K/C	K/C	383,7 +/- 200,4	19,6

v) Ải lực của mảnh kháng thể Ab696 đã nhân hóa

Ải lực của mỗi mô ghép kháng thể được nhân hóa Ab969 và kháng thể chimeric bố mẹ được đo bằng BIAcore (Bảng 10) trong đó ba thí nghiệm độc lập đã được thực hiện và tính toán các trị số trung bình. Dữ liệu thể hiện ải lực (K_D) không thay đổi trong suốt quá trình nhân hóa từ phân tử chimeric (Ab969.g0) thông qua kháng thể “đã nhân hóa hoàn toàn” Ab969.g5. Tuy nhiên, “tốc độ ghép” của kháng thể giảm khi quá trình nhân hóa đi qua mô ghép Ab969.g2; cả Ab969.g4 và Ab969.g5 đều có các trị số K_a thấp hơn mô ghép trước đó. Ngoài ra, K_a của Ab969.g5 thấp hơn Ab969.g4, có khả năng chỉ ra rằng sự đột biến của vị trí đồng phân hóa DG đến SG làm giảm đi “tốc độ ghép” của kháng thể hơn nữa.

Bảng 10

Mô ghép kháng thể	Tên kháng thể	Gốc cho VK	Gốc cho VH	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	$K_D(pM)$
969cHcL	969.0	Không có	Không có	2,83E+06	1,03E-05	3,6
				2,79E+06	1,10E-05	3,9
				2,68E+06	9,51E-06	3,6
				2,77E+06	1,03E-05	3,7
969gH1gL1	969.g1	K38, Y71, F87	A78	2,65E+06	8,47E-06	3,2
				2,57E+06	6,04E-06	2,4
				2,51E+06	9,88E-06	3,9
				2,58E+06	8,13E-06	3,2
969gH2gL1	969.g6	K38, Y71, F87	-	2,43E+06	8,84E-06	3,6
				2,44E+06	8,95E-06	3,7
				2,54E+06	6,63e-06	2,6

				2,47E+06	8,14E-06	3,3
969gH2gL4	969.g7	K38, Y71	-	2,57E+06	7,73E-06	3,0
				2,60E+06	9,41E-06	3,6
				2,52E+06	1,15E-06	4,6
				2,56E+06	9,55E-06	3,7
969gH2gL7	969.g2	Y71	-	2,43E+06	1,07E-05	4,3
				2,44E+06	8,39E-06	3,4
				2,54E+06	8,74E-06	3,6
				2,47E+06	9,28E-06	3,8
969gH2gL8	969.g4	-	-	1,99E+06	5,00E-06	2,5
				1,94E+06	6,65E-06	3,4
				1,97E+06	5,00E-06	2,5
				1,97E+06	5,55E-06	2,8
969gH2gL8(SG)	969.g5	-	-	1,71E+06	5,00E-06	2,9
				1,85E+06	7,03E-06	3,8
				1,84E+06	6,76E-06	3,7
				1,80E+06	6,26E-06	3,5

Kết luận:

Việc thử nghiệm mảnh mô ghép đã được nhân hóa Ab969 ở trong một vài thử nghiệm cho thấy rằng tyrosin gốc ở vị trí 71 (ví dụ như Y71) trong chuỗi nhẹ thúc đẩy hoạt tính của kháng thể. Thế vị trí Y71 cho ví dụ như phenylalanin cho kết quả là một sự giảm tốc độ ghép của kháng thể (giảm K_a) liên quan đến phân tử chimeric bố mẹ. Điều này dẫn việc giảm khả năng kháng thể gắn CSF-1 liên kết với CSF-1R, đã tiết lộ trong thử nghiệm theo dõi hoạt tính của CSF-1R trong bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người (thử nghiệm ức chế MCP-1).

Ví dụ 4 – Sự ổn định phân tử của mảnh ghép Ab696 được nhân hóa

i) Độ ổn định nhiệt

Độ ổn định nhiệt (được đo bằng nhiệt độ nóng chảy, T_m) được xác định bởi hai phương pháp độc lập; một phương pháp theo dõi quy trình bằng liên kết của thuốc nhuộm huỳnh quang để tiếp xúc bề mặt kỵ nước (phương pháp Nhiệt huỳnh quang), phương pháp còn lại là phương pháp đo nhiệt lượng (DSC), một kỹ thuật trực giao.

T_m được đo bằng phương pháp Nhiệt huỳnh quang cho các loại mô phép của kháng thể 969 (trong PSB pH7.4) được tóm tắt lại ở Bảng 11.

Bảng 11

Mẫu	T_{m1} trung bình ($^{\circ}\text{C}$)	T_{m1} S.D. ($^{\circ}\text{C}$)	T_{m2} trung bình ($^{\circ}\text{C}$)	T_{m2} S.D. ($^{\circ}\text{C}$)
969.g2	80,5	0,6	65,6	0,4
969.g2	80,5	0,6	65,6	0,4
969.g5	79,7	0,6	64,7	0,2
969.g5 (pH 5.0)	82,7	0,1	59,9	0,5
969.g7	79,8	0,5	65,9	0,4
969.g9	79,4	0,5	65,8	0,5
Đối chứng IgG4	66,4	0,8	ND	ND

Nói chung, Fab' T_m như được đo bởi phương pháp Nhiệt huỳnh quang ám chỉ là phần lớn mô ghép 969 ổn định về mặt nhiệt lượng hơn đối chứng IgG4.

ii) Tác dụng của nồng độ mẫu theo khuynh hướng kết tụ

Theo dự đoán về tính ổn định của các mẫu trong suốt quá trình cất giữ, tác dụng của nồng độ kháng thể lên tính ổn định trong PHS pH 7,4 đã được nghiên cứu.

Thí nghiệm 1:

Kháng thể >10 mg/ml được cô đặc và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 ngày. Ngay sau khi cô đặc (T_0) 969.g7 xuất hiện đám mây và 969.g8 xuất hiện màu trắng đục. Ngược lại, mẫu 969.g5 được đánh giá rõ ràng bằng sự kiểm nghiệm bằng mắt. Sau 5 ngày ủ ở nhiệt độ phòng, mẫu 965.g5 được giữ lại, trong khi đó việc kết tụ 969.g7 và 969.g8 đã tiến triển thêm, trong đó mỗi mẫu thể hiện một chất kết tủa nặng.

Từ nghiên cứu này, có thể sắp xếp các mẫu theo trật tự của sự kháng kết tụ trong các điều kiện như sau: 969.g5 $>$ 969.g8 $>$ 969.g7.

Thí nghiệm 2:

Trước khi cô đặc, tất cả ba mẫu kháng thể đều rõ ràng khi kiểm nghiệm bằng mắt với việc loại trừ 969.g6 (ở 4,68 mg/ml) có màu trắng đục. Sau khi cô đặc 16mg/ml, lưu ý kết tủa 969.g6 sau 24 giờ lưu giữ ở cả nhiệt độ phòng và 4°C. Tuy nhiên, cả 4969.g1 và 969.g4 đều duy trì rõ ràng khi nhìn bằng mắt. Sau 5 ngày ủ thêm, các hạt lớn hoặc các hạt bức xạ rõ ràng nhất là cho mẫu 969.g1 ở cả nhiệt độ phòng và 4°C. Quan sát việc không kết tụ đối với mẫu 969.g4 hoặc là ở nhiệt độ phòng hoặc 4°C, đã đánh giá khi kiểm nghiệm bằng mắt.

Từ nghiên cứu này, có thể thấy rằng 969.g6 có một số kết tụ không ổn định như lưu giữ ở nồng độ thấp (4,68mg/ml) trong PBS pH 7.4. Ngoài ra, sự kết tủa này tăng thêm bởi nồng độ kháng thể. 969.g1 đã cô đặc cho thấy tốc độ kết tụ chậm hơn, trong khi 969.g4 đã cô đặc duy trì độ ổn định đến 5 ngày hoặc ở nhiệt độ lưu giữ. Theo thứ tự của tính ổn định để kết tụ sau: 969.g4 > 969.g1 > 969.g6.

Thí nghiệm 3: Kháng thể 969.g2, 969.g5, 969.g7 và 969.g9

Tiến hành phân tích trên các mẫu ngay sau khi cô đặc (T_0), sau khi ủ qua đêm và 5 ngày sau khi cô đặc. Tất cả các mẫu đều rõ ràng qua sự kiểm nghiệm bằng mắt và không có hiện tượng nào về sự hình thành hạt. Ngay sau khi cô đặc 23,07 mg/ml, mẫu 969.g7 cho thấy sự kết tủa như đã quan sát được từ trước trong thí nghiệm 1. Quan sát thấy màu trắng đục ở 969.g9, có thể thấy rõ hơn sau 24 giờ lưu trữ hoặc ở nhiệt độ phòng hoặc 4°C. Tất cả các mô ghép 969 khác đều có thể thấy rõ qua sự kiểm nghiệm bằng mắt ngay sau khi cô đặc.

Sau 21 ngày ủ, không có thay đổi nhìn thấy được nào quan sát thấy sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng, cả hai mô ghép 969.g7 và 969.g9 được tổng hợp là kết quả của việc cô đặc các mẫu trong khi không thể nhìn thấy được sự kết tủa rõ ràng ở các mẫu khác.

Nói chung, mẫu 969.g2 cho thấy ít nhất là khuynh hướng tổng hợp là kết quả của việc gia tăng nồng độ. Điều này cũng tương quan với T_m cao nhất như được đo bằng phương pháp Nhiệt huỳnh quang.

Kết luận: Trong quá trình biểu hiện và tinh chế mảnh ghép Ab969 được nhân

hóa, rõ ràng là nồng độ kháng thể tăng trên 10 mg/ml làm cho quá trình kết tủa của một số mô ghép của kháng thể được nhân hóa tăng nhanh. Đặc biệt là, Ab969.g1, Ab969.g6 và Ab969.g7 tạo thành chất kết tủa, trong khi Ab969.g2, Ab969.g4 và Ab969.g5 thì không. Dữ liệu này chỉ ra rằng việc thế gốc lizin ở vị trí 38 (K38) trong chuỗi nhẹ cho glutamin làm tăng tính ổn định của kháng thể khi được cô đặc trên 10 mg/ml.

Ví dụ 5 - Phân tích in vitro đối với Ab969.g2

i) Trình tự của Ab969.g2

Ab969.g2 chứa mô ghép của chuỗi nhẹ gL7 và mô ghép của chuỗi nặng gH2. Liên kết các trình tự kháng thể (của người cho) trong vùng V với các trình tự dòng tinh ở người trong vùng V đã thể hiện trên Fig.2A và Fig.2B, với các trình tự đã nhân hóa cuối cùng cho mô ghép chuỗi nhẹ gL7 và mô ghép chuỗi nặng gH2.

Các gốc cấu trúc của chuỗi nhẹ trong mô ghép gH2 là tất cả từ gen dòng tinh ở người. Gốc glutamin ở vị trí 1 trong cấu trúc của chuỗi nhẹ ở người được thay bằng axit Glutamic (E1) nhằm tăng cường sự biểu hiện và độ tinh chế của chế phẩm đồng nhất, ví dụ bằng cách chuyển hóa Glutamin thành pyroGlutamat ở đầu N của kháng thể và các mảnh kháng thể.

Các gốc cấu trúc của chuỗi nhẹ trong mô ghép gL7 là tất cả từ gen dòng tinh ở người, với việc loại trừ gốc 71 (kiểu đánh số Kabat), trong đó có duy trì gốc tyrosin thể cho. Giữ lại gốc này để tạo khả năng gia tăng kháng thể được nhân hóa như đã đề cập đến trong Ví dụ 3.

ii) Sự ức chế của hoạt tính bạch cầu đơn nhân phụ thuộc IL-34 ở người.

Hoạt tính của Ab969.g2 so với 969.g0 được đánh giá trong thử nghiệm bạch cầu đơn nhân phụ thuộc IL-34. Tiến hành thí nghiệm bằng cách sử dụng hai thể cho bạch cầu đơn nhân riêng biệt và IC₅₀ cho ức chế để kích thích bạch cầu đơn nhân trung gian đã tính toán (Bảng 12). Không có sự khác biệt đáng kể về IC₅₀ giữa Ab969.g2 và Ab969.g0.

Bạch cầu đơn nhân nguyên phát ở người được đặt với 20.000 tế bào trên mỗi

giếng trong sự có mặt của 100ng/ml IL-34 tái tổ hợp ở người và liều có chuẩn độ của kháng thể kháng CSF-1R (dãy pha loãng nửa logarit bao gồm nồng 16 nồng độ, tối đa là 10 μ g/ml). Ủ các tế bào trong 24 giờ và phù nổi được gom lại. MCP-1 tiết ra được đo bằng ELISA (DY279 các hệ thống R&D). Biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế trong sản xuất MCP-1 so với đối chứng duy nhất CSF-1.

Bảng 12

Kháng thể	IC ₅₀ (ng/ml)		
	Gốc cho 1	Gốc cho 2	Trung bình $\pm$ S.E.
969.g0	20,10	9,79	14,95 $\pm$ 5,17
969.g2	20,58	9,59	15,09 $\pm$ 5,51

iii) Sự liên kết của Ab969.g2 với SNPs của CSF-1R ở người

Có bốn đa hình đơn nucleotit (SNP) không đồng nghĩa được bố trí bên trong vùng liên kết thụ thể của gen CSF-1R ở người được ghi lại trong dân số. Các SNP là V32G, A245S, H247P và V279M (Fig.1F). Mỗi SNP cải biến của CSF-1R ở người được tạo ra và biểu hiện một cách ổn định trong các dòng tế bào. Liên kết của Ab969.g2 với mỗi SNP được xác nhận bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy. Ví dụ 6 - Phân tích đánh dấu được lực học ở khi mồm chó

Nghiên cứu dược động học/dược lực học (PK/PD) với kháng thể được nhân hóa đơn bào chống CSF-1R 969.g2 được tiến hành để chứng minh rằng hoạt tính dược lý của kháng thể đối với động vật linh trưởng không phải là người (khi mồm chó). Nhóm bao gồm ba con khi mồm chó được sử dụng qua tĩnh mạch với liều đơn với hoặc 7 mg/kg (nhóm 1) hoặc 1,5 mg/kg (nhóm 2) kháng thể 969.g2. Kháng thể được dung nạp tốt mà không có cá dấu hiệu lâm sàng bất lợi nào. Các mẫu huyết thanh lấy ở nhiều thời điểm trong suốt 25 ngày nghiên cứu.

Nồng độ huyết thanh của 969.g2 được đo bằng ELISA và tiến hành phân tích dược động học (Bảng 13). Các thông số PK được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm WinNonlin.

$t_{1/2}$ là chu kỳ bán rã của kháng thể trong huyết thanh.

$C_{t\text{đđ}}$ là nồng độ tối đa của kháng thể trong huyết thanh.

AUC là diện tích dưới đường cong (biểu diễn nồng độ thuốc theo thời gian) và cho biết mức độ hấp thụ thuốc.

Sự thanh thải là thể tích huyết tương thanh thải thuốc trên mỗi đơn vị thời gian.

Vol. Dist. là lượng phân bố, thể tích biểu kiến trong đó thuốc được phân tán.

Có sự tương quan tốt giữa các trị số được quan sát thấy và các trị số được dự đoán (động vật 2 là một trường hợp ngoại lệ và được xem là một mẫu ngoại lai). $C_{t\text{đđ}}$ tỷ lệ thuận với liều; AUC lớn hơn liều tỷ lệ thuận, chỉ báo chậm hơn sự thanh thải ở liều cao hơn. Đa số 969.g2 được dò tìm trong huyết thanh.

Bảng 13

Động vật	Liều [mg/kg]	$t_{1/2}$ [h]	$C_{t\text{đđ}}$ [μg/mL]	AUC_{INF_obs} [h*μg/mL]	Sự thanh thải (Cl_{obs}) [mL/h/kg]	Lượng phân tán (V_{z_obs}) [mL/kg]
1	7	66,1	209,4	23184,5	0,30	28,8
2	7	30,3	117,6	6075,9	1,15	50,4
3	7	63,3	188,7	16761,0	0,42	38,1
4	1,5	27,9	36,1	1928,1	0,78	31,3
5	1,5	22,7	34,7	1668,6	0,90	29,5
6	1,5	27,1	36,6	1634,8	0,92	35,9

Phương pháp chủ yếu để thanh thải CSF-1 thông qua liên kết với thụ thể cùng nguồn gốc, CSF-1R. Kìm hãm CSF-1 liên kết với CSF-1R làm gia tăng nồng độ huyết thanh của CSF-1 thông qua việc ngăn ngừa sự thanh thải thụ thể trung gian; quan sát hiện tượng trong các mẫu chuột. Do vậy, việc tăng nồng độ CSF-1 trong huyết thanh là dấu hiệu dược lực học của sự khớp nối và ức chế CSF-1R.

Cả hai liều theo 969.g2 đều tạo ra sự kết tụ nhanh và đáng kể huyết thanh CSF-1. Hiệu quả là liều phụ thuộc, có liều 7 mg/kg cho nồng độ CSF-1 đỉnh lớn hơn xấp xỉ 10 lần so với liều 1,5 mg/kg. Mối tương quan giữa dược động học/dược lực

học quan sát được với sự chuẩn hóa các mức CSF-1 theo sự thanh thải của kháng thể. Mức độ CSF-1 trở lại đường chuẩn ở cuối nghiên cứu đối với cả hai nhóm điều trị. Kết quả được thể hiện trên Fig.15a và Fig.15b.

Fig.15a thể hiện nồng độ của CSF-1 trong các mẫu huyết thanh được lấy từ khi mồm chó được điều trị với liều tiêm tĩnh mạch đơn với 7 mg/kg Ab969.g2. Nồng độ huyết thanh của CSF-1 được đo trong hai thử nghiệm độc lập. Biểu đồ thể hiện nồng độ trung bình của CSF-1 đối với ba động vật trong Nhóm 1 (7mg/kg) với sai số chuẩn (kí hiệu hình vuông). Cũng đề cập đến nồng độ huyết thanh trung bình của Ab969.g2 (ký hiệu hình tròn)

Fig.15b thể hiện nồng độ của CSF-1 trong các mẫu huyết thanh được lấy từ khi mồm chó được điều trị với liều tiêm qua tĩnh mạch đơn với 1,5 mg/kg Ab969.g2. Nồng độ huyết thanh của CSF-1 được đo trong hai thử nghiệm độc lập. Biểu đồ thể hiện nồng độ trung bình của CSF-1 đối với ba động vật trong Nhóm 2 (1,5 mg/kg) với sai số chuẩn (ký hiệu hình vuông). Cùng đề cập đến nồng độ huyết thanh trung bình của Ab969.g2 (ký hiệu hình tròn).

Hai loại chính của các tế bào bạch cầu đơn nhân ở người và ở khỉ mồm chó lưu thông; (i) các bạch cầu đơn nhân “cổ điển” CD14⁺ CD16⁻ và (ii) các bạch cầu đơn nhân CD14⁺ CD16⁺ ‘không cổ điển’ hoặc các bạch cầu đơn nhân “nội trú”. Các mẫu ở chuột chứng minh được rằng đại thực bào nội trú ở mô, bao gồm các TAM, được đưa ra từ loại bạch cầu đơn nhân không cổ điển. Ngoài ra, các bạch cầu đơn nhân không cổ điển được cung cấp từ biệt hóa thêm của bạch cầu đơn nhân cổ điển. Lưu thông các loại bạch cầu đơn nhân ở khỉ mồm chó định lượng với 969.g2 đã được theo dõi bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy bốn màu trong máu toàn phần. Kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng cyno CD45-PerCP, kháng người HLA-DR-APC, kháng người CD14-FITC (tách dòng My4) và kháng người CD16-PE (tách dòng 3G8). Các cổng được đặt bằng cách sử dụng đối chứng đồng vị thích hợp cho mỗi kháng thể. Các bạch cầu đơn nhân cổ điển được định nghĩa là CD45⁺ HLA-DR⁺ CD14⁺ CD16⁻. Các bạch cầu đơn nhân

không cổ điển được định nghĩa là $CD45^+ HLA-DR^+ CD14^+ CD16^+$.

Cả hai liều 969.g2 tạo ra quá trình tiêu diệt dần dần của các bạch cầu đơn nhân không cổ điển $CD14^+ CD16^+$ trong suốt tuần nghiên cứu đầu tiên. Hầu như toàn bộ quá trình tiêu diệt của các bạch cầu đơn nhân không cổ điển bị gây ra bởi liều 7mg/kg. Giảm bạch cầu đơn nhân không cổ điển bằng cả hai liều 7 mg/kg và 1,5 mg/kg xuất hiện để đạt đỉnh vào thời điểm ngày thứ 4, với số liệu trở lại bình thường vào ngày thứ 11. Kết quả được thể hiện trên Fig.15c. Biểu đồ hình cột cho thấy số liệu trung bình của bạch cầu đơn nhân $CD14^+ CD16^+$ không cổ điển tuần hoàn ở các thời điểm trong suốt quá trình nghiên cứu (các ngày (D) 0, 1, 4, 18 và 25) với sai số chuẩn. Nồng độ trung bình của huyết thanh CSF-1 cũng được thể hiện theo sai số chuẩn.

Ví dụ này xác nhận rằng (i) kháng thể 969.g2 có khả năng liên kết CSF-1R và ức chế CSF-1 liên kết ở khi mỡ chó, (ii) chứng minh được hoạt tính được lý của kháng thể 969.g2 trong mẫu động vật linh trưởng không phải là người, (iii) chứng minh được rằng kháng thể 969.g2 đã dùng hết một cách chọn lọc tập hợp bạch cầu đơn nhân không cổ điển ở khi mỡ chó in vivo – tập hợp bạch cầu đơn nhân được xem là các tiền chất của đại thực bào liên kết ung thư, và (iv) nồng độ huyết thanh của CSF-1 thích hợp là một dấu ấn sinh học để đo hoạt tính 969/g2.

Ví dụ 7 - Ức chế sự phát triển của mô hình cấy ghép ung thư vú MCF-7

Kháng thể 969.g2 không có khả năng liên kết với CSF-1R ở chuột. Do vậy, in vivo các nghiên cứu ở chuột được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể chống chuột CFS-1R Ab535 để cho thấy tính hữu dụng của Ab969.g2 trong điều trị bệnh ung thư và bệnh xơ hóa. Ab535 đã thể hiện các đặc tính so sánh và hoạt tính đối với Ab969.g2 trong một số thí nghiệm in vitro.

Ab535 tạo ra ức chế bạch cầu đơn nhân CSF-1-mediated còn sống trong ví dụ 2 iii), có ái lực so sánh trong ví dụ 2 iv) và không dẫn đến quá trình tiếp nhận CSF-1R trong ví dụ 2 vii).

Theo nghiên cứu in vivo trên Ab535, in vivo mô hình cấy ghép ung thư vú

được tiến hành như sau:

Nghiên cứu đã đo lường hiệu quả điều trị của kháng thể Ab535, dùng dưới da (dưới da), vs. kháng thể đối chứng, đối chứng dương tính và chất dẫn làm đối chứng ở chuột không lông miễn dịch có cấy ghép dưới da mô hình cấp ghép ung thư vú ở người MCF-7. Ước chế sự phát triển của khối u được sử dụng làm thông số điều trị. Ung thư vú ở người MCP-7 được sử dụng làm mẫu cấy ghép tế bào sống dưới da trong chuột cái không lông miễn dịch. Dòng tế bào MCF-7 được quan sát từ ngân hàng u của Viện Ung Thư Quốc gia (Hoa Kỳ). Để sử dụng thử nghiệm, các tế bào được nuôi cấy in vitro trong RPMI 1640 trung bình + 10% FCS. Các tế bào được lấy từ mảng nhỏ nuôi cấy và tiêm dưới da vào chuột. Bắt đầu điều trị khối u có kích thước sờ thấy được rõ ràng (4-10mm). Các hợp chất và chất dẫn làm đối chứng kiểm nghiệm được đưa vào da ba lần một tuần. Sử dụng đối chứng dương tính qua tĩnh mạch mỗi ngày một lần vào các ngày 24, 33 và 40. Lượng tiêm được điều chỉnh riêng biệt theo trọng lượng cơ thể ở thời điểm tiêm. Đo đường kính khối u ba lần mỗi tuần bằng compa đo lỗ. Tính toán thể tích khối u theo công thức $V = (\text{chiều dài} \times (\text{chiều rộng})^2)/2$. Để tính toán thể tích u tương đối (RTV), thể tích mỗi ngày đo liên quan đến ngày điều trị đầu tiên. Tính toán tại trung bình mỗi ngày đo và thể tích khối u trung bình trên nhóm và cũng được điều trị trung bình mỗi ngày để kiểm soát (T/C) các trị số theo phần trăm.

Kết quả đã được thể hiện trên Fig.16. Ab535 cho thấy tác dụng kháng u bằng một liều phụ thuộc. Cả hai liều kháng thể IgG đối chứng ở chuột đều không có tác dụng ức chế sự phát triển của khối u. Thể tích khối u tương đối tương đương với chất dẫn làm đối chứng và đối chứng dương tính dẫn đến sự ức chế phát triển khối u.

Kết luận: kháng thể thử nghiệm Ab535 có tác dụng kháng u đáng kể về mặt thống kê mô hình cấy ghép ung thư vú ở người MCF-7 với liều cao nhất (30 mg/kg/ngày).

Ví dụ 8 - Ước chế sự phát triển của ung thư ruột thẳng PC-3

Tác dụng kháng u và chống di căn của kháng thể Ab535 cũng được kiểm

nghiệm bằng cách sử dụng mẫu ung thư ruột thẳng PC-3 in vivo. Dòng tế bào PC-3 được biến đổi di truyền để tiếp tục biểu hiện luciferaza cho phép in vivo phân tích hình ảnh phát quang sinh học, cho phép theo dõi sự phát triển của khối u in vivo và để tiến hành ex vivo phân tích di căn trong các cơ quan nội tạng đã chọn.

Nghiên cứu bao gồm sáu nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm chứa hoặc ngẫu nhiên 11 con chuột đực không lông NMRI hoặc 12 (tất cả các Nhóm còn lại) con chuột đực không lông NMRI. Vào ngày 0, các tế bào PC-3 được cấy ghép đúng chỗ vào tuyến tiền liệt của tất cả con chuột không lông đực NMRI tham gia nghiên cứu này. Vào ngày thứ 3, kiểm nghiệm khởi phát sự tăng trưởng của khối u qua in vivo hình ảnh phát quang sinh học. Vào ngày thứ 8, tiến hành in vivo hình ảnh phát quang sinh học lần thứ hai và động vật mang khối u được lấy ngẫu nhiên vào sáu nhóm cho các kết quả hình ảnh chính là cường độ phát quang sinh học. Vào ngày tiếp theo (ngày thứ 9), bắt đầu việc trị liệu. Động vật ở Nhóm 2 và Nhóm 3 tiếp nhận lần lượt 30mg/kg và 10mg/kg kháng thể đối chứng, 3 lần mỗi tuần dưới da cho đến ngày thứ 42. Động vật ở Nhóm điều trị 4 và Nhóm điều trị 5 tiếp nhận lần lượt 30mg/kg và 10mg/kg kháng thể Ab535, 3 lần mỗi tuần dưới da cho đến ngày thứ 42. Động vật ở Nhóm đã biểu thị Chất dẫn làm đối chứng và tiếp nhận Chất dẫn (PBS) 3 lần mỗi tuần dưới da cho đến ngày thứ 42. Động vật ở Nhóm 6 đã biểu thị đối chứng dương tính và tiếp nhận 360mg/kg đối chứng qua ven một lần một tuần trong vòng bốn tuần (vào các ngày 10, 17, 24 và 31). Trong suốt quá trình nghiên cứu, sự phát triển của các khối u PC-3 đã cấy ghép đúng chỗ được theo dõi in vivo vào các ngày 3, 8 (ngẫu nhiên), 15, 22, 29, 36 và 43 bằng cách sử dụng hình ảnh phát quang sinh học.

Tiến hành khám nghiệm tử thi khi kết thúc nghiên cứu. Trọng lượng và thể tích khối u nguyên phát được xác định. Các bộ phận được chọn lựa (gan, lá lách và phổi) được gom lại, một trong mỗi phần cố định trong formalin và phần còn lại tính toán theo dạng mẫu di căn qua hình ảnh phát quang sinh học bằng cách sử dụng in vitro thử nghiệm luciferaza. Ngoài ra, xương đùi ở phần chân và một phần tương tự ở xương sống lưng được gom lại để tính toán dạng mẫu di căn ở xương bằng cách sử

dụng in vitro thử nghiệm luciferaza.

Dấu hiệu phát quang sinh học in vivo thể hiện cả hai khối u nguyên phát và di căn (hình ảnh toàn thân). Dựa trên dữ liệu này, đường cong về sự phát triển khối u có thể được tính toán ở tất cả các nhóm (Fig.17). Sự tăng trưởng của khối u đồng nhất trong tất cả các nhóm nghiên cứu cho đến khi ngẫu nhiên và bắt đầu trị liệu. Dưới đây, Nhóm chất dẫn làm đối chứng 1 cũng như hai kháng thể dẫn chứng RTE11 nhóm 2 và nhóm 3 thể hiện sự phát triển khối u đều đặn. Sự phát triển của khối u giảm đi đáng kể đo in vivo trong ngày thứ 43 có thể quan sát thấy đối với đối chứng dương tính (nhóm 6). Kháng thể Ab535, dùng lần lượt 30mg/kg hoặc 10mg/kg (nhóm 4 và nhóm 5), dẫn đến sự phát triển của khối u giảm đi đáng kể khi theo dõi bằng cách sử dụng in vivo hình ảnh phát quang sinh học.

Thể tích và trọng lượng ẩm ướt của khối u nguyên phát được xác định trong suốt quá trình khám nghiệm tử thi vào ngày thứ 44. Đối chứng dương tính (nhóm 6), dẫn đến cả thể tích và trọng lượng của khối u nguyên phát giảm đi đáng kể. Sử dụng 30mg/kg kháng thể Ab535 (nhóm 4), có thể quan sát thấy được là cả thể tích và trọng lượng của khối u nguyên phát giảm đi đáng kể. Khi sử dụng 10mg/kg Ab535, thể tích khối u giảm đáng chú ý nhưng nhỏ hơn những gì nhóm 4 cho thấy. Hiệu quả kháng u không đáng kể có thể quan sát thấy trong trường hợp với kháng thể đối chứng.

Bằng cách sử dụng kỹ thuật hình ảnh phát quang sinh học, hoạt tính luciferaza của khối u nguyên phát được đo sau khi xét nghiệm tử thi. Kết quả thấy được có thể so sánh với kết quả nhận thấy qua giải phẫu khám nghiệm và đường cong phát triển in vivo. Đối chứng dương tính (nhóm 6) khiến hoạt tính luciferaza của khối u nguyên phát giảm đi rất đáng kể. Sử dụng 30mg/kg kháng thể Ab535 (nhóm 4), khiến hoạt tính luciferaza của khối u nguyên phát giảm đi đáng kể, trong khi đó thì mức giảm ít hơn, khi sử dụng 10mg/kg Ab535 (nhóm 5). Hoạt tính luciferaza không giảm đi đáng kể có thể nhận thấy ở kháng thể đối chứng.

Một số bộ phận khác (gan, lá lách, phổi, xương đùi và một phần của xương sống lưng) được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật hình ảnh phát quang sinh học

ex vivo. Trong trường hợp sử dụng đối chứng dương tính, hoạt tính luciferaza giảm đi đáng kể có thể thấy được ở xương đùi và xương sống lưng, trong khi đó sự giảm mang tính tín hiệu chỉ nhỏ hơn đáng kể trong trường hợp với gan và lá lách. Trong trường hợp sử dụng 30mg/kg (nhóm 4) kháng thể Ab535, hoạt tính luciferaza giảm đi đáng kể cho gan và rõ rệt ở tất cả các cơ quan nội tạng khác. Kháng thể đối chứng (nhóm 2 và nhóm 3) không tạo ra bất kỳ sự giảm nào cho hoạt tính luciferaza ở tất cả các cơ quan nội tạng đã kiểm nghiệm.

Kết luận: hiệu quả kháng u đáng kể có thể được chứng minh cho kháng thể Ab535 trong mẫu khối u này, kết hợp với hiệu quả chống di căn rõ rệt.

Ví dụ 9 - Tác động của kháng thể kháng CSF-1R trong Bleomycin thấy được trong in vivo mẫu vật của chứng xơ hóa phổi

Bleomycin là một chất kháng sinh được tách ra từ *Streptomyces verticillatus* và được sử dụng như là phương pháp hóa trị cho các bệnh ung thư khác nhau. Mẫu vật bleomycin của bệnh xơ hóa phổi là một mẫu vật đã tồn tại trong một thời gian dài và được sử dụng chủ yếu như được mô tả trong Madtes, DK và cộng sự, 1999, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20, 924-34. Quy chuẩn chi tiết có thể tìm thấy trong tài liệu tham khảo sau đây: Morschl, E., Molina, J. G., Volmer, J., Mohsenin, A., Pero, R. S., Hong, J. S., Kheradmand, F., Lee, J. J. và Blackburn, M. R. (2008), ảnh hưởng mang tính tín hiệu của thụ thể A3 adenosin với bệnh viêm và xơ hóa phổi. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39: 697-705.

Tất cả các con chuột đã sử dụng là các con chuột cái thuộc loài C57Blk6 hoang dã được mua từ Harlan Labs. Đường truyền dẫn khí quản cắt ngắn được sử dụng trong đó chuột đã bị gây mê với avertin và tiến hành phẫu thuật mở thông khí quản để truyền dẫn 3,5 đơn vị liều bleomycin trong 50 μ l nước muối hoặc chỉ mỗi 50 μ l nước muối làm đối chứng. Điều trị theo cách này dẫn đến giai đoạn viêm đạt đỉnh vào ngày thứ 7 sau khi tiếp xúc bleomycin và giai đoạn xơ hóa đạt cực đại vào ngày thứ 21 sau khi tiếp xúc. Tác động của kháng thể Ab535 thử nghiệm dưới da với 30mg/kg, ba lần mỗi tuần từ ngày thứ 9 đến ngày thứ 21. Động vật tham gia thí nghiệm vào ngày thứ

21 và đầu đọc bao gồm phân tích mô bệnh học của phổi. Tình trạng lỏng của tế bào trong kỹ thuật BAL (rửa phế quản phế nang) và sự đo lường collagen có thể hòa tan được trong chất lỏng BAL. Phân tích mô bệnh học được tiến hành để đánh giá tổn thương phổi bằng cách sử dụng hệ thống đánh giá Ashcroft cải biến để xác định mức độ nghiêm trọng của bệnh xơ hóa phổi (Hubner RH và cộng sự, 2008, *Biotechniques* 44: 507-17). Phổi bị cắt một mô được bơm căng với 10% formalin đến 25cm áp suất và được điều trị thông qua một loạt dung dịch rượu và xylen, nhúng trong paraffin và phần mô đã loại bỏ paraffin trước khi xử lý và nhuộm bằng phương pháp nhuộm Trichrome của Masson.

Lượng collagen có thể hòa tan được trong chất lỏng BAL được đánh giá bằng cách sử dụng bộ dụng cụ thử nghiệm Sircol có bán sẵn trên thị trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tác động trên số lượng đại thực bào trong BAL có thể hòa tan được xác định bằng cách sử dụng các chất pha chế cytospin. Phần phân ước của các tế bào BAL được quay trên tấm kính hiển vi, nhuộm bằng Diff-Quick và đếm đại thực bào.

Đã nhận thấy rằng liệu pháp điều trị với kháng thể chống CSF-1R, Ab535, với liều dùng bắt đầu vào ngày thứ 9 khiến phần xơ hóa phổi có bleomycin được giảm nhiều. Cả mức độ nghiêm trọng và mức độ xơ hóa đều được giảm đáng kể. Chuột đã điều trị có lượng collagen bị giảm, đồng thời được cải thiện bệnh xơ hóa và tăng cường bảo vệ hàng rào phổi.

Fig.18a thể hiện việc điều trị xơ hóa phổi có bleomycin với Ab535 làm giảm nồng độ collagen BALF so với khi điều trị với đối chứng đồng vị.

Fig.18b thể hiện việc điều trị xơ hóa phổi có bleomycin với Ab535 làm giảm số điểm Ashcroft của các vật mẫu so với khi điều trị với đối chứng đồng vị cho thấy thêm rằng chuột đã điều trị với Ab535 đã được cải thiện bệnh xơ hóa.

Fig.18c thể hiện việc điều trị xơ hóa phổi có bleomycin với Ab535 làm giảm nồng độ albumin trong huyết thanh so với khi điều trị với đối chứng đồng vị cho thấy thêm rằng tính thấm thành mạch ở chuột đã điều trị với Ab535 đã được cải thiện.

Fig.19 thể hiện các hình vẽ biểu thị việc phân tích mô bệnh học của phổi theo nước muối đối chứng, bleomycin với đối chứng đồng vị và bleocycin với Ab535 đã điều trị cho động vật. Động vật đã điều trị bằng Ab535 khiến xơ hóa phổi giảm đi nhiều so với điều trị bằng đối chứng đồng vị, động vật điều trị bằng bleomycin.

Ví dụ 10 - Tác động của kháng thể kháng CSF-1R ở chuột mẫu thiếu adenosin deaminaza của chứng xơ hóa phổi

Adenosin là một nucleosit phát tín hiệu mạnh, mức độ của tăng khi các tế bào phải chịu sức ép hoặc bị tổn thương và một loạt các phản ứng được tạo ra khi adenosin khớp với các thụ thể ghép protein G đặc hiệu. Adenosin deaminaza (ADA) là một enzym biến những purin chuyển đổi adenosin thành inosin. Tạo ra các con chuột loại bị bỏ ADA và cho thấy mức độ gia tăng của adenosin trong huyết thanh cũng như trong các mô, chẳng hạn như trong thận, gan và phổi (Blackburn, MR và cộng sự, 1998, J Biol Chem, 273(9): 5093-5100). Các con chuột này cho thấy triệu chứng của bệnh phổi mãn tính chẳng hạn như sự phá hủy phế nang, viêm đường hô hấp và tăng đờm có liên quan đến mức độ gia tăng của adenosin trong phổi Blackburn MR và cộng sự, 2000, J Exp Med, 192: 159-70). Hậu quả là các con chuột chết sau ba tuần tuổi do suy hô hấp. Việc đưa ADA ngoại sinh vào bằng cách sử dụng chế độ liều thấp làm giảm lượng adenosin và gia tăng tuổi thọ của chuột cho phép phát triển mẫu vật của chứng xơ hóa phổi (Chunn JL và cộng sự, 2005, J Immunol 175: 1937-46, Pedrosa M và cộng sự, 2011, PLoS One, 6(7): e22667). Theo mẫu vật này, sự nâng cao liên tục của lượng adenosin liên quan đến sự gia tăng trong chất trung gian profibrotic có TGF-1 trong phổi, tăng độ kết tủa collagen trong mô phổi và tăng bệnh xơ hóa phổi. Để khảo sát ảnh hưởng của các phân tử với tiềm năng chống xơ cho các con chuột thiếu ADA được duy trì theo chế độ ADA ngoại sinh liều lượng thấp trong vài tuần, sau đó dừng điều trị ADA và sử dụng chất chống xơ tiềm tàng.

Tác động của kháng thể kháng CSF-1R Ab535 được khảo sát ở chuột mẫu loại bỏ ADA bị xơ hóa phổi. Trong mẫu này, duy trì các con chuột thiếu enzym bằng điều trị enzym ADA từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 21 sau sinh. Điều chế phức hệ ADA-

polyetylen glycol (PEG) (Young HW và cộng sự, 2004, J Immunol 173: 1380-89) và sử dụng để tiêm trong cơ vào ngày thứ 1, 5, 9, 13 và 17 sau sinh (lần lượt theo các đơn vị 0,625, 1,25, 2,5, 2,5 và 2,5) tiếp theo là 5 đơn vị tiêm ở bụng vào ngày thứ 21. Không sử dụng thêm enzym sau ngày thứ 21. Tiêm 30mg/kg Ab535 dưới da, với lượng là 100 μ l ba lần/ tuần từ ngày thứ 25 (sau sinh) cho đến khi động vật tham gia thí nghiệm vào ngày thứ 42.

Động vật tham gia thí nghiệm vào ngày thứ 42 và số liệu đọc được chứa các phân tích mô bệnh học của phổi, tình trạng lỏng của tế bào BAL và lượng collagen có thể hòa tan trong chất lỏng BAL. Phân tích mô bệnh học được tiến hành để đánh giá tổn thương phổi bằng cách sử dụng hệ thống đánh giá Ashcroft cải biến để xác định mức độ nghiêm trọng của bệnh xơ hóa phổi (Hubner và cộng sự, 2008, Biotechnology 44: 507-17). Phổi bị cắt một mô được bơm căng với 10% focmalin đến 25cm áp suất và được điều trị thông qua một loạt dung dịch rượu và xylen, nhúng trong paraffin và phần mô đã loại bỏ paraffin trước khi xử lý và nhuộm bằng phương pháp Trichrome của Masson.

Lượng collagen có thể hòa tan được trong chất lỏng BAL được đánh giá bằng cách sử dụng bộ dụng cụ thử nghiệm Sircol có bán sẵn trên thị trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tác động về số lượng đại thực bào trong chất lỏng BAL được xác định bằng cách sử dụng các chất pha chế cyto-spin. Phân ước của các tế bào BAL được quay trên tâm kính hiển vi, nhuộm bằng Diff-Quick và đại thực bào được đếm.

Đã nhận thấy rằng liệu pháp điều trị với kháng thể chống CSF-1F Ab535 làm giảm đáng kể xơ phổi trong các con chuột thiếu ADA. Chuột đã điều trị có lượng collagen bị giảm, đồng thời được cải thiện bệnh xơ hóa và tăng cường bảo vệ hàng rào phổi.

Fig.20a thể hiện việc điều trị chuột thiếu ADA với bệnh xơ phổi đã tạo thành với Ab535 làm giảm nồng độ collagen BALF so với điều trị bằng đối chứng đồng vị.

Fig.20b thể hiện việc điều trị chuột thiếu ADA với bệnh xơ phổi đã tạo thành

với Ab535 làm giảm điểm Ashcroft của mẫu vật so với khi điều trị bằng đối chứng đồng vị, cho thấy thêm rằng chuột đã điều trị với Ab535 được cải thiện bệnh xơ hóa.

Fig.20c thể hiện việc điều trị chuột thiếu ADA với bệnh xơ phổi đã tạo thành với Ab535 làm giảm nồng độ albumin trong huyết thanh so với khi điều trị bằng đối chứng đồng vị, cho thấy thêm rằng tính thấm thành mạch của chuột đã điều trị với Ab535 được cải thiện.

Fig.20d thể hiện việc điều trị chuột thiếu ADA với bệnh xơ phổi đã tạo thành tiếp nhận Ab535 khiến số lượng đại thực bào trong chất lỏng BAL giảm.

Fig.21 thể hiện các hình vẽ biểu thị phân tích mô bệnh học của phổi từ những con chuột bình thường (ADA+) và chuột thiếu ADA với bệnh xơ phổi đã tạo thành (ADA-), cả hai đều loại đều được điều trị bằng đối chứng đồng vị hoặc Ab535. Đối với chuột ADA-, đã điều trị với Ab535 thì bệnh xơ hóa phổi đã được giảm đi đáng kể so với điều trị bằng đối chứng đồng vị.

Do vậy, điều này cho thấy trong hai mẫu xơ phổi ở chuột thì việc điều trị bằng kháng thể kháng CSF-1R có thể điều trị hữu hiệu bệnh xơ hóa.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CSF-1R bao gồm:

chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:4 cho CDR-H1, CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:5 cho CDR-H2 và CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:6 cho CDR-H3; và

chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:1 cho CDR-L1, CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:2 cho CDR-L2 và CDR có trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:3 cho CDR-L3.

2. Kháng thể kháng CSF-1R theo điểm 1, trong đó chuỗi nặng bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:23.

3. Kháng thể kháng CSF-1R theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 1 đến điểm 2, trong đó chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:15.

4. Kháng thể kháng CSF-1R theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 1 đến điểm 3, có chuỗi nặng bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:23 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:15.

5. Kháng thể kháng CSF-1R theo điểm 1, có chuỗi nặng bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:27 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:19.

6. Kháng thể kháng CSF-1R theo điểm 5, trong đó không có lysin ở đầu C của kháng thể.

7. Kháng thể kháng CSF-1R theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 1 đến điểm 6, trong đó phân tử kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm: phân tử kháng thể hoàn chỉnh có các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ hoặc mảnh phân tử này, ví dụ như được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab' biến đổi, Fab', F(ab')₂, Fv, và mảnh scFv.

8. Kháng thể kháng CSF-1R theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 1 đến điểm 7 có bộ phận tác động hoặc phân tử chỉ thị được gắn vào đó.

9. Kháng thể kháng CSF-1R theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 1 đến điểm 8 có ái lực liên kết cho CSF-1R ở người là 10pM hoặc nhỏ hơn 10pM.

10. Trình tự ADN phân lập mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 1 đến điểm 9.

11. Vector tách dòng bao gồm một hoặc nhiều trình tự ADN theo điểm 10.

12. Vector biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều trình tự ADN theo điểm 10.

13. Vector theo điểm 11 hoặc điểm 12, trong đó vector bao gồm các trình tự được đưa ra trong SEQ ID Số:28 và/hoặc SEQ ID Số:20.

14. Tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều vector tách dòng theo điểm 11 hoặc vector biểu hiện theo điểm 12.

15. Quy trình tạo ra kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 1 đến điểm 9, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 14 và bước phân lập kháng thể.

16. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ điểm 1 đến điểm 9, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

17. Dược phẩm theo điểm 16, còn bao gồm các thành phần hoạt tính khác.

FIG.1A

Các trình tự CA019_969 Ab

CDR-L1

LASEDIYDNLA SEQ ID NO:1

CDRL2

YASSLQD SEQ ID NO:2

CDR-L3

LQDSEYPWT SEQ ID NO:3

CDR-H1

GFSLTITYGMGVG SEQ ID NO:4

CDR-H2

NIWDDDKYYNPSLKN SEQ ID NO:5

CDR-H3

IGPIKYPTAPYRYFDF SEQ ID NO:6

FIG.1B

Vùng V của L Ab969 ở chuột nhắt

SEQ ID NO: 7

DIQMTQSPAS LSASLGETVS IECLASEDIY DNLAWYQKKP GKSPHLLIYY
 ASSLQDGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLES EDAATYFCLQ DSEYPWTFGG
 GTKLELK

Vùng V của L Ab969 ở chuột nhắt

SEQ ID NO: 8

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga
 aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac gataatttag
 cgtggtacca gaagaagcca ggaaaatctc ctcacctcct catctattat
 gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg gcagtggatc
 tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct gaagatgctg
 cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac gttcgggtgga
 ggcaccaagc tggaattgaa a

Vùng V của L Ab969 ở chuột nhắt với trình tự tín hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng SEQ ID
 NO: 9

MGVPTQLLVL LLLWITDAIC DIQMTQSPAS LSASLGETVS IECLASEDIY
 DNLAWYQKKP GKSPHLLIYY ASSLQDGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLES
 EDAATYFCLQ DSEYPWTFGG GTKLELK

Vùng V của L Ab969 ở chuột nhắt với trình tự tín hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng SEQ ID
 NO: 10

atgggtgtcc ccactcagct cttggtgttg ttgctgctgt ggattacaga
tgccatatgt gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat
 ctctgggaga aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac
 gataatttag cgtggtacca gaagaagcca ggaaaatctc ctcacctcct
 catctattat gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg
 gcagtggatc tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct
 gaagatgctg cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac
 gttcgggtgga ggcaccaagc tggaattgaa a

Vùng V của H Ab969 ở chuột nhắt SEQ ID NO: 11

QVTLKESGPG ILQPSQTLST TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPSGKGLEWL
 ANIWDDDKY YNPSLKNRLT ISKDTSNQA FLKLTVHTS DSATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYFDFWGPST MVTVS

Vùng V của H Ab969 ở chuột nhắt SEQ ID NO: 12

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac
 cctcagtcgt acttgcaatt tctctgggtt ttcactgacc acttatggtg

3/35

tgggtgtggg ctggattcgt cagccttcag ggaaggggtct ggagtggctg
 gcaaacattt ggtgggatga tgataagtat tacaatccat ctctgaaaaa
 ccggctcaca atctccaagg acacctccaa caaccaagca ttcctcaagc
 tcaccaatgt acacacttca gattctgcca catactactg tgctcggata
 gggccgatta aatacccgac ggccccctac cggtactttg acttctgggg
 cccaggaacc atggtcaccg tctcg

Vùng V của H Ab969 ở chuột nhắt với trình tự tín hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng
 SEQ ID NO:13

MDRLTSSFLL LIVPAYVLSQ VTLKESGPGI LQPSQTLSLT CTFSGFSLTT
 YGMGVGWIRQ PSGKGLEWLA NIWDDDKYY NPSLKNRLTI SKDTSNNQAF
 LKLTNVHTSD SATYYCARIG PIKYPTAPYR YFDFWGPSTM VTVS

Vùng V của H Ab969 ở chuột nhắt với trình tự tín hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng
 SEQ ID NO:14

atggacaggc ttacttcctc attcctactg ctgattgtcc ctgcatatgt
cctgtctcag gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct
 cccagaccct cagtctgact tgcactttct ctgggttttc actgaccact
 tatggatatg gtgtgggctg gattcgtcag ccttcaggga agggctctgga
 gtggctggca aacatttggg gggatgatga taagtattac aatccatctc
 tgaaaaaccg gctcacaatc tccaaggaca cctccaacaa ccaagcattc
 ctcaagctca ccaatgtaca caattcagat tctgccacat actactgtgc
 tcggataggg ccgattaaat acccgacggc cccctaccgg tactttgact
 tctggggccc aggaaccatg gtcaccgtct cg

FIG.1C

Vùng V của 969gL7 SEQ ID NO:15

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
GTKVEIK

Vùng V của 969gL7 SEQ ID NO:16

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccca gtgtgggaga
caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg
catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtggt
ggcaccaaag tggaaatcaa g

Vùng V của 969gL7 với trình tự ký hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng SEQ ID NO:17

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY
DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP
EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG GTKVEIK

Vùng V của 969gL7 với trình tự ký hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng SEQ ID NO:18

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga
cgcaagatgc gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccca
gtgtgggaga caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac
gataacctgg catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct
gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg
gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg
gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac
cttcgggtggt ggcaccaaag tggaaatcaa g

chuỗi nhẹ 969gL7 (V + hằng định) SEQ ID NO:19

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

chuỗi nhẹ 969gL7 (V + hằng định) SEQ ID NO:20

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccca gtgtgggaga
caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg

5/35

```

catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtgg
ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat ctgtcttcat
cttcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt

```

chuỗi nhẹ 969g_{L7} (V + hằng định) với trình tự ký hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng
SEQ ID NO: 21

```

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY
DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP
EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

```

chuỗi nhẹ 969g_{L7} (V + hằng định) với trình tự ký hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng
SEQ ID NO: 22

```

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga
cgcaagatgc gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcc
gtgtgggaga cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac
gataacctgg catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct
gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg
gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg
gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac
cttcgggtgg ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat
ctgtcttcat cttcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc
tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca
gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca
cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac
ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt
gt

```

FIG.1D

Vùng V của 969gH2 SEQ ID NO:23

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
 ANIWWDDEKY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYFDFWGQGT MVTVS

Vùng V của 969gH2 SEQ ID NO:24

gaagtgcac tcaaggagtc tggacccgct ctggtgaaac caacccaaac
 actcactttg acatgtactt ttagtggtct ctcattgact acctatggaa
 tgggcgtggg atggatcaga cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg
 gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccctg ccctgaaaaa
 ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtgt gtgctgacca
 tgacaaaatat ggatcccgtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcat
 ggtcccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg
 ccaagggaca atggttactg tctcg

Vùng V của 969gH2 với trình tự ký hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng SEQ ID NO:25

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSE VTLKESGPAL VKPTQTLTLT CTFSGFSLTT
 YGMGVGWIRQ PPGKALEWLA NIWWDDEKY NPSLKNRLTI SKDTSKNQVV
 LTMTNMDPVD TATYYCARIG PIKYPTAPYR YFDFWGQGTMT VTVS

Vùng V của 969gH2 với trình tự ký hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng SEQ ID NO:26

atggagtggg cctgggtggt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccggggg
ccactccgaa gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaacca
 cccaaacact cactttgaca tgtactttta gtggcttctc attgactacc
 tatggaatgg gctgtgggatg gatcagacag ccacctggca aggtctctgga
 atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat aaccgtccc
 tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtgggtg
 ctgaccatga caaatatgga tcccgttgac accgcaacct actactgcgc
 ccgcattggt ccataaaagt accctacggc accttaccga tatttcgact
 tttggggcca agggacaatg gttactgtct cg

chuỗi nặng 969gH2 (V + hằng định – hu IgG4P) SEQ ID NO:27

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
 ANIWWDDEKY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYFDFWGQGT MVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA
 LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS
 SLGKTKYTCN VDHKPSNTKV DKRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QFNSTYRVVS VLTIVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR

EPQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QOPENNYKTT
 PPVLDSGDSF FLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
 LGK

chuỗi nặng 969gH2 (V + hằng định – hu IgG4P, exons underlined) SEQ ID NO: 28

gaagtgacac tcaaggagtc tggacccgct ctggtgaac caacccaaac
actcactttg acatgtactt ttagtggctt ctcattgact acctatggaa
tgggcgtggg atggatcaga cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg
gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataacccg ccctgaaaaa
ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagt gtgctgacca
tgacaaatat ggatcccg gtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcatt
ggtcccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg
ccaagggaca atggttactg tctcgagcgc ttctacaaag ggcccatccg
tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg
gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttccc gctgtcctac
agtccctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc
agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa
caccaaggtg gacaagagag ttggtgaag gccagcacag ggagggagg
tgtctgctgg aagccaggct cagccctcct gcctggacgc accccggctg
tgcagcccca gcccagggca gcaaggcatg ccccatctgt ctcctcacc
ggaggcctct gaccaccca ctcatgcca gggagagggt cttctggatt
tttccaccag gctccgggca gccacaggct ggatgccct accccaggcc
ctgcgcatag aggggcagg gctgcgtca gacctgcaa gagccatctc
cgggaggacc ctgcccctga cctaagcca ccccaaaggc caaactctcc
actccctcag ctcagacacc ttctctcctc ccagatctga gtaactcca
atcttctctc tgcagagtcc aaatatgg tc ccccatgcc accatgcca
ggtaagccaa cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgcc
tagagtagcc tgcatccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacgcatcc
acctccatct cttcctcagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt
cctgttcccc ccaaaacca aggacactct catgatctcc cggaccctg
aggtcacgtg cgtgggtgg gacgtgagcc aggaagacc cgaggtccag
ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggt cataatgcc agacaaaggcc
gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc gtcctcaccg
tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc
aacaaaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg
tgggaccac ggggtgcgag ggcacatgg acagaggtca gctcggcca
ccctctgcc tgggagtga cgctgtgcca acctctgtcc ctacagggca
gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatccag gaggagatga
ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa
gaccagcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca
ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc
cctgtctctg ggtaaa

chuỗi nặng 969gH2 (V + hằng định – hu IgG4P) với trình tự ký hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng

SEQ ID NO:29

MEWSWVFLFF LSVTIGVHSE VTLKESGPAL VKPTQTLTLT CTFSGFSLTT
YGMGVGWIRQ PPGKALEWLA NIWDDDKYY NPSLKNRLTI SKDTSKNQVV
LTMTNMDPVD TATYYCARIG PIKYPTAPYR YDFDWGQGTMT VTVSSASTKG
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWDVGDVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG OPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSL GK

chuỗi nặng 969gH2 (V + hằng định – hu IgG4P, exons underlined) với trình tự ký hiệu được gạch dưới hoặc in nghiêng SEQ ID NO:30

atggagtggg cctgggtggt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccggggg
ccactccgaa gtgacactca aggagtctgg accgctctg gtgaaaccaa
cccaaact cactttgaca tgtactttta gtggcttctc attgactacc
tatggaatgg gcggtggatg gatcagacag ccacctggca aggctctgga
atggctggcc aacatctggg gggatgacga caagtactat aaccgtccc
tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtgggt
ctgaccatga caaatatgga tcccgttgac accgcaacct actactgcgc
ccgcattggg cccataaagt accctacggc accttaccga tatttcgact
tttggggcca agggacaatg gttactgtct cgagcgcttc tacaaagggc
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac
agccgccttg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg
tgctgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc
ccagcaacac caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga
gggagggtgt ctgctggaag ccaggctcag ccctcctgcc tggacgcacc
ccggctgtgc agccccagcc cagggcagca aggcatgccc catctgtctc
ctcacccgga ggcctctgac cacccactc atgcccaggg agagggtctt
ctggattttt ccaccaggct ccgggcagcc acaggctgga tgcccctacc
ccaggccctg cgcatacagg ggcagggtgt gcgtcagac ctgccaagag
ccatatccgg gaggaccctg cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa
actctccact ccctcagctc agacaccttc tctcctccca gatctgagta
actcccaatc ttctctctgc agagtccaaa tatgggtccc catgcccacc
atgcccaggt aagccaaccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca
ggtgccttag agtagcctgc atccaggagc aggccccagc cggtgtgtga
cgcattccacc tccatctctt cctcagcacc tgagttcctg gggggaccat
cagtcttcct gttcccccca aaacccaagg acactctcat gatctcccgg
accctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccccga

9/35

ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga
caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa
ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag
ccaaaggtgg gacccacggg gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct
cggcccaccc tctgccctgg gagtgaccgc tgtgccaacc tctgtcccta
cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta
ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc
tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt
ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga
gcctctccct gtctctgggt aaa

FIG.1E

VK1 2-1-(1) ở người trong kết cấu chất nhận O12 JK4 SEQ ID NO:31

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA
ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTKVEIK

VK1 2-1-(1) ở người trong kết cấu chất nhận O12 JK4 SEQ ID NO:32

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa
attggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct
gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtggatc
tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct gaagattttg
caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga
gggaccaagg tggagatcaa a

VH2 3-1 2-70 ở người trong kết cấu chất nhận JH3 SEQ ID NO:33

QVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLs TSGMRVSWIR QPPGKALEWL
ARIDWDDDKF YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
AFDIWGQGTm VTVS

VH2 3-1 2-70 ở người trong kết cấu chất nhận JH3 SEQ ID NO:34

caggtcacct tgaaggagtc tggctctgcg ctggtgaaac ccacacagac
cctcacactg acctgcacct tctctggggt ctcactcagc actagtggaa
tgcggtgtgag ctggatccgt cagccccag ggaaggccct ggagtggctt
gcacgcattg attgggatga tgataaattc tacagcacat ctctgaagac
caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccagggtg gtccttacia
tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata
gcttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgtct ct

FIG.1F

Trình tự axit amin cho CSF-1R SEQ ID NO: 35

MGPGLLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW
 DGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGT
 VKDPARPWNV LAQEVVVFED QDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRPLMR
 HTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
 GPPALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
 DFHNNRYQKV LTLNLDQVDFQHAGNYSVCV
 LNLSSSQNLIEQVTVGEGNLKVMVEAYPGLOGFNWTYLGPFSDHQPEPKLANATTKD
 LANATTKDTRYHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFFELTLRYPPE
 PPEVSVIWTFIGSGTLLCAASGYQPQNVTLWQCSGHTDRCDEAQVLQVWDDPYPEVLSQ
 DDPYPEVLSQEPFHKVTVQSLTLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGAHTHP
 ISAGAHTHPDEFLLTPVVLACMSIMALLLLLLLLLYKYKQKPKYQVRW
 KIIESYEGNSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNLQFGKTLGAGAFGKVVEAT
 AFGLGKEDAVLKVAVKMLKSTAHADKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLL
 GACTHGGPVLVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGPSLSPGQDPEGGVVDYK
 NIHLEKKYVR RDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLDKEDGRPL
 ELRDLHLHFSSQVAQGMFLASKNCIHRDVARNVLLTNGHVAKIGDFGLA
 RDIMNDSNYIVKGNARLPVKWMAPEISIFDCVYTVQSDVWSYGILLWEIFS
 LGLNPYPGILVNSKFYKLVKDGYQMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPTHR
 PTFQQICSFLEQEAQEDRREDYTNLPSSSRSGSGSSSSSEEESSSEH
 LTCCEQGDIAQPLLQPNNYQFC

Trình tự axit amin cho CSF-1R SEQ ID NO: 36

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGT
 CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGR
 LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
 LVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
 YSCVASNVQGHSTSMFFRVV

Trình tự axit amin cho CSF-1R SEQ ID NO: 37

MRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSIRLKVQK

Trình tự axit amin cho CSF-1R SEQ ID NO:38 (SNP V32G, A245S, H247P, V279M, ở đoạn được gạch dưới)

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGT
 CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGR
 LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
 LVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
 YSCVASNVQGHSTSMFFRVVESAYLNLSSSQNLIEQVTVGEGNLKVMVEAYPGLOGFNWTYLG
 PFSDHQPEPKLANATTKDTRYHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFFELTLRYPPE
 VSVIWTFIGSGTLLCAASGYQPQNVTLWQCSGHTDRCDEAQVLQVWDDPYPEVLSQEPFHKVT
 VQSLTLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGAHTHPDE

Mô ghép CHUỖI NHỊ 969

[illegible]

969 = Trình tự chuỗi nhẹ biến đổi ở chuột nhất

969 = Iринт ың чууру ине биенди О Чууру инат
969 gL7 = Мo ghép được nhân hóa của 969 chuỗi nhẹ biến đổi sử dụng VK1 2-1-(1) O12 với dòng tinh ở người JK4 làm kết cấu chất nhận CDR được thể hiện bằng cách in đậm/gạch dưới
Du lượng thể cho được thể hiện bằng cách in đậm/in nghiêng và được làm nổi bật: Y71

FIG.2B

Mô ghép chuỗi nặng 969

	1	5	10	15	20	25	30	ab	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	abc	85	90	95	105	110	
Chuỗi nặng 969	QVTLKESGPGILOPSQTLSLTCTFSGFLTTYGMGVGMIRQPSCKGLEWLANIWWDDDKYYPNPSLKRLTISKDTSNQAFKLINVHTSDSATYYCARI GP IKYPTAPRYPTDFWGFCTMTVTS																								
VH2 3-1 2-70	QVTLKESGPAIVKPTQTILTCTFSGLSTSGMRVSNIRQPEGKALEWLANIDWDDDKFYSTSLKRLTISKDTSKNQVLLITNNMDPVDATYYCARI----- AFD WGGGTMTVTS																								
969gH2	EVLTKESGPAIVKPTQTILTCTFSGLTTYGMGVGMIRQPEGKALEWLANIWWDDDKYYPNPSLKRLTISKDTSKNQVLLITNNMDPVDATYYCARI GP IKYPTAPRYPTDFWGGGTMTVTS																								

Chú thích

969 = Trình tự chuỗi nặng biến đổi ở chuột nhắt
969gH2 = Mô ghép được nhân hóa của 969 chuỗi nặng biến đổi sử dụng VH2 3-1 2-70 với dòng tinh ở người JH3 làm kết cấu chất nhận
CDRs được thể hiện bằng cách bôi đậm/gạch dưới

FIG.3**SEQ ID NO: 39**

MGPGVLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW DGPPSPHWT L YSDGSSSILS
TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPARPWNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL
VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA
ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDFVLQHN NTKLAIPQOS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA
SNVQGHSTS MFFRVVESAY LNLSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK
LANATTKDTY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWF INGSGTLLCA
ASGYQPQNV T WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS
VGSGSWAFIP ISAGATHPP DE

15/35

FIG.4

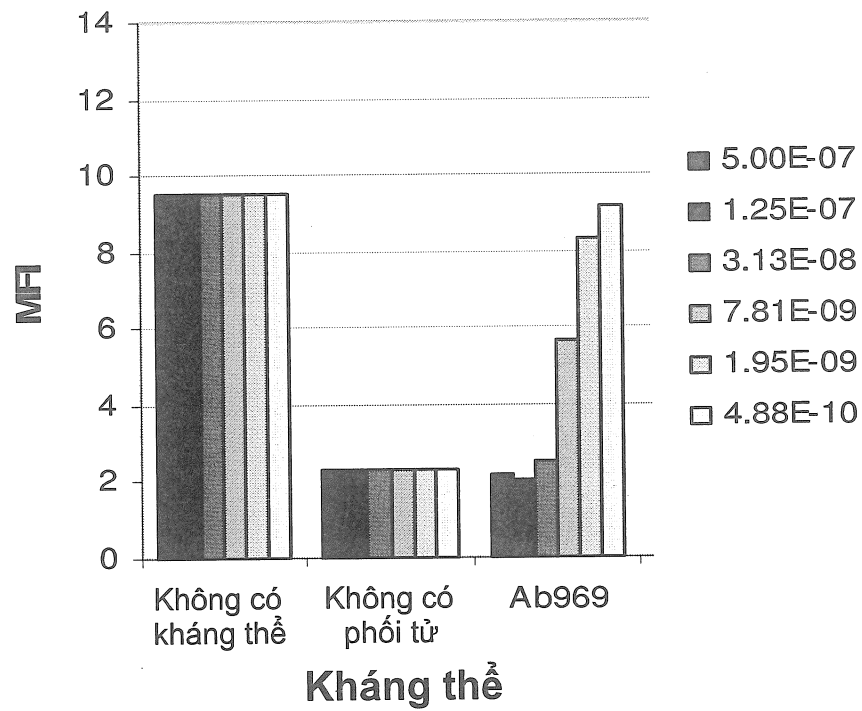


FIG.5a

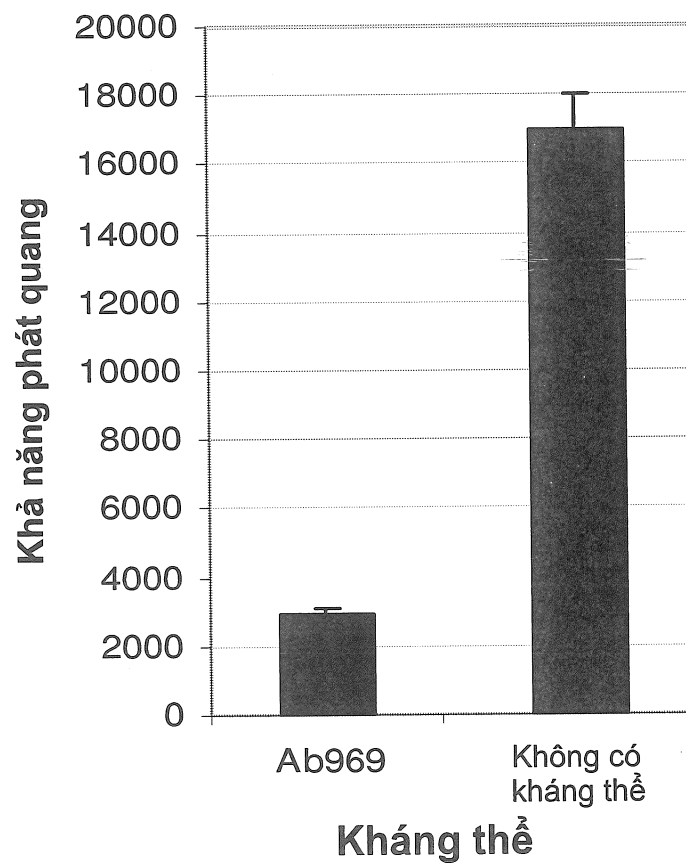


FIG.5b

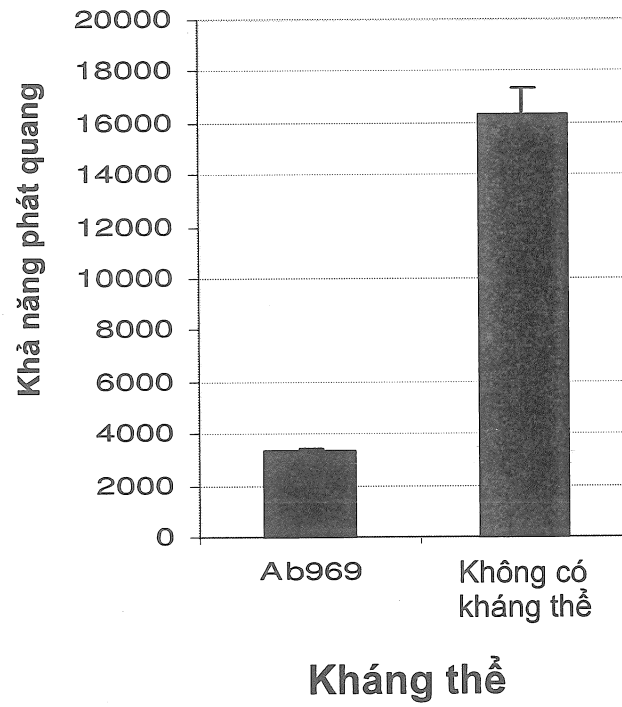


FIG.6

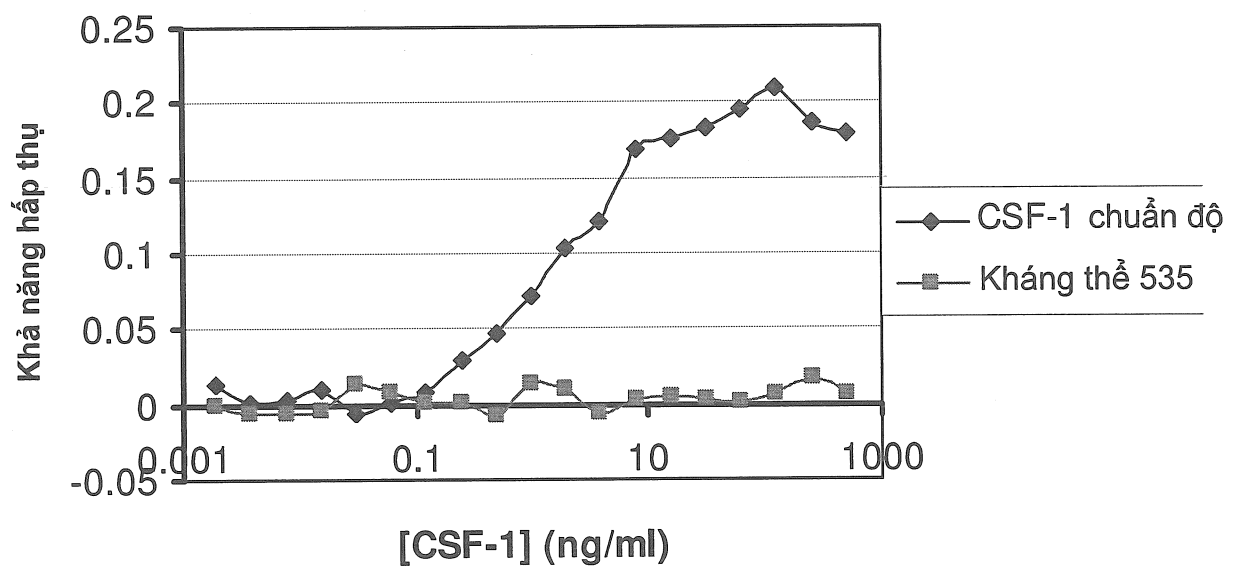
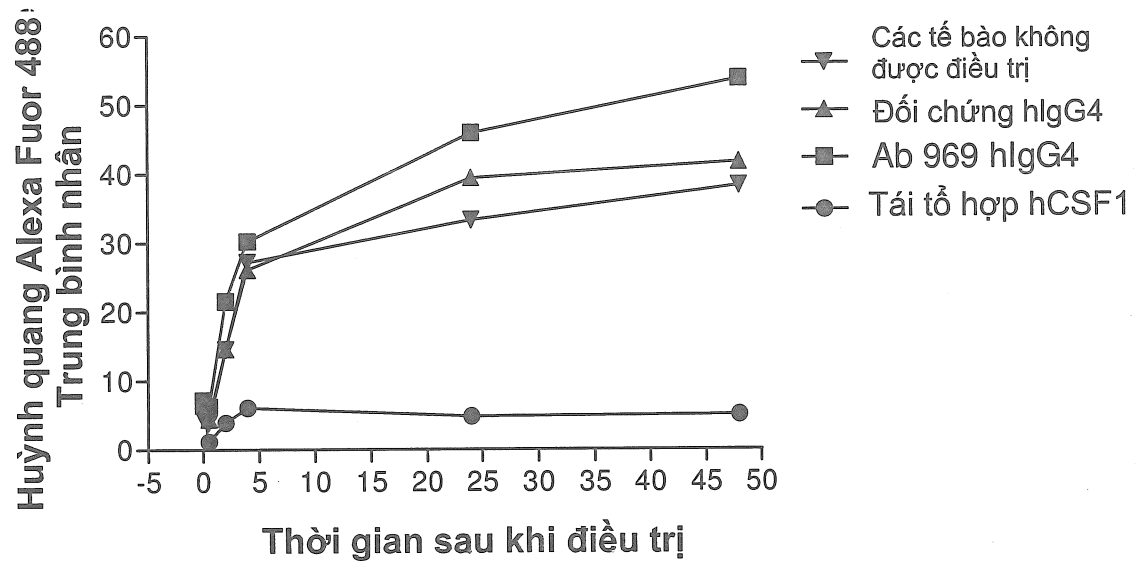


FIG.7



18/35

FIG.8

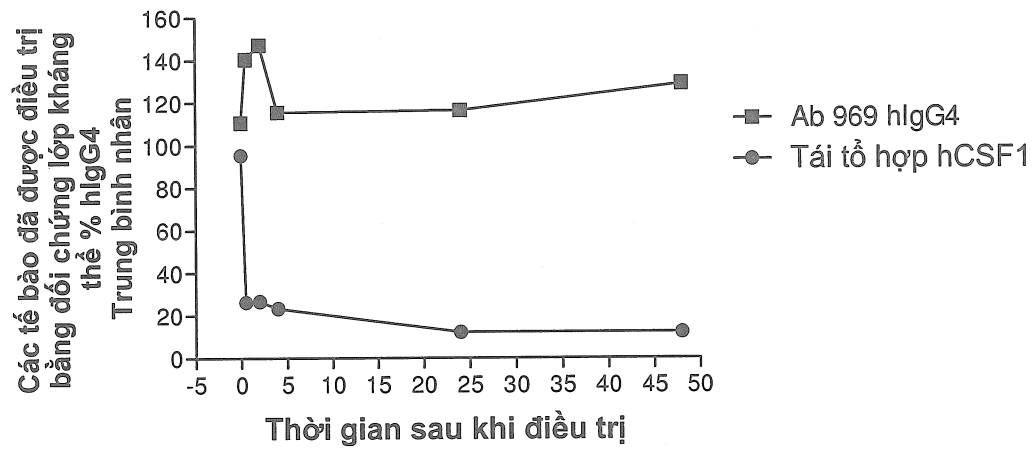


FIG.9

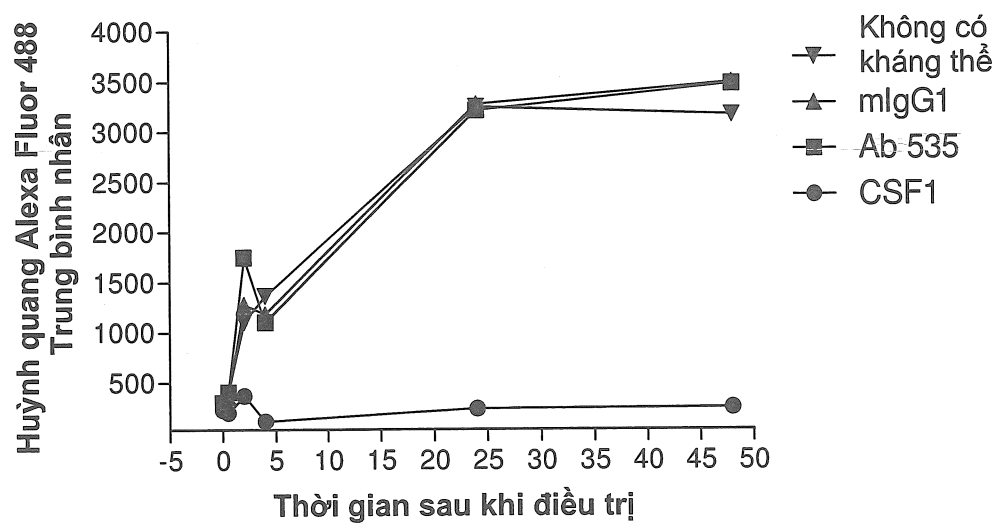


FIG.10

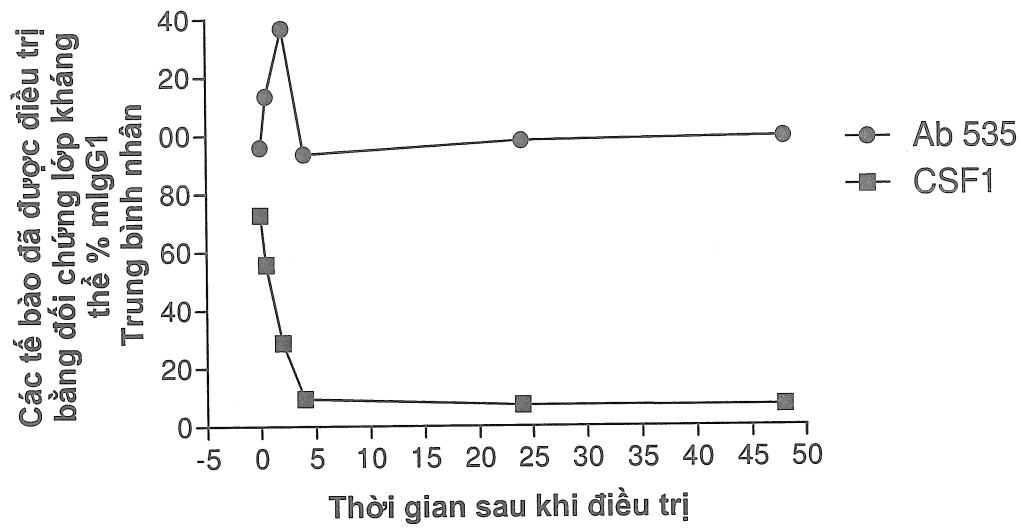
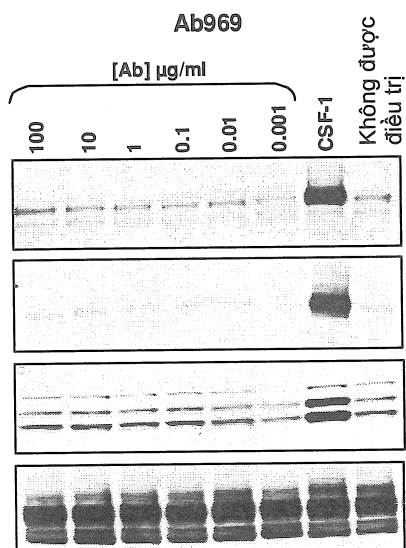


FIG.11



20/35

FIG.12

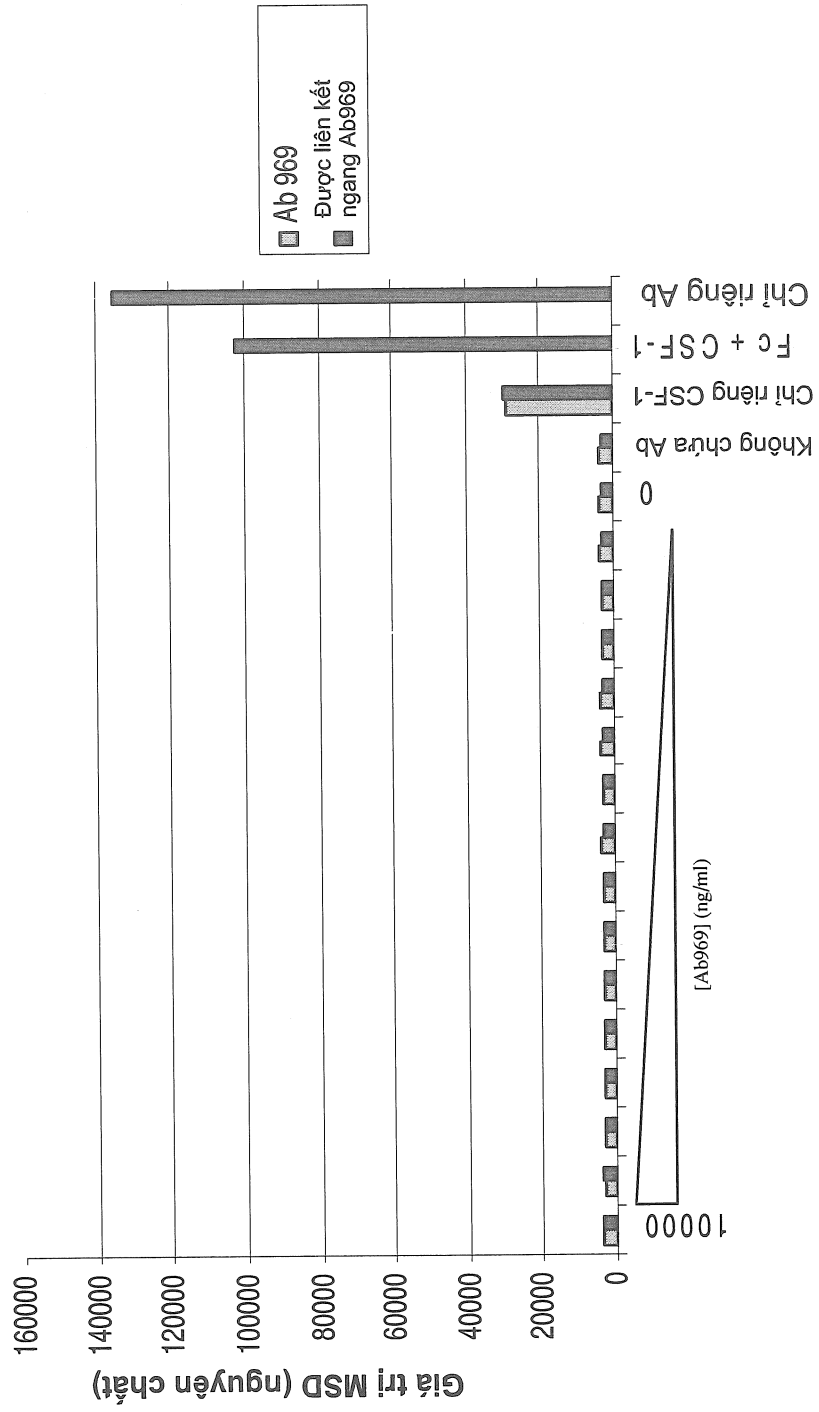
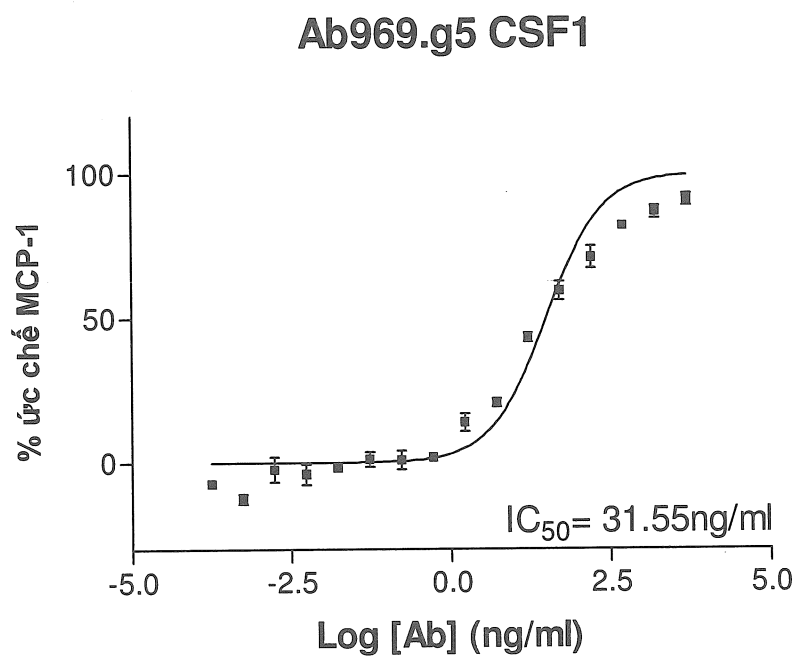
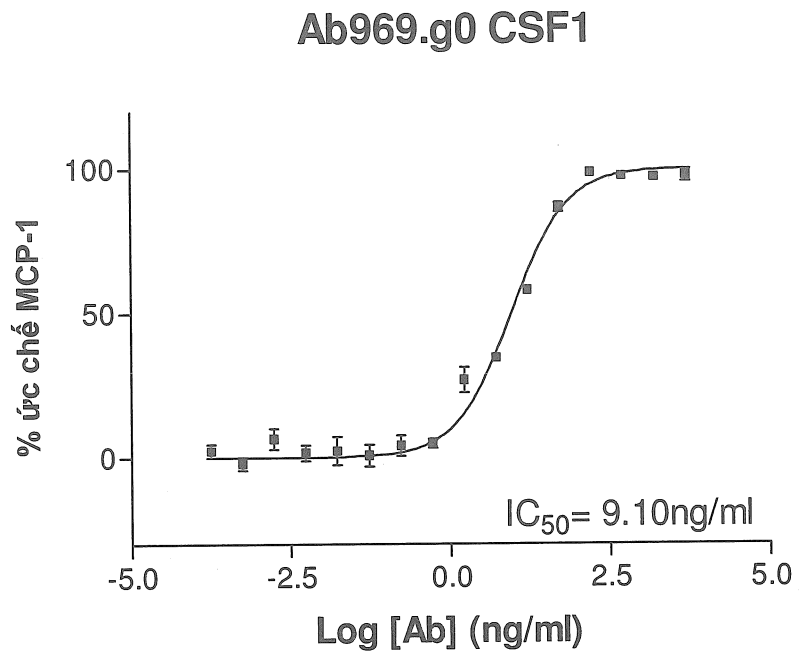


FIG.13



22/35

FIG.14

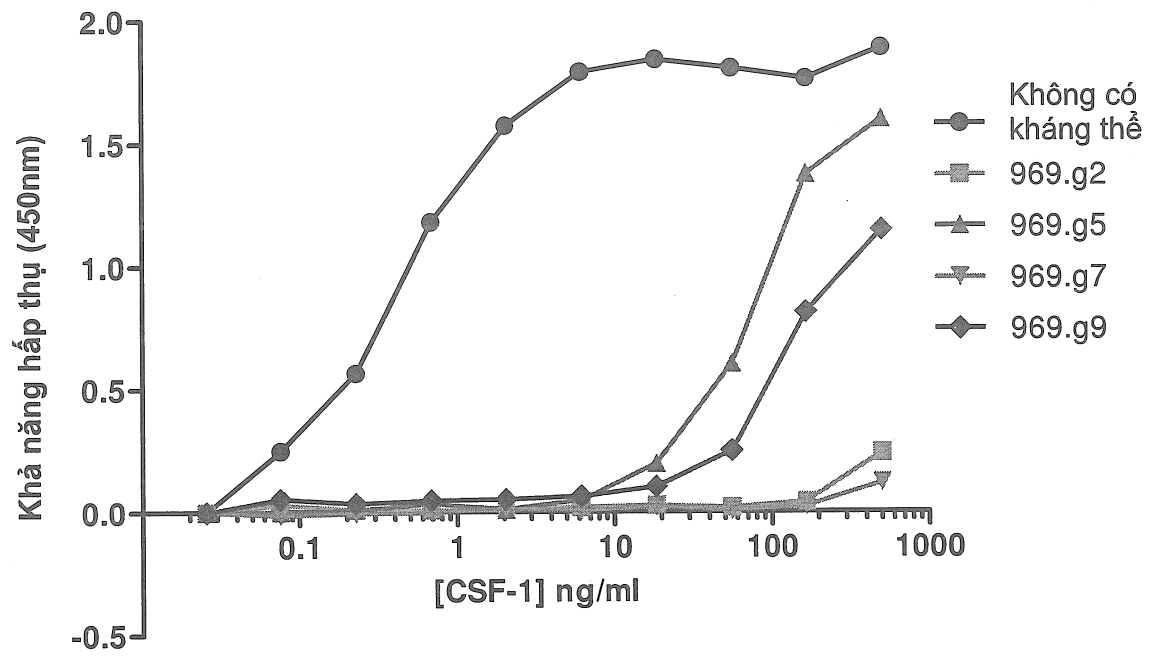


FIG.15a

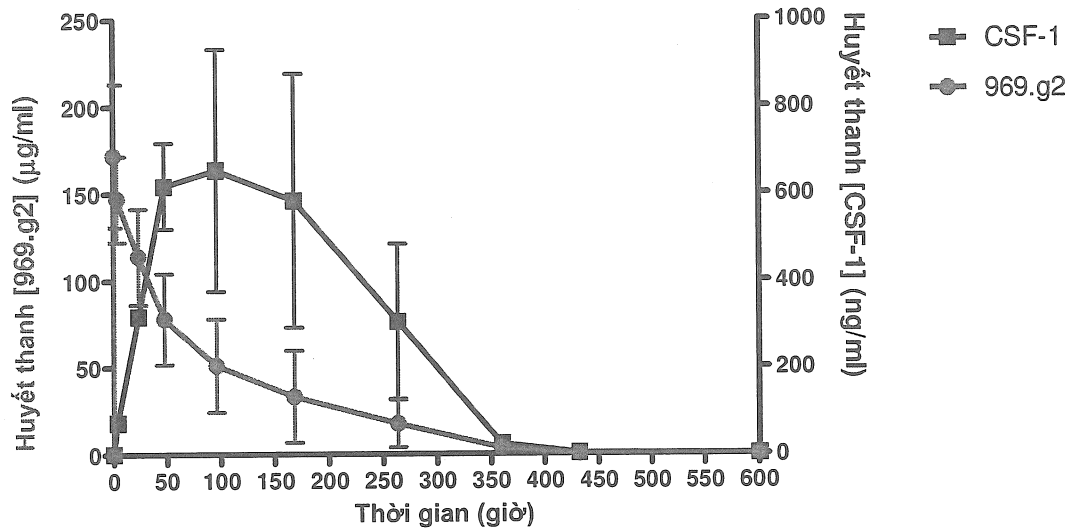


FIG.15b

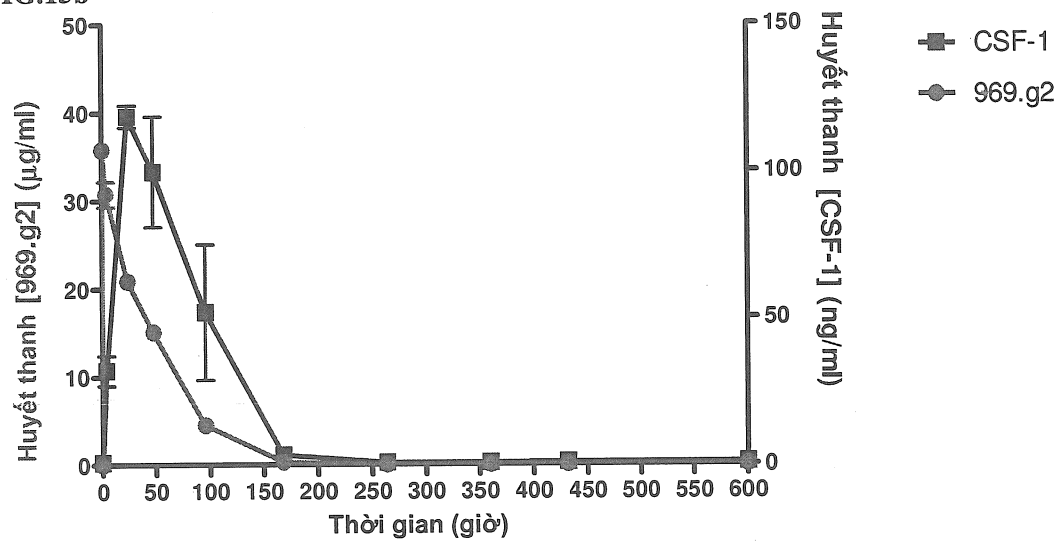
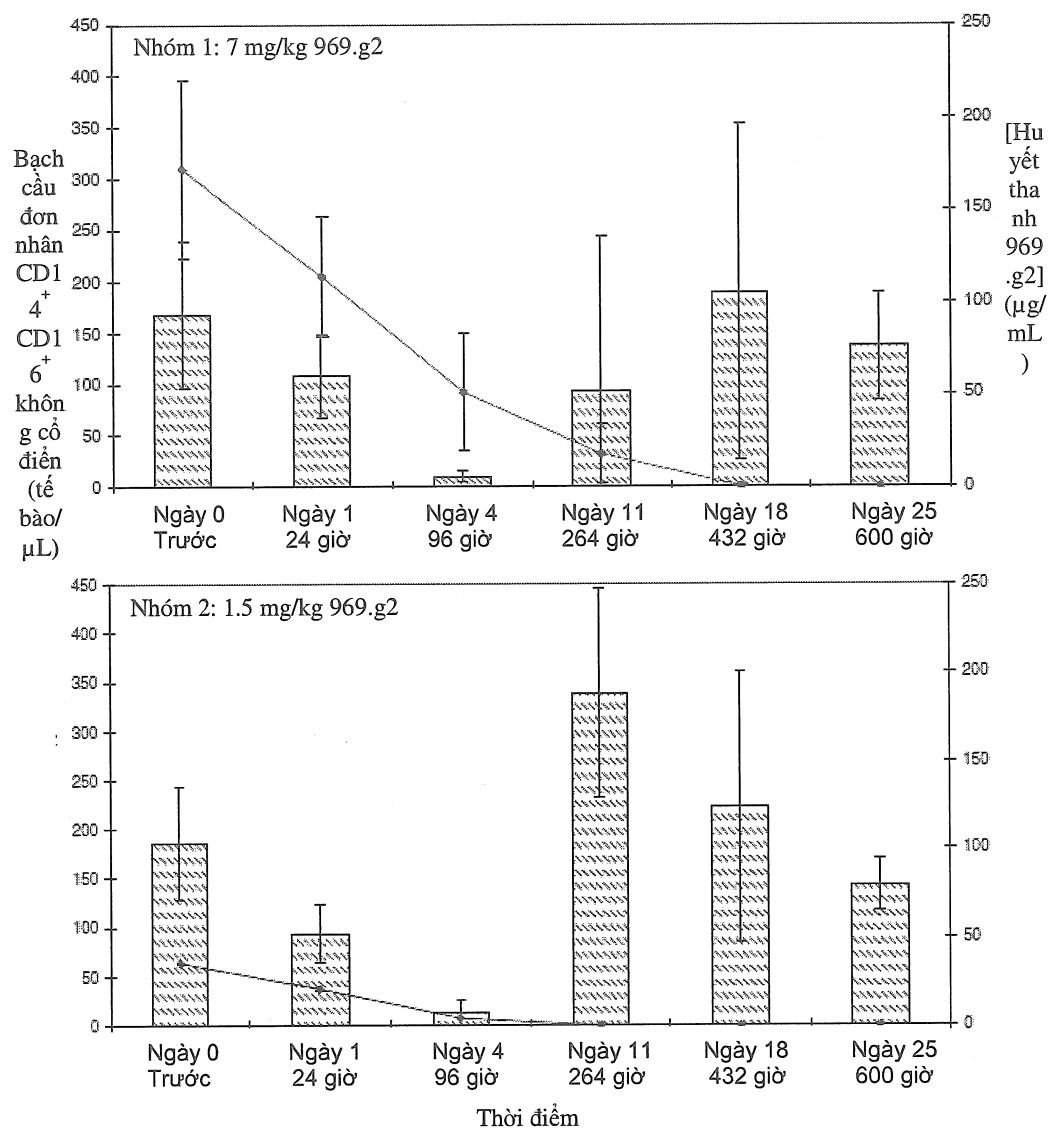


Fig.15c



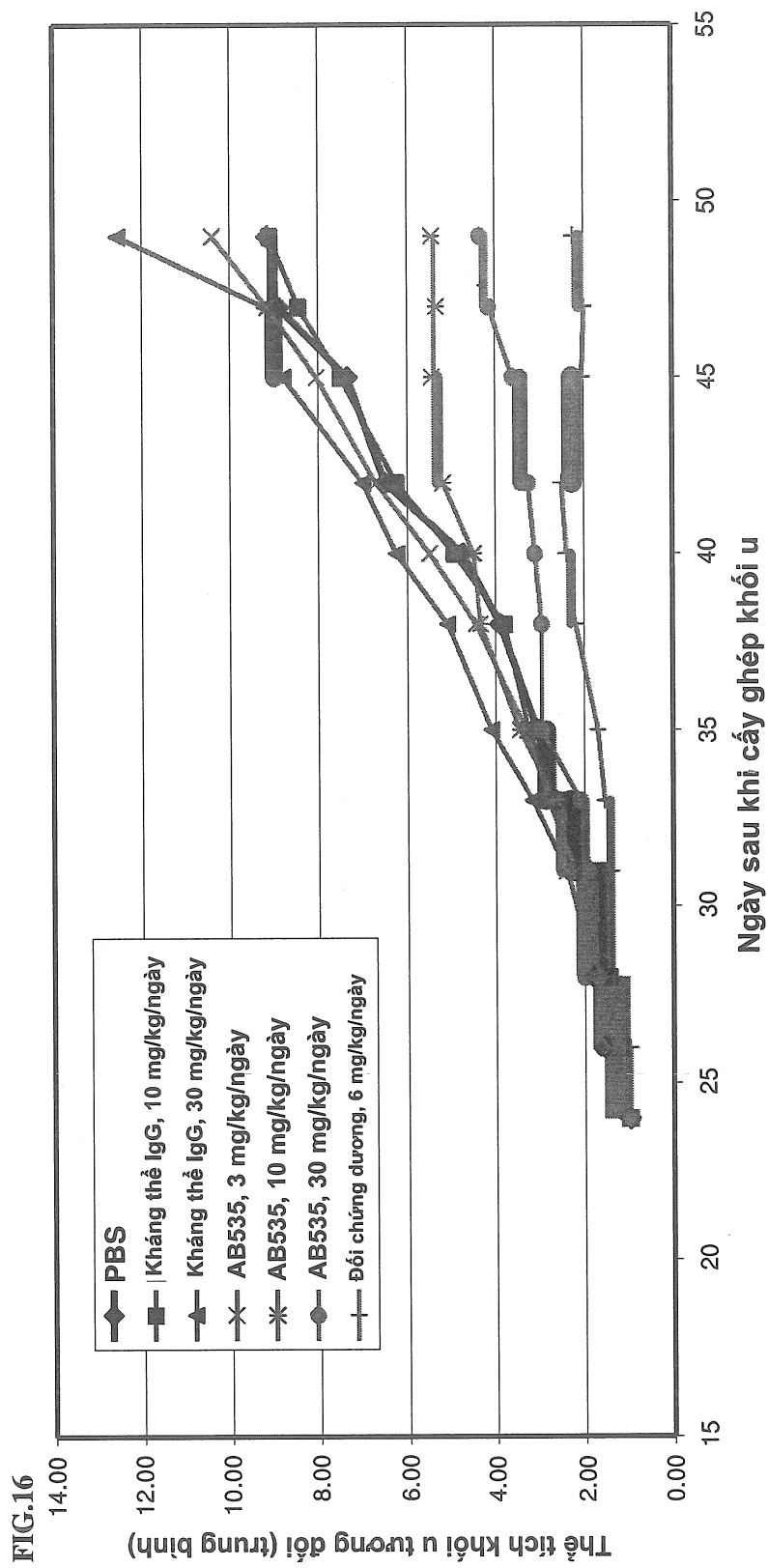


FIG.17

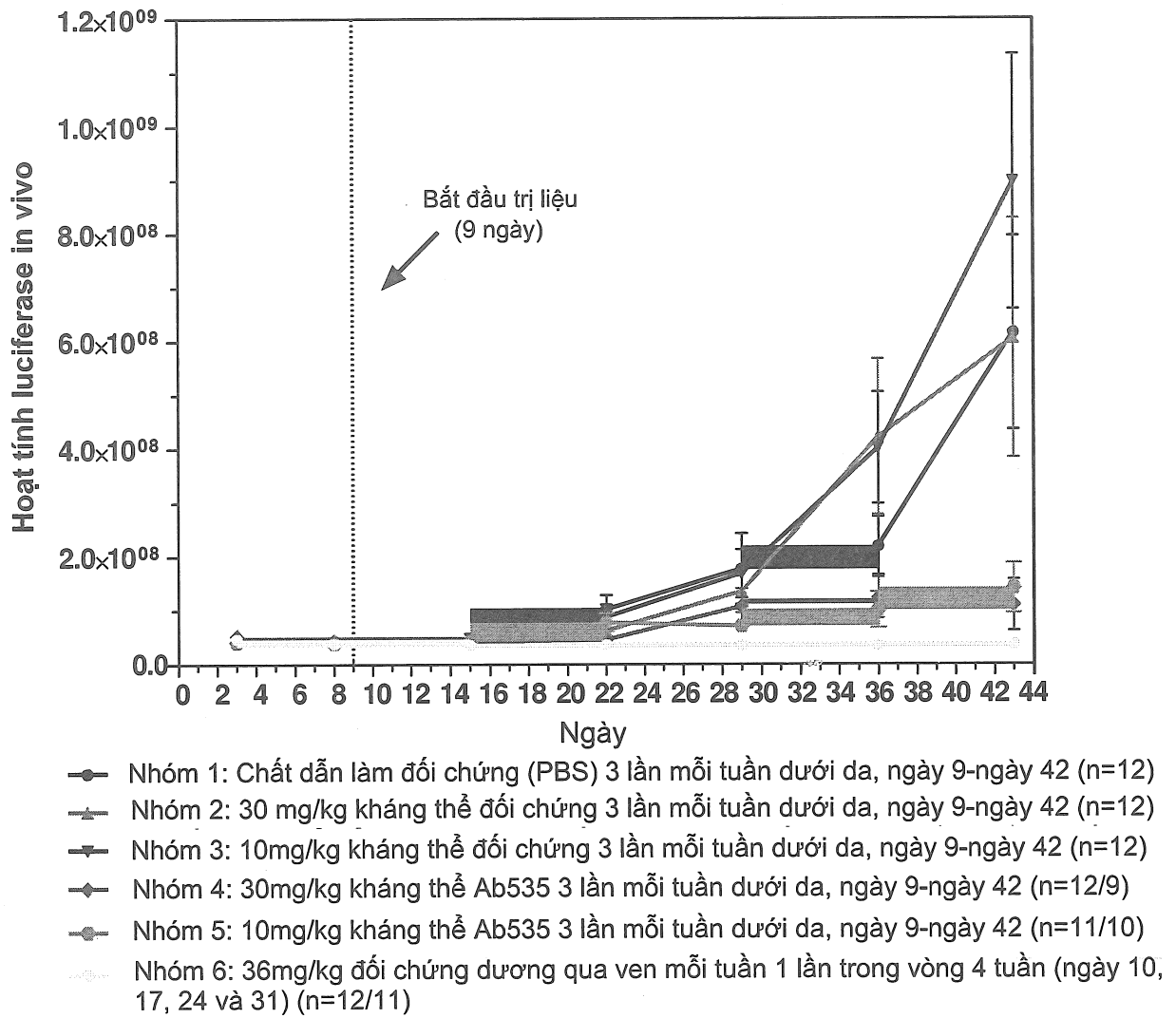
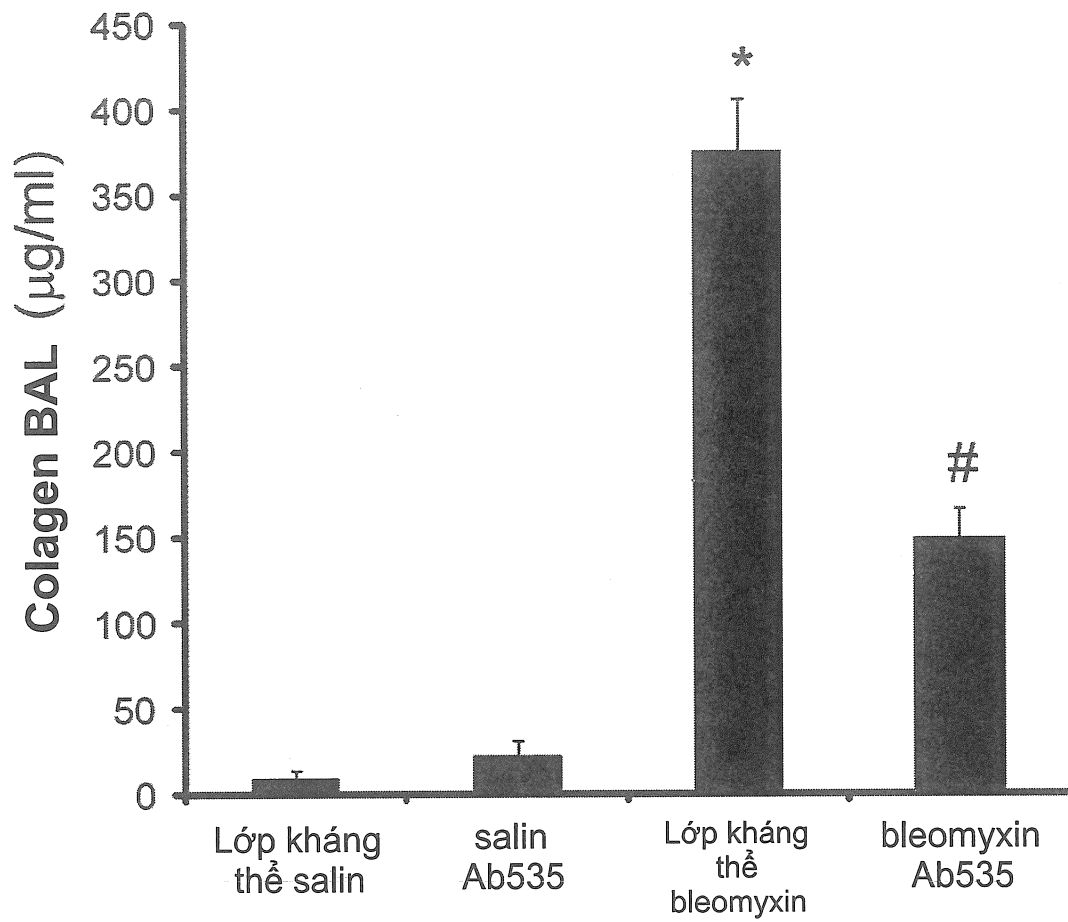


Fig.18a



28/35

Fig.18b

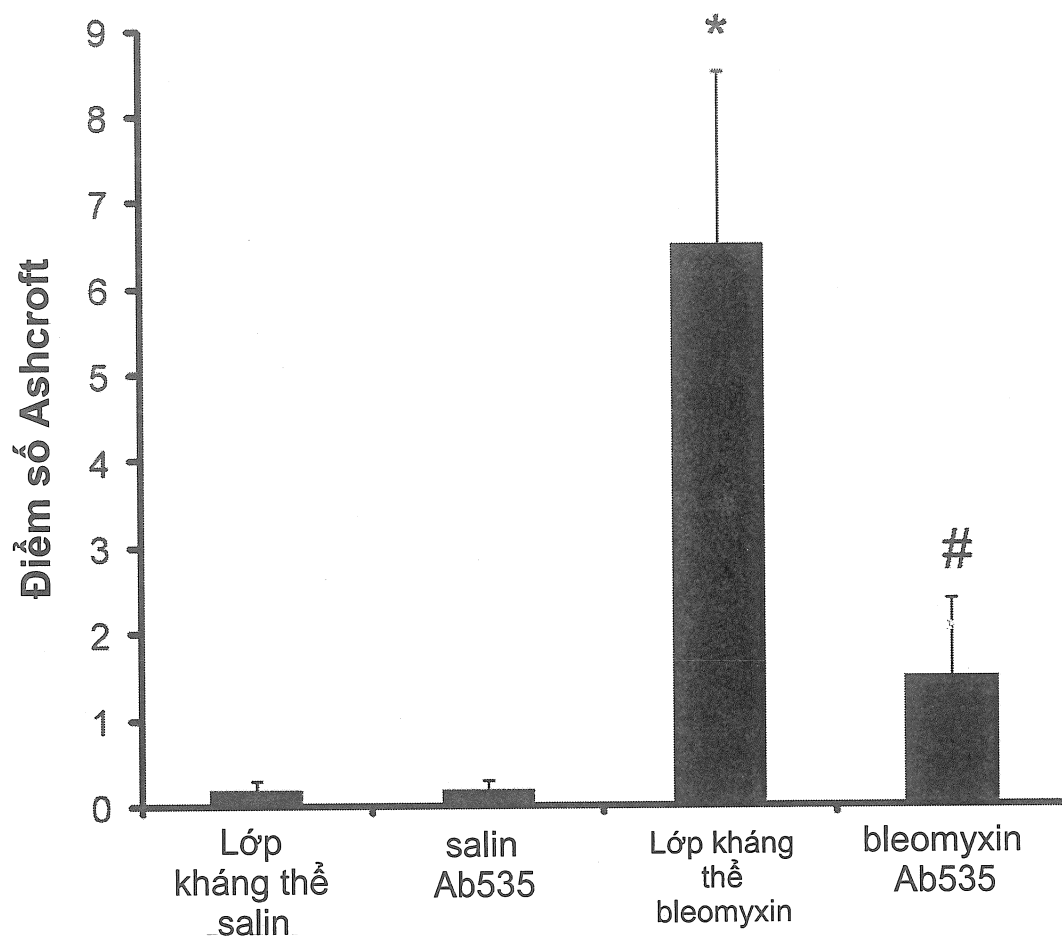


Fig.18c

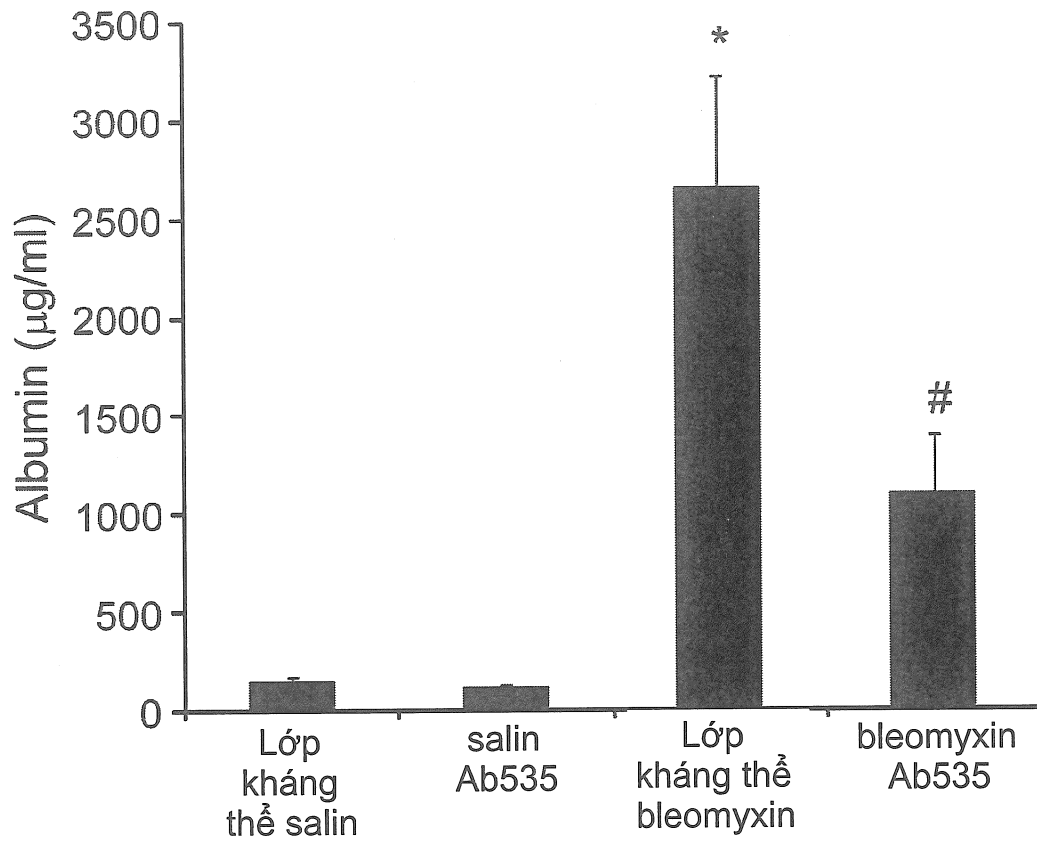


Fig 18d:

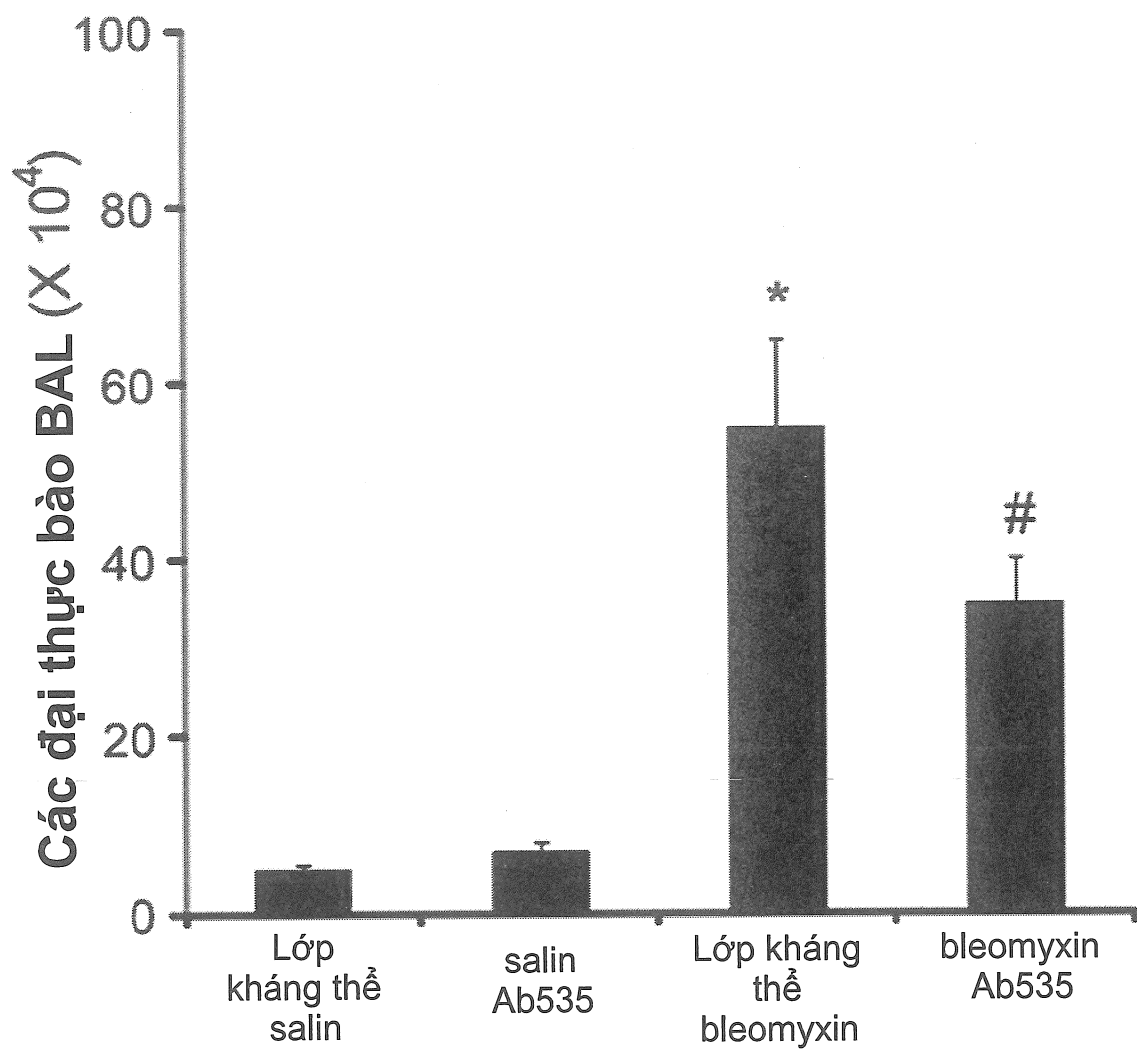


Fig.19

Salin + đối chứng lớp kháng thể Ab Bleomycin + đối chứng lớp kháng thể Ab Bleomycin + Ab535

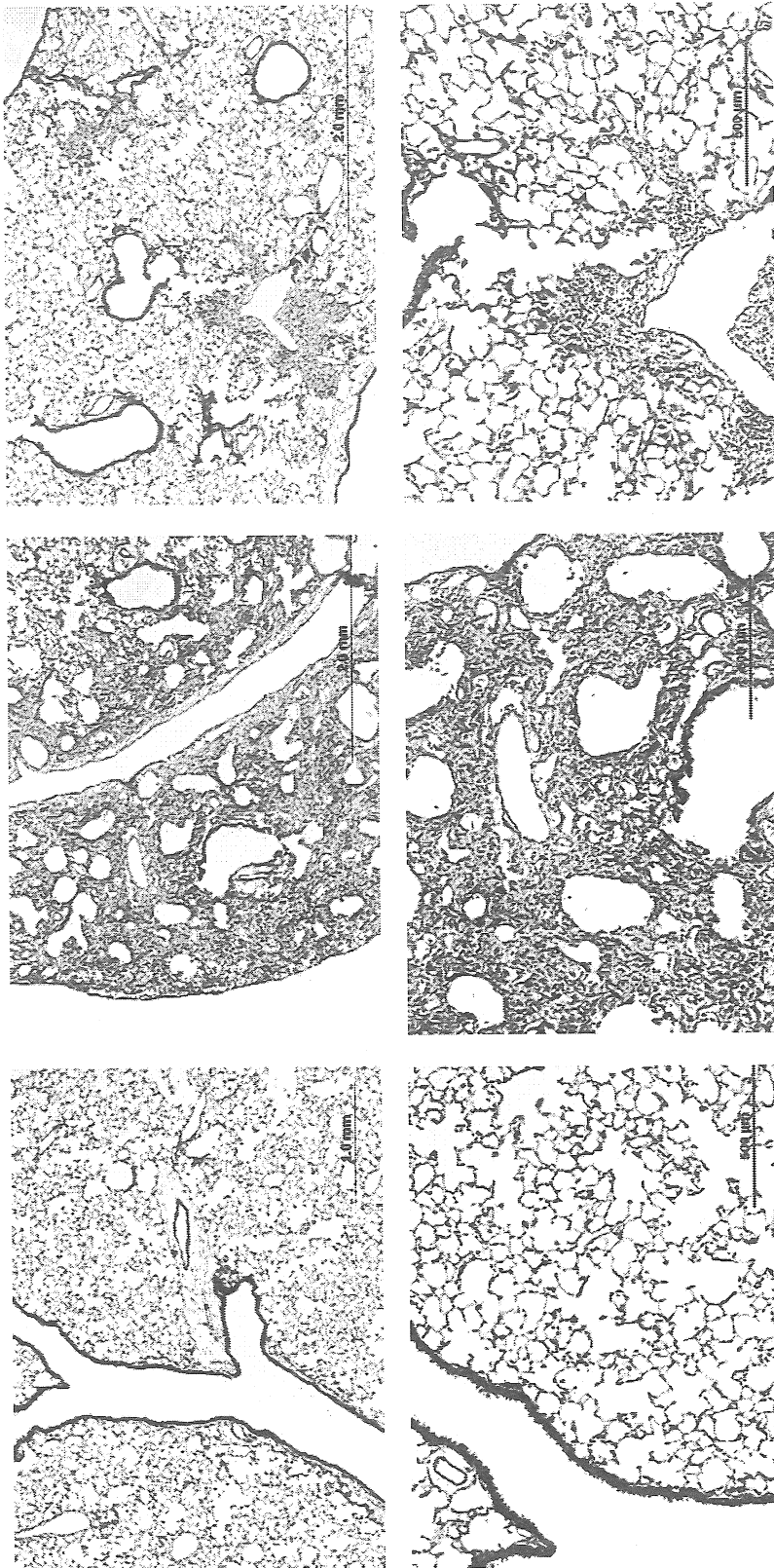


Fig.20a

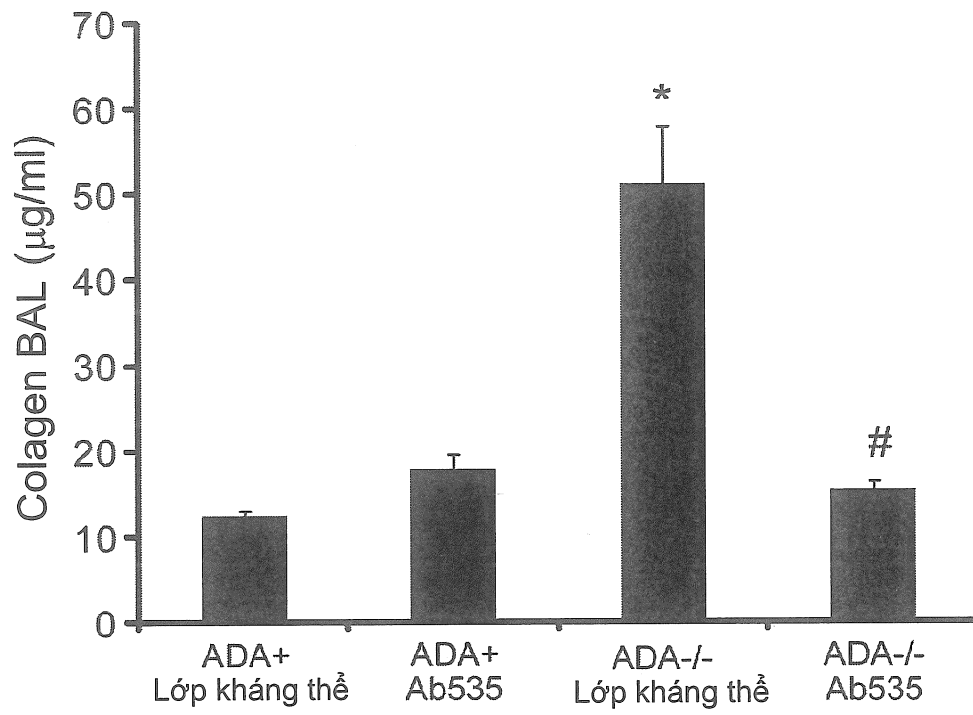


Fig.20b

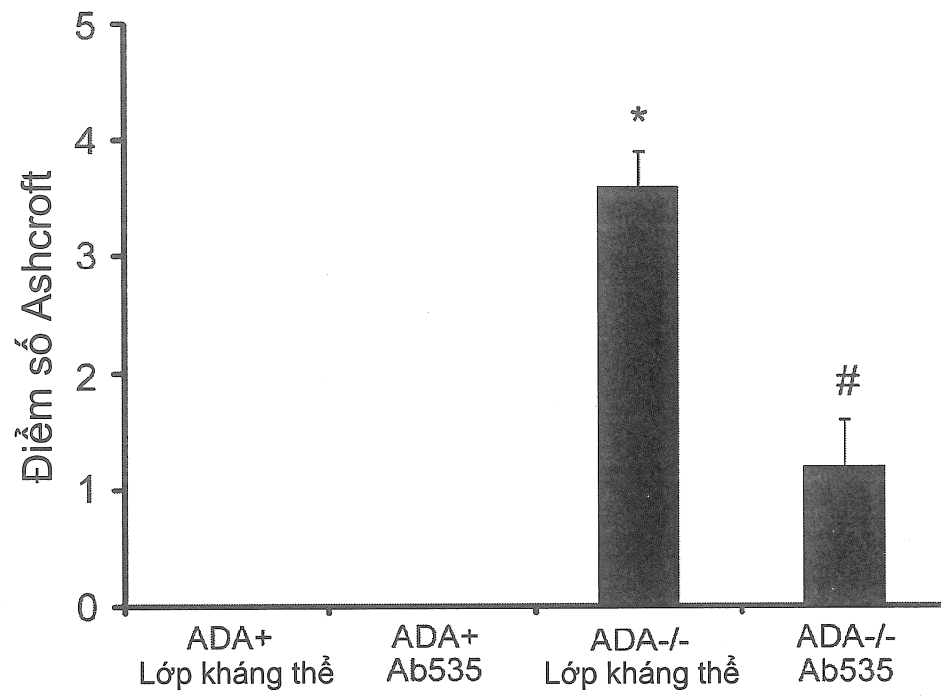


Fig.20c

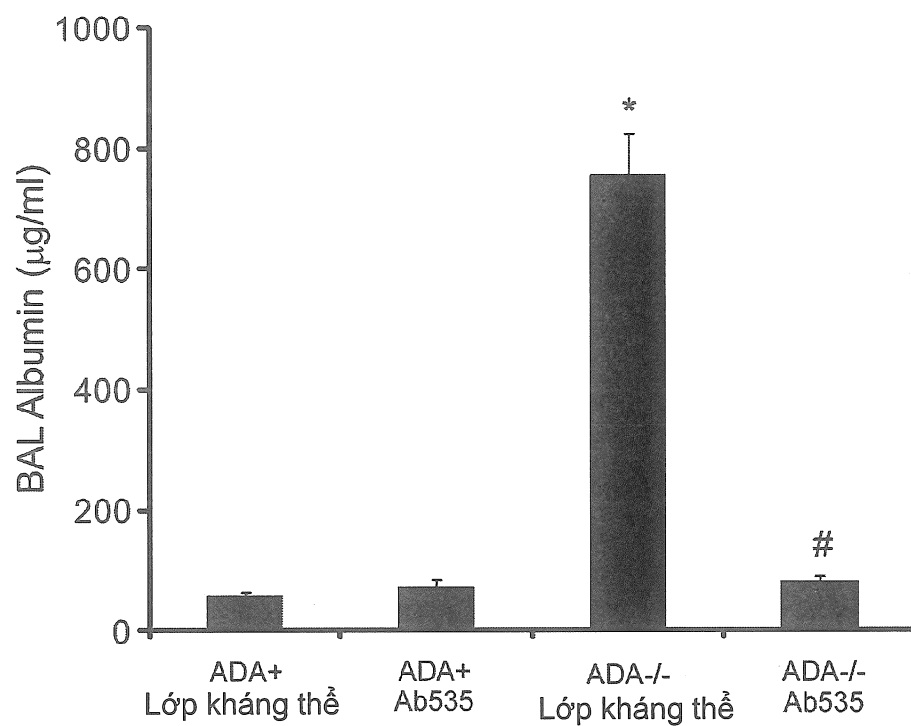
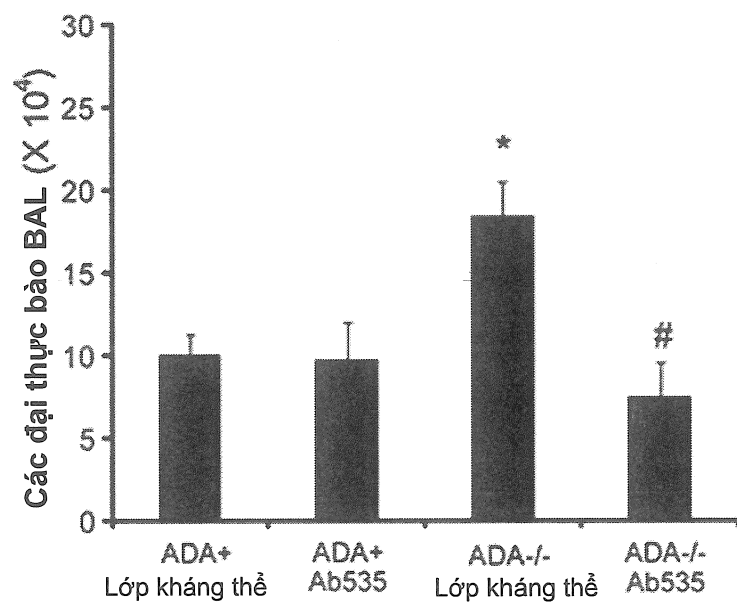
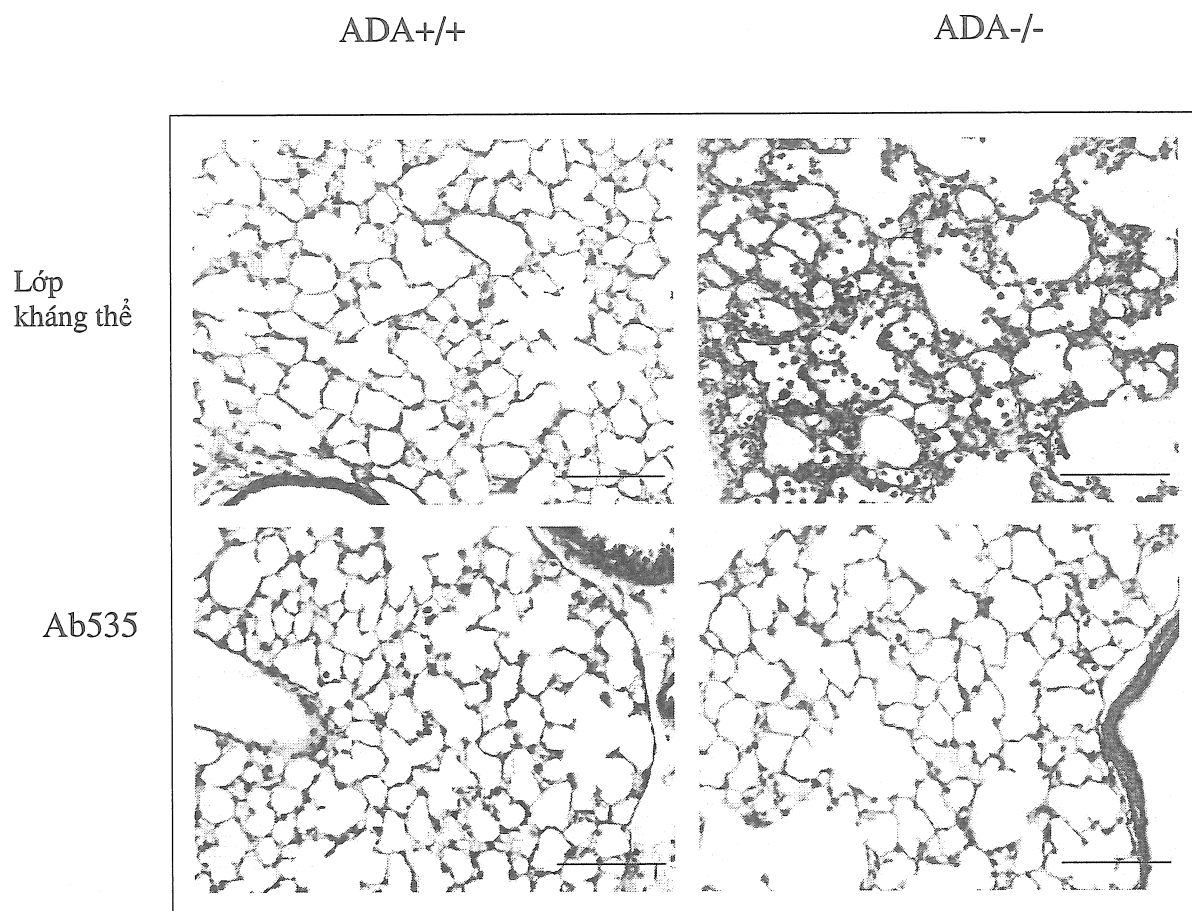


Fig.20d



* Biểu thị sự khác biệt đáng kể so với ADA+ (kiểu hoang dã); # biểu thị sự khác biệt đáng kể so với ADA-/- ở chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng lớp kháng thể ($p \leq 0,05$).

Fig.21



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG CSF-1R, TRÌNH TỰ ADN PHÂN LẬP, VECTƠ TÁCH ĐỒNG HOẶC VECTƠ BIỂU HIỆN, TẾ BÀO CHỦ BAO GỒM VECTƠ NÀY, QUY TRÌNH TẠO RA KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ

<130> G0181-PCT

<150> GB1315487.7

<151> 2013-08-30

<160> 39

<170> Sáng chế phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CA019_969 Ab trong trình tự của CDR-L1

<400> 1

Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	Asp	Asn	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CA019_969 Ab trong trình tự của CDRL2

<400> 2

Tyr	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Asp
1				5		

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CA019_969 Ab trong trình tự của CDR-L3

<400> 3

Leu Gln Asp Ser Glu Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CA019_969 Ab trong trình tự của CDR-H1

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly
1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CA019_969 Ab trong trình tự của CDR-H2

<400> 5

Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CA019_969 Ab trong trình tự của CDR-H3

<400> 6

Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe
1 5 10 15

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ab 969 chuột nhắt trong vùng VL

<400> 7

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

Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80

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

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

<210> 8

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ab 969 chuột nhắt trong vùng VL

<400> 8

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtctcc 60

atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac gataatttag cgtggtacca gaagaagcca 120

ggaaaatctc ctcacctcct catctattat gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca 180

cggttcagtg gcagtggatc tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct 240

gaagatgctg cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac gttcgggtgga 300

ggcaccaagc tggaattgaa a 321

<210> 9
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ab 969 chuột nhắt trong vùng VL với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng

<400> 9

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Trp Ile Thr
 1 5 10 15

Asp Ala Ile Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp
 35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Pro
 50 55 60

His Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95

Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Asp Ser
 100 105 110

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

<210> 10
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ab 969 chuột nhắt trong vùng VL với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in

nghiêng

```
<400> 10
atgggtgtcc ccactcagct cttggtgttg ttgctgctgt ggattacaga tgccatatgt      60
gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtctcc      120
atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac gataatttag cgtggtacca gaagaagcca      180
ggaaaatctc ctcacctcct catctattat gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca      240
cggttcagtg gcagtggatc tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct      300
gaagatgctg cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac gttcggtgga      360
ggcaccaagc tggaattgaa a                                              381
```

```
<210> 11
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

```
<220>
<223> Ab 969 chuột nhất trong vùng VH
```

```
<400> 11
```

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

```
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
          20          25          30
```

```
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
          35          40          45
```

```
Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
          50          55          60
```

```
Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Ala
65           70           75          80
```

```
Phe Leu Lys Leu Thr Asn Val His Thr Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
          85          90          95
```

Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
 100 105 110

Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

<210> 12

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ab 969 chuột nhắt trong vùng VH

<400> 12

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60

acttgcactt tctctgggtt ttcactgacc acttatggta tgggtgtggg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaagggctc ggagtggctg gcaaacattt ggtgggatga tgataagtat 180

tacaatccat ctctgaaaaa ccggctcaca atctccaagg acacctccaa caaccaagca 240

ttcctcaagc tcaccaatgt acacacttca gattctgccata cataactactg tgctcggata 300

gggccgatta aatacccgac ggccccctac cgggtactttg acttctgggg cccaggaacc 360

atgggtcaccg tctcg 375

<210> 13

<211> 144

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ab 969 chuột nhắt trong vùng VH với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng

<400> 13

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu

35

40

45

Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn
 85 90 95

Asn Gln Ala Phe Leu Lys Leu Thr Asn Val His Thr Ser Asp Ser Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 130 135 140

<210> 14

<211> 432

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Ab 969 chuột nhắt trong vùng VH với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng

<400> 14

atggacaggc ttacttcctc attcctactg ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtctcag 60
 gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact 120
 tgcactttct ctgggttttc actgaccact tatggtatgg gtgtgggctg gattcgtcag 180
 ccttcaggga agggctctgga gtggctggca aacatttggt gggatgatga taagtattac 240
 aatccatctc tgaaaaaccg gtcacaatc tccaaggaca cctccaacaa ccaagcattc 300
 ctcaagctca ccaatgtaca cacttcagat tctgccacat actactgtgc tcggataggg 360
 ccgattaaat acccgacggc cccctaccgg tactttgact tctggggccc aggaaccatg 420
 gtcaccgtct cg 432

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 969 gL7 trong vùng V

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 16
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 969 gL7 trong vùng V

<400> 16

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtgggaga cagggtgaca 60

atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 120

ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 180
 cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 240
 gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt 300
 ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

<210> 17
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 969 gL7 trong vùng V với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng
 <400> 17

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp
 35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser
 100 105 110

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 18
 <211> 381

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 969 gL7 trong vùng V với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng

<400> 18

```

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga cgcaagatgc      60
gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtggggaga cagggtgaca      120
atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct      180
ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct      240
cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg      300
gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt      360
ggcaccaaag tggaaatcaa g                                     381

```

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ 969 gL7 (V + hằng định)

<400> 19

```

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

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn
20           25           30

```

```

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

```

```

Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

```

```

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Glu Tyr Pro Trp

```

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile 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> 20

<211> 642

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ 969 gL7 (V + hằng định)

<400> 20

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtgggaga cagggtgaca 60

atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 120

ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 180

cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 240

gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtggt 300

```

ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat ctgtcttcat cttcccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtttgtgt gcctgctgaa taactttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                               642

```

<210> 21

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ 969 gL7 (V + hằng định) với trình tự tín hiệu
được gạch dưới và được in nghiêng

<400> 21

```

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1              5              10              15

```

```

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          20              25              30

```

```

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp
          35              40              45

```

```

Ile Tyr Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          50              55              60

```

```

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
          65              70              75              80

```

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
          85              90              95

```

```

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser
          100             105             110

```

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 22
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ 969 gL7 (V + hằng định) với trình tự tín hiệu
 được gạch dưới và được in nghiêng

<400> 22
 atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga cgcaagatgc 60
 gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtggggaga cagggtgaca 120
 atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 180
 ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 240
 cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 300
 gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtggt 360

```

ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat ctgtcttcat cttcccgcca      420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtttgtgt gcctgctgaa taactttctat      480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag      540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                          702

```

<210> 23
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> 969 gH2 trong vùng V

 <400> 23

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
 100 105 110

Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser

115

120

125

<210> 24

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 969 gH2 trong vùng V

<400> 24

gaagtgcac tcaaggagtc tggacccgct ctggtgaaac caacccaaac actcactttg 60

acatgtactt ttagtggctt ctcattgact acctatggaa tgggcgtggg atggatcaga 120

cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac 180

tataacccgt ccctgaaaaa ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg 240

gtgctgacca tgacaaatat ggatcccgtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcat 300

ggtcccataa agtacctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg ccaagggaca 360

atggttactg tctcg 375

<210> 25

<211> 144

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 969 gH2 trong vùng V với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng

<400> 25

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15Val His Ser Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
20 25 30Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro
115 120 125

Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
130 135 140

<210> 26

<211> 432

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 969 gH2 trong vùng V với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng

<400> 26

atggagtggt cctgggtgtt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccggggt ccactccgaa 60

gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa ccaaact cactttgaca 120

tgtacttttta gtggcttctc attgactacc tatggaatgg gcgtgggatg gatcagacag 180

ccacctggca aggctctgga atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat 240

aaccgtccc tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaataaa tcaagtgggt 300

ctgaccatga caaatatgga tcccgttgac accgcaacct actactgcgc ccgcattggt 360

cccataaagt accctacggc accttaccga tatttcgact tttggggcca agggacaatg 420

gttactgtct cg 432

<210> 27

<211> 453

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng 969 gH2 (V + hằng định - hu IgG4P)

<400> 27

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
 100 105 110

Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

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

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

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

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
 195 200 205

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 28

<211> 1966

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng 969 gH2 (V + hằng định - hu IgG4P, các exon được gạch dưới)

<400> 28

gaagtgcac tcaaggagtc tggacccgct ctggtgaaac caacccaaac actcactttg	60
acatgtactt ttagtggtctt ctcattgact acctatggaa tgggcgtggg atggatcaga	120
cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac	180
tataaccgtt ccctgaaaaa ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg	240
gtgctgacca tgacaaatat ggatcccgtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcat	300
ggtcccataa agtacacctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg ccaagggaca	360
atggttactg tctcgagcgc ttctacaaag ggcccatccg tcttccccct ggcgcctgc	420
tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc	480
gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg	540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc	600
agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg	660
gacaagagag ttggtgagag gccagcacag ggaggaggagg tgtctgctgg aagccaggct	720
cagccctcct gcctggacgc accccggctg tgcagcccca gccagggca gcaaggcatg	780
ccccatctgt ctcctcacc ggaggcctct gaccaccca ctcagccca gggagagggt	840
cttctggatt tttccaccag gctccgggca gccacaggct ggatgcccct accccaggcc	900
ctgcgcatatc aggggcagggt gctgcgctca gacctgcaa gagccatatc cgggaggacc	960

```

ctgcccctga cctaagccca ccccaaaggc caaactctcc actccctcag ctgagacacc 1020
ttctctcctc ccagatctga gtaactccca atcttctctc tgcagagtcc aaatatggtc 1080
ccccatgccc accatgccca ggtaagccaa cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg 1140
acaggtgccc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacgcatcc 1200
acctccatct cttcctcagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc 1260
ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggacccttg aggtcacgtg cgtgggtggg 1320
gacgtgagcc aggaagaccc cgaggtccag ttcaactggg acgtggatgg cgtggaggtg 1380
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1440
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1500
aacaaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccac 1560
ggggtgagcag ggccacatgg acagaggtca gctcggccca ccctctgccc tgggagtgac 1620
cgctgtgcca acctctgtcc ctacagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc 1680
cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt 1740
ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa 1800
gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttctctc ctctacagca ggctaaccgt 1860
ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct 1920
gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaaa 1966

```

<210> 29

<211> 472

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng 969 gH2 (V + hằng định - hu IgG4P) với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng

<400> 29

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1           5           10          15

```

```

Val His Ser Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
          20          25          30

```

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 145 150 155 160

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 210 215 220

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 340 345 350

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 465 470

<210> 30

<211> 2023

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng 969 gH2 (V + hằng định - hu IgG4P, các exon được gạch dưới)
 với trình tự tín hiệu được gạch dưới và in nghiêng

<400> 30

atggagtggg cctgggtgtt tctgtttctt ctgagtgtga ccaccggggg ccactccgaa	60
gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa ccaaact cactttgaca	120
tgtactttta gtggcttctc attgactacc tatggaatgg gcgtgggatg gatcagacag	180
ccacctggca aggctctgga atggctggcc aacatctggg gggatgacga caagtactat	240
aaccgtccc tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaataa tcaagtggg	300
ctgaccatga caaatatgga tcccgttgac accgcaacct actactgcgc ccgcattggg	360
cccataaagt accctacggc accttaccga tatttcgact tttggggcca agggacaatg	420
gttactgtct cgagcgcttc tacaaagggc ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc	480
aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa	540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctgagcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct	600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc	660
ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac	720
aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggaggggtgt ctgctggaag ccaggctcag	780
ccctcctgcc tggacgcacc ccggctgtgc agccccagcc cagggcagca aggcattgccc	840
catctgtctc ctcacccgga ggcctctgac caccctctc atgcccaggg agagggtctt	900
ctggatTTTT ccaccaggct ccgggcagcc acaggctgga tgcccctacc ccaggccctg	960
cgcatacagg ggcaggtgct gcgctcagac ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg	1020
cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa actctccact ccctcagctc agacaccttc	1080

tctcctccca gatctgagta actcccaatc ttctctctgc agagtccaaa tatgggtcccc 1140
 catgcccacc atgcccaggt aagccaaccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca 1200
 ggtgccctag agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cgcattccacc 1260
 tccatctctt cctcagcacc tgagttcctg gggggaccat cagtcttcct gttcccccca 1320
 aaaccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 1380
 gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 1440
 aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1500
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1560
 aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggtgg gaccacggg 1620
 gtgaggggc cacatggaca gaggtcagct cggcccaccc tctgccctgg gagtgaccgc 1680
 tgtgccaacc tctgtcccta cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc 1740
 atcccaggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 1800
 cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 1860
 cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaggc taaccgtgga 1920
 caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca 1980
 caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaa 2023

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chấp nhận VK1 2-1-(1) 012 JK4 ở người

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chấp nhận VK1 2-1-(1) 012 JK4 ở người

<400> 32

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 33

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc chấp nhận VH2 3-1 2-70 JH3 ở người

<400> 33

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Arg Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Phe Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser

<210> 34
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc chấp nhận VH2 3-1 2-70 JH3 ở người

<400> 34
caggtcacct tgaaggagtc tggctctgctg ctggtgaaac ccacacagac cctcacactg 60
acctgcacct tctctgggtt ctactcagc actagtggaa tgcgtgtgag ctggatccgt 120
cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacgcattg attgggatga tgataaattc 180
tacagcacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240
gtccttaca tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300
gcttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgtct ct 342

<210> 35

<211> 972
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin cho CSF-1R

<400> 35

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
 1 5 10 15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val
 20 25 30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
 35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
 50 55 60

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
 85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
 100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
 115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
 130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln
 165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg
 180 185 190
 Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val
 195 200 205
 Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys
 210 215 220
 Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn
 225 230 235 240
 Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg
 245 250 255
 Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His
 260 265 270
 Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser
 275 280 285
 Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser
 290 295 300
 Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn
 305 310 315 320
 Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp
 325 330 335
 Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala
 340 345 350
 Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu
 355 360 365
 Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg
 370 375 380
 Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr

385		390		395		400									
Pro	Pro	Glu	Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr
				405					410					415	
Leu	Leu	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Pro	Asn	Val	Thr	Trp	Leu
			420					425					430		
Gln	Cys	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Leu	Gln
		435					440					445			
Val	Trp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Gln	Glu	Pro	Phe	His
	450					455					460				
Lys	Val	Thr	Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	His	Asn
465					470					475					480
Gln	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Ala	His	Asn	Ser	Val	Gly	Ser	Gly	Ser	Trp
				485					490					495	
Ala	Phe	Ile	Pro	Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	His	Thr	His	Pro	Pro	Asp	Glu
			500					505					510		
Phe	Leu	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Val	Ala	Cys	Met	Ser	Ile	Met	Ala	Leu
		515					520					525			
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Gln	Lys	Pro
	530					535					540				
Lys	Tyr	Gln	Val	Arg	Trp	Lys	Ile	Ile	Glu	Ser	Tyr	Glu	Gly	Asn	Ser
545					550					555					560
Tyr	Thr	Phe	Ile	Asp	Pro	Thr	Gln	Leu	Pro	Tyr	Asn	Glu	Lys	Trp	Glu
				565					570					575	
Phe	Pro	Arg	Asn	Asn	Leu	Gln	Phe	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala
			580					585					590		
Phe	Gly	Lys	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Lys	Glu	Asp
	595						600					605			

Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
 610 615 620

Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
 625 630 635 640

Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
 645 650 655

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
 660 665 670

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
 675 680 685

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
 690 695 700

Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val
 705 710 715 720

Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser
 725 730 735

Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu
 740 745 750

Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe
 755 760 765

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val
 770 775 780

Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
 785 790 795 800

Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg
 805 810 815

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr
820 825 830

Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
835 840 845

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys
850 855 860

Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe
865 870 875 880

Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
885 890 895

Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
900 905 910

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
915 920 925

Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
930 935 940

Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
945 950 955 960

Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
965 970

<210> 36

<211> 277

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin cho CSF-1R

<400> 36

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

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
 20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
 35 40 45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
 50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
 65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
 85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
 100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
 115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
 130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
 145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
 165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
 180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
 195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
 210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
 225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
 245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
 260 265 270

Phe Phe Arg Val Val
 275

<210> 37
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin cho CSF-1R

<400> 37

Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr Ile
 1 5 10 15

His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala Leu
 20 25 30

Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val Gln
 35 40 45

Lys

<210> 38
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin cho CSF-1R (SNP V32G, A245S, H247P, V279M,
 vị trí được gạch dưới)

<400> 38

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

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
35 40 45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
 210 215 220

Leu Ala Ile His Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
 225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
 245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
 260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln
 275 280 285

Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val
 290 295 300

Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu
 305 310 315 320

Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr
 325 330 335

Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu
 340 345 350

Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly
 355 360 365

Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu
 370 375 380

Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys
 385 390 395 400

Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser
 405 410 415

Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp

41254

420 425 430

Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr
435 440 445

Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr
450 455 460

Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile
465 470 475 480

Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
485 490

<210> 39
<211> 512
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự miền ngoại bào CSF-1R của người

<400> 39

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
1 5 10 15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
 100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
 115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
 130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln
 165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg
 180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val
 195 200 205

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys
 210 215 220

Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn
 225 230 235 240

Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg
 245 250 255

Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His
 260 265 270

Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser
 275 280 285

Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser
 290 295 300

Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn

305		310		315		320									
Leu	Lys	Val	Met	Val	Glu	Ala	Tyr	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Asn	Trp
			325						330					335	
Thr	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	His	Gln	Pro	Glu	Pro	Lys	Leu	Ala
			340					345					350		
Asn	Ala	Thr	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Arg	His	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Leu
		355					360					365			
Pro	Arg	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg
	370					375					380				
Asn	Pro	Gly	Gly	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr
385					390					395					400
Pro	Pro	Glu	Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr
				405					410					415	
Leu	Leu	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Pro	Asn	Val	Thr	Trp	Leu
			420					425					430		
Gln	Cys	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Leu	Gln
		435					440					445			
Val	Trp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Gln	Glu	Pro	Phe	His
	450					455					460				
Lys	Val	Thr	Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	His	Asn
465					470					475					480
Gln	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Ala	His	Asn	Ser	Val	Gly	Ser	Gly	Ser	Trp
				485					490					495	
Ala	Phe	Ile	Pro	Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	His	Thr	His	Pro	Pro	Asp	Glu
			500					505					510		