(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) **1-0042317**

(51)[2020.01] **C07K 16/22**; A61P 19/02; A61P 25/00; G01N 33/68; C12N 15/13; G01N 33/577; A61K 39/395; A61P 29/00

(13) **B**

(21) 1-2020-06526
(22) 10/04/2019
(86) PCT/CN2019/082107 10/04/2019
(87) WO 2019/201133 24/10/2019
(30) 201810344670.3 17/04/2018 CN; 201811320006.1 07/11/2018 CN
(45) 27/01/2025 442
(43) 26/04/2021 397
(73) Akeso Biopharma, Inc. (CN)
6 Shennong Road, Torch Development Zone Zhongshan, Guangdong 528437, China
(72) WANG, Zhongmin Maxwell (US); LI, Baiyong (US); XIA, Yu (US); ZHANG, Peng (CN).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG YẾU TỐ SINH TRƯỞNG THẦN KINH, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY, KIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2020-06526

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh, trình tự nucleotit mã hóa nó, kit và thuốc chứa kháng thể này. Kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng bao gồm vùng ổn định của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nặng, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng ổn định của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm ba vùng quyết định tính bổ trợ HCDR1, HCDR2 và HCDR3, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm ba vùng quyết định tính bổ trợ LCDR1, LCDR2 và LCDR3. Kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với yếu tố sinh trưởng thần kinh, và có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt và/hoặc mức độ của yếu tố sinh trưởng thần kinh, cũng như để bào chế thuốc để ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 phụ thuộc yếu tố sinh trưởng thần kinh, và để bào chế thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa ít nhất một trong số chứng đau do bệnh lý thần kinh, đau mạn tính, và đau do viêm.

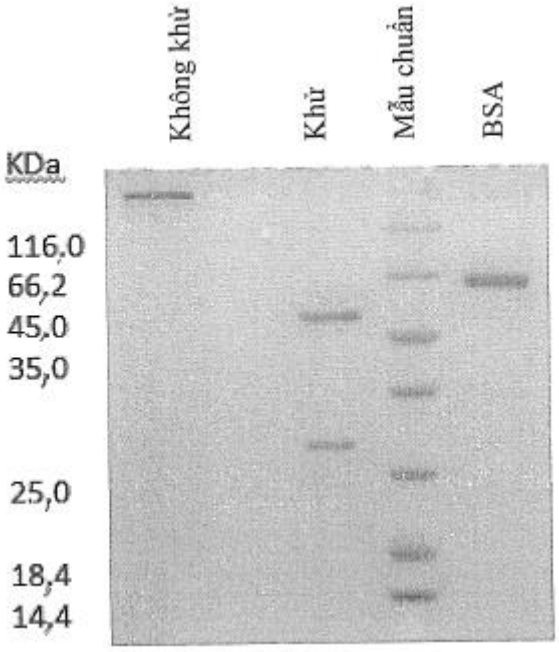


FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực miễn dịch học và sinh học phân tử. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh, gen mã hóa nó, và sử dụng nó để sản xuất các kit phát hiện và các thuốc khác nhau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Yếu tố sinh trưởng thần kinh (NGF) là một trong số các yếu tố dinh dưỡng thần kinh được xác định sớm nhất, và đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh, biệt hóa và duy trì chức năng của các nơron sinh học. NGF có thể liên kết với thụ thể tropomyosin kinaza A (TrKA) với ái lực cao và có thể liên kết không đặc hiệu với thụ thể $P75^{NTR}$. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy rằng, ngoài việc có các tác dụng sinh học thúc đẩy sự sinh trưởng, phát triển và sống còn của nơron, NGF thường được coi là yếu tố trung gian gây ra chứng đau dai dẳng và đau mạn tính. Ví dụ, việc truyền tĩnh mạch NGF có thể gây ra các phản ứng đau toàn thân, và việc tiêm tại chỗ NGF có thể gây ra chứng tăng cảm đau và đau bất thường ở vị trí tiêm. Sự tiết NGF ở vị trí viêm tăng vọt và kéo dài lâu hơn. Ngoài ra, trong các loại bệnh ung thư nhất định, NGF quá mức thúc đẩy sự sinh trưởng và thâm nhiễm các sợi thần kinh, do đó cảm ứng đau ung thư. Đã có thông báo rằng chuột nhắt bị bất hoạt thụ thể TrKA sẽ không biểu hiện chứng đau, và NGF được coi là phân tử liên quan mật thiết đến chứng đau. Bằng chứng cho thấy rằng việc sử dụng các chất ức chế NGF có thể làm giảm nhẹ các đáp ứng đau trong mô hình động vật đau do bệnh lý thần kinh và đau do viêm mạn tính. Kháng thể trung hòa kháng NGF có thể làm giảm đau đáng kể trong mô hình đau ung thư ở chuột.

Các thuốc kháng thể, nhất là kháng thể đơn dòng, đã đạt tác dụng tốt trong điều trị các bệnh khác nhau. Việc điều chế các kháng thể đơn dòng kháng NGF an toàn và hiệu quả có thể tạo ra lớp thuốc giảm đau mới trong điều trị đau mạn tính và đau ung thư khác với thuốc opiat, thuốc không steroit, *v.v.*, gây nghiện hoặc gây tác dụng phụ trong đường

tiêu hóa. Hiện nay, Tanezumab, do Pfizer Pharmaceuticals Co., Ltd. phát triển, có tác dụng giảm đau tốt trong các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng. Tuy nhiên, vẫn chưa có các kháng thể kháng NGF khác với hoạt tính cao hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là khắc phục các nhược điểm về hoạt tính thấp và khác biệt loài của các kháng thể kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh trong lĩnh vực này, và đề xuất kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh với hoạt tính cao và loại bỏ khác biệt loài, và gen mã hóa và sử dụng nó, cũng như sử dụng nó trong sản xuất các kit phát hiện và các thuốc khác nhau.

Để đạt được mục đích trên đây của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng mà có thể liên kết đặc hiệu với yếu tố sinh trưởng thần kinh của người, bao gồm các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ, chuỗi nặng bao gồm vùng ổn định của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nặng, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng ổn định của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng xác định sự liên kết (gắn kết) kháng nguyên; vùng biến đổi của mỗi chuỗi chứa ba vùng siêu biến, gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) (các CDR của chuỗi nặng (H) bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, và các CDR của chuỗi nhẹ (L) bao gồm LCDR1, LCDR2, LCDR3; mà được đặt tên bởi Kabat và các đồng tác giả, xem *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition (1991), Volumes 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md).

Theo sáng chế, vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm ba vùng quyết định tính bổ trợ HCDR1, HCDR2 và HCDR3, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm ba vùng quyết định tính bổ trợ LCDR1, LCDR2 và LCDR3;

trong đó trình tự axit amin của vùng quyết định tính bổ trợ HCDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 5;

trình tự axit amin của vùng quyết định tính bổ trợ HCDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 6;

trình tự axit amin của vùng quyết định tính bổ trợ HCDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 7;

trình tự axit amin của vùng quyết định tính bổ trợ LCDR1 được nêu trong SEQ ID NO: 8;

trình tự axit amin của vùng quyết định tính bổ trợ LCDR2 được nêu trong SEQ ID NO: 9; và

trình tự axit amin của vùng quyết định tính bổ trợ LCDR3 được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo sáng chế, trình tự axit amin của 6 vùng CDR được cấu trúc, và các cải biến đặc hiệu được tạo ra để cải thiện hoạt tính liên kết với kháng nguyên của các vùng biến đổi của kháng thể. Để thích ứng với các thay đổi trong các vùng CDR, các vùng khung cũng được cải biến. Tuy nhiên, cần đảm bảo rằng các cải biến của các vùng khung này vẫn tương thích với các trình tự dòng mầm của người. Các cải biến khung cũng sẽ được phân tích để đảm bảo rằng các thay đổi này không tác động đến sự liên kết của các vùng CDR với kháng nguyên.

Thông qua các phương tiện kỹ thuật đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, thông qua trang web của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI), vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng được phân tích, mà lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 5-7 và SEQ ID NO: 8-10 trên đây. Theo sáng chế, kháng thể đơn dòng này được gọi là H26L17.

Theo phương án ưu tiên về kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 2; trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 4.

Theo phương án ưu tiên khác về kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế, trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1; trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án về kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế, kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh được chọn từ Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb, mảnh vùng quyết định tính bổ trợ, kháng thể chuỗi đơn (*ví dụ,* scFv), kháng thể được nhân hóa, kháng thể dạng khảm, và diabody.

Theo một phương án về kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế, kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh liên kết với protein NGF với EC_{50} nhỏ hơn 100 nM (*ví dụ,* nhỏ hơn khoảng 10 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM,

0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, hoặc nhỏ hơn). Trong đó, EC_{50} có thể đo được bằng phương pháp ELISA kẹp.

Theo một phương án về kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế, kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh bao gồm vùng không CDR, và vùng không CDR là từ loài khác với chuột, ví dụ, từ kháng thể người.

Để đạt được mục đích trên đây của sáng chế, sáng chế còn đề xuất gen mã hóa kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh nêu trên.

Để đạt được mục đích trên đây của sáng chế, sáng chế còn đề xuất vectơ bao gồm trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Để đạt được mục đích trên đây của sáng chế, sáng chế còn đề xuất tế bào chủ bao gồm trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ;

hoặc

vectơ bao gồm trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Để đạt được mục đích trên đây của sáng chế, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh, phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện thích hợp, và phân lập kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh từ môi trường nuôi cấy tế bào.

Sáng chế còn đề xuất thể liên hợp kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh và phần liên hợp được liên hợp với nó, trong đó phần liên hợp là chất đánh dấu phát hiện được. Tốt hơn nếu phần liên hợp là chất đồng vị phóng xạ, chất phát quang, chất màu hoặc enzym.

Sáng chế còn đề xuất kit, bao gồm kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh và/hoặc thể liên hợp kháng thể đơn dòng.

Theo phương án ưu tiên về kit theo sáng chế, kit còn bao gồm kháng thể thứ cấp mà nhận biết đặc hiệu kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh; ngoài ra,

kháng thể thứ cấp còn bao gồm chất đánh dấu phát hiện được, như chất đồng vị phóng xạ, chất phát quang, chất màu, hoặc enzym.

Sáng chế còn đề xuất sử dụng kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh và/hoặc thể liên hợp kháng thể đơn dòng trong kit mà có thể phát hiện sự có mặt và/hoặc mức độ của yếu tố sinh trưởng thần kinh. Kit được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc mức độ của NGF trong mẫu.

Sáng chế còn đề xuất thuốc bao gồm kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh và/hoặc thể liên hợp kháng thể đơn dòng; tùy ý, nó còn bao gồm các chất mang dược dụng và/hoặc tá dược.

Thuốc trên đây liên kết đặc hiệu với yếu tố sinh trưởng thần kinh và có thể được sử dụng để ức chế các tác dụng sinh học qua trung gian yếu tố sinh trưởng thần kinh, như sự tăng sinh của tế bào TF-1;

và/hoặc

để điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau do bệnh lý thần kinh, đau mạn tính, và đau do viêm.

Sáng chế, thông qua các thí nghiệm in vivo, phát hiện ra rằng kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế có thể cải thiện sự thay đổi hành vi đi bộ của chi bị ảnh hưởng và tình trạng sụt cân của động vật trong mô hình đau do viêm khớp gối ở chuột nhắt Lenti-IL-1β-NIH/3T3.

Theo sáng chế, trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ khoa học kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa như thường được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài ra, các công đoạn phòng thí nghiệm về nuôi cấy tế bào, di truyền học phân tử, hóa học axit nucleic và miễn dịch học được sử dụng theo sáng chế là các công đoạn thông thường được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực tương ứng. Trong khi đó, để hiểu sáng chế tốt hơn, các định nghĩa và giải thích về các thuật ngữ liên quan được trình bày dưới đây.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể" chỉ phân tử globulin miễn dịch mà thường gồm hai cặp chuỗi polypeptit (mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (L) và một chuỗi "nặng" (H)). Các chuỗi nhẹ của kháng thể được phân loại là các chuỗi nhẹ κ và λ. Chuỗi nặng được phân loại là μ, δ, γ, α, hoặc ε. Và các isotyp của kháng thể lần lượt được

xác định là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Trong các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng biến đổi và vùng ổn định được liên kết bởi vùng "J" gồm khoảng 12 axit amin hoặc lớn hơn, và chuỗi nặng còn bao gồm vùng "D" gồm khoảng 3 axit amin hoặc lớn hơn. Mỗi chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) và vùng ổn định của chuỗi nặng (C_H). Vùng ổn định của chuỗi nặng gồm ba vùng (C_H1, C_H2 và C_H3). Mỗi chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ (C_L). Vùng ổn định của chuỗi nhẹ gồm một vùng C_L. Vùng ổn định của kháng thể có thể làm trung gian cho sự liên kết của globulin miễn dịch với mô chủ hoặc yếu tố chủ, bao gồm sự liên kết của các tế bào khác nhau (*ví dụ,* tế bào tác động) của hệ miễn dịch và thành phần thứ nhất (C1q) của hệ thống bổ thể cổ điển. Các vùng V_H và V_L có thể còn được chia nhỏ thành vùng biến đổi cao (gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (CDR)), và giữa chúng có phân bố các vùng bảo toàn gọi là các vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L gồm 3 CDR và 4 FR bố trí từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi (V_H và V_L) của mỗi cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ lần lượt tạo thành các vị trí liên kết của kháng thể. Việc gán các axit amin cho mỗi vùng hoặc miền theo định nghĩa của Kabat trong *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991)), hoặc Chothia và Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *và các đồng tác giả* (1989) *Nature* 342:878-883. Thuật ngữ "kháng thể" không bị giới hạn bởi phương pháp cụ thể bất kỳ sản xuất kháng thể. Ví dụ, kháng thể bao gồm, cụ thể là, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng. Các kháng thể có thể là các isotyp khác nhau của kháng thể, như các kháng thể IgG (*ví dụ,* các phân typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "mảnh liên kết với kháng nguyên" (hoặc "mảnh gắn kết kháng nguyên") của kháng thể chỉ polypeptit bao gồm mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ, mà duy trì khả năng liên kết đặc hiệu với cùng kháng nguyên mà kháng thể có chiều dài đầy đủ liên kết với nó, và/hoặc cạnh tranh với kháng thể có chiều dài đầy đủ về việc liên kết đặc hiệu với kháng nguyên, mà còn được gọi là "phần liên kết với kháng nguyên". Nói chung, xem *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989), tài liệu này được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn. Mảnh liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể được sản xuất bằng công

nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách phân cắt kháng thể nguyên vẹn bằng enzym hoặc hóa học. Trong một số trường hợp, mảnh liên kết với kháng nguyên bao gồm Fab, Fab', F $(ab')_2$, Fd, Fv, dAb, mảnh của vùng xác định tính bổ trợ (CDR), mảnh kháng thể chuỗi đơn (*ví dụ,* scFv), kháng thể dạng khảm, diabody và polypeptit bao gồm ít nhất một phần của kháng thể đủ để làm cho polypeptit này có khả năng liên kết với kháng nguyên đặc hiệu.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "mảnh Fd" chỉ mảnh kháng thể gồm các vùng V_H và C_H1; thuật ngữ "mảnh Fv " chỉ mảnh kháng thể gồm các vùng V_L và V_H của cánh đơn của kháng thể; thuật ngữ "mảnh dAb" chỉ mảnh kháng thể gồm vùng V_H (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989)); thuật ngữ "mảnh Fab" chỉ mảnh kháng thể gồm các vùng V_L, V_H, C_L, và C_H1; và thuật ngữ "mảnh F $(ab')_2$" chỉ mảnh kháng thể bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu nối disulfua trên vùng bản lề.

Trong một số trường hợp, mảnh liên kết với kháng nguyên của kháng thể là kháng thể chuỗi đơn (*ví dụ,* scFv) trong đó các vùng V_L và V_H được bắt cặp tạo ra phân tử hóa trị một thông qua yếu tố nối cho phép chúng tạo ra chuỗi polypeptit đơn (xem, *ví dụ,* Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988) và Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). Các phân tử scFv như vậy có cấu trúc chung: NH_2-V_L-yếu tố nối-V_H-COOH hoặc NH_2-V_H-yếu tố nối-V_L-COOH. Yếu tố nối thích hợp đã biết trong lĩnh vực này gồm trình tự axit amin GGGGS lặp hoặc biến thể của nó. Ví dụ, yếu tố nối có trình tự axit amin $(GGGGS)_4$ có thể được sử dụng, nhưng các biến thể của nó cũng có thể được sử dụng (Holliger *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448). Các yếu tố nối khác mà có thể được sử dụng theo sáng chế được mô tả bởi Alfthan *et al.* (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi *et al.* (2001), *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu *et al.* (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov *et al.* (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 và Roovers *et al.* (2001), *Cancer Immunol.*

Trong một số trường hợp, mảnh liên kết với kháng nguyên của kháng thể là diabody, tức là, kháng thể hóa trị hai, trong đó các vùng V_H và V_L được thể hiện dưới dạng chuỗi polypeptit đơn. Tuy nhiên, yếu tố nối được sử dụng là quá ngắn để cho phép bắt cặp hai vùng này trên một chuỗi, do đó các vùng này buộc phải bắt cặp với các vùng bổ trợ trên chuỗi khác và hai vị trí liên kết với kháng nguyên được tạo ra (xem, *ví dụ,* Holliger P. *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993), và Poljak R. J. *et al.*, *Structure* 2: 1121-1123 (1994)).

Mảnh liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể thu được từ các kháng thể nhất định bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này (*ví dụ,* công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc phân cắt bằng enzym hoặc hóa học), và mảnh liên kết với kháng nguyên của kháng thể được sàng lọc về tính đặc hiệu theo cách giống như đối với các kháng thể nguyên vẹn.

Theo sáng chế, trừ khi được xác định rõ theo ngữ cảnh, khi đề cập đến thuật ngữ "kháng thể", nó bao gồm không chỉ là kháng thể nguyên vẹn mà còn là mảnh liên kết với kháng nguyên của kháng thể.

Như được sử dụng theo sáng chế, các thuật ngữ "McAb" và "kháng thể đơn dòng" chỉ kháng thể hoặc mảnh của kháng thể được tạo ra từ nhóm kháng thể tương đồng cao, *tức là,* từ nhóm phân tử kháng thể giống hệt, ngoại trừ các đột biến tự nhiên xảy ra một cách tự phát. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao với epitop duy nhất trên kháng nguyên. Kháng thể đa dòng, so với kháng thể đơn dòng, nói chung bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều hơn kháng thể khác nhau mà nói chung nhận biết các epitop khác nhau trên kháng nguyên. Nói chung, kháng thể đơn dòng có thể thu được bằng công nghệ tế bào lai được thông báo lần đầu tiên bởi Kohler *và các đồng tác giả* (Nature, 256:495, 1975), nhưng cũng có thể thu được bằng công nghệ ADN tái tổ hợp (ví dụ, xem patent Mỹ số 4,816,567).

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể được nhân hóa" chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể thu được khi toàn bộ hoặc một phần của các vùng CDR của globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) được thay bằng các vùng CDR của kháng thể không phải của người (kháng thể cho), trong đó kháng thể cho có thể là kháng thể không phải của người (*ví dụ,* chuột nhắt, chuột cống hoặc thỏ) có tính đặc hiệu, ái lực hoặc khả năng phản ứng mong muốn. Ngoài ra, các gốc axit amin nhất định trong các vùng khung (FR) của kháng thể nhận cũng có thể được thay bằng các gốc axit amin của các kháng thể không phải của người tương ứng hoặc bằng các gốc axit amin của các kháng thể khác để cải thiện thêm hoặc tối ưu hóa hiệu năng của kháng thể. Để có thêm chi tiết về kháng thể được nhân

hóa, xem, ví dụ, Jones *et al.*, Nature, 321:522 525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332:323 329 (1988); Presta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593 596 (1992); và Clark, Immunol. Today 21: 397 402 (2000).

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "epitop" chỉ vị trí trên kháng nguyên mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể liên kết đặc hiệu với nó. "Epitop" còn được gọi trong lĩnh vực này là "quyết định tố kháng nguyên". Epitop hoặc quyết định tố kháng nguyên nói chung gồm nhóm phân tử bề mặt có hoạt tính hóa học như axit amin hoặc hydrat cacbon hoặc chuỗi bên đường, và thường có các đặc trưng cấu trúc ba chiều riêng và các đặc trưng điện tích riêng. Ví dụ, epitop nói chung bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 axit amin liền kề hoặc không liền kề trong cấu hình không gian duy nhất, mà có thể là "thẳng" hoặc "cấu hình". Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). Trong epitop thẳng, tất cả các điểm tương tác giữa protein và phân tử tương tác (*ví dụ,* kháng thể) tồn tại theo đường thẳng dọc theo trình tự axit amin bậc một của protein. Trong epitop cấu hình, các điểm tương tác tồn tại trên các gốc axit amin của protein mà cách biệt nhau.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "được phân lập" chỉ "việc thu được bằng phương pháp nhân tạo từ trạng thái tự nhiên". Nếu chất hoặc thành phần "được phân lập" nhất định tồn tại tự nhiên, có thể là do sự thay đổi về môi trường tự nhiên của nó, hoặc nó được phân lập từ môi trường tự nhiên, hoặc cả hai trường hợp. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit không được phân lập nhất định tồn tại tự nhiên trong động vật sống nhất định, và polynucleotit hoặc polypeptit này có độ tinh khiết cao được phân lập từ trạng thái tự nhiên như vậy được gọi là polynucleotit hoặc polypeptit được phân lập. Thuật ngữ "được phân lập" không loại trừ sự tồn tại của các chất nhân tạo hoặc tổng hợp hoặc các tạp chất khác mà không ảnh hưởng đến hoạt tính của chất này.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "hệ biểu hiện *E. coli*" chỉ hệ biểu hiện gồm *E. coli* (chủng) và vectơ, trong đó *E. coli* (chủng) được tạo ra từ chủng có bán trên thị trường, như, nhưng không giới hạn ở, GI698, ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3), và BLR (DE3).

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "vectơ" chỉ phương tiện axit nucleic mà polynucleotit có thể được cài vào trong đó. Khi vectơ cho phép biểu hiện protein được mã hóa bởi polynucleotit đã cài vào, vectơ này được gọi là vectơ biểu hiện. Vectơ có thể được đưa vào tế bào chủ bằng cách biến nạp, tải nạp, hoặc chuyển nhiễm sao cho các yếu tố vật chất di truyền do vectơ này mang có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Các vectơ là đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: plasmit; phagemit; cosmit; nhiễm sắc thể nhân tạo, như nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC) hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo có nguồn gốc từ P1 (PAC); thể thực khuẩn như thể thực khuẩn lambda hoặc thể thực khuẩn M13, và virut động vật, *v.v.*. Các virut động vật mà có thể được sử dụng làm vectơ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, retrovirut (bao gồm lentivirut), adenovirut, virut đi kèm adenovirut, virut herpes (như virut herpes simplex), poxvirut, baculovirut, papillomavirut, và papovavirut (như SV40). Vectơ có thể chứa các yếu tố khác nhau kiểm soát sự biểu hiện, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự vùng khởi đầu (promoter), trình tự khởi đầu phiên mã, trình tự tăng cường, yếu tố chọn lọc, và gen thông báo. Ngoài ra, vectơ có thể còn chứa vị trí khởi đầu sao chép.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "tế bào chủ" chỉ tế bào có thể được sử dụng để tiếp nhận vectơ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào không có nhân điển hình như *E. coli* hoặc *bacillus subtilis*, tế bào nấm như tế bào nấm men hoặc aspergillus, tế bào côn trùng như tế bào S2 drosophila hoặc Sf9, hoặc tế bào động vật như nguyên bào sợi, tế bào CHO, tế bào COS, tế bào NSO, tế bào HeLa, tế bào BHK, tế bào HEK 293, hoặc tế bào người.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" chỉ phản ứng liên kết không ngẫu nhiên giữa hai phân tử, như phản ứng giữa kháng thể và kháng nguyên mà nó hướng tới. Theo một số phương án, kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (hoặc kháng thể mà đặc hiệu với kháng nguyên) chỉ kháng thể liên kết với kháng nguyên với ái lực (K_D) nhỏ hơn khoảng 10^{-5} M, như nhỏ hơn khoảng 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "K_D" chỉ hằng số phân ly cân bằng đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể, mà được sử dụng để mô tả ái lực liên kết

giữa kháng thể và kháng nguyên. Hằng số phân ly cân bằng càng nhỏ, liên kết kháng thể-kháng nguyên càng chặt, và ái lực giữa kháng thể và kháng nguyên càng cao. Nói chung, các kháng thể liên kết với kháng nguyên (*ví dụ,* protein L1) với hằng số phân ly cân bằng (K_D) nhỏ hơn khoảng 10^{-5} M, như nhỏ hơn khoảng 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn, ví dụ, như được xác định bằng thiết bị BIACORE sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

Như được sử dụng theo sáng chế, các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" và "McAb" có nghĩa giống nhau và có thể được sử dụng thay thế cho nhau; các thuật ngữ "kháng thể đa dòng" và "PcAb" có nghĩa giống nhau và có thể được sử dụng thay thế cho nhau; các thuật ngữ "polypeptit" và "protein" có nghĩa giống nhau và có thể được sử dụng thay thế cho nhau. Và theo sáng chế, nói chung các axit amin được đại diện bằng các chữ viết tắt một chữ cái hoặc ba chữ cái là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, alanin có thể được đại diện bằng A hoặc Ala.

Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" chỉ lượng đủ để thu được hoặc ít nhất là thu được một phần tác dụng mong muốn. Ví dụ, lượng hữu hiệu dự phòng chỉ lượng đủ để ngăn ngừa, dừng, hoặc làm chậm sự khởi phát bệnh; lượng hữu hiệu trị liệu chỉ lượng đủ để chữa khỏi hoặc ít nhất là dừng một phần bệnh và các biến chứng kèm theo ở bệnh nhân mắc bệnh. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định được lượng hữu hiệu như vậy. Ví dụ, lượng hữu hiệu trị liệu sẽ phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh cần điều trị, trạng thái chung của hệ miễn dịch của bệnh nhân, tình trạng chung của bệnh nhân như tuổi, thể trọng và giới tính, cách dùng thuốc, và các điều trị khác được dùng đồng thời, *v.v.*.

So với tình trạng kỹ thuật đã biết, sáng chế có các ưu điểm sau:

Kháng thể đơn dòng kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với yếu tố sinh trưởng thần kinh và có các ưu điểm về hoạt tính cao và dạng tương tự, và có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt và/hoặc mức độ của yếu tố sinh trưởng thần kinh, cũng như để bào chế thuốc để đối kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh, và để bào chế thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau do bệnh lý thần kinh, đau mạn tính, và đau do viêm, do đó có triển vọng ứng dụng tốt và giá trị thương mại.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả phân tích SDS-PAGE của kháng thể đơn dòng H26L17 kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế. Các mẫu gồm bốn làn từ trái sang phải và lượng nạp tương ứng của chúng là: kháng thể trong dung dịch đệm nạp điện di protein không khử, 1 μg; kháng thể trong dung dịch đệm nạp điện di protein khử, 1 μg; chuẩn trọng lượng phân tử protein (Mẫu chuẩn), 5 μL; albumin huyết thanh bò (BSA), 1 μg.

Fig. 2 thể hiện kết quả phân tích hoạt tính liên kết của H26L17 và Tanezumab với kháng nguyên β-NGF của người.

Fig. 3 thể hiện kết quả đường cong chuẩn đối với phân tích H26L17 và Tanezumab ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 bằng phương pháp CCK-8.

Fig. 4 thể hiện lượng tế bào sau 72 giờ ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 được cảm ứng bởi NGF bằng kháng thể đơn dòng H26L17 kháng yếu tố sinh trưởng thần kinh theo sáng chế.

Fig. 5 thể hiện giá trị OD của mỗi nhóm trong việc đo mức ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 bởi H26L17 và Tanezumab bằng phương pháp CCK-8.

Fig. 6 thể hiện dường điều chỉnh của H26L17 ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 được cảm ứng bởi NGF. Lấy logarit của nồng độ kháng thể (nM) làm trục x và giá trị OD 450nm làm trục y, điều chỉnh đường cong liều-tác dụng được thực hiện để so sánh EC_{50} của các kháng thể khác nhau.

Fig. 7 thể hiện tác dụng của H26L17 đến hành vi đi bộ của chi bị ảnh hưởng do đau gây ra trong mô hình đau do viêm khớp gối ở chuột nhắt Lenti-IL-1β-NIH/3T3.

Fig. 8 thể hiện tác dụng của H26L17 đến thể trọng của chuột nhắt trong mô hình đau do viêm khớp gối ở chuột nhắt Lenti-IL-1β-NIH/3T3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây có tham chiếu đến các ví dụ. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các ví dụ sau chỉ được sử dụng để minh họa sáng chế, và không được coi là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các trường hợp không mô tả cụ thể kỹ thuật hoặc điều kiện là được thực hiện theo các kỹ thuật hoặc điều kiện được mô tả trong tài liệu chuyên ngành đã biết (*ví dụ,* xem, *Guide to*

Molecular Cloning Experiments, authored by J. Sambrook *et al.*, và translated by Huang Peitang *et al.*, third edition, Science Press) hoặc theo sách hướng dẫn về sản phẩm. Các thuốc thử hoặc thiết bị được sử dụng là các sản phẩm thông thường có bán trên thị trường nếu các nhà sản xuất chúng không được nêu rõ.

Trong các ví dụ sau theo sáng chế, chuột nhắt C57BL/6 được sử dụng được mua từ Trung tâm Động vật Thí nghiệm Y khoa Quảng Đông (Guangdong Medical Experimental Animal Center).

Kháng thể đối chứng dương tính Tanezumab được sử dụng là kháng thể Tanezumab của Pfizer (David L. Shelton. Methods for treating bone cancer by administering a Nerve Growth Factor antagonist antibody. USA, 20110243961A1. 2011-06-06).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Thiết kế, biểu hiện và tinh chế các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của H26L17

1. Thiết kế kháng thể

Để tạo ra kháng thể kháng NGF của người H26L17, các tác giả sáng chế đã thiết kế một cách sáng tạo một loạt trình tự kháng thể dựa trên trình tự protein NGF và cấu trúc tinh thể ba chiều của chúng, *v.v.* Thông qua việc mở rộng sàng lọc và phân tích, cuối cùng đã thu được kháng thể, H26L17, liên kết đặc hiệu với NGF. Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể và trình tự ADN mã hóa chúng được nêu trong SEQ ID NO: 1-4.

2. Biểu hiện và tinh chế kháng thể

Trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng (nêu trong SEQ ID NO: 1; vùng ổn định là vùng C của chuỗi Ig gama-1, ACCESSION: P01857) và trình tự nucleotit mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (nêu trong SEQ ID NO: 3; vùng ổn định là vùng C của chuỗi Ig lambda-2; ACCESSION: P0CG05.1) của H26L17 độc lập được tách dòng trong các vectơ pUC57simple (do Genscript cung cấp), và lần lượt thu được các plasmit pUC57simple-H26L17H và pUC57simple-H26L17L.

Các plasmit pUC57simple-H26L17H và pUC57simple-H26L17L được cắt (*Hind*III & *Eco*RI), và trình tự nucleotit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thu được bằng điện di độc lập

được tái tạo dòng trong các vectơ pcDNA3.1, và các plasmit tái tổ hợp được chiết xuất để đồng chuyển nhiễm vào tế bào 293F. Sau khi tế bào 293F đã chuyển nhiễm được nuôi cấy trong 7 ngày, môi trường nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ cao, và dịch nổi thu được được cô và nạp lên cột HiTrap MabSelect SuRe. Protein được giải hấp một bước bằng dung môi giải hấp để phân lập mẫu đích. Mẫu kháng thể được bảo quản trong dung dịch đệm PBS.

Mẫu đã tinh chế được thêm vào cả dung dịch đệm nạp điện di protein khử và dung dịch đệm nạp điện di protein không khử, và tiếp theo được đun sôi. Mẫu đã xử lý được phân tích bằng điện di SDS-PAGE. Điện di đồ của H26L17 được thể hiện trên Fig. 1. Mẫu protein đích trong dung dịch đệm khử là ở 45 kD và 30 kD, và mẫu protein đích trong dung dịch đệm không khử (kháng thể duy nhất) là ở 150 kD.

H26L17 điều chế được trong ví dụ này được sử dụng trong các ví dụ 2 đến 4 dưới đây.

Ví dụ 2. Phân tích hoạt tính liên kết của H26L17 với kháng nguyên β-NGF của người

Trong thí nghiệm này, phương pháp ELISA được sử dụng để xác định EC_{50} (nồng độ tác dụng trung vị) của H26L17 liên kết với β-NGF của người để nghiên cứu tính đặc hiệu và ái lực liên kết của kháng thể với β-NGF của người.

Đĩa đa lỗ được phủ 50 µL β-NGF của người 0,5 µg/mL trong mỗi lỗ, và được ủ qua đêm ở 4 °C. Sau khi đĩa đa lỗ được rửa một lần và vỗ nhẹ cho khô, mỗi lỗ được phong bế bằng 300 µL dung dịch BSA 1% (được hòa tan trong PBS). Đĩa đa lỗ được ủ ở 37 °C trong 2 giờ, và vỗ nhẹ cho khô sau khi được rửa ba lần. Kháng thể được pha loãng đến 1 µg/mL làm nồng độ ban đầu, và pha loãng theo gradien 1:3 được thực hiện trong đĩa đa lỗ để thu được tổng cộng 7 nồng độ, ngoài lỗ đối chứng trống. Các lỗ đúp được đặt đối với các nồng độ nêu trên, với thể tích cuối là 100 µL/lỗ, và đĩa đa lỗ được ủ ở 37 °C trong 30 phút. Sau khi đĩa đa lỗ được rửa ba lần và vỗ nhẹ cho khô, 50 µL dung dịch làm việc chứa kháng thể thứ cấp của dê kháng IgG người (H + L) có đánh dấu peroxidaza cải ngựa được thêm vào mỗi lỗ, và đĩa đa lỗ được ủ ở 37 °C trong 30 phút. Sau khi đĩa đa lỗ được rửa bốn lần và vỗ nhẹ cho khô, 50 µL dung dịch sinh màu TMB được thêm vào mỗi lỗ để phát triển màu ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút mà không có ánh sáng, tiếp theo 50 µL dung dịch dập tắt được thêm vào mỗi lỗ để dừng phản ứng phát triển màu. Ngay sau khi phản ứng kết thúc,

đĩa đa lỗ được đặt vào máy đọc đĩa đa lỗ, và bước sóng ánh sáng 450 nm được chọn để đọc giá trị OD của mỗi lỗ của đĩa đa lỗ. Phần mềm SoftMax Pro 6.2.1 được sử dụng để phân tích và xử lý số liệu.

Có thể thấy từ Bảng 2 và Fig. 2 rằng kết quả đọc ở 450 nm cho thấy rằng H26L17 có thể liên kết hữu hiệu với β-NGF của người, và hiệu quả liên kết là phụ thuộc liều. Lấy nồng độ kháng thể làm hoành độ và giá trị hấp thụ làm tung độ, đường (cong) điều chỉnh 4 thông số được vẽ, thu được EC_{50} liên kết là 0,071 nM, tương đương với Tanezumab. Xem Bảng 2 về kết quả phân tích hoạt tính liên kết của H26L17 và Tanezumab với β-NGF của người. Kết quả cho thấy rằng sự liên kết của H26L17 với kháng nguyên β-NGF của người là phụ thuộc liều, với EC_{50} liên kết là 0,071 nM, tương đương với Tanezumab.

Bảng 2. Kết quả phân tích hoạt tính liên kết của H26L17 và Tanezumab với kháng nguyên β-NGF của người

Độ pha loãng kháng thể	**Liên kết kháng nguyên-kháng thể theo giá trị OD (450 nm)**			
	H26L17		Tanezumab	
1 µg/mL	2,730	2,655	2,770	2,705
1:3	2,704	2,797	2,656	2,553
1:9	2,663	2,605	2,482	2,274
1:27	2,242	2,222	2,166	1,969
1:81	1,613	1,525	1,178	1,266
1:243	0,779	0,735	0,560	0,609
1:729	0,323	0,313	0,227	0,245
0	0,047	0,046	0,044	0,045
EC_{50} (nM)	0,071		0,103	

Ví dụ 3. Phân tích hoạt tính sinh học tế bào của H26L17

1. Phân tích hoạt tính dược lý của H26L17 trong ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 được cảm ứng bởi NGF

Để phân tích tác dụng của H26L17 trong ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 phụ thuộc NGF, các kháng thể, NGF và tế bào TF-1 có nồng độ khác nhau được ủ cùng nhau và sự tăng sinh tế bào được đo sau 72 giờ nuôi cấy. Quy trình cụ thể là như sau:

Tế bào TF-1 được thu bằng cách ly tâm và được đếm, và 40.000 tế bào được cấy trong mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ. Để dùng, nhóm đối chứng được đặt với ba nồng độ NGF: 0,2, 2, và 20 ng/mL, và nhóm kháng thể được đặt với 20 ng/mL NGF; kháng thể được đặt với năm nồng độ: 0,016 nM, 0,08 nM, 0,4 nM, 2 nM, và 10 nM. Trước khi dùng, hỗn hợp trộn sẵn NGF/kháng thể với tế bào, kháng thể và NGF được ủ sơ bộ ở 37°C trong 30 phút. Trong thí nghiệm này, nhóm đối chứng isotyp cũng được bao gồm. Sau khi tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ (dùng pipet và được làm đồng nhất một lần sau mỗi 24 giờ) sau xử lý, sự tăng sinh tế bào được đo theo hướng dẫn của kit thử CCK-8 (100 µL chất lỏng được lấy để phân tích). Đường cong chuẩn của sự tăng sinh tế bào được thể hiện trên Fig. 3. Kết quả phân tích sự tăng sinh tế bào sau 72 giờ ủ tế bào được thể hiện trên Fig. 4. Như được thấy trên Fig. 4, H26L17 ức chế tác dụng kích thích của NGF đến sự tăng sinh của tế bào TF-1 theo cách phụ thuộc liều. Cụ thể là, khi nồng độ kháng thể là thấp hơn 0,08 nM, kháng thể H26L17 là tốt hơn đáng kể so với kháng thể đối chứng dương tính Tanezumab trong việc ức chế tác dụng của NGF đến sự tăng sinh của tế bào TF-1.

2. Giá trị EC_{50} của H26L17 trung hòa NGF trong thí nghiệm này là H26L17 ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 được cảm ứng bởi NGF

Để phân tích hoạt tính dược lý của H26L17 trong việc ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 được cảm ứng bởi NGF và tính EC_{50} của H26L17 trung hòa NGF, các kháng thể, NGF và tế bào TF-1 có nồng độ khác nhau được ủ cùng nhau và sự tăng sinh tế bào được đo sau 72 giờ nuôi cấy. Quy trình hoặc phương pháp cụ thể được mô tả vắn tắt như sau:

Tế bào TF-1 được thu bằng cách ly tâm và được cấy vào đĩa 96 lỗ với 40.000 tế bào/lỗ. Để dùng, nhóm đối chứng được đặt với ba nồng độ NGF: 0,06 nM, 0,3 nM, và 1,5 nM. Nồng độ cuối của NGF trong nhóm hỗn hợp NGF/kháng thể là 1,5 nM, và nồng độ cuối của kháng thể lần lượt là 0,0468 nM, 0,07 nM, 0,105 nM, 0,158 nM, 0,237 nM, 0,356 nM, 0,533 nM, và 0,8 nM. Trước khi dùng, hỗn hợp trộn sẵn NGF/kháng thể với tế bào, kháng thể và NGF được ủ sơ bộ ở 37 °C trong 30 phút. Trong thí nghiệm này, nhóm kháng thể đối chứng isotyp có nồng độ 1,5 nM được bao gồm. Sau khi tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ (dùng pipet và được làm đồng nhất một lần sau mỗi 24 giờ) sau xử lý, sự tăng sinh tế bào được đo theo hướng dẫn của kit thử CCK-8 (100 µL chất lỏng được lấy để phân tích).

Giá trị OD của mỗi nhóm đo trong thí nghiệm CCK-8 được thể hiện trên Fig. 5. Lấy logarit của nồng độ kháng thể (nM) làm trục x và giá trị OD 450 nm làm trục y, điều chỉnh đường cong liều-tác dụng được thực hiện để so sánh EC_{50} của các kháng thể khác nhau, và đường điều chỉnh được thể hiện trên Fig. 6. H26L17 có thể ức chế sự tăng sinh của tế bào TF-1 được cảm ứng bởi NGF theo cách phụ thuộc liều, cho thấy hoạt tính trung hòa kháng NGF, và hoạt tính này tốt hơn không đáng kể so với hoạt tính của thuốc bán trên thị trường là Tanezumab cho cùng đích. EC_{50} trung hòa NGF của hai kháng thể lần lượt là 0,16 nM và 0,21 nM, và kháng thể H26L17 là tốt hơn đáng kể so với kháng thể đối chứng dương tính Tanezumab trong việc ức chế tác dụng của NGF đến sự tăng sinh của tế bào TF-1.

Ví dụ 4. H26L17 có thể cải thiện hành vi đi bộ của chi bị ảnh hưởng và làm giảm nhẹ sụt cân trong mô hình đau do viêm khớp gối ở chuột nhắt Lenti-IL-1β-NIH/3T3.

Bệnh nhân viêm khớp có thể trải qua què quặt và các thay đổi hành vi khác do đau, cũng như sụt cân do giảm hấp thu thức ăn bởi cảm xúc kém do đau. Để đo mức độ làm giảm nhẹ của kháng thể kháng NGF đối với đáp ứng đau do viêm khớp gối, mô hình chuột nhắt đau do viêm khớp gối được cảm ứng bởi Lenti-IL-1β-NIH/3T3 được thiết lập, và tác dụng của thuốc được đánh giá bằng sự cải thiện hành vi của chuột nhắt. Trong mô hình này, tế bào Lenti-IL-1β-NIH/3T3 biểu hiện quá mức IL-1β trong ổ khớp của chuột nhắt, đến lượt nó cảm ứng viêm khớp và đau ở vị trí tiêm. Trong thí nghiệm này, 60 chuột nhắt C57BL/6 được chia thành 6 nhóm theo thể trọng, cụ thể là nhóm bình thường (nước muối, S.C.), nhóm mô hình (kháng HEL, 20 mg/kg, S.C.), nhóm Tanezumab (Tanezumab, 20 mg/kg, S.C.) và nhóm kháng thể H26L17 liều thấp (H26L17, 0,2 mg/kg, S.C.), nhóm liều trung bình (H26L17, 2 mg/kg, S.C.), và nhóm liều cao (H26L17, 20 mg/kg, S.C.), 10 con/nhóm. Ngày phân nhóm được ghi là ngày 0 (D0). Sau khi phân nhóm, chuột được cân, và các thuốc tương ứng được tiêm qua đường dưới da theo thể trọng của chuột ở thể tích dùng là 10 mL/kg. Thuốc được dùng ba lần tổng cộng, và được dùng qua đường dưới da lần lượt vào D0, D3, và D6 sau khi phân nhóm. Sau khi dùng vào ngày phân nhóm, 10 chuột C57BL/6 trong nhóm bình thường được tiêm huyền phù tế bào NIH/3T3 (50.000 tế bào/chuột) vào ổ khớp gối, và 50 chuột C57BL/6 còn lại trong các nhóm còn lại được tiêm huyền phù tế bào Lenti-IL-1β-NIH/3T3 (50.000 tế bào/chuột) vào ổ khớp gối. Tiếp theo,

tính điểm hành vi của chuột nhắt được thực hiện vào D3, D5 và D11 sau khi dùng vào ngày phân nhóm.

Kết quả tác dụng của kháng thể kháng NGF đến đáp ứng đau khớp gối ở chuột nhắt được thể hiện trên Fig. 7. So với kháng thể đối chứng dương tính Tanezumab (20 mg/kg, S.C.), nhóm H26L17 liều cao (20 mg/kg, S.C.) làm giảm đáp ứng đau đáng kể; so với kháng thể đối chứng dương tính Tanezumab (20 mg/kg, S.C.), nhóm kháng thể H26L17 liều thấp (0,2 mg/kg, S.C.) và nhóm H26L17 liều trung bình (2 mg/kg, S.C.) có tác dụng tương đương trong việc làm giảm đau ở chuột nhắt. Kết quả kháng thể kháng NGF làm giảm nhẹ sụt cân của chuột nhắt trong mô hình đau do viêm khớp gối ở chuột nhắt được thể hiện trên Fig. 8. Nhóm kháng thể H26L17 liều trung bình và liều cao có tác dụng tương đương như kháng thể đối chứng dương tính Tanezumab trong việc làm giảm nhẹ sụt cân của chuột nhắt trong mô hình đau do viêm khớp gối ở chuột nhắt, có ý nghĩa lớn hơn so với đối chứng isotyp kháng HEL.

Các phương án được ưu tiên theo sáng chế đã được mô tả chi tiết trên đây, nhưng sáng chế không được giới hạn ở các phương án này. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện các cải biến hoặc thay thế tương đương mà không vượt ra khỏi dự tính của sáng chế. Các cải biến hoặc thay thế tương đương này được bao gồm trong phạm vi được xác định bởi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protein yếu tố sinh trưởng thần kinh (NGF), bao gồm

a) vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ (CDRs) có các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 5-7; và

b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) bao gồm CDRs có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

2. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó

VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và

VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.

3. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể được nhân hóa, kháng thể dạng khảm, và diabody.

4. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protein NGF với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 100 nM.

5. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm các vùng phi CDR được tạo ra từ loài khác với chuột nhắt.

6. Phân tử axit nucleic, bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa VH và trình tự axit nucleic mã hóa VL của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.

7. Phân tử axit nucleic theo điểm 6, trong đó trình tự axit nucleic mã hóa VH bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1; và trình tự axit nucleic mã hóa VL bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 3.

8. Vectơ, bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 6.

9. Tế bào chủ, bao gồm vectơ theo điểm 8.

10. Thể liên hợp, bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 và phần liên hợp bao gồm chất đánh dấu phát hiện được.

11. Thể liên hợp theo điểm 10, trong đó chất đánh dấu phát hiện được bao gồm chất đồng vị phóng xạ, chất phát quang, chất màu, enzym hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

12. Phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc lượng protein NGF trong mẫu sinh học, phương pháp này bao gồm cho mẫu sinh học tiếp xúc với thể liên hợp theo điểm 10.

13. Kit, bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.

14. Dược phẩm, chứa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 và ít nhất một chất mang dược dụng hoặc tá dược.

15. Phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc lượng protein NGF trong mẫu sinh học, phương pháp này bao gồm cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AKESO BIOPHARMA, INC.

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG YẾU TỐ SINH TRƯỞNG THẦN KINH, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY, KIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<160> 10

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng H26L17 (Trình tự nhân tạo)

<400> 1
caggtgcagc tgcaggaaag cggaccagga ctggtgaagc ctagcgagac cctgagcctg
60
acttgtaccg tgtccggatt cgatctgagc ggctacgacc tgaattggat cagacagcct
120
cccggaaagg gcctggagtg gatcggtatc gtctggggag acggcagcag cgattacaac
180
agcgccgtga agagccgcgt gacaatcagc aaggacacca gcaagaacca gttcagcctg
240
aagctgtcta gcgtgacagc cgccgataca gcagtgtact attgcgtgcg gggcggctat
300
tggtacgcca ccagctacta cttcgactat tggggccagg gaacactggt gaccgtgtct
360
tct
363

<210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng H26L17 (Trình tự nhân tạo)

<400> 2
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Gly Tyr
20 25 30
Asp Leu Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ile Val Trp Gly Asp Gly Ser Ser Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95
Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng H26L17 (Trình tự nhân tạo)

<400> 3
gatatccaga tgacccagag ccccagctct ctgtcagcca gcgtgggcga tagagtgacc 60
atcacttgca gagccagcga gagcatcagc agcaacctga attggtacca gcagaagcca 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagat tccacagcgg cgtgcctagc 180
agattcagcg gaagcggcag cggcaccgac tttaccttca ccatcagctc tctgcagccc 240
gaggacatcg ccacctacta ttgccagcag gagcacaccc tgcccтttac ctttggccag 300
ggaacaaagc tggagatcaa g 321

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng H26L17 (Trình tự nhân tạo)

<400> 4
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 Glu Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Vùng quyết định tính bổ trợ của vùng biến đổi của chuỗi nặng 1 (HCDR1)

<400> 5
Gly Phe Asp Leu Ser Gly Tyr Asp
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Vùng quyết định tính bổ trợ của vùng biến đổi của chuỗi nặng 2 (HCDR2)

<400> 6
Val Trp Gly Asp Gly Ser Ser
1 5

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Vùng quyết định tính bổ trợ của vùng biến đổi của chuỗi nặng 3 (HCDR3)

<400> 7
Val Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Vùng quyết định tính bổ trợ của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 1 (LCDR1)

<400> 8
Glu Ser Ile Ser Ser Asn
1 5

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> Vùng quyết định tính bổ trợ của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 2 (LCDR2)

<400> 9
Tyr Thr Ser
1

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Vùng quyết định tính bổ trợ của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 3 (LCDR3)

<400> 10
Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Phe Thr
1 5

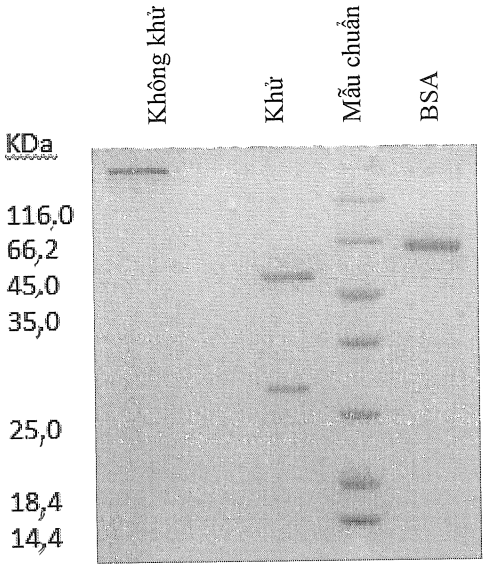
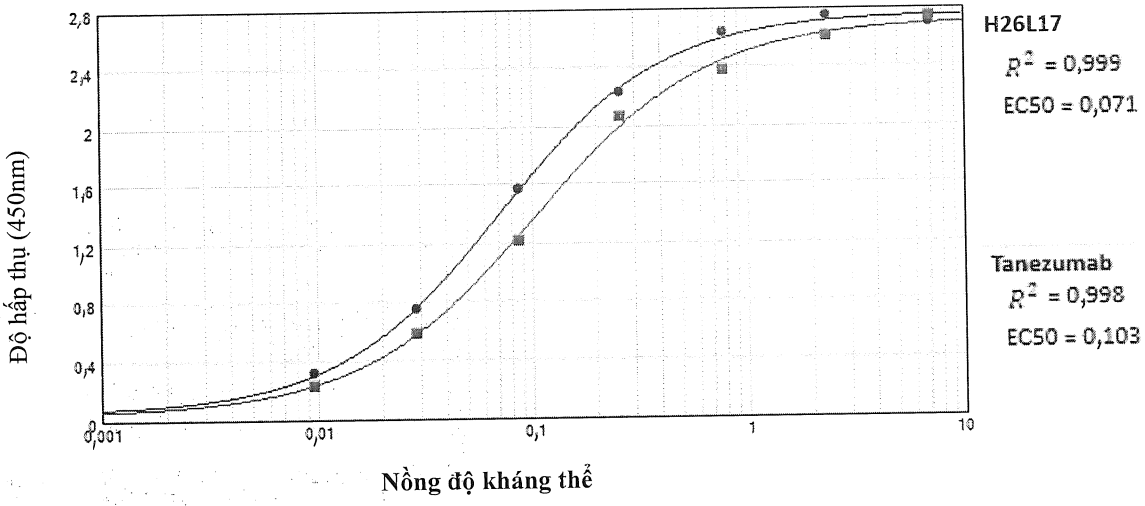


Fig. 1



● H26L17 Theo nồng độ…)

■ Tanezumab (Tanezumab: Giá trị trung bình theo nồng độ …)

Kết quả điều chỉnh đường cong ▲

Đường điều chỉnh 4 thông số $y = D + \frac{A-D}{1+\left(\frac{x}{C}\right)^{B}}$

Fig. 2

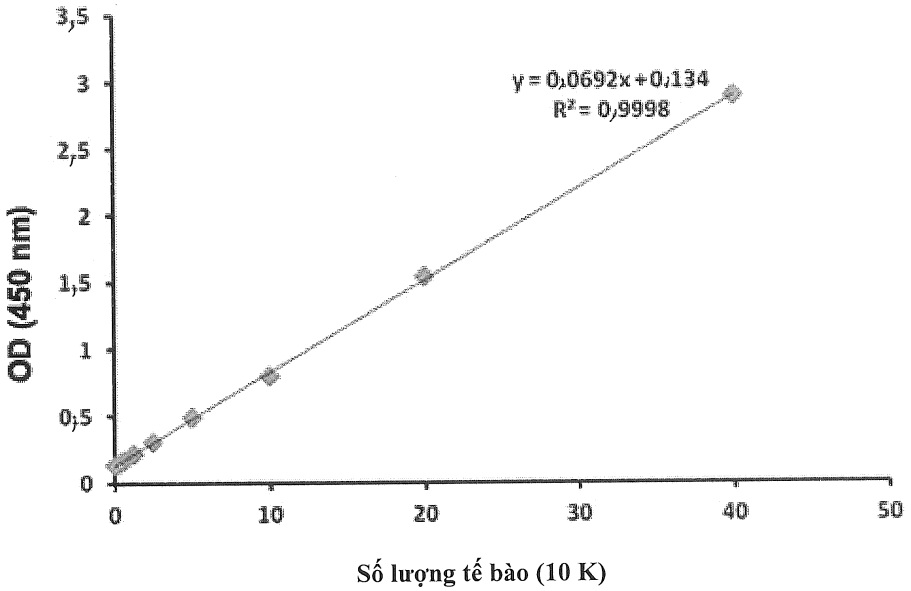

y = 0,0692x + 0,134
R² = 0,9998
OD (450 nm)
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
10
20
30
40
50
Số lượng tế bào (10 K)

Fig. 3

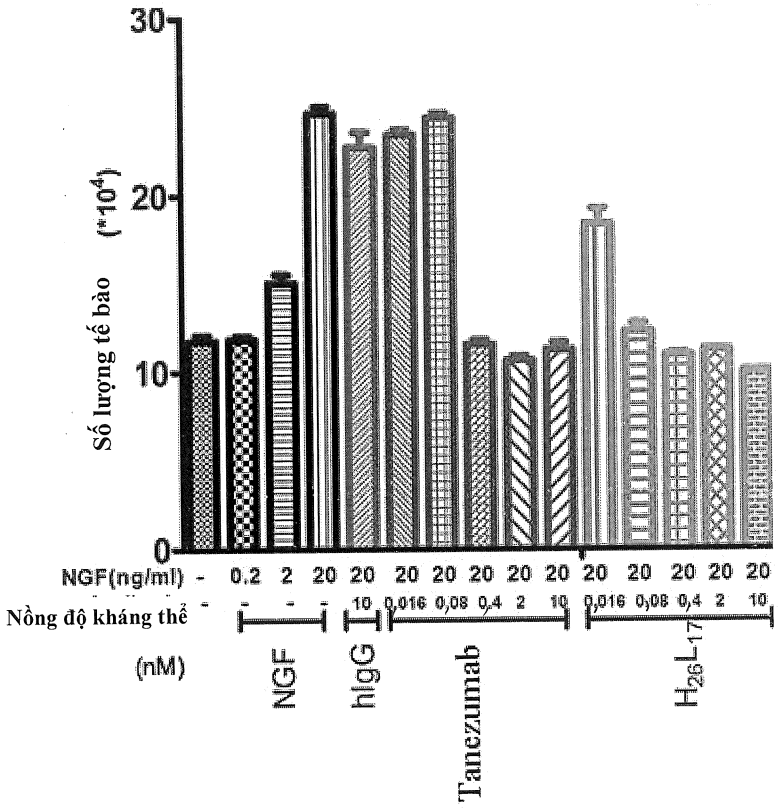

Số lượng tế bào (*10⁴)
30
20
10
0
NGF(ng/ml) - 0,2 2 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20
Nồng độ kháng thể - - - 10 0,016 0,08 0,4 2 10 0,016 0,08 0,4 2 10
(nM)
NGF
hIgG
Tanezumab
H26L17

Fig. 4

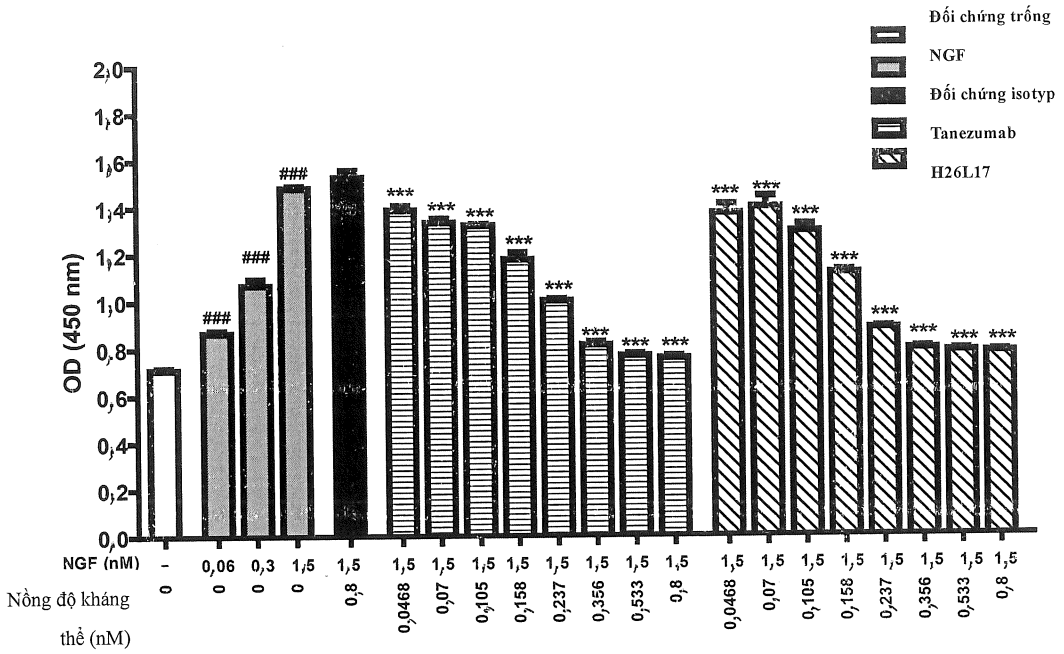

Đối chứng trống
NGF
Đối chứng isotyp
Tanezumab
H26L17
OD (450 nm)
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
###
***
NGF (nM)
Nồng độ kháng thể (nM)

Fig. 5

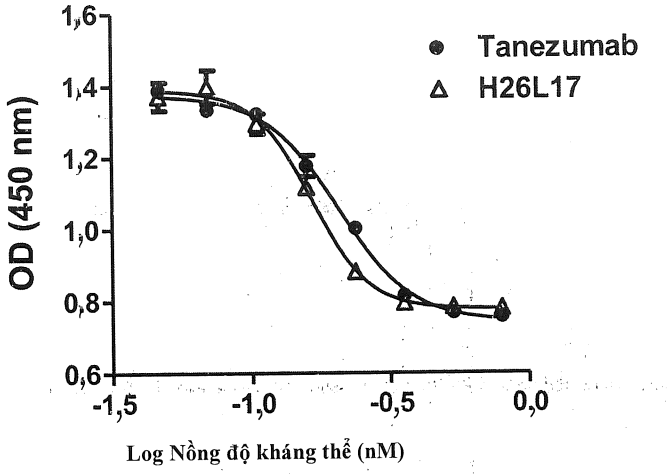

Tanezumab
H26L17
OD (450 nm)
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
-1,5
-1,0
-0,5
0,0
Log Nồng độ kháng thể (nM)

Fig. 6

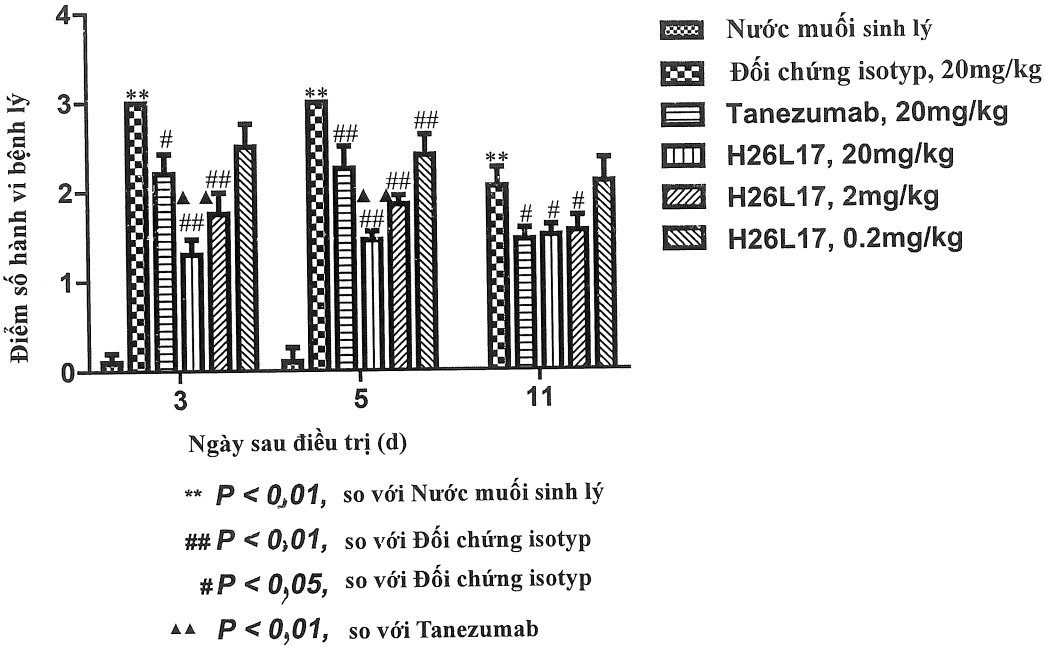

Điểm số hành vi bệnh lý
Ngày sau điều trị (d)
Nước muối sinh lý
Đối chứng isotyp, 20mg/kg
Tanezumab, 20mg/kg
H26L17, 20mg/kg
H26L17, 2mg/kg
H26L17, 0.2mg/kg
** P < 0,01, so với Nước muối sinh lý
P < 0,01, so với Đối chứng isotyp
# P < 0,05, so với Đối chứng isotyp
▲▲ P < 0,01, so với Tanezumab

Fig. 7

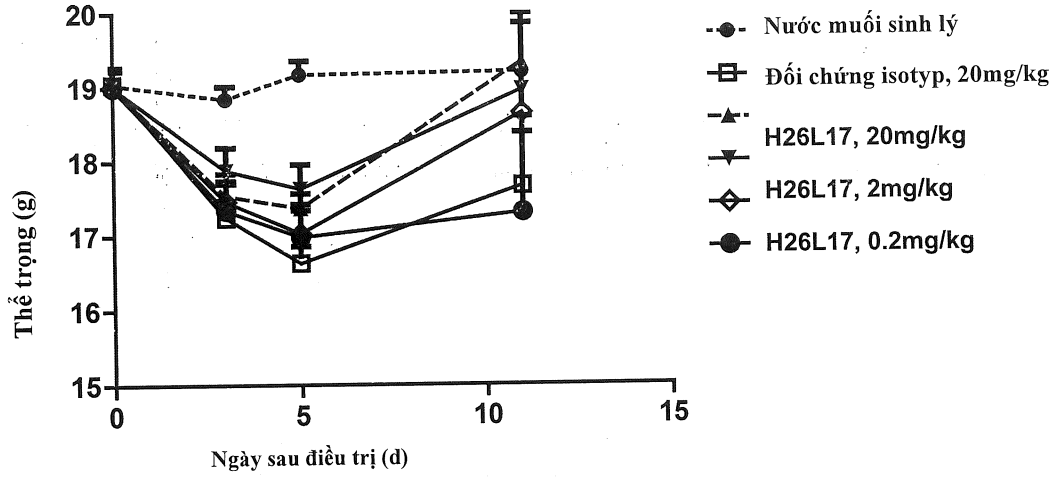

Thể trọng (g)
Ngày sau điều trị (d)
Nước muối sinh lý
Đối chứng isotyp, 20mg/kg
H26L17, 20mg/kg
H26L17, 2mg/kg
H26L17, 0.2mg/kg

Fig. 8