



(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)



1-0043675

(51)⁷ C07K 16/10; A61P 31/14

(13) B

(21) 1-2018-02203

(22) 27/10/2016

(86) PCT/US2016/058975 27/10/2016

(87) WO 2017/075124 04/05/2017

(30) 62/247,841 29/10/2015 US; 62/367,359 27/07/2016 US

(45) 25/02/2025 443

(43) 27/08/2018 365A

(73) Merck Sharp & Dohme LLC (US)

126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065, United States of America

(72) VORA, Kalpit, A. (US); COX, Kara, S. (US); TANG, Aimin (US); CHEN, Zhifeng (US); DISTEFANO, Daniel (US); ZHANG, Lan (US); SU, Hua-Poo (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP HOẶC MẢNH LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ LIÊN KẾT VỚI PROTEIN F CỦA VIRUT HỢP BÀO HÔ HẤP Ở NGƯỜI, TẾ BÀO CHỦ CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ

(21) 1-2018-02203

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng có độ chuẩn trung hòa kháng RSV cao. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể theo sáng chế và các tế bào chủ được biến nạp nhờ đó. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp chẩn đoán, phòng ngừa và điều trị bằng cách sử dụng kháng thể và axit nucleic theo sáng chế, cụ thể là chất miễn dịch trị liệu thụ động ở trẻ sơ sinh và người cao tuổi.

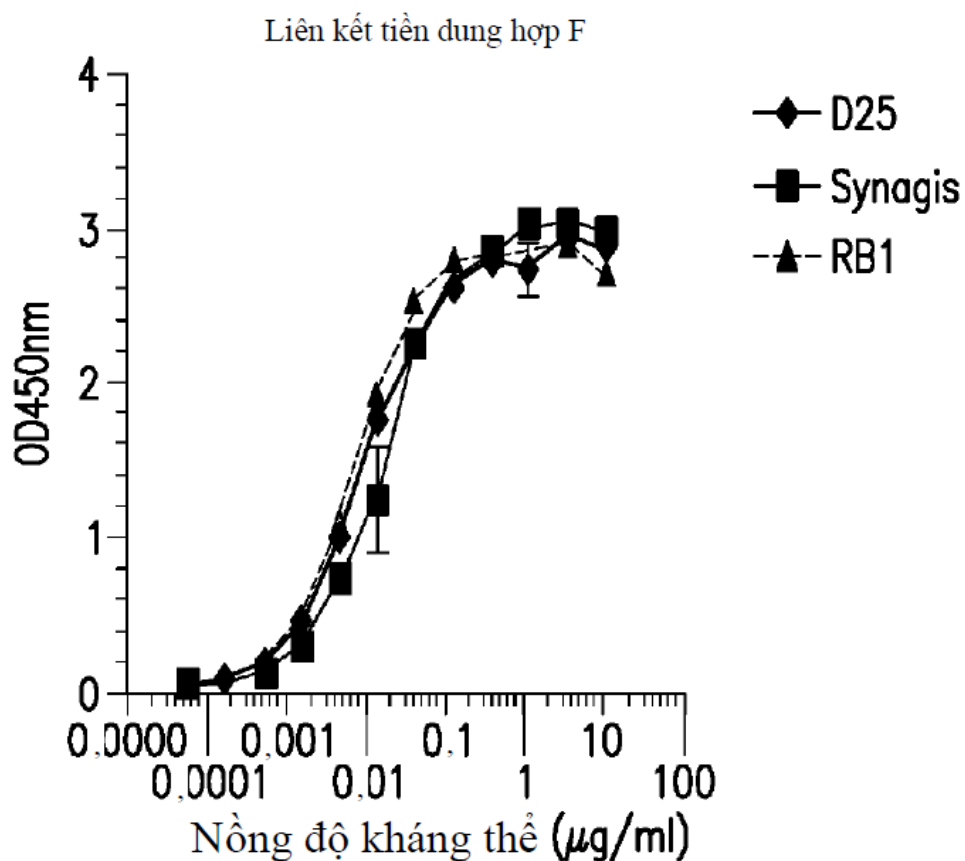


FIG. 1A

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng ở người có độ chuẩn trung hòa kháng RSV cao, cũng như việc sử dụng các kháng thể này làm chất miễn dịch trị liệu thụ động ở trẻ sơ sinh và người cao tuổi.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Paramyxovirut là virut ARN sợi âm có vỏ là tác nhân gây bệnh chủ yếu ở người và động vật. Virut hợp bào hô hấp ở người (human respiratory syncytial virus - hRSV, respiratory syncytial virus - RSV) thuộc họ *Paramyxoviridae*, phân họ *Pneumovirinae*. Hai typ phụ, typ A và typ B, được xác định và là nguyên nhân chính gây nhiễm trùng đường hô hấp nghiêm trọng và thậm chí đôi khi gây tử vong ở trẻ em dưới 6 tháng tuổi. Người trưởng thành mắc các bệnh sau đây, như COPD, bệnh hen, ung thư, tình trạng suy giảm miễn dịch, bao gồm HIV hoặc sau khi cấy ghép, cũng có nguy cơ tiến triển bệnh nhiễm RSV nghiêm trọng. 15% ca nhập viện hàng năm ở người trưởng thành trên 50 tuổi do nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính gây ra bởi RSV. Ở Hoa Kỳ, RSV gây ra hơn 100.000 ca nhập viện hàng năm, và ước tính gây ra khoảng 160.000 ca tử vong trên toàn thế giới mỗi năm. Hiện nay không có vaccin cho RSV, và thử nghiệm với virut được bất hoạt bởi formalin thường gắn với mức độ nghiêm trọng của bệnh tăng ở trẻ em khi nhiễm RSV. Các thành viên khác thuộc họ bao gồm virut gây viêm phổi cho người (human metapneumo virus - hMPV) và virut ái cúm ở người (human parainfluenza virus - hPIV) cũng gây ra các bệnh hô hấp cấp tính giống như hRSV.

Hệ gen hRSV là phân tử ARN sợi âm mạch đơn xấp xỉ 15 kb mã hóa 11 protein. Hai trong số các protein này là glycoprotein bề mặt chính của virion. Chúng là (i) protein gắn kết (G), điều chỉnh việc gắn kết của virut với các tế bào, và (ii) protein dung hợp (F), thúc đẩy cả quá trình dung hợp của virut và màng tế bào ở giai đoạn đầu của chu trình nhiễm và quá trình dung hợp của màng của các tế bào bị nhiễm với màng của các tế bào liền kề để tạo ra hợp bào đặc trưng. Protein gắn kết G liên

kết với các thụ thể bề mặt tế bào và tương tác với F. Tương tác này kích hoạt sự thay đổi cấu dạng trong F để cảm ứng quá trình dung hợp của màng, theo đó giải phóng phức hợp ribonucleoprotein của virus vào tế bào chất của tế bào chủ.

Các kháng thể đơn dòng kháng protein F hoặc protein G đã được chỉ ra là có tác dụng trung hòa *in vitro* và tác dụng phòng bệnh *in vivo*. Xem, ví dụ, tài liệu Beeler và Coelingh 1989, J. Virol. 63:2941-50; Garcia-Barreno *et al.*, 1989, J. Virol. 63:925-32; Taylor *et al.*, 1984, Immunology 52: 137-142; Walsh *et al.*, 1984, Infection and Immunity 43:756-758; và các patent Mỹ số 5,842,307 và 6,818,216. Các epitop trung hòa trên glycoprotein F ban đầu được lập bản đồ bằng cách xác định các axit amin bị thay đổi trong các biến thể giải phóng kháng thể và bằng cách đánh giá liên kết của kháng thể với peptit thu được từ F RSV. Các nghiên cứu này chứng minh các kháng thể trung hòa thường hướng đích đến hai epitop thẳng riêng biệt. Xem tài liệu Graham *et al.*, 2015, Curr Opin Immunol 35:30-38 để xem xét vị trí kháng nguyên đối với dạng F tiền dung hợp và sau dung hợp. Vị trí kháng nguyên II (cũng được gọi là vị trí A) bao gồm các gốc từ 255 đến 275 và là đích của palivizumab (SYNAGIS®, AstraZeneca). Epitop này được dự đoán là có tính phụ thuộc vào cấu dạng, và cấu trúc của một dẫn xuất có hoạt lực cao hơn của palivizumab trong phức hợp với epitop này chỉ ra rằng epitop thẳng chấp nhận cấu dạng xoắn vòng xoắn. Vị trí kháng nguyên IV (cũng được gọi là vị trí C) bao gồm các gốc từ 422 đến 438 và là đích của các kháng thể MAb19 và 101F. Epitop này là đầu tận cùng C cho vùng giàu xystein và là một phần của miền II, mà trong glycoprotein F của paramyxovirus tương đồng duy trì giữ nguyên về cấu trúc giữa cấu dạng trước và sau dung hợp. 5C4, AM22 và D25 mô tả epitop được ký hiệu là vị trí 0 mà chỉ có mặt trên protein F tiền dung hợp và có hoạt lực gấp 50 lần palivizumab. Xem tài liệu McLellan *et al.*, 2013, Science 340:1113–1117; Đơn sáng chế quốc tế số WO 2008/147196 và patent Mỹ số 8,568,726. Các kháng thể hRSV khác được mô tả trong các Đơn sáng chế quốc tế số WO94/06448 và WO92/04381 và patent Mỹ số 8,221,759.

Vaccine RSV dùng để gây miễn dịch chủ động, nếu có sẵn, cũng không thể được sử dụng để điều trị cho trẻ sơ sinh có hệ thống miễn dịch chưa trưởng thành hoặc bệnh nhân mà bị ức chế miễn dịch. Ở bệnh nhân mà cần tới liệu pháp miễn dịch thụ động để phòng bệnh, do dạng mạn tính hơn của bệnh, thì liệu pháp hiện nay được

điều chỉnh thông qua việc chủng ngừa định kỳ qua đường tĩnh mạch IgG ở người thu được từ huyết tương đã thu gom. Loại liệu pháp này, do độ chuẩn thấp của kháng thể trung hòa kháng RSV, thường sử dụng số lượng lớn globulin (ví dụ, 0,75 gm/kg) và do đó, cần dùng trong tĩnh mạch, trong phòng khám hoặc bệnh viện, trong một khoảng thời gian dài (từ 2 đến 4 giờ), dùng hằng tháng trong các tháng có nguy cơ cao (mùa thu, mùa đông và đầu xuân).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng protein F của RSV và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có các đặc tính cấu trúc và chức năng được xác định dưới đây.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với protein F của RSV ở người, chứa: vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tùy ý có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị Kd nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị Kd nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-6} M đến khoảng 1×10^{-9} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với protein F của RSV ở người, chứa: vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo các phương án nhất định, chuỗi nhẹ không liên kết với chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, chuỗi nhẹ liên kết với chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên

kết kháng nguyên của nó tùy ý có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với protein F của RSV ở người bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; và (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tùy ý có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa: (i) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (iii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi

nhẹ không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo các phương án nhất định, chuỗi nhẹ không liên kết với chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, chuỗi nhẹ liên kết với chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể của nó tùy ý có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tùy ý có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm,

trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà liên kết với protein F của RSV ở người bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có độ đồng nhất ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ đồng nhất ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 8. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án được nêu ở trên, các biến thể trình tự xuất hiện trong vùng khung. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tùy ý có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với RSV ở người bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng

biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có sự thay thế 1, 2 hoặc 3 axit amin trong chuỗi nặng CDR (SEQ ID NO: 1-3) và/hoặc trong chuỗi nhẹ CDR (SEQ ID NO: 4-6). Trình tự VH của SEQ ID NO: 7 có các CDR của SEQ ID NO: 1-3; và trình tự VL của SEQ ID NO: 8 có các CDR của SEQ ID NO: 4-6. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tùy ý có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa: chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 và/hoặc chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với protein F của RSV ở người. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với protein F của RSV ở người. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tùy ý có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d

nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với cùng epitop của protein F của RSV ở người là kháng thể bao gồm chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 25, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo một phương án, kháng thể chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% độ đồng nhất trình tự với vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 7 và 8, một cách tương ứng. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 hoặc 30 đột biến thay thế axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nặng có SEQ ID NO: 7 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 8. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà phong bế chéo liên kết của (hoặc cạnh tranh với) kháng thể bao gồm chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 25 với RSV ở người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có ít nhất một trong các đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở

người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với vùng biến đổi chuỗi nặng có SEQ ID NO: 7 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 8. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 hoặc 30 đột biến thay thế axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nặng có SEQ ID NO: 7 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 8. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa 1, 2 hoặc 3 đột biến thay thế axit amin trong CDR chuỗi nặng (SEQ ID NO: 1-3) và/hoặc trong CDR chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 4-6). Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà liên kết với protein F của RSV ở người bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc biến thể của nó có lên đến 30 đột biến thay thế axit amin, và/hoặc chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8 có sự thay thế lên đến 12 axit amin. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà liên kết với protein F của RSV ở người, trong đó kháng thể liên kết với protein F của RSV ở người qua một hoặc nhiều tương tác dưới đây hoặc tất cả tương tác dưới đây:

1) vòng CDR3 chuỗi nhẹ, thông qua các gốc Phe 91 và Leu 92, tương tác với chuỗi bên của Arg 429 của protein F của RSV ở người thông qua việc tạo thành hai liên kết hydro giữa oxy thuộc nhóm cacbonyl của Phe 91 và Leu 92 trong vòng CDR3

và nitơ thuộc nhóm guanidino của Arg 429 của protein F của RSV ở người;

2) vòng CDR2 chuỗi nhẹ, thông qua các gốc Asp 50 và Glu 55, tạo ra liên kết hydro với Asn 426 và Lys 445 của protein F của RSV ở người;

3) vòng CDR3 chuỗi nặng, thông qua các gốc Tyr 104 và Tyr 110, tạo ra bề mặt cho tương tác van der Waals với Ile 432 trên protein F của RSV ở người;

4) vòng CDR3 chuỗi nặng, qua Asn 107, tạo ra liên kết hydro với Lys 433 của protein F của RSV ở người; và

5) các bó chuỗi nhẹ kháng lại Glu 161 và Ser 182 của monome liền kề của trimer tiền dung hợp RSV.

Theo các khía cạnh nhất định của phương án bất kỳ trong số các phương án trên, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được phân lập.

Theo các khía cạnh nhất định của phương án bất kỳ trong số các phương án trên, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể tái tổ hợp.

Theo các khía cạnh nhất định của phương án bất kỳ trong số các phương án trên, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Theo các khía cạnh nhất định của phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi vùng chuỗi nặng bao gồm: (a) chuỗi nặng bất kỳ trong số các chuỗi nặng biến đổi được mô tả ở trên và (b) peptit dẫn đầu (ví dụ, peptit dẫn đầu có SEQ ID NO: 10). Theo các khía cạnh nhất định của phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm: (a) chuỗi nhẹ bất kỳ trong số các chuỗi nhẹ biến đổi được mô tả ở trên và (b) peptit dẫn đầu (ví dụ, peptit dẫn đầu có SEQ ID NO: 10).

Theo các khía cạnh nhất định của phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là kháng thể chứa chuỗi nặng bất kỳ trong số các chuỗi nặng biến đổi được mô tả ở trên và vùng hằng định chuỗi nặng ở người bất kỳ. Theo một phương án, kháng thể hoặc

mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là của lớp kháng thể IgG, và bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng ở người của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 ở người. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa miền hằng định IgG1 chuỗi nặng ở người, trong đó miền hằng định IgG1 được bỏ qua quá trình fucosyl hóa.

Theo các khía cạnh nhất định của phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể bao gồm chuỗi nhẹ bất kỳ trong số các chuỗi nhẹ biến đổi được mô tả ở trên và miền hằng định chuỗi nhẹ ở người. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm miền hằng định chuỗi nhẹ kappa ở người hoặc biến thể của nó, trong đó biến thể này có lên đến 20, 10, 5, 3, 2, hoặc 1 đột biến thay thế axit amin được cải biến. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm miền hằng định chuỗi nhẹ lamda ở người hoặc biến thể của nó, trong đó biến thể này có lên đến 20, 10, 5, 3, 2, hoặc 1 đột biến thay thế axit amin được cải biến. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm miền hằng định chuỗi nhẹ kappa ở người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14.

Theo một phương án, kháng thể kháng protein F của hRSV theo sáng chế bao gồm cấu trúc tứ phân đầy đủ có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, trong đó mỗi chuỗi nhẹ bao gồm: vùng biến đổi bao gồm SEQ ID NO: 8 và miền hằng định chuỗi nhẹ kappa ở người (SEQ ID NO: 14); và mỗi chuỗi nặng bao gồm: vùng biến đổi bao gồm SEQ ID NO: 7 và miền hằng định IgG1 ở người (SEQ ID NO: 13).

Theo các khía cạnh nhất định của phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được liên hợp với ít nhất một chất phòng hoặc điều trị bệnh. Theo một phương án, chất trị liệu chứa kháng thể thứ cấp hoặc mảnh của nó, tác nhân điều biến miễn dịch, hormon, chất gây độc tế bào, enzym, nuclit phóng xạ, kháng thể thứ cấp liên hợp với ít nhất một tác nhân điều biến miễn dịch, enzym, chất đánh dấu phóng xạ, hormon, oligonucleotit đối nghĩa, hoặc chất gây độc tế bào, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất polypeptit được phân lập bao gồm trình tự axit amin

nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1-8, 23 hoặc 25, hoặc mảnh của trình tự bất kỳ nêu trên. Theo các phương án nhất định, polypeptit bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo một phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập mã hóa một polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 1-8, 23 hoặc 25, trong đó các polypeptit này có thể tùy ý bao gồm trình tự dẫn đầu. Theo các phương án nhất định, polypeptit bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Sáng chế cũng đề xuất các vector biểu hiện bao gồm axit nucleic mã hóa một polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 1-8, 23 hoặc 25 (trong đó các polypeptit này có thể tùy ý bao gồm trình tự dẫn đầu). Theo các phương án nhất định, polypeptit bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Các axit nucleic được phân lập này và các vector biểu hiện chứa chúng có thể được sử dụng để biểu hiện các kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong các tế bào chủ tái tổ hợp. Do đó, sáng chế cũng đề xuất các tế bào chủ bao gồm axit nucleic được phân lập mã hóa một polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 1-8, 23 hoặc 25 (trong đó các polypeptit này có thể tùy ý bao gồm trình tự dẫn đầu). Theo các phương án nhất định, polypeptit bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc. Theo một phương án, tế bào chủ này là tế bào nấm men, ví dụ tế bào *Pichia* hoặc tế bào chủ *Pichia pastoris*.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng. Theo một phương án, chất mang hoặc chất pha loãng được dụng là L-Histidin. Theo một khía cạnh của phương án này, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bào chế trong 10 mM L-Histidin, 7% (khối lượng/thể tích) Sucroza, và 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat-80, pH=6,0. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên thường có mặt ở khoảng 100 mg/mL trong dạng bào chế như vậy.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và chứa chất phòng hoặc điều trị bệnh khác. Theo một phương án, chất phòng hoặc điều trị bệnh khác được chọn từ nhóm bao gồm: kháng thể kháng hRSV thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một phương án, kháng thể kháng hRSV thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Sáng chế cũng đề xuất bình hoặc dụng cụ tiêm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo một phương án, kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các bước: nuôi cấy

tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) trong điều kiện thích hợp để biểu hiện polynucleotit; và tùy ý, thu hồi kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên từ tế bào chủ và/hoặc môi trường nuôi cấy. Theo một phương án, polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ trong một vector duy nhất. Theo một phương án khác, polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ trong các vector khác nhau. Theo một phương án, polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị nhiễm hRSV ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế, tùy ý kết hợp với chất phòng hoặc điều trị bệnh hoặc quy trình điều trị. Theo một phương án, đối tượng được điều trị là người. Theo một phương án, chất phòng hoặc điều trị bệnh còn được chọn từ nhóm bao gồm: kháng thể kháng hRSV thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic mã hóa kháng thể kháng F RSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, hoặc thể liên hợp kháng thể. Theo một phương án, kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu

trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị nhiễm hRSV ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế, tùy ý kết hợp với chất phòng hoặc điều trị bệnh hoặc quy trình điều trị. Theo một phương án, kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Sáng chế cũng đề xuất vaccin, hoặc dược phẩm gây miễn dịch, chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo một phương án, kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu

trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo một phương án, vaccin, hoặc chế phẩm gây miễn dịch, còn chứa kháng nguyên được chọn từ protein F của RSV và protein G của RSV và các mảnh của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của RSV trong mẫu (bằng cách phát hiện protein F hoặc mảnh của nó) bao gồm bước cho mẫu này tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và phát hiện sự có mặt của phức hợp giữa kháng thể hoặc mảnh và peptit; trong đó bước phát hiện phức hợp chỉ ra sự có mặt của protein F của RSV. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; (ii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; (iii) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (iv) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; (v) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5; và (vi) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm tăng hoạt tính kháng hRSV của kháng thể kháng protein F của hRSV bao gồm các bước: thu kháng thể gốc kháng protein F của hRSV và làm tăng chức năng tác động của kháng thể gốc kháng protein F của hRSV; trong đó hoạt tính của kháng thể kháng protein F của hRSV thu được cao hơn

so với kháng thể gốc kháng protein F của hRSV. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “kháng thể kháng gốc” dùng để chỉ kháng thể có vùng Fc kiểu đại và/hoặc sự glycosyl hóa kiểu đại (nghĩa là, mô hình glycosyl hóa, do sự biểu hiện của polypeptit trong tế bào chủ động vật có vú không được thiết kế). Chức năng tác động của kháng thể gốc có thể được làm tăng bằng cách gây đột biến vùng Fc của nó hoặc bằng cách làm thay đổi sự glycosyl hóa của nó, ví dụ bằng cách tạo ra kháng thể được bỏ qua quá trình fucosyl hóa (như được thảo luận chi tiết hơn dưới đây). Theo một phương án, chức năng tác động của kháng thể gốc kháng protein F của hRSV được làm tăng bằng cách tạo ra các đột biến trong vùng Fc của kháng thể gốc kháng protein F của hRSV. Theo phương án khác, chức năng tác động của kháng thể gốc kháng protein F của hRSV được làm tăng bằng cách loại bỏ các gốc fucoza khỏi kháng thể, hoặc biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ mà được thiết kế di truyền để loại bỏ hoạt tính của enzym xúc tác phản ứng cộng fucoza vào glycoprotein.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1B thể hiện đường cong liên kết (từ ELISA) của các kháng thể RSV ở người D25, palivizumab, và RB1 với protein F tiền dung hợp (A) và sau dung hợp (B) RSV ở người.

Các hình vẽ từ Fig.2A đến Fig.2B thể hiện đường cong trung hòa đối với các kháng thể RSV ở người trong chủng RSV A Long (A) và RSV B Washington (B).

Các hình vẽ từ Fig.3A đến Fig.3B thể hiện bản đồ epitop của RB1 bằng cách gây đột biến quét alanin protein F dung hợp (A) và các gốc được lập bản đồ epitop trên cấu trúc tinh thể F tiền dung hợp (B).

Các hình vẽ từ Fig.4A đến Fig.4D thể hiện hiệu lực của RB1 so với D25 ở phổi trên mô hình thử thách RSV A ở chuột bông được vẽ đồ thị dựa vào nồng độ của kháng thể (A) và thử thách RSV B được vẽ đồ thị dựa vào nồng độ của kháng thể (B) hoặc các hạt virus (PFU/g) có mặt trong các mô được vẽ đồ thị dựa vào liều của kháng thể trong thử thách RSV A (C) và thử thách RSV B (D).

Các hình vẽ từ Fig.5A đến Fig.5D thể hiện hiệu lực của RB1 so với D25 ở mũi trên mô hình thử thách RSV A ở chuột bông được vẽ đồ thị dựa vào nồng độ của kháng thể (A) và thử thách RSV B được vẽ đồ thị dựa vào nồng độ của kháng thể (B)

hoặc các hạt virus (PFU/g) có mặt trong các mô được vẽ đồ thị dựa vào liều của kháng thể trong thử thách RSV A (C) và thử thách RSV B (D).

Fig.6 thể hiện đường cong liên kết (từ ELISA) của kháng thể RB1+YTE của RSV ở người với protein F của RSV A ở người.

Fig.7 thể hiện các đặc tính dược động học ở khỉ Rhesus của RB1-YTE (RB1+YTE) đối với motavizumab có bộ đột biến YTE.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các chữ viết tắt

Các chữ viết tắt sau đây sẽ được sử dụng trong toàn bộ phần mô tả chi tiết và các ví dụ thực hiện của sáng chế :

ADCC	Tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể
CDC	Tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể
CDR	Vùng xác định bổ thể trong vùng biến đổi globulin miễn dịch, được xác định bằng cách sử dụng hệ thống đánh số Kabat
CHO	Buồng trứng chuột đồng Trung Quốc
ELISA	Thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym
FR	Vùng khung kháng thể: vùng biến đổi globulin miễn dịch ngoại trừ các vùng CDR
HRP	Peroxidaza ở cây cải ngựa
IC50	Nồng độ dẫn đến sự ức chế 50%
IgG	Globulin miễn dịch G
Kabat	Sự sắp hàng globulin miễn dịch và hệ thống đánh số được tiên phong bởi Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5 th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)
mAb hoặc Mab hoặc MAb	Kháng thể đơn dòng
Vùng V	Đoạn của các chuỗi IgG có thể biến đổi về trình tự giữa các

kháng thể khác nhau. Nó kéo dài đến gốc Kabat 109 trong chuỗi nhẹ và 113 trong chuỗi nặng.

VH Vùng biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch

VK Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kapa của globulin miễn dịch

Định nghĩa

Để sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật nhất định được xác định cụ thể dưới đây. Trừ khi được xác định cụ thể trong tài liệu này, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật khác được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa thông thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan mà sáng chế này thuộc về.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, dạng số ít "một" bao gồm dạng số nhiều tương đương trừ khi ngữ cảnh sử dụng thể hiện rõ ràng theo cách khác.

"Việc dùng" và "việc điều trị" khi áp dụng cho động vật, người, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học, dùng để chỉ việc cho động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học tiếp xúc với được phẩm ngoại sinh, chất trị liệu, chất chẩn đoán, hoặc chế phẩm. Việc xử lý tế bào bao gồm việc cho tế bào tiếp xúc với chất thử, cũng như việc tiếp xúc của chất phản ứng với dịch, mà dịch này tiếp xúc với tế bào. "Việc dùng" và "việc điều trị" cũng có nghĩa là việc xử lý *in vitro* và *ex vivo*, ví dụ, tế bào, bằng chất thử, chất chẩn đoán, hợp chất liên kết, hoặc bằng tế bào khác.

“Bệnh RSV” dùng để chỉ bệnh bất kỳ được gây ra, trực tiếp hoặc gián tiếp, bởi sự nhiễm virus hợp bào hô hấp (Respiratory Syncytial Virus - RSV) cũng như bệnh hoặc tình trạng bệnh lý làm cho bệnh nhân dễ bị nhiễm RSV. Ví dụ về các bệnh thuộc danh mục trước bao gồm bệnh viêm phổi và viêm tiểu phế quản. Bệnh và tình trạng bệnh lý thuộc danh mục sau (nghĩa là, các bệnh khiến bệnh nhân có nguy cơ nhiễm RSV nặng) bao gồm bệnh xơ nang, bệnh tim bẩm sinh, bệnh ung thư, ức chế miễn dịch liên quan đến tuổi tác, người được ghép tạng và nói chung là bất kỳ tình trạng bệnh lý nào gây ra tình trạng ức chế miễn dịch hoặc suy giảm chức năng của hệ miễn dịch suy giảm như phác đồ cấy ghép nội tạng sau phẫu thuật hoặc sinh non.

"Điều trị" hoặc "việc điều trị" dùng để chỉ việc dùng chất trị liệu, như chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ theo sáng chế, bên trong hoặc bên ngoài cho đối tượng hoặc bệnh nhân có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh, hoặc đang nghi ngờ mắc bệnh, mà chất này có hoạt tính điều trị bệnh. Thông thường, chất này được dùng ở lượng hữu hiệu để giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở đối tượng hoặc quần thể được điều trị, cho dù bằng cách kích thích sự thoái triển hoặc ức chế sự tiến triển của (các) triệu chứng theo mức độ có thể đo được lâm sàng bất kỳ. Lượng chất trị liệu có hiệu quả làm giảm bất kỳ triệu chứng bệnh cụ thể nào có thể thay đổi tùy theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, và cân nặng của bệnh nhân, và khả năng của thuốc tạo ra đáp ứng mong muốn ở đối tượng. Việc một triệu chứng bệnh có thuyên giảm hay không có thể được đánh giá bằng phép đo lâm sàng bất kỳ thường được bác sĩ hoặc nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe lành nghề khác sử dụng để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng đó. Việc điều trị bằng kháng thể kháng RSV cũng có thể kết hợp với các biện pháp can thiệp khác (kháng thể, axit nucleic, vacxin và các hợp chất phân tử nhỏ) để điều trị các tác nhân gây bệnh đường hô hấp khác.

"Ngăn ngừa" hoặc "việc ngăn ngừa" dùng để chỉ việc dùng chất phòng ngừa, như chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ theo sáng chế, bên trong hoặc bên ngoài cho đối tượng hoặc bệnh nhân có nguy cơ bị nhiễm hRSV, để mà chất này có hoạt tính phòng ngừa. Việc ngăn ngừa bao gồm việc làm giảm khả năng hoặc mức độ nghiêm trọng của lần nhiễm RSV tiếp theo, cải thiện các triệu chứng liên quan đến nhiễm trùng đường hô hấp dưới (lower respiratory tract infection - LRI) khi nhiễm RSV, và kích thích miễn dịch để bảo vệ chống lại sự nhiễm RSV. Thông thường, chất này được dùng với lượng hữu hiệu để trung hòa RSV trong phổi và/hoặc mũi để ngăn nhiễm trùng. Lượng chất phòng ngừa có hiệu quả để cải thiện triệu chứng bệnh cụ thể bất kỳ có thể thay đổi tùy theo các yếu tố như độ tuổi, và cân nặng của bệnh nhân, và khả năng của chất này để tạo ra đáp ứng mong muốn ở đối tượng. Việc một triệu chứng bệnh có được cải thiện hay không có thể được đánh giá bằng phép đo lâm sàng bất kỳ thường được bác sĩ hoặc nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe lành nghề khác sử dụng để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng đó hoặc trong một số trường hợp nhất định sẽ làm giảm nhu cầu nhập viện.

Protein F của hRSV

Protein F của RSV ở người được tổng hợp dưới dạng tiền chất trime bán ổn định (F0) được phân cắt protein phân giải thành các tiểu phần F1 và F2 liên kết cộng hóa trị. Cấu trúc nguyên tử của trime F ở dạng tiền dung hợp được xác định đối với các thành viên PIV5 và RSV thuộc họ *paramyxoviridae*. Xem tài liệu McLellan *et al.*, 2011, J Virol. 85:7788-7796 (RSV) và Welch *et al.*, 2012, Proc Natl Acad Sci 109:16672-16677 (PIV). F tiền dung hợp có đuôi tế bào chất đầu tận cùng C ngắn, miền xuyên màng đơn, thân xoắn, và miền đầu hình cầu. Cấu trúc nguyên tử của NDV, hPIV3, và F của RSV ở dạng sau dung hợp cho thấy sự kiện tái gấp nếp lớn xảy ra để chuyển F tiền dung hợp thành F sau dung hợp, trong đó một phần của miền đầu hình cầu tái sắp xếp để tạo ra sáu bó xoắn. Các cấu trúc này, cùng với dữ liệu ức chế peptit, gợi ý mô hình cho dung hợp màng trung gian F mà, khi hoạt hóa, F1/F2 tái sắp xếp để chèn peptit dung hợp kỵ nước từ đầu tận cùng N của F1 vào màng tế bào đích tạo ra tiền chất trung gian kẹp tóc. Cấu trúc tương đối mở rộng này giới hạn virut vào màng tế bào và biến thể để tạo ra sáu bó xoắn ổn định của cấu trúc sau dung hợp. Việc chuyển đổi từ tiền dung hợp bán ổn định, thành chất trung gian tiền kẹp tóc, thành cấu dạng sau dung hợp làm giảm gradien năng lượng bằng dạng sau dung hợp thể hiện trạng thái ổn định nhất, và năng lượng này được giải phóng trong quá trình tái gấp nếp F được kết hợp với quá trình dung hợp màng.

Thuật ngữ protein F của hRSV bao gồm protein F của RSV ở người cũng như các mảnh của nó như mảnh trưởng thành của nó thiếu peptit tín hiệu. Theo phương án của sáng chế, trình tự axit amin của protein F của RSV ở người bao gồm trình tự axit amin được bộc lộ với số nộp lưu Ngân hàng gen AAR14266 (chủng hRSV B 9320).

Kháng thể kháng hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết protein F của RSV ở người, tốt hơn là từ cả hai chủng A và chủng B của RSV, mà liên kết cả protein F tiền dung hợp và protein F sau dung hợp, và sử dụng kháng thể hoặc mảnh như vậy. Theo một số phương án, kháng thể kháng protein F của RSV được phân lập. Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này liên kết với epitop ở vị trí IV của protein F. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án theo sáng chế

được mô tả trong bản mô tả này, theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 và/hoặc chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể kháng protein F của RSV là đầy đủ ở người. Ưu điểm chính của kháng thể đơn dòng theo sáng chế xuất phát từ thực tế rằng chúng bao gồm các trình tự CDR3 ở người và, theo một số phương án, có thể hoàn toàn là kháng thể đơn dòng ở người. Do đó, việc sử dụng *in vivo* kháng thể đơn dòng đầy đủ ở người theo sáng chế để phòng bệnh miễn dịch và liệu pháp miễn dịch của bệnh RSV làm giảm đáng kể vấn đề về đáp ứng miễn dịch vật chủ so với kháng thể được dùng thụ động. Vấn đề này thường gặp phải khi kháng thể đơn dòng trong phần tình trạng kỹ thuật của nguồn ghép khác loại hoặc khảm được sử dụng. Khía cạnh quan trọng thứ hai của ưu điểm này là độ an toàn tiềm năng của các kháng thể đơn dòng ở người này đối với ứng dụng liệu pháp gen, trong đó sự biểu hiện của protein ghép khác loại hoặc khảm chứa trình tự không phải ở người không thể được kết thúc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể kháng protein F của RSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó dùng để chỉ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với protein F của RSV ở người. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó "liên kết đặc hiệu với RSV ở người" là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với protein F của RSV ở người tiền dung hợp hoặc sau dung hợp với Kd có giá trị là khoảng 1 nM hoặc ái lực cao hơn (ví dụ, 1 nM-2 pM, 1 nM, 100 pM, 10 pM hoặc 2 pM), nhưng không liên kết với các protein khác thiếu trình tự protein F của RSV. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết đặc hiệu với protein F của RSV ở người cũng phản ứng chéo với protein F của RSV ở bò. Như được sử dụng trong bản mô tả này "phản ứng chéo" dùng để chỉ khả năng của kháng thể phản ứng với protein tương đồng từ các loại khác. Nếu kháng thể liên kết đặc hiệu với protein F của RSV ở người có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví

dự về các thử nghiệm đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật để xác định liên kết ái lực bao gồm cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET).

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV và phương pháp sử dụng kháng thể này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ dạng bất kỳ của kháng thể có hoạt tính sinh học mong muốn. Do đó, nó được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và cụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng (bao gồm kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng), kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), kháng thể được làm giống như của người, kháng thể đầy đủ ở người, và kháng thể khảm.

Sáng chế bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên protein F kháng hRSV và phương pháp sử dụng mảnh liên kết kháng nguyên này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi được chỉ ra theo cách khác, "mảnh kháng thể" hoặc "mảnh liên kết kháng nguyên" dùng để chỉ mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể, *nghĩa là* mảnh kháng thể mà giữ lại khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên được liên kết bằng kháng thể có chiều dài đầy đủ, ví dụ, mảnh mà giữ lại một hoặc nhiều vùng CDR. Ví dụ về các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv; các kháng thể tổ hợp kép; các kháng thể tuyến tính; các phân tử kháng thể chuỗi đơn, ví dụ, sc-Fv; và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Sáng chế bao gồm mảnh Fab kháng protein F của RSV và phương pháp sử dụng mảnh Fab này. "Mảnh Fab" bao gồm một chuỗi nhẹ và C_{H1} và vùng biến đổi của một chuỗi nặng. Chuỗi nặng của phân tử Fab không thể tạo ra liên kết disulfua với phân tử chuỗi nặng khác. "Mảnh Fab" có thể là sản phẩm của việc phân cắt papain của kháng thể.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng protein F của RSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng Fc và phương pháp sử dụng kháng thể này. Vùng "Fc" chứa hai mảnh chuỗi nặng bao gồm miền C_{H1} và C_{H2} của kháng thể. Hai mảnh chuỗi nặng được nối với nhau bằng hai hoặc nhiều liên kết disulfua và bằng tương tác kỵ nước của các miền C_{H3}.

Sáng chế bao gồm các mảnh Fab' kháng protein F của RSV và phương pháp sử dụng các mảnh này. "Mảnh Fab'" chứa một chuỗi nhẹ và phần hoặc mảnh của một chuỗi nặng mà chứa miền V_H và miền C_{H1} và ngoài ra vùng này nằm giữa miền C_{H1} và miền C_{H2} , sao cho liên kết disulfua liên chuỗi có thể được tạo ra giữa hai chuỗi nặng của hai mảnh Fab' để tạo ra phân tử $F(ab')_2$.

Sáng chế bao gồm các mảnh $F(ab')_2$ kháng protein F của RSV và phương pháp sử dụng các mảnh này. "Mảnh $F(ab')_2$ " bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng chứa phần vùng hằng định giữa miền C_{H1} và miền C_{H2} , sao cho liên kết disulfua liên chuỗi được tạo ra giữa hai chuỗi nặng. Do đó, mảnh $F(ab')_2$ bao gồm hai mảnh Fab' được nối với nhau bằng liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng. "Mảnh $F(ab')_2$ " có thể là sản phẩm của sự phân cắt pepsin của kháng thể.

Sáng chế bao gồm các mảnh Fv kháng protein F của RSV và phương pháp sử dụng các mảnh này. "Vùng Fv" bao gồm các vùng biến đổi từ cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, nhưng thiếu vùng hằng định.

Sáng chế bao gồm các mảnh scFv kháng protein F của RSV và phương pháp sử dụng các mảnh này. Thuật ngữ kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" dùng để chỉ mảnh kháng thể chứa miền V_H và V_L của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Thông thường, polypeptit Fv còn bao gồm tác nhân liên kết polypeptit giữa các miền V_H và V_L mà cho phép scFv tạo ra cấu trúc mong muốn để liên kết kháng nguyên. Để xem xét scFv, xem tài liệu Pluckthun (1994) *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315. Cũng xem, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 88/01649 và các patent Mỹ số 4,946,778 và 5,260,203.

Sáng chế bao gồm kháng thể miền kháng protein F của RSV và phương pháp sử dụng kháng thể này. "Kháng thể miền" là mảnh globulin miễn dịch chức năng miễn dịch học chỉ chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Trong một số trường hợp, hai hoặc nhiều vùng V_H được liên kết cộng hóa trị với tác nhân liên kết peptit để tạo ra kháng thể miền hóa trị hai. Hai vùng V_H của kháng thể miền hóa trị hai có thể hướng đích kháng nguyên giống hoặc khác nhau.

Sáng chế bao gồm các kháng thể hóa trị hai kháng protein F của RSV và

phương pháp sử dụng các kháng thể này. "Kháng thể hóa trị hai" bao gồm hai vị trí liên kết kháng nguyên. Trong một số trường hợp, hai vị trí liên kết này có cùng tính đặc hiệu kháng nguyên. Tuy nhiên, kháng thể hóa trị hai có thể là đặc hiệu kép (xem dưới đây).

Sáng chế bao gồm kháng thể tổ hợp kép kháng protein F của RSV và phương pháp sử dụng nó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể tổ hợp kép" dùng để chỉ các mảnh kháng thể nhỏ với hai vị trí liên kết kháng nguyên, mà các mảnh bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) nối với miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) trong cùng chuỗi polypeptit (V_H-V_L hoặc V_L-V_H). Bằng cách sử dụng tác nhân liên kết là quá ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai miền trên cùng chuỗi, các miền này bị buộc phải ghép cặp với miền bổ thể của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên. Kháng thể tổ hợp kép được mô tả đầy đủ hơn trong, ví dụ, patent châu Âu số EP 404,097; công bố đơn quốc tế số WO 93/11161; và Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448. Để xem xét các biến thể kháng thể được thiết kế thường xem tài liệu Holliger and Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

Thông thường, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế được cải biến theo một vài cách giữ lại ít nhất 10% hoạt tính liên kết của nó (khi so với kháng thể gốc) khi hoạt tính này được biểu hiện trên cơ sở phân tử. Tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế giữ lại ít nhất là 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc 100% hoặc nhiều ái lực liên kết protein F của RSV là kháng thể gốc. Cũng được dự định rằng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể có đột biến thay thế axit amin bảo toàn hoặc không bảo toàn (đề cập đến dưới dạng "các biến thể bảo toàn" hoặc "các biến thể bảo toàn chức năng" của kháng thể) không thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học của nó.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV được phân lập và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó và phương pháp sử dụng kháng thể này. Kháng thể "được phân lập" hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó ít nhất một phần không chứa các phân tử sinh học khác từ các tế bào hoặc chủng nuôi cấy tế bào trong đó chúng được tạo ra. Các phân tử sinh học này bao gồm axit nucleic, protein, lipid, hydrat cacbon, hoặc nguyên liệu khác như mảnh tế bào và môi trường phát triển.

Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể còn ít nhất một phần không chứa các thành phần của hệ thống biểu hiện như các phân tử sinh học từ tế bào chủ hoặc của môi trường phát triển chúng. Thông thường, thuật ngữ "được phân lập" không được dự định để đề cập đến sự không có mặt hoàn toàn của các phân tử sinh học này hoặc đến sự không có mặt của nước, đệm, hoặc muối hoặc đến các thành phần của dạng bào chế được mà bao gồm kháng thể hoặc mảnh.

Sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó cũng như các thành phần kháng thể đơn dòng chứa nhiều kháng thể đơn dòng được phân lập. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ tập hợp kháng thể tương đồng đáng kể, *nghĩa là*, các phân tử kháng thể chứa tập hợp giống hệt về trình tự axit amin ngoại trừ các đột biến có thể xuất hiện trong tự nhiên mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Ngược lại, các dạng bào chế kháng thể (đa dòng) thông thường thường bao gồm vô số các kháng thể khác nhau có trình tự axit amin khác nhau trong miền biến đổi của chúng, cụ thể các CDR của chúng thường đặc hiệu đối với các epitope khác nhau. Chất cải biến "đơn dòng" chỉ ra đặc tính của kháng thể thu được từ tập hợp kháng thể tương đồng đáng kể, và không được phân tích khi yêu cầu sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế cũng có thể được thực hiện bằng phương pháp ADN tái tổ hợp (*xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567*).

Nói chung, đơn vị cấu trúc kháng thể cơ bản (hoặc "chiều dài đầy đủ") chứa tetrame. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit tương đồng, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25 kDa) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu tận amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng hoặc miền biến đổi nằm trong khoảng từ khoảng 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin hơn chịu trách nhiệm chính để nhận diện kháng nguyên. Phần đầu tận carboxy của chuỗi nặng có thể xác định vùng hoặc miền hằng định chịu trách nhiệm chính cho chức năng tác động. Thông thường, chuỗi nhẹ ở người được phân loại là chuỗi nhẹ kappa và lamda. Hơn thế nữa, chuỗi nặng ở người thường được phân loại là mu, delta, gama, alpha, hoặc epsilon, và xác định lớp kháng thể của kháng thể là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE, một cách tương ứng. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng biến đổi và vùng hằng định được liên kết bằng vùng "J" chứa

khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng cũng bao gồm vùng "D" bằng nhiều hơn khoảng 10 axit amin. Thường xem, tài liệu Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989). Theo ngữ cảnh về kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, thuật ngữ miền và vùng có thể được sử dụng thay thế cho nhau, nếu thích hợp.

Vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo ra vị trí liên kết kháng thể. Do đó, nói chung, kháng thể nguyên vẹn có hai vị trí liên kết. Ngoại trừ kháng thể hai chức hoặc kháng thể đặc hiệu kép, thì hai vị trí liên kết, nói chung, là giống nhau.

Thông thường, các miền biến đổi của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm ba vùng siêu biến đổi, cũng được gọi là vùng xác định bổ thể (complementarity determining regions - CDR), được định vị trong vùng khung được bảo toàn tương đối (framework region - FR). Các CDR này thường được sắp hàng bằng vùng khung, có thể liên kết với epitope đặc hiệu. Nói chung, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, cả miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng bao gồm FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Việc gán các axit amin đối với mỗi miền, nói chung, phù hợp với các định nghĩa về trình tự protein quan tâm trong miễn dịch học (Sequences of Proteins of Immunological Interest), Kabat, *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat, 1978, *Adv. Prot. Chem.* 32:1-75; Kabat, *et al.*, 1977, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616; Chothia *et al.*, 1987, *J Mol. Biol.* 196:901-917 hoặc Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng siêu biến đổi" dùng để chỉ các gốc axit amin của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà chịu trách nhiệm liên kết kháng nguyên. Vùng siêu biến đổi chứa các gốc axit amin từ "vùng xác định bổ thể" hoặc "CDR" (*nghĩa là*, CDRL1, CDRL2 và CDRL3 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 trong miền biến đổi chuỗi nặng). Xem tài liệu Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (xác định các vùng CDR của kháng thể bằng trình tự); cũng xem Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (xác định các vùng CDR của kháng thể bằng cấu trúc). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ các gốc "khung" hoặc "FR"

dùng để chỉ các gốc miền biến đổi khác các gốc vùng siêu biến đổi được xác định trong bản mô tả này là các gốc CDR.

"Phân tử axit nucleic được phân lập" hoặc "polynucleotit được phân lập" dùng để chỉ ADN hoặc ARN của hệ gen, mARN, cADN, hoặc nguồn gốc tổng hợp hoặc một số tổ hợp của chúng mà không liên quan đến tất cả hoặc một phần của polynucleotit trong đó polynucleotit được phân lập được tìm thấy trong tự nhiên, hoặc được liên kết với polynucleotit mà nó không được liên kết trong tự nhiên. Đối với mục đích của việc bộc lộ này, nên được hiểu là "phân tử axit nucleic chứa" trình tự nucleotit cụ thể không bao gồm nhiễm sắc thể nguyên vẹn. Các phân tử axit nucleic được phân lập "chứa" các trình tự axit nucleic được chỉ rõ có thể bao gồm, ngoài các trình tự cụ thể, mã hóa trình tự lên đến mười hoặc thậm chí lên đến hai mươi hoặc nhiều protein khác hoặc các phần hoặc các mảnh của chúng, hoặc có thể bao gồm các trình tự điều hòa được liên kết theo cách có điều khiển mà kiểm soát sự biểu hiện của vùng mã hóa của các trình tự axit nucleic được trích dẫn, và/hoặc có thể bao gồm các trình tự vector.

Cụm từ "trình tự kiểm soát" dùng để chỉ trình tự ADN cần thiết để biểu hiện trình tự mã hóa được liên kết theo cách có điều khiển trong sinh vật chủ cụ thể. Các trình tự kiểm soát thích hợp đối với sinh vật chưa có nhân điển hình, ví dụ, bao gồm gen khởi đầu, tùy ý là trình tự chỉ huy, và vị trí liên kết ribosom. Các tế bào sinh vật có nhân điển hình đã được biết để sử dụng gen khởi đầu, tín hiệu polyadenyl hóa, và gen tăng cường.

Axit nucleic hoặc polynucleotit "được liên kết theo cách có điều khiển" khi nó được đặt trong môi liên hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN đối với trình tự ban đầu hoặc trình tự dẫn đầu tiết được liên kết theo cách có điều khiển với ADN đối với polypeptit nếu nó được biểu hiện dưới dạng tiền protein tham gia vào quá trình bài tiết polypeptit; gen khởi đầu hoặc gen tăng cường được liên kết theo cách có điều khiển với trình tự mã hóa nếu nó tác động đến sự phiên mã của trình tự; hoặc vị trí liên kết ribosom được liên kết theo cách có điều khiển với trình tự mã hóa nếu nó được định vị để hỗ trợ cho sự dịch mã. Nói chung, nhưng không phải luôn luôn, "được liên kết theo cách có điều khiển" dùng để chỉ các trình tự ADN được liên kết là liền kề nhau, và, trong trường hợp của trình tự dẫn đầu tiết, là liền kề và trong

pha đọc. Tuy nhiên, gen tăng cường không nhất thiết phải liên kết nhau. Việc liên kết được thực hiện bằng cách nối ở các vị trí giới hạn thuận tiện. Nếu các vị trí như vậy không tồn tại, thể thích nghi oligonucleotit tổng hợp hoặc các tác nhân liên kết được sử dụng theo thực tiễn thông thường.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các cách diễn đạt "tế bào", "dòng tế bào" và "chúng nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay thế cho nhau và tất cả các ký hiệu như vậy bao gồm thể hệ sau. Do đó, các từ "thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp" bao gồm đối tượng tế bào sơ cấp và nuôi cấy bắt nguồn từ đó mà không liên quan đến số lần chuyển. Cũng cần hiểu rằng không phải tất cả thể hệ sau sẽ có hàm lượng AND tương đồng chính xác, do các đột biến có tính toán hoặc không có tính toán. Bao gồm cả thể hệ sau đột biến mà có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc trong tế bào được biến nạp ban đầu. Các ký hiệu riêng rẽ được dự định, nó sẽ rõ ràng từ ngữ cảnh này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "trình tự dòng mầm" dùng để chỉ trình tự của trình tự AND globulin miễn dịch không được sắp xếp lại. Nguồn thích hợp bất kỳ của trình tự globulin miễn dịch không được sắp xếp lại có thể được sử dụng. Trình tự dòng mầm của người có thể thu được, ví dụ, từ cơ sở dữ liệu dòng mầm JOINSOLVER trên trang web của Viện Quốc gia về Viêm khớp và Bệnh Cơ xương và Da (National Institute of Arthritis và Musculoskeletal và Skin Diseases) thuộc Viện Y tế Quốc gia Hoa Kỳ (United States National Institutes of Health). Trình tự dòng mầm của chuột nhất có thể thu được, ví dụ, như được mô tả trong Giudicelli *et al.*, 2005, *Nucleic Acid Res.* 33:D256-D261.

Các đặc tính vật lý và chức năng của kháng thể kháng protein F của RSV được nêu làm ví dụ

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó có đặc tính cấu trúc và chức năng được chỉ rõ, và phương pháp sử dụng của kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh/tình trạng bệnh lý liên quan đến nhiễm RSV.

“Kháng thể kháng protein F của RSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế” bao gồm: kháng thể bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của

nó được thảo luận trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) hoặc biến thể của nó (ví dụ, biến thể trình tự hoặc biến thể chức năng); kháng thể bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều bộ CDR bất kỳ được nêu trong bảng 7; kháng thể bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà liên kết với cùng epitop trong protein F của RSV ở người là kháng thể được thảo luận trong bản mô tả này (ví dụ, RB1); và kháng thể bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà phong bế chéo (một phần hoặc đầy đủ) hoặc được phong bế chéo (một phần hoặc đầy đủ) bằng kháng thể được thảo luận trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) để liên kết RSV.

Kháng thể phong bế chéo và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được xác định dựa trên khả năng của chúng để cạnh tranh chéo với kháng thể theo sáng chế trong các thử nghiệm liên kết chuẩn (ví dụ, BIAcore, ELISA, đếm tế bào theo dòng). Ví dụ, các thử nghiệm ELISA chuẩn có thể được sử dụng trong đó protein protein F của RSV tái tổ hợp được cố định trên đĩa, một trong các kháng thể được đánh dấu huỳnh quang và khả năng của kháng thể không được đánh dấu để cạnh tranh tắt liên kết của kháng thể được đánh dấu được đánh giá. Ngoài ra hoặc theo cách khác, phân tích BIAcore có thể được sử dụng để đánh giá khả năng của kháng thể để cạnh tranh chéo. Khả năng của kháng thể thử nghiệm để ức chế liên kết của kháng thể khác (ví dụ, kháng thể D25) đối với protein F của RSV chứng minh rằng kháng thể thử nghiệm có thể cạnh tranh với kháng thể khác (ví dụ, D25) để liên kết với protein F của RSV và do đó, có thể, trong một số trường hợp, liên kết với cùng epitop trên protein F của RSV là kháng thể D25 với epitop chồng lặp.

Như được nêu ở trên, kháng thể và mảnh của nó liên kết với cùng epitop là kháng thể bất kỳ trong số kháng thể kháng protein F của RSV hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế cũng tạo ra một phần của sáng chế. Hơn nữa, theo các phương án nhất định, kháng thể liên kết với epitop mà chồng lặp với epitop được liên kết bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng protein F của RSV theo sáng chế cũng tạo ra một phần của sáng chế. Có nhiều phương pháp có sẵn để lập bản đồ kháng thể epitop trên kháng nguyên hướng đích, bao gồm: khối phổ H/D-Ex, tinh thể học tia X, phân tích pepscan và gây đột biến định hướng điểm. Ví dụ, HDX (Trao đổi hydro đơteri - Hydrogen Deuterium Exchange) kết hợp với phân giải protein và khối phổ có thể được sử dụng để xác định epitop của kháng thể trên kháng nguyên

đặc hiệu Y. HDX-MS dựa trên phép đo chính xác và so sánh mức độ kết hợp đơteri bằng kháng nguyên khi được ủ riêng trong D₂O và với sự có mặt của kháng thể của nó ở các khoảng thời gian khác nhau. Đơteri được trao đổi với hydro trên khung amit của protein ở các vùng tiếp xúc, trong khi các vùng của kháng nguyên được liên kết với kháng thể sẽ được bảo vệ và sẽ có ít hoặc không có sự trao đổi sau khi phân tích bằng LC-MS/MS các mảnh phân giải protein.

Ví dụ về chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể kháng protein F của RSV theo sáng chế cũng như CDR của chúng gồm, nhưng không giới hạn ở các chuỗi được bộc lộ trong bảng 7 (SEQ ID NO: 1-8, 23 và 25). Sáng chế bao gồm polypeptit bất kỳ bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1-8, 23, và 25, và nucleotit tái tổ hợp mã hóa các polypeptit như vậy.

Phạm vi của sáng chế bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV được phân lập và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm biến thể của chuỗi globulin miễn dịch được nêu trong bản mô tả này, ví dụ, trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 7, 8; trong đó biến thể có một hoặc nhiều đặc tính sau đây: (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết protein F của hRSV ở người và có miền V_L và miền V_H có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO: 8 (V_L) và 7 (V_H); trong đó biến thể có khả năng liên kết và đặc tính mong muốn, ví dụ, (i) liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người với giá trị K_d nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật

tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET); hoặc (ii) liên kết với protein F sau dung hợp RSV ở người với giá trị Kd nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-11} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

"Các biến thể được cải biến bảo toàn" hoặc "sự thay thế bảo toàn" dùng để chỉ các đột biến thay thế axit amin trong protein bằng các axit amin khác có các đặc điểm tương tự (ví dụ, điện tích, kích thước chuỗi bên, tính kỵ nước/tính ưa nước, cấu dạng mạch chính và tính cứng, v.v.), sao cho sự thay đổi có thể thường xuyên được tạo ra mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein. người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan nhận ra rằng, nói chung, một axit amin thay thế duy nhất trong các vùng không thiết yếu của polypeptit về cơ bản không làm thay đổi hoạt tính sinh học (xem, ví dụ, Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Ngoài ra, các đột biến thay thế của các axit amin tương tự về mặt cấu trúc hoặc chức năng ít có khả năng phá vỡ hoạt tính sinh học. Các đột biến thay thế bảo toàn được nêu làm ví dụ được nêu trong bảng 1.

Bảng 1. Đột biến thay thế axit amin bảo toàn được nêu làm ví dụ

Gốc ban đầu	Đột biến thay thế bảo toàn
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr

Gốc ban đầu	Đột biến thay thế bảo toàn
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Các biến thể bảo toàn chức năng của kháng thể theo sáng chế cũng được dự tính bởi sáng chế. "Các biến thể bảo toàn chức năng" như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ kháng thể hoặc mảnh trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được thay đổi mà không làm thay đổi đặc tính mong muốn, ái lực và/hoặc tính đặc hiệu của kháng nguyên. Các biến thể như vậy gồm, nhưng không giới hạn ở, sự thay thế axit amin bằng một axit amin có các đặc tính tương tự, như đột biến thay thế axit amin bảo toàn trong bảng 1. Cũng đề cập đến là polypeptit được phân lập bao gồm các miền V_L của kháng thể kháng protein F của hRSV theo sáng chế (ví dụ, SEQ ID NO: 8), và polypeptit được phân lập bao gồm các miền V_H (ví dụ, SEQ ID NO: 7) của kháng thể kháng hRSV theo sáng chế có lên đến 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 đột biến thay thế axit amin hoặc nhiều hơn, mà có thể xuất hiện riêng trong vùng khung hoặc một hoặc nhiều đột biến thay thế axit amin có thể được định vị trong một hoặc nhiều CDR. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết protein F của hRSV và có các miền V_L và các miền V_H có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80% hoặc 75% so với một hoặc nhiều miền V_L hoặc miền V_H được mô tả trong bản mô tả này, và có sự liên kết đặc hiệu với protein F của hRSV. Theo một phương án khác, kháng thể liên kết hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm các miền V_L và V_H (có và không có trình tự tín hiệu) có lên đến 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 đột biến thay thế axit amin hoặc nhiều hơn, có thể xuất hiện riêng trong vùng khung hoặc một hoặc nhiều axit amin thay thế có thể được định vị trong một hoặc nhiều đột biến thay thế axit amin có thể được định vị trong một hoặc nhiều CDR, và có liên kết đặc hiệu với protein F của hRSV. Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng không bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:

9.

Polynucleotit và polypeptit

Sáng chế còn bao gồm polynucleotit mã hóa bất kỳ trong số polypeptit hoặc chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo một phương án, polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất một miền biến đổi globulin miễn dịch chuỗi nhẹ (V_L) trưởng thành theo sáng chế và/hoặc ít nhất một miền biến đổi globulin miễn dịch chuỗi nặng (V_H) trưởng thành theo sáng chế. Theo một số phương án, polynucleotit được phân lập mã hóa cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trên một phân tử polynucleotit duy nhất, và theo các phương án khác, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được mã hóa trên các phân tử polynucleotit riêng rẽ. Theo một phương án khác, polynucleotit còn mã hóa trình tự tín hiệu. Ví dụ, sáng chế bao gồm polynucleotit mã hóa axit amin được mô tả trong SEQ ID NO: 1-8, 23 và 25, cũng như polynucleotit mà lai vào đó và, ngoài ra, polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi polynucleotit lai như vậy. Theo một phương án, sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm có SEQ ID NO: 15 (chuỗi nặng biến đổi) hoặc SEQ ID NO: 16 (chuỗi nhẹ biến đổi). Theo các phương án nhất định, việc tối ưu hóa codon có thể được sử dụng để tăng cường đặc tính của axit nucleic, ví dụ, biểu hiện trong tế bào chủ nhất định. Theo một phương án, sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm có SEQ ID NO: 17 (chuỗi nặng biến đổi được tối ưu hóa codon) hoặc SEQ ID NO: 18 (chuỗi nhẹ biến đổi được tối ưu hóa codon). Theo các phương án nhất định, trình tự dẫn đầu có thể được sử dụng. Theo một phương án, sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic bao gồm, chủ yếu bao gồm hoặc gồm có SEQ ID NO: 19 (trình tự dẫn đầu và chuỗi nặng) hoặc SEQ ID NO: 20 (trình tự dẫn đầu và chuỗi nhẹ) được liên kết với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ để tạo ra SEQ ID NO: 21 hoặc SEQ ID NO: 22, một cách tương ứng.

Nói chung, polynucleotit lai trong điều kiện nghiêm ngặt thấp, trung bình hoặc cao, và mã hóa kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà duy trì khả năng để liên kết với protein F của hRSV. Phân tử polynucleotit thứ nhất "có thể lai" với phân tử polynucleotit thứ hai khi dạng chuỗi đơn của phân tử polynucleotit thứ nhất có thể gắn với phân tử polynucleotit thứ hai trong các điều kiện thích hợp về

hiệt độ và cường độ ion của dung dịch (xem Sambrook, *et al.*, nêu trên). Các điều kiện về nhiệt độ và cường độ ion xác định "tính nghiêm ngặt" của quy trình lai. Điều kiện lai có tính nghiêm ngặt thấp điển hình là 55°C, 5X SSC, 0,1% SDS và không có formamit; hoặc 30% formamit, 5X SSC, 0,5% SDS ở nhiệt độ 42°C. Điều kiện lai có tính nghiêm ngặt trung bình điển hình là 40% formamit, với 5X hoặc 6X SSC và 0,1% SDS ở nhiệt độ 42°C. Điều kiện lai có tính nghiêm ngặt cao là 50% formamit, 5X hoặc 6X SSC ở nhiệt độ 42°C hoặc, tùy ý, ở nhiệt độ cao hơn (ví dụ, 57°C, 59°C, 60°C, 62°C, 63°C, 65°C hoặc 68°C). Nói chung, SSC là 0,15M NaCl và 0,015M Na-xitrat. Quy trình lai yêu cầu rằng hai polynucleotit chứa các trình tự bổ thể, mặc dù, tùy thuộc vào tính nghiêm ngặt của quy trình lai, sự ghép cặp không khớp giữa các bazơ là có thể. Tính nghiêm ngặt thích hợp đối với polynucleotit lai tùy thuộc vào chiều dài của polynucleotit và mức độ bổ sung, các biến đổi đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mức độ tương tự hoặc tương đồng giữa hai trình tự nucleotit càng lớn, thì tính nghiêm ngặt mà ở điều kiện đó axit nucleic có thể lai càng cao. Đối với thể lai có chiều dài lớn hơn 100 nucleotit, rút ra được phương trình tính toán nhiệt độ nóng chảy (xem Sambrook *et al.*, ở trên, 9,50-9,51). Đối với việc lai với polynucleotit ngắn hơn, ví dụ, oligonucleotit, vị trí ghép cặp không khớp trở nên quan trọng hơn, và chiều dài của oligonucleotit xác định tính đặc hiệu của nó (xem Sambrook, *et al.*, ở trên, 11.7-11.8).

Theo một phương án, sáng chế bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể (V_H) hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm CDR-H1 (SEQ ID NO: 1), CDR-H2 (SEQ ID NO: 2) và CDR-H3 (SEQ ID NO: 3).

Theo một phương án, sáng chế bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (V_L) hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm CDR-L1 (SEQ ID NO: 4), CDR-L2 (SEQ ID NO: 5) và CDR-L3 (SEQ ID NO: 6).

Theo một phương án, sáng chế bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (V_H) của SEQ ID NO: 7 hoặc chuỗi nặng của SEQ ID NO: 23.

Theo một phương án, sáng chế bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa

miền biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (V_L) của SEQ ID NO: 8 hoặc chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 25.

Sáng chế cũng đề xuất vector, ví dụ, vector biểu hiện, như plasmit, chứa polynucleotit được phân lập theo sáng chế, trong đó polynucleotit được liên kết theo cách có điều khiển với các trình tự kiểm soát mà được nhận diện bằng tế bào chủ khi tế bào chủ được chuyển nhiễm bằng vector. Sáng chế cũng đề xuất các tế bào chủ chứa vector theo sáng chế và phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc polypeptit được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ mang vector biểu hiện hoặc axit nucleic mã hóa chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong môi trường nuôi cấy, và phân tách kháng nguyên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy.

Cũng được đề xuất trong sáng chế là các polypeptit, ví dụ, globulin miễn dịch polypeptit, bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là khoảng 75%, 80%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 90% và tốt hơn nhất là ít nhất khoảng 95% (ví dụ, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) so với trình tự axit amin của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này khi sự so sánh được thực hiện bằng thuật toán BLAST, trong đó các thông số của thuật toán được chọn để tạo ra sự bắt cặp lớn nhất giữa các trình tự tương ứng theo toàn bộ chiều dài của các trình tự tham chiếu tương ứng (ví dụ ngưỡng mong đợi: 10; kích cỡ từ: 3; sự bắt cặp tối đa trong phạm vi truy vấn: 0; ma trận BLOSUM 62; giá trị khoảng trống: có mặt 11, mở rộng 1; sự điều chỉnh điểm ma trận thành phần điều kiện).

Độ đồng nhất trình tự dùng để chỉ mức độ mà các axit amin của hai polypeptit là giống nhau tại các vị trí tương đương khi hai trình tự được sắp hàng tối ưu.

Việc tham chiếu dưới đây đề cập đến các thuật toán BLAST thường được sử dụng để phân tích trình tự: BLAST ALGORITHMS: Altschul et al. (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S.F., et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., et al., (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., et al., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., et al., (1997) Nucleic Acid Res. 25:3389-3402; Zhang, J., et al., (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., et al., (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. et al., (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70;

ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., et al., "A model of evolutionary change in proteins." trong Atlas of Protein Sequence và Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., et al., "Matrices for detecting distant relationships." trong Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3." M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., et al., (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., et al., (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., et al., (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; và Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." trong Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

Ái lực liên kết

Bằng cách ví dụ, và không hạn chế, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể liên kết protein F tiền dung hợp RSV ở người hoặc protein F sau dung hợp với giá trị K_D ít nhất là khoảng 1×10^{-9} M (nghĩa là, giá trị K_D bằng 1×10^{-9} M hoặc thấp hơn) như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo một phương án, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả có thể liên kết protein F tiền dung hợp RSV ở người hoặc protein F sau dung hợp với giá trị K_D ít nhất là từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo một phương án, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể liên kết protein F tiền dung hợp RSV ở người hoặc protein F sau dung hợp với giá trị K_D ở khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET). Theo một phương án, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể liên kết protein F tiền dung hợp RSV ở người hoặc

protein F sau dung hợp với giá trị K_D ít nhất khoảng 100 pM (nghĩa là, giá trị K_D là khoảng 100 pM hoặc thấp hơn) như được xác định bằng BIACORE hoặc kỹ thuật tương tự. Theo một phương án, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bọc lộ trong bản mô tả này có thể liên kết protein F tiền dung hợp RSV ở người hoặc protein F sau dung hợp với giá trị K_D ít nhất khoảng 10 pM (nghĩa là, giá trị K_D khoảng 10 pM hoặc thấp hơn) như được xác định bằng BIACORE hoặc kỹ thuật tương tự. Theo một phương án, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người hoặc protein F sau dung hợp với K_D khoảng 1 pM đến khoảng 100 pM như được xác định bằng BIACORE hoặc kỹ thuật tương tự.

Phương pháp tạo ra kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy dòng tế bào mà biểu hiện kháng thể hoặc mảnh trong điều kiện thuận lợi đối với sự biểu hiện này và, tùy ý, phân lập kháng thể hoặc mảnh từ các tế bào và/hoặc môi trường sinh trưởng (ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào).

Kháng thể kháng protein F của hRSV được bọc lộ trong bản mô tả này cũng có thể được tạo ra tái tổ hợp (ví dụ, trong hệ thống biểu hiện *E. coli*/T7, hệ thống biểu hiện tế bào động vật có vú hoặc hệ thống biểu hiện sinh vật có nhân điển hình bậc thấp). Theo phương án này, axit nucleic mã hóa phân tử globulin miễn dịch kháng thể theo sáng chế (ví dụ, V_H hoặc V_L) có thể được chèn vào plasmid dựa trên pET và được biểu hiện trong hệ thống *E. coli*/T7. Ví dụ, sáng chế bao gồm các phương pháp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc chuỗi globulin miễn dịch của nó trong tế bào chủ (ví dụ, tế bào chủ vi khuẩn như *E. coli* như BL21 hoặc BL21DE3) bao gồm bước biểu hiện T7 ARN polymeaza trong tế bào cũng bao gồm polynucleotit mã hóa chuỗi globulin miễn dịch mà được liên kết theo cách có điều khiển với gen khởi đầu T7. Ví dụ, theo phương án của sáng chế, tế bào chủ vi khuẩn, như *E. coli*, bao gồm polynucleotit mã hóa gen T7 ARN polymeaza được liên kết theo cách có điều khiển với gen khởi đầu *lac* và sự biểu hiện của polymeaza và chuỗi này được kích thích bằng việc ủ tế bào chủ với IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside).

Có nhiều phương pháp để tạo ra kháng thể tái tổ hợp được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Một ví dụ về phương pháp sản xuất tái tổ hợp kháng thể được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,816,567.

Sự biến nạp có thể bằng phương pháp bất kỳ đã biết để đưa polynucleotit vào tế bào chủ. Phương pháp đưa polynucleotit khác loại vào các tế bào động vật có vú đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm sự chuyển nhiễm qua trung gian dextran, sự kết tủa canxi phosphat, sự chuyển nhiễm qua trung gian polybren, sự dung hợp tế bào nguyên sinh, sự mở lỗ bằng điện, sự bao nang (các) polynucleotit trong liposom, tiêm bằng bắn gen và vi tiêm trực tiếp ADN vào nhân. Ngoài ra, phân tử axit nucleic có thể được đưa vào các tế bào động vật có vú bằng vector virus. Phương pháp biến nạp các tế bào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,399,216; 4,912,040; 4,740,461 và 4,959,455.

Do đó, sáng chế bao gồm phương pháp tái tổ hợp để tạo ra kháng thể kháng hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc chuỗi globulin miễn dịch của nó, bao gồm bước đưa polynucleotit mã hóa một hoặc nhiều chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể hoặc mảnh (ví dụ, chuỗi globulin miễn dịch nặng và/hoặc nhẹ); nuôi cấy tế bào chủ (ví dụ, CHO hoặc *Pichia* hoặc *Pichia pastoris*) trong điều kiện thuận lợi đối với sự biểu hiện như vậy và, tùy ý, phân lập kháng thể hoặc mảnh hoặc chuỗi từ tế bào chủ và/hoặc môi trường trong đó tế bào chủ được phát triển.

Kháng thể kháng protein F của hRSV cũng có thể được tổng hợp bằng phương pháp bất kỳ được nêu trong patent Mỹ số 6,331,415.

Các tế bào chủ sinh vật có nhân điển hình và sinh vật không có nhân điển hình, bao gồm các tế bào động vật có vú là vật chủ để biểu hiện kháng thể hoặc mảnh hoặc chuỗi globulin miễn dịch được bộc lộ trong bản mô tả đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm nhiều dòng tế bào bất động có sẵn từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC). Chúng bao gồm, không kể những cái khác, các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO), NSO, các tế bào SP2, các tế bào HeLa, các tế bào thận chuột đồng con (baby hamster kidney - BHK), các tế bào thận khỉ (COS), các tế bào caxinom tế bào gan ở người (ví dụ, Hep G2), các tế bào A549, các tế bào 3T3, các tế bào HEK-293 và một số dòng

tế bào khác. Các tế bào chủ động vật có vú bao gồm các tế bào người, chuột nhắt, chuột cống, chó, khỉ, lợn, dê, bò, ngựa và chuột đồng. Dòng tế bào tham chiếu cụ thể được chọn qua sự xác định các dòng tế bào có mức độ biểu hiện cao. Các dòng tế bào khác có thể được sử dụng là các dòng tế bào côn trùng, như các tế bào Sf9, các tế bào động vật lưỡng cư, các tế bào vi khuẩn, các tế bào thực vật và các tế bào nấm. Các tế bào nấm bao gồm nấm men và các tế bào nấm sợi bao gồm, ví dụ, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* và *Neurospora crassa*. *Pichia sp.*, *Saccharomyces sp.* bất kỳ, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.* bất kỳ, *Candida albicans*, *Aspergillus sp.* bất kỳ, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.* bất kỳ, *Yarrowia lipolytica*, và *Neurospora crassa*. Khi các vectơ biểu hiện tái tổ hợp mã hóa chuỗi nặng hoặc phần hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chuỗi nhẹ và/hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đưa vào các tế bào chủ động vật có vú, kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể hoặc mảnh hoặc chuỗi trong các tế bào chủ hoặc tiết vào môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào chủ được phát triển.

Kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó và chuỗi globulin miễn dịch có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp tinh chế protein chuẩn. Hơn nữa, sự biểu hiện của kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó và chuỗi globulin miễn dịch theo sáng chế (hoặc các gốc khác từ đó) từ sự sản xuất các dòng tế bào có thể được tăng cường bằng cách sử dụng một số kỹ thuật đã biết. Ví dụ, hệ thống biểu hiện gen glutamin synthetaza (hệ thống GS) là phương pháp tiếp cận phổ biến để tăng cường sự biểu hiện dưới các điều kiện nhất định. Hệ thống GS được thảo luận trong toàn bộ hoặc một phần liên quan đến patent châu Âu số 0 216 846, 0 256 055, và 0 323 997 và đơn sáng chế châu Âu số 89303964.4. Do đó, trong phương án theo sáng chế, các tế bào chủ động vật có vú (ví

dụ, CHO) thiếu gen glutamin synthetaza và được phát triển với sự có mặt của glutamin trong môi trường trong đó, tuy nhiên, polynucleotit mã hóa chuỗi globulin miễn dịch chứa gen glutamin synthetaza mà bổ sung sự thiếu của gen trong tế bào chủ.

Sáng chế đề xuất các phương pháp tinh chế kháng thể kháng hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm việc đưa mẫu chứa kháng thể hoặc mảnh vào môi trường tinh chế (ví dụ, môi trường trao đổi cation, môi trường trao đổi anion, môi trường trao đổi kỵ nước, môi trường tinh chế ái lực (ví dụ, protein A, protein G, protein A/G, protein L)) và thu thập kháng thể hoặc mảnh được tinh chế từ sự phân đoạn qua dòng chảy của mẫu mà không liên kết với môi trường; hoặc, loại bỏ sự phân đoạn qua dòng chảy và phân giải kháng thể hoặc mảnh được liên kết từ môi trường và thu thập nước giải hấp. Trong phương án theo sáng chế, mẫu được áp dụng cho môi trường trong cột. Trong phương án theo sáng chế, phương pháp tinh chế được thực hiện theo biểu hiện tái tổ hợp của kháng thể hoặc mảnh trong tế bào chủ, ví dụ, trong đó tế bào chủ được phân giải đầu tiên và, tùy ý, dịch tan được tinh chế của nguyên liệu không thể hòa tan trước khi tinh chế trên môi trường.

Nói chung, glycoprotein được tạo ra trong dòng tế bào cụ thể hoặc động vật chuyển gen sẽ có mô hình glycosyl hóa là đặc trưng đối với glycoprotein được tạo ra trong dòng tế bào hoặc động vật chuyển gen. Do đó, mô hình glycosyl hóa cụ thể của kháng thể sẽ tùy thuộc vào dòng tế bào cụ thể hoặc động vật chuyển gen được sử dụng để sản xuất kháng thể. Tuy nhiên, tất cả kháng thể được mã hóa bởi phân tử axit nucleic được đề cập đến trong bản mô tả này, hoặc bao gồm trình tự axit amin được đề cập đến trong bản mô tả này, bao gồm sáng chế, không phụ thuộc vào mô hình glycosyl hóa kháng thể có thể có. Tương tự, theo các phương án cụ thể, kháng thể với mô hình glycosyl hóa chỉ chứa N-glycan không được fucosyl hóa có thể là ưu điểm, bởi vì các kháng thể này được thể hiện thường để biểu hiện hiệu lực tiềm năng hơn các bản đối chiếu được fucosyl hóa của chúng cả *in vitro* và *in vivo* (xem ví dụ, Shinkawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278: 3466-3473 (2003); các patent Mỹ số 6,946,292 và 7,214,775). Các kháng thể này với N-glycan không fucosyl hóa không có khả năng gây miễn dịch bởi vì cấu trúc hydrat cacbon của chúng là thành phần thông thường của tập hợp mà tồn tại trong IgG huyết thanh người.

Sáng chế bao gồm kháng thể đặc hiệu kép và hai chức và mảnh liên kết kháng nguyên có tính đặc hiệu liên kết đối với protein F của hRSV và kháng nguyên khác như, ví dụ, protein G hRSV, và phương pháp sử dụng nó. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc hai chức là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết khác nhau. Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp bao gồm dung hợp khối lai hoặc liên kết các mảnh Fab'. Xem, ví dụ, Songsivilai, *et al.*, (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321, Kostelny, *et al.*, (1992) *J Immunol.* 148:1547- 1553. Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra là "kháng thể tổ hợp kép" (Holliger, *et al.*, (1993) *PNAS USA* 90:6444-6448) hoặc là "Janusins" (Traunecker, *et al.*, (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659 và Traunecker, *et al.*, (1992) *Int. J. Cancer Suppl.* 7:51-52).

Sáng chế còn bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên protein F kháng hRSV của kháng thể kháng hRSV được bộc lộ trong bản mô tả này. Các mảnh kháng thể bao gồm các mảnh F(ab)₂, có thể được tạo ra bằng cách phân cắt enzym của IgG, ví dụ, bằng pepsin. Các mảnh Fab có thể được tạo ra bằng, ví dụ, sự khử F(ab)₂ bằng dithiothreitol hoặc mercaptoethylamin.

Các globulin miễn dịch có thể được gán cho các lớp khác nhau tùy thuộc vào trình tự axit amin của miền hằng định của các chuỗi nặng của chúng. Có ít nhất năm lớp globulin miễn dịch chính: IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và nhiều lớp trong số chúng có thể còn được chia thành các lớp phụ (lớp kháng thể), ví dụ IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4; IgA1 và IgA2. Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của lớp bất kỳ trong số các lớp hoặc các lớp phụ của kháng thể.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng, ví dụ, vùng hằng định ở người, như vùng hằng định chuỗi nặng ở người $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, hoặc $\gamma 4$ hoặc biến thể của nó. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm vùng hằng định chuỗi nhẹ, ví dụ vùng hằng định chuỗi nhẹ ở người, như lamda hoặc kapa vùng chuỗi nhẹ ở người hoặc biến thể của nó. Bằng cách ví dụ, và không hạn chế vùng hằng định chuỗi nặng ở người có thể là $\gamma 4$ và vùng hằng định chuỗi nhẹ ở người có thể là kapa. Theo phương án thay thế, vùng Fc của kháng thể là $\gamma 4$ với đột biến Ser228Pro (Schuurman, J *et. al.*, 2001, *Mol. Immunol.* 38: 1-8).

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của typ phụ IgG1.

Theo một số phương án, các miền hằng định khác nhau có thể phụ thuộc vào các vùng V_L và V_H thu được từ CDR được đề cập đến trong bản mô tả. Ví dụ, nếu mục đích sử dụng cụ thể của kháng thể (hoặc mảnh) theo sáng chế để gọi cho chức năng tác động thay đổi, vùng hằng định chuỗi nặng khác IgG1 ở người có thể được sử dụng, hoặc thể lai IgG1/IgG4 có thể được sử dụng.

Mặc dù kháng thể IgG1 ở người tạo ra thời gian bán thải kéo dài và cho chức năng tác động, như sự hoạt hóa bổ sung và tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, các hoạt động này có thể không mong muốn đối với tất cả việc sử dụng của kháng thể. Trong các trường hợp này, vùng hằng định IgG4 ở người, ví dụ, có thể được sử dụng. Sáng chế bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền hằng định IgG4, ví dụ, chất đối kháng, kháng thể và mảnh được làm giống người kháng protein F của hRSV, và phương pháp sử dụng chúng. Theo một phương án, miền hằng định IgG4 có thể khác vùng hằng định IgG4 ở người tự nhiên (số nộp lưu Swiss-Prot P01861.1) ở vị trí tương ứng với vị trí 228 trong hệ thống EU và vị trí 241 trong hệ thống KABAT, ở đó Ser108 tự nhiên được thay thế bằng Pro, để ngăn ngừa liên kết disulfua liên chuỗi tiềm năng giữa Cys106 và Cys109 (tương ứng với các vị trí Cys 226 và Cys 229 trong hệ thống EU và các vị trí Cys 239 và Cys 242 trong hệ thống KABAT) mà có thể cản trở sự tạo thành liên kết disulfua liên chuỗi thích hợp. Xem Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105. Trong các trường hợp khác, có thể được sử dụng miền hằng định IgG1 cải biến được cải biến để làm tăng thời gian bán thải hoặc làm giảm chức năng tác động.

Thiết kế kháng thể

Kháng thể theo sáng chế có thể được đột biến khung để cải thiện các đặc tính của kháng thể. Một sự cải biến khung như vậy liên quan đến việc đột biến một hoặc nhiều gốc trong vùng khung, hoặc thậm chí trong một hoặc nhiều vùng CDR, để loại bỏ các epitop tế bào T theo đó làm giảm tính gây miễn dịch tiềm năng của kháng thể. Phương pháp tiếp cận này cũng được đề cập đến dưới dạng "sự khử tạo miễn dịch" ("deimmunization") và được mô tả chi tiết hơn trong patent Mỹ số 7,125,689.

Theo các phương án cụ thể, sẽ mong muốn để thay đổi axit amin nhất định chứa các chuỗi bên được lộ ra với gốc axit amin khác để tạo ra độ ổn định hóa học cao hơn của kháng thể cuối cùng, để tránh sự tách nhóm amit hoặc sự đồng phân hóa. Sự tách nhóm amit của asparagin có thể xảy ra trên các trình tự NG, DG, NG, NS, NA, NT, QG hoặc QS và kết quả là tạo thành gốc axit isoaspartic mà đưa nút thắt vào chuỗi polypeptit và làm giảm độ ổn định của nó (tác dụng của axit isoaspartic). Sự đồng phân hóa có thể xảy ra ở các trình tự DG, DS, DA hoặc DT. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế không bao gồm sự tách nhóm amit hoặc vị trí hiện tượng đồng phân asparagin.

Ví dụ, gốc asparagin (Asn) có thể được thay đổi thành Gln hoặc Ala để làm giảm tiềm năng để tạo thành isoaspartat ở trình tự Asn-Gly bất kỳ, cụ thể trong CDR. Vấn đề tương tự có thể xảy ra ở trình tự Asp-Gly. Reissner and Aswad (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1281. Sự tạo thành isoaspartat có thể suy giảm hoặc hủy bỏ hoàn toàn liên kết của kháng thể với kháng nguyên đích của chúng. Xem, Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734. Theo một phương án, asparagin được chuyển thành glutamin (Gln). Cũng có thể mong đợi để thay đổi axit amin liền kề với asparagin (Asn) hoặc gốc glutamin (Gln) để làm giảm khả năng xảy ra sự tách nhóm amit, mà xảy ra ở tỷ lệ cao hơn khi axit amin nhỏ xuất hiện liền kề với asparagin hoặc glutamin. Xem, Bischoff & Kolbe (1994) *J. Chromatog.* 662:261. Ngoài ra, các gốc methionin bất kỳ (thông thường Met được tiếp xúc dung môi) trong các CDR có thể được thay đổi thành Lys, Leu, Ala, hoặc Phe hoặc axit amin khác để làm giảm khả năng methionin lưu huỳnh sẽ oxy hóa, mà có thể làm giảm ái lực liên kết kháng nguyên và cũng góp phần vào tính không đồng nhất phân tử trong dạng bào chế kháng thể cuối cùng. *Id.* Ngoài ra, để ngăn ngừa hoặc giảm thiểu liên kết peptit Asn-Pro có tiềm năng dễ phân cắt, có thể mong đợi để thay đổi sự kết hợp Asn-Pro bất kỳ được tìm thấy trong CDR thành Gln-Pro, Ala-Pro, hoặc Asn-Ala. Kháng thể với các thay thế như vậy được sàng lọc sau đó để đảm bảo rằng các đột biến thay thế không làm giảm ái lực hoặc tính đặc hiệu của kháng thể đối với protein F của hRSV, hoặc hoạt tính sinh học mong muốn khác đến mức không thể chấp nhận.

Bảng 2. Các biến thể CDR ổn định được nêu làm ví dụ

Gốc CDR	Trình tự biến thể ổn định
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly, hoặc Asn-Ala (Q-G), (A-G), hoặc (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly hoặc Asp-Ala (E-G), (A-G), hoặc (D-A)
Met (thường được tiếp xúc dung môi) (M)	Lys, Leu, Ala, hoặc Phe (K), (L), (A), hoặc (F)
Asn (N)	Gln hoặc Ala (Q) hoặc (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro, hoặc Asn-Ala (Q-P), (A-P), hoặc (N-A)

Thiết kế kháng thể của vùng Fc

Kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) cũng có thể được thiết kế để bao gồm các cải biến trong vùng Fc, thường để thay thế một hoặc nhiều đặc tính của kháng thể, như thời gian bán thải trong huyết thanh, sự cố định bổ thể, liên kết thụ thể Fc, và/hoặc chức năng tác động (ví dụ, tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên). Hơn thế nữa, kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) có thể được cải biến về mặt hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn với kháng thể) hoặc được cải biến để thay đổi sự glycosyl hóa của nó, một lần nữa để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính của kháng thể hoặc mảnh. Mỗi trong số các phương án này được mô tả trong chi tiết hơn dưới đây. Việc đánh số các gốc từ trong vùng Fc là việc đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

Kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) cũng bao gồm kháng thể và mảnh với các vùng Fc được cải biến (hoặc được phong bế) để tạo ra chức năng tác động được thay đổi. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,624,821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Các cải biến như vậy có thể được sử dụng để tăng cường hoặc ức chế các phản ứng khác nhau của hệ miễn dịch, với các tác động có lợi có thể trong chẩn đoán và liệu pháp. Các thay đổi của vùng Fc bao gồm các thay đổi axit amin (đột biến thay thế, đột biến khuyết và đột biến xen), sự glycosyl hóa hoặc khử glycosyl hóa, và bổ sung nhiều vùng Fc. Các thay đổi đối với Fc cũng có thể thay đổi thời gian bán thải của kháng thể trong kháng thể điều trị, có thể dùng liều ít thường xuyên và do đó làm tăng

sự thuận tiện và làm giảm việc sử dụng nguyên liệu. Xem Presta, 2005, *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734-35.

Theo một phương án của sáng chế, vùng bản lề của CH1 được cải biến sao cho số gốc xystein trong vùng bản lề được làm tăng hoặc làm giảm. Phương pháp tiếp cận này còn được mô tả trong patent Mỹ số 5,677,425. Số gốc xystein trong vùng bản lề của CH1 được thay đổi, ví dụ, để hỗ trợ sự lắp ráp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc để làm tăng hoặc làm giảm độ ổn định của kháng thể.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế (ví dụ, RB1) được cải biến để làm tăng thời gian bán thải sinh học của nó. Các phương pháp tiếp cận khác nhau là có thể. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến dưới đây có thể được đưa vào: T252L, T254S, T256F, như được mô tả trong patent Mỹ số 6,277,375. Theo cách khác, để làm tăng thời gian bán thải sinh học, kháng thể có thể được thay đổi trong vùng CH1 hoặc CL để chứa epitop liên kết thụ thể tận dụng từ hai vòng của miền CH2 của vùng Fc của IgG, như được mô tả trong patent Mỹ số 5,869,046 và 6,121,022. Theo một phương án, đột biến M252Y/S254T/T256E (YTE) được đưa vào. Xem, ví dụ, Oganessian *et al.*, *Mol. Immunol.* 2009, 46:1750.

Theo các phương án khác, vùng Fc được thay đổi bằng cách thay thế ít nhất một nhóm axit amin bằng gốc axit amin khác nhau để thay đổi (các) chức năng tác động của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 và 322 có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác nhau sao cho kháng thể có ái lực thay đổi đối với phối tử tác động và giữ lại khả năng liên kết kháng nguyên của kháng thể gốc. Phối tử tác động mà ái lực được thay đổi có thể, ví dụ, là thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của bổ thể. Phương pháp tiếp cận này được mô tả chi tiết hơn trong các patent Mỹ số 5,624,821 và 5,648,260.

Theo một ví dụ khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 329, 331 và 322 có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác nhau sao cho kháng thể có liên kết C1q biến đổi và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC) được làm giảm hoặc hủy bỏ. Phương pháp tiếp cận này được mô tả chi tiết hơn trong patent Mỹ số 6,194,551.

Theo ví dụ khác, một hoặc nhiều gốc axit amin trong các vị trí axit amin 231 và 239 được thay đổi để theo đó thay đổi khả năng của kháng thể để cố định bổ thể. Phương pháp tiếp cận này còn được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 94/29351.

Theo một ví dụ khác nữa, vùng Fc được cải biến để làm giảm khả năng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế (ví dụ, RB1) để điều tiết tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC) và/hoặc làm giảm ái lực của kháng thể hoặc mảnh đối với thụ thể Fc γ bằng cách cải biến một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí dưới đây: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439. Phương pháp tiếp cận này còn được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 00/42072. Hơn nữa, các vị trí liên kết trên IgG1 ở người đối với Fc γ R1, Fc γ R2, Fc γ R3 và FcRn được lập bản đồ và các biến thể có liên kết được cải thiện được mô tả (xem Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604).

Theo một phương án của sáng chế, vùng Fc được cải biến để làm giảm khả năng của kháng thể theo sáng chế (ví dụ, RB1) để điều tiết chức năng tác động và/hoặc làm tăng các đặc tính chống viêm bằng cách cải biến các gốc 243 và 264. Theo một phương án, vùng Fc của kháng thể hoặc mảnh được cải biến bằng cách thay đổi các gốc ở các vị trí 243 và 264 thành alanin. Theo một phương án, vùng Fc được cải biến để làm giảm khả năng của kháng thể hoặc mảnh để điều tiết chức năng tác động và/hoặc để làm tăng đặc tính chống viêm bằng cách cải biến các gốc 243, 264, 267 và 328.

Tăng cường chức năng tác động

Theo một số phương án, vùng Fc của kháng thể kháng hRSV được cải biến để làm tăng khả năng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên để điều tiết chức năng tác động và/hoặc làm tăng liên kết của chúng với các thụ thể Fc γ (Fc γ Rs).

Thuật ngữ "chức năng tác động" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng

để chỉ một hoặc nhiều đáp ứng được điều tiết hoạt tính gây độc tế bào trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC), hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC), sự thực bào qua trung gian Fc hoặc sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular phagocytosis - ADCP) và kháng thể tuần hoàn thông qua thụ thể FcRn.

Tương tác giữa vùng hằng định của protein liên kết kháng nguyên và các thụ thể Fc khác nhau (FcR) bao gồm FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) và FcγRIII (CD16) được tin là để điều tiết chức năng tác động, như ADCC và CDC, của protein liên kết kháng nguyên. Thụ thể Fc cũng quan trọng để liên kết chéo kháng thể, có thể là quan trọng đối với miễn dịch chống khối u.

Chức năng tác động có thể được xác định theo một số cách bao gồm ví dụ thông qua liên kết của FcγRIII với các tế bào giết tự nhiên hoặc thông qua FcγRI với bạch cầu đơn nhân/đại thực bào để xác định chức năng tác động ADCC. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được đánh giá đối với chức năng tác động ADCC trong thử nghiệm tế bào giết tự nhiên. Ví dụ về các thử nghiệm như vậy có thể được tìm thấy trong tài liệu Shields *et al.*, 2001 *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, p 6591-6604; Chappel *et al.*, 1993 *J. Biol. Chem.* 268: 25124-25131; Lazar *et al.*, 2006, *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4005-4010.

Các đặc tính ADCC hoặc CDC của kháng thể theo sáng chế, hoặc đặc tính liên kết chéo của chúng, có thể được tăng cường theo một số cách.

Vùng hằng định IgG1 ở người chứa các đột biến cụ thể hoặc sự glycosyl hóa được thay đổi trên gốc Asn297 được thể hiện để tăng cường liên kết với các thụ thể Fc. Trong một số trường hợp, các đột biến này cũng được thể hiện để tăng cường ADCC và CDC (Lazar *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:4005-4010; Shields *et al.*, *J Biol Chem* 2001, 276:6591-6604; Nechansky *et al.*, *Mol Immunol* 2007, 44:1815-1817).

Theo một phương án của sáng chế, các đột biến như vậy trong một hoặc nhiều vị trí được chọn từ 239, 332 và 330 (IgG1), hoặc các vị trí tương đương trong các lớp kháng thể IgG khác. Ví dụ về các đột biến thích hợp là S239D và I332E và A330L.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế ở đây được mô tả được đột biến ở các vị trí 239 và 332, ví dụ S239D và I332E hoặc theo phương án khác nó được đột biến ở ba hoặc nhiều vị trí được chọn từ 239 và 332 và 330, ví dụ S239D và I332E và A330L. (đánh số theo chỉ số EU).

Theo phương án thay thế của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng với profin glycosyl hóa được thay đổi sao cho protein liên kết kháng nguyên có chức năng tác động được tăng cường. Ví dụ, trong đó kháng thể này có ADCC được tăng cường hoặc CDC được tăng cường hoặc trong đó nó có cả chức năng tác động ADCC và CDC được tăng cường. Ví dụ về các hệ phương pháp thích hợp để sản xuất protein liên kết kháng nguyên với profin glycosyl hóa được thay đổi được mô tả trong các Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2003011878 và WO2006014679 và đơn sáng chế châu Âu số EP1229125.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể “không được fucosyl hóa” hoặc “được bỏ qua quá trình fucosyl hóa”. Kháng thể không được fucosyl hóa mang cấu trúc lõi tri-manosyl của N-glycan loại phức hợp của Fc mà không có nhóm fucoza. Các kháng thể được thiết kế glyco này thiếu nhóm fucoza lõi từ Fc N-glycan có thể có ADCC mạnh hơn các tương đương được bỏ qua quá trình fucosyl hóa do sự tăng cường khả năng liên kết FcγRIIIa.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế bao gồm các bước: a) nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp không chứa alpha-1,6-fucosyltransferaza; và b) thu hồi protein liên kết kháng nguyên. Tế bào chủ tái tổ hợp bình thường có thể không chứa gen mã hóa alpha-1,6-fucosyltransferaza (ví dụ, các tế bào chủ nấm men như *Pichia sp.*) hoặc có thể được cải biến di truyền để bất hoạt alpha-1,6-fucosyltransferaza. Các tế bào chủ tái tổ hợp được cải biến di truyền để bất hoạt gen FUT8 mã hóa alpha-1,6-fucosyltransferaza có sẵn. Xem, ví dụ, hệ thống công nghệ POTELLIGENT™ có sẵn từ BioWa, Inc. (Princeton, N.J.) trong đó các tế bào CHOK1SV thiếu bản sao chức năng của gen FUT8 tạo ra kháng thể đơn dòng có hoạt tính gây độc trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể được tăng cường (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC) được tăng lên so với kháng thể đơn dòng đồng nhất được tạo ra trong tế bào với gen FUT8

chức năng. Các khía cạnh của hệ thống công nghệ POTEILLIGENT™ được mô tả trong các patent Mỹ số 7,214,775; 6,946,292; và các Đơn sáng chế quốc tế số WO0061739 và WO0231240. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan cũng sẽ nhận ra các hệ thống thích hợp khác.

Sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan rằng các cải biến như vậy không chỉ được sử dụng một mình mà còn có thể được sử dụng kết hợp với các cải biến khác để tăng cường thêm chức năng tác động.

Sản xuất các kháng thể có sự glycosyl hóa được cải biến

Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế (ví dụ, RB1) bao gồm mô hình glycosyl hóa cụ thể. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh được bỏ qua quá trình fucosyl hóa hoặc được bỏ qua quá trình glycosyl hóa có thể được tạo ra (nghĩa là, kháng thể thiếu fucoza hoặc sự glycosyl hóa, một cách tương ứng). Mô hình glycosyl hóa của kháng thể hoặc mảnh có thể được thay đổi để, ví dụ, làm tăng tính ái lực hoặc ái tính của kháng thể hoặc mảnh đối với kháng nguyên protein F của hRSV. Các cải biến như vậy có thể được hoàn thành bằng cách, ví dụ, thay đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong trình tự kháng thể hoặc mảnh. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến thay thế axit amin có thể được tạo ra mà dẫn đến sự loại bỏ một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa khung vùng biến đổi để theo đó hạn chế sự glycosyl hóa ở vị trí này. Sự glycosyl hóa như vậy có thể làm tăng ái lực hoặc ái tính của kháng thể hoặc mảnh đối với kháng nguyên. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,714,350 và 6,350,861.

Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) có thể còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được tạo ra trong các tế bào chủ sinh vật có nhân điển hình bậc thấp, cụ thể các tế bào chủ nấm như nấm men và nấm sợi được thiết kế di truyền để sản xuất glycoprotein mà có mô hình glycosyl hóa của động vật có vú hoặc giống người (xem ví dụ, Choi *et al.*, (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5022-5027; Hamilton *et al.*, (2003) *Science* 301: 1244-1246; Hamilton *et al.*, (2006) *Science* 313: 1441-1443; Nett *et al.*, (2011) *Yeast* 28(3):237-52; Hamilton *et al.*, (2007) *Curr Opin Biotechnol.* Oct;18(5):387-92). Các tế bào chủ được cải biến di truyền này có khả năng để kiểm soát profin glycosyl hóa của glycoprotein được tạo ra trong các tế bào sao cho chế phẩm chứa glycoprotein có

thể được sản xuất trong đó cấu trúc N-glycan cụ thể chiếm ưu thế (xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,029,872 và patent Mỹ số 7,449,308). Các tế bào chủ được cải biến di truyền này được sử dụng để sản xuất kháng thể mà có cấu trúc N-glycan cụ thể chiếm ưu thế (Xem ví dụ, Li *et al.*, (2006) *Nat. Biotechnol.* 24: 210-215).

Theo các phương án cụ thể, kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) còn bao gồm kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được sản xuất trong các tế bào chủ sinh vật có nhân điển hình bậc thấp và bao gồm thể lai được fucosyl hóa và không được fucosyl hóa và phức hợp N-glycan, bao gồm các loài được chia đôi và nhiều anten, bao gồm nhưng không giới hạn ở N-glycan như GlcNAc(1-4)Man3GlcNAc2; Gal(1-4)GlcNAc(1-4)Man3GlcNAc2; NANA(1-4)Gal(1-4)GlcNAc(1-4)Man3GlcNAc2.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề cập đến trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) có thể bao gồm kháng thể hoặc mảnh có ít nhất một thể lai N-glycan được chọn từ nhóm bao gồm GlcNAcMan5GlcNAc2; GalGlcNAcMan5GlcNAc2; và NANAGalGlcNAcMan5GlcNAc2. Theo các khía cạnh cụ thể, thể lai N-glycan là các loại N-glycan chiếm ưu thế trong chế phẩm.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề cập đến trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) chứa kháng thể và mảnh có ít nhất một phức hợp N-glycan được chọn từ nhóm bao gồm:

GlcNAcMan3GlcNAc2; GalGlcNAcMan3GlcNAc2;
NANAGalGlcNAcMan3GlcNAc2; GlcNAc2Man3GlcNAc2;
GalGlcNAc2Man3GlcNAc2; Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2;
NANAGal2GlcNAc2Man3GlcNAc2; và NANA2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2.

Theo các khía cạnh cụ thể, phức hợp N-glycan là các loại N-glycan chiếm ưu thế trong chế phẩm. Theo các khía cạnh khác, phức hợp N-glycan là các loại N-glycan cụ thể mà chứa khoảng 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% của phức hợp N-glycan trong chế phẩm. Theo một phương án, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề cập đến trong bản mô tả này chứa phức hợp N-glycan, trong đó ít nhất 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% phức hợp N-glycan chứa cấu trúc

$\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, trong đó cấu trúc như vậy được bỏ qua quá trình fucosyl hóa. Cấu trúc như vậy có thể được tạo ra, ví dụ, trong các tế bào chủ *Pichia pastoris* được thiết kế.

Theo các phương án cụ thể, N-glycan được bỏ qua quá trình fucosyl hóa. Nói chung, fucoza trong $\alpha 1,3$ -liên kết với GlcNAc ở đầu khử của N-glycan, $\alpha 1,6$ -liên kết với GlcNAc ở đầu khử của N-glycan, $\alpha 1,2$ -liên kết với Gal ở đầu không khử của N-glycan, $\alpha 1,3$ -liên kết với GlcNAc ở đầu không khử của N-glycan, hoặc $\alpha 1,4$ -liên kết với GlcNAc ở đầu không khử của N-glycan.

Do đó, theo các khía cạnh cụ thể của chế phẩm glycoprotein ở trên, dạng glycogen trong $\alpha 1,3$ -liên kết hoặc $\alpha 1,6$ -liên kết fucoza để tạo ra dạng glycogen được chọn từ nhóm bao gồm $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$, và $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$; trong $\alpha 1,3$ -liên kết hoặc $\alpha 1,4$ -liên kết fucoza để tạo ra dạng glycogen được chọn từ nhóm bao gồm $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}1-2)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{GalGlcNAc}_2(\text{Fuc}1-2)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}1-2)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}1-2)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, và $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}1-2)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; hoặc trong $\alpha 1,2$ -liên kết fucoza để tạo ra dạng glycogen được chọn từ nhóm bao gồm $\text{Gal}(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2(\text{Fuc}1-2)\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{NANAGal}_2(\text{Fuc}1-2)\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, và $\text{NANA}_2\text{Gal}_2(\text{Fuc}1-2)\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

Theo các khía cạnh khác, kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm manozơ N-glycan cao, gồm, nhưng không giới hạn ở, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$, hoặc N-glycan mà bao gồm cấu trúc $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ N-glycan.

Theo các khía cạnh khác ở trên, phức hợp N-glycan còn bao gồm các loại được chia đôi và nhiều anten được fucosyl hóa và không được fucosyl hóa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "N-glycan" và "dạng

glycogen" được sử dụng thay thế cho nhau và dùng để chỉ oligosacarit được liên kết N, ví dụ, một oligosacarit được gắn bởi asparagin-N-axetylglucosamin liên kết với nhóm asparagin của polypeptit. Glycoprotein được liên kết N chứa nhóm N-axetylglucosamin được liên kết với amit nitơ của nhóm asparagin trong protein. Đường chiếm ưu thế được tìm thấy trong glycoprotein là glucoza, galactoza, manozơ, fucoza, N-axetylgalactosamin (GalNAc), N-axetylglucosamin (GlcNAc) và axit sialic (ví dụ, axit N-axetyl-neuraminic (NANA)). Việc xử lý nhóm đường xảy ra cùng dịch mã trong khoang ER và tiếp tục sau dịch mã trong bộ máy Golgi đối với glycoprotein được liên kết N.

N-glycan có lõi pentasacarit thông thường của $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man" dùng để chỉ manozơ; "Glc" dùng để chỉ glucoza; và "NAc" dùng để chỉ N-axetyl; GlcNAc dùng để chỉ N-axetylglucosamin). Thông thường, cấu trúc N-glycan được thể hiện bằng dấu không khử ở bên trái và dấu khử ở bên phải. Dấu khử của N-glycan là dấu gắn với gốc Asn bao gồm vị trí glycosyl hóa trên protein. N-glycan khác nhau liên quan đến số lượng các nhánh (anten) chứa đường ngoại vi (ví dụ, GlcNAc, galactoza, fucoza và axit sialic) mà được bổ sung vào cấu trúc lõi $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ("Man3") cũng được đề cập đến dưới dạng "lõi trimanoza", "lõi pentasacarit" hoặc "lõi paucimanoza". N-glycan được phân loại theo thành phần phân nhánh của chúng (ví dụ, manozơ, phức hợp hoặc thể lai cao). N-glycan loại "manozơ cao" có năm hoặc nhiều nhóm manozơ. N-glycan loại "phức hợp" thông thường có ít nhất một GlcNAc gắn với nhánh 1,3 manozơ và ít nhất một GlcNAc được gắn với nhánh 1,6 manozơ của lõi "trimanoza". Phức hợp N-glycan cũng có thể có các gốc galactoza ("Gal") hoặc N-axetylgalactosamin ("GalNAc") tùy ý được cải biến bằng axit sialic hoặc dẫn xuất (ví dụ, "NANA" hoặc "NeuAc", tại đó "Neu" dùng để chỉ axit neuraminic và "Ac" dùng để chỉ axetyl). Phức hợp N-glycan cũng có thể có các đột biến thay thế trong chuỗi chứa GlcNAc "chia đôi" và lõi fucoza ("Fuc"). Phức hợp N-glycan cũng có thể có nhiều anten trên "lõi trimanoza" thường được đề cập đến dưới dạng "glycan nhiều anten". N-glycan "thể lai" có ít nhất một GlcNAc trên đầu tận cùng của nhánh 1,3 manozơ của lõi trimanoza và không hoặc nhiều manozơ trên nhánh 1,6 manozơ của lõi trimanoza. N-glycan khác nhau cũng được đề cập đến dưới dạng "dạng glycogen".

Đối với phức hợp N-glycan, các thuật ngữ "G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2",

"A1", và "A2" có nghĩa sau đây. "G-2" dùng để chỉ cấu trúc N-glycan mà có thể được đặc trưng là $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; thuật ngữ "G-1" dùng để chỉ cấu trúc N-glycan mà có thể được đặc trưng là $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$; thuật ngữ "G0" dùng để chỉ cấu trúc N-glycan mà có thể được đặc trưng là $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; thuật ngữ "G1" dùng để chỉ cấu trúc N-glycan mà có thể được đặc trưng là $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; thuật ngữ "G2" dùng để chỉ cấu trúc N-glycan mà có thể được đặc trưng là $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; thuật ngữ "A1" dùng để chỉ cấu trúc N-glycan mà có thể được đặc trưng là $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; và, thuật ngữ "A2" dùng để chỉ cấu trúc N-glycan mà có thể được đặc trưng là $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Trừ khi được chỉ ra theo cách khác, các thuật ngữ G-2", "G-1", "G0", "G1", "G2", "A1", và "A2" dùng để chỉ các loại N-glycan mà thiếu fucoza gắn với nhóm GlcNAc ở đầu khỉ của N-glycan. Khi thuật ngữ này bao gồm "F", "F" chỉ ra rằng các loại N-glycan chứa nhóm fucoza trên nhóm GlcNAc ở đầu khỉ của N-glycan. Ví dụ, tất cả G0F, G1F, G2F, A1F, và A2F chỉ ra rằng N-glycan còn bao gồm nhóm fucoza gắn với nhóm GlcNAc ở đầu khỉ của N-glycan. Sinh vật có nhân điển hình bậc thấp như nấm men và nấm sợi thông thường không tạo ra N-glycan mà tạo ra fucoza.

Đối với N-glycan nhiều anten, thuật ngữ "N-glycan nhiều anten" dùng để chỉ N-glycan còn chứa gốc GlcNAc trên gốc manosa bao gồm đầu không khỉ của nhánh 1,6 hoặc nhánh 1,3 của N-glycan hoặc nhóm GlcNAc trên mỗi trong số các gốc manosa chứa đầu không khỉ của nhánh 1,6 và nhánh 1,3 của N-glycan. Do đó, N-glycan nhiều anten có thể được đặc trưng bởi các công thức $\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, hoặc $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Thuật ngữ "1-4" dùng để chỉ các gốc 1, 2, 3, hoặc 4.

Đối với N-glycan được chia đôi, thuật ngữ "N-glycan được chia đôi" dùng để chỉ N-glycan, trong đó gốc GlcNAc được liên kết với gốc manosa ở đầu khỉ của N-glycan. N-glycan được chia đôi có thể được đặc trưng bởi công thức $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ trong đó mỗi nhóm manosa được liên kết ở đầu không khỉ của nó với gốc GlcNAc. Ngược lại, khi N-glycan nhiều anten được đặc trưng là $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, công thức chỉ ra rằng hai gốc GlcNAc được liên kết với gốc manosa ở đầu không khỉ của một trong hai nhánh của N-glycan và một gốc GlcNAc

được liên kết với gốc mannoza ở đầu không khử của nhánh khác của N-glycan.

Đặc tính vật lý của kháng thể

Kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bọc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) còn có thể bao gồm một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong vùng biến đổi globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng. Các vị trí glycosyl hóa nhất định có thể dẫn đến tính gây miễn dịch giảm của kháng thể hoặc mảnh hoặc sự thay đổi pK của kháng thể do liên kết kháng nguyên thay đổi (Marshall *et al.*, 1972, *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala và Morrison, 2004, *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al.*, 1988, *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro, 2002, *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.*, 1985, *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.*, 2000, *Mol Immunol* 37:697-706). Sự glycosyl hóa được biết xảy ra ở môtip chứa trình tự N-X-S/T.

Mỗi kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên (ví dụ, RB1) sẽ có điểm đẳng điện (pI) duy nhất, thường nằm trong khoảng pH từ 6 đến 9,5. pI đối với kháng thể IgG1 thường nằm trong khoảng pH từ 7 đến 9,5 và pI đối với kháng thể IgG4 thường nằm trong khoảng pH từ 6 đến 8.

Mỗi kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên (ví dụ, RB1) sẽ có nhiệt độ nóng chảy đặc trưng, với nhiệt độ nóng chảy cao hơn chỉ ra độ ổn định *in vivo* tổng thể cao hơn (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Nói chung, TM1 (nhiệt độ không gấp nếp ban đầu) có thể cao hơn 60°C, cao hơn 65°C, hoặc cao hơn 70°C. Điểm nóng chảy của kháng thể hoặc mảnh có thể được xác định bằng cách sử dụng phân tích nhiệt quét vi sai (Chen *et al.*, (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al.*, (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) hoặc quang phổ lưỡng sắc tròn (Murray *et al.*, (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

Theo phương án khác, kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó (ví dụ, RB1) được chọn là không phân hủy nhanh. Sự phân hủy của kháng thể hoặc mảnh có thể được xác định bằng cách sử dụng điện di mao quản (CE) và MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

Theo phương án khác, kháng thể (ví dụ, RB1) và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn có tác dụng kết tụ tối thiểu, có thể dẫn đến sự kích hoạt đáp ứng miễn dịch không mong muốn và/hoặc được thay đổi hoặc đặc tính dược động

học không mong muốn. Thông thường, kháng thể và mảnh có thể chấp nhận được bằng cách tập hợp 25% hoặc ít hơn, 20% hoặc ít hơn, 15% hoặc ít hơn, 10% hoặc ít hơn, hoặc 5% hoặc ít hơn. Việc kết tụ có thể được xác định bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm kỹ thuật sắc ký cột loại trừ kích thước (size-exclusion column - SEC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC), và sự tán xạ ánh sáng.

Thế liên hợp kháng thể

Kháng thể kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bọc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) cũng có thể được liên hợp với gốc hóa học. Gốc hóa học có thể là, không kể đến những gốc khác, polyme, nuclit phóng xạ hoặc yếu tố gây độc tế bào. Theo các phương án cụ thể, gốc hóa học là polyme làm tăng thời gian bán thải của kháng thể hoặc mảnh trong cơ thể đối tượng. Các polyme thích hợp gồm, nhưng không giới hạn ở, polyme ưa nước bao gồm nhưng không giới hạn ở polyetylen glycol (PEG) (ví dụ, PEG có khối lượng phân tử bằng 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 20 kDa, 30 kDa hoặc 40 kDa), dextran và monometoxypolyetylen glycol (mPEG). Lee, *et al.*, (1999) (*Bioconj. Chem.* 10:973-981) bọc lộ kháng thể chuỗi đơn được liên hợp PEG. Wen, *et al.*, (2001) (*Bioconj. Chem.* 12:545-553) bọc lộ kháng thể liên hợp với PEG được gắn với chất tạo chelat luyện kim phóng xạ (axit diethylentriaminpentaaxetic (DTPA)).

Kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bọc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) cũng có thể được liên hợp với các nhãn như ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{111}In , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{226}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th và ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tr và ^{56}Fe .

Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bọc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) cũng có thể được PEGyl hóa, ví dụ để làm tăng thời gian bán thải sinh học (ví dụ, trong huyết thanh) của nó. Đối với kháng thể hoặc mảnh PEGyl hóa, kháng thể hoặc mảnh, thường được phản ứng với dạng phản ứng của polyetylen glycol (PEG), như este phản ứng hoặc dẫn xuất aldehyt của PEG, trong điều kiện trong đó một hoặc nhiều nhóm PEG trở nên gắn với kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Theo các phương án cụ thể, phản ứng PEGyl hóa được thực hiện thông qua phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với phân tử PEG phản ứng (hoặc polyme tan trong nước phản

ứng tương tự). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polyetylen glycol" được dự định để bao gồm dạng bất kỳ của PEG được sử dụng để tạo dẫn xuất các protein khác, như mono (C₁-C₁₀) alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol-maleimit. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh được PEGyl hóa là kháng thể hoặc mảnh được bỏ qua quá trình glycosyl hóa. Các phương pháp để PEGyl hóa protein được biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được áp dụng đối với kháng thể theo sáng chế. Xem, ví dụ, các đơn sáng chế châu Âu số EP 0 154 316 và EP 0 401 384.

Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) cũng có thể được liên hợp với nhãn huỳnh quang hoặc nhãn phát quang hóa học, bao gồm các gốc từ huỳnh quang như chelat đất hiếm, florescein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, isothioxyanat, phycoerythrin, phycoxyanin, alophycoxyanin, o-phthaladehyt, florescamin, ¹⁵²Eu, dansyl, umbeliferon, luciferin, nhãn luminal, nhãn isoluminal, nhãn este acridini thơm, nhãn imidazol, nhãn muối acridimi, nhãn este oxalat, nhãn aequorin, 2,3-dihydrophtalazindion, biotin/avidin, nhãn quay và các gốc tự do ổn định.

Kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế (ví dụ, RB1) cũng có thể được liên hợp với yếu tố gây độc tế bào như chất độc diptheria, chuỗi *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, chuỗi ricin A, chuỗi abrin A, chuỗi modeccin A, alpha-sarcin, protein và hợp chất và protein *Aleurites fordii* (ví dụ, axit béo), protein dianthin, protein *Phytoiaccia americana* PAPI, PAPII, và PAP-S, chất ức chế *momordica charantia*, curcin, crotin, chất ức chế *saponaria officinalis*, mitogellin, restrictocin, phenomyxin, và enomyxin.

Phương pháp đã biết bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật để liên hợp kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế (ví dụ, RB1) với các gốc khác nhau có thể được sử dụng, bao gồm các phương pháp được mô tả bởi Hunter *et al.*, 1962, *Nature* 144:945; David *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:1014; Pain *et al.*, 1981, *J. Immunol. Meth.* 40:219; và Nygren, 1982, *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Các phương pháp liên hợp kháng thể và mảnh là thông thường và đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ứng dụng phòng ngừa và điều trị bệnh của kháng thể kháng hRSV

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp ngăn ngừa, điều trị hoặc cải thiện triệu chứng nhiễm RSV ở các đối tượng, bao gồm đối tượng là người, cần ngăn ngừa, điều trị, hoặc cải thiện bằng kháng thể đã phân lập hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1). Theo một phương án của sáng chế, đối tượng bị nhiễm RSV. Theo một phương án của sáng chế, đối tượng như vậy có nguy cơ nhiễm RSV.

Theo phương án cụ thể, động vật có vú, tốt hơn là người, được dùng chế phẩm phòng, điều trị hoặc được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng để điều trị, ngăn ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến nhiễm RSV ở lượng hữu hiệu để làm giảm độ chuẩn RSV. Theo phương án này, lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh kháng thể làm giảm độ chuẩn RSV trong phổi được xác định, ví dụ, bằng nồng độ của RSV trong các mẫu đờm hoặc rửa từ phổi từ động vật có vú. Theo phương án khác, động vật có vú, tốt hơn là con người, được dùng chế phẩm phòng, điều trị hoặc được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng để điều trị, ngăn ngừa hoặc cải thiện các triệu chứng liên quan đến nhiễm RSV ở lượng hữu hiệu để trung hòa RSV và/hoặc phong bế nhiễm RSV ở động vật có vú.

Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cũng có thể được sử dụng theo cách trị liệu miễn dịch đối với bệnh RSV ở cả người và động vật khác. Thuật ngữ, “trị liệu miễn dịch” hoặc “liệu pháp miễn dịch” như được sử dụng trong bản mô tả này liên hợp với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế dùng để chỉ cả việc dùng để phòng bệnh cũng như điều trị và cả sự tạo miễn dịch thụ động bằng các sản phẩm polypeptit được tinh chế đáng kể, cũng như liệu pháp gen bằng cách chuyển trình tự polynucleotit mã hóa sản phẩm hoặc một phần của nó. Sự tạo miễn dịch thụ động bao gồm việc chuyển miễn dịch thể dịch chủ động hoặc cung cấp kháng thể cho đối tượng cần điều trị. Do đó, theo các phương án nhất định của sáng chế, sáng chế đề xuất các phương pháp chuyển miễn dịch thể dịch chủ động và phương pháp cung cấp kháng thể RSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, như kháng thể IgG, cho bệnh nhân có nguy cơ nhiễm RSV. Do đó, kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được dùng đối tượng có nguy cơ cao để làm giảm khả năng và/hoặc mức độ nghiêm trọng của

bệnh RSV hoặc được dùng cho các đối tượng để chứng minh sự nhiễm RSV hoạt hóa.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị ít nhất một bệnh có liên quan đến RSV ở người trưởng thành hoặc ở trẻ em, trong tế bào, mô, cơ quan, động vật, hoặc bệnh nhân gồm, nhưng không giới hạn ở, nhiễm trùng đường hô hấp dưới, viêm phổi, viêm khí-phế quản, viêm tiểu phế quản, viêm phế quản, và bệnh nhiễm trùng hoặc các rối loạn viêm có liên quan bất kỳ, như không bị giới hạn ở ít nhất một trong số, hoặc ít nhất một bệnh viêm liên quan đến, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân, hội chứng nhiễm khuẩn, bệnh nhiễm khuẩn gram dương, bệnh nhiễm khuẩn gram âm, bệnh nhiễm khuẩn âm chùng nuôi cấy, bệnh nhiễm khuẩn do nấm, sốt giảm bạch cầu trung tính, nhiễm khuẩn niệu, màng não cầu-huyết, hội chứng suy hô hấp ở người trưởng thành, viêm mũi dị ứng, viêm mũi quanh năm, bệnh hen, phản vệ toàn thân, phản ứng tăng cảm thụ thể, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease - COPD), bệnh viêm phổi khu trú tăng cảm, u hạt do sinh vật nội bào, tính nhạy cảm với thuốc, chứng suy mòn, bệnh xơ nang, bệnh phổi mạn tính sơ sinh; ít nhất một bệnh nhiễm trùng trong tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân, gồm, nhưng không giới hạn ở, ít nhất một: sự nhiễm trùng vi khuẩn mạn tính hoặc cấp tính, quá trình nhiễm trùng hoặc ký sinh mạn tính và cấp tính, bao gồm nhiễm trùng vi khuẩn, virus và nấm, nhiễm trùng HIV, bệnh thần kinh HIV, chứng viêm màng não, viêm gan (A, B hoặc C, hoặc tương tự), bệnh viêm khớp nhiễm khuẩn, viêm màng bụng, viêm phổi, viêm nắp thanh quản, E. coli 0157:h7, hội chứng urê huyết tan máu, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tan huyết khối, bệnh sốt rét, sốt xuất huyết dengue, bệnh Leishmania, bệnh phong, hội chứng sốc độc, viêm cơ liên cầu, hoại tử khí, bệnh lao do mycobacterium, mycobacterium avium phức tạp, viêm phổi do nhiễm trung bào tử, bệnh viêm vùng chậu, viêm tinh hoàn, viêm mào tinh hoàn, nhiễm khuẩn, bệnh Lyme, bệnh cúm A, virus Epstein-Barr, hội chứng thực bào máu liên quan đến virus, viêm não do virus, chứng viêm màng não vô trùng, và các bệnh tương tự. Phương pháp này có thể tùy ý bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm hoặc dược phẩm chứa ít nhất một kháng thể RSV hoặc mảnh kháng nguyên của nó với tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân cần điều chỉnh, điều trị hoặc trị liệu.

Theo một phương án, chế phẩm phòng, điều trị hoặc dược phẩm chứa kháng

thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng được dùng cho động vật có vú, tốt hơn là con người, để điều trị, ngăn ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến nhiễm RSV. Theo một phương án khác, chế phẩm phòng, điều trị hoặc được phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng được dùng cho con người mắc bệnh xơ nang, loạn sản phổi phế quản, bệnh tim bẩm sinh, suy giảm miễn dịch bẩm sinh hoặc suy giảm miễn dịch mắc phải, hoặc cho người vừa cấy ghép (ví dụ, tủy xương, phổi, hoặc cấy ghép tế bào gốc tạo máu (HSCT)) để điều trị, ngăn ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều các triệu chứng liên quan đến nhiễm RSV.

Theo một phương án khác, chế phẩm phòng, điều trị hoặc được phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng được dùng cho trẻ em, tốt hơn là trẻ sinh non hoặc trẻ có nguy cơ nhập viện do nhiễm RSV để điều trị, ngăn ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều các triệu chứng liên quan đến nhiễm RSV. Theo phương án khác, chế phẩm phòng, điều trị hoặc được phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng được dùng cho người cao tuổi hoặc người trong nhà (ví dụ, viện dưỡng lão hoặc trung tâm thu hồi chức năng) hoặc cá nhân mắc suy giảm miễn dịch.

Ưu tiên sử dụng các kháng thể ức chế *in vivo* có tiềm năng và/hoặc ái lực cao và/hoặc kháng thể trung hòa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên RSV, đối với cả việc ngăn ngừa nhiễm RSV và trị liệu nhiễm RSV. Cũng ưu tiên sử dụng polynucleotit mã hóa kháng thể ức chế *in vivo* có tiềm năng và/hoặc ái lực cao và/hoặc kháng thể trung hòa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên RSV, đối với cả sự ngăn ngừa nhiễm RSV và trị liệu nhiễm RSV. Kháng thể hoặc các mảnh của nó sẽ tốt hơn là có ái lực đối với glycoprotein F của RSV và/hoặc mảnh của glycoprotein F.

Kháng thể và đối tượng tương đương về chức năng (như mảnh liên kết kháng nguyên của nó) theo sáng chế nhận diện epitop trong protein F của RSV. Kháng thể hoặc đối tượng tương đương về chức năng của nó nhận diện đặc hiệu epitop này có thể được kết hợp với kháng thể đặc hiệu RSV mà liên kết với epitop khác nhau đã được biết, như palivizumab, D25, AM14, AM16 và AM23. Bằng cách kết hợp kháng thể hoặc đối tượng tương đương về chức năng theo sáng chế mà nhận diện đặc hiệu epitop này bằng kháng thể đặc hiệu RSV đã biết, hai hoặc nhiều epitop khác nhau của

RSV được nhận diện trong cùng liệu pháp. Cách này, đáp ứng gây miễn dịch mạnh hơn đối với RSV và/hoặc tính đặc hiệu kháng thể cao hơn kháng lại RSV có thể đạt đến. Bằng đáp ứng gây miễn dịch mạnh hơn và tính đặc hiệu cao hơn kháng lại RSV, sự kết hợp như vậy có thể dẫn đến việc điều trị và/hoặc ngăn ngừa hiệu quả hơn rối loạn liên quan đến RSV.

Một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng liên kết đặc hiệu miễn dịch với một hoặc nhiều kháng nguyên RSV có thể được sử dụng cục bộ hoặc hệ thống trong cơ thể khi phòng bệnh. Kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng cũng có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể khảm, hoặc với lymphokin hoặc yếu tố sinh trưởng tạo máu (như, ví dụ, IL-2, IL-3, IL-7, và IL-15), mà, ví dụ, thích hợp để làm tăng số lượng hoặc hoạt tính của các tế bào tác động tương tác với kháng thể. Kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng cũng có thể được sử dụng thuận lợi kết hợp với kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể khảm khác, hoặc với lymphokin hoặc yếu tố sinh trưởng tạo máu (như, ví dụ, IL-2, IL-3 và IL-7), mà, ví dụ, thích hợp để làm tăng đáp ứng miễn dịch. Kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng cũng có thể được sử dụng thuận lợi kết hợp với một hoặc nhiều thuốc được sử dụng để điều trị nhiễm RSV như, ví dụ chất kháng virus.

Kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều thuốc sau đây: NIH-351 (Gemini Technologies), vacxin RSV tái tổ hợp (Aviron), RSVf-2 (Intracel), F-50042 (Pierre Fabre), T-786 (Trimeris), VP-36676 (ViroPharma), RFI-641 (American Home Products), VP-14637 (ViroPharma), PFP-1 và PFP-2 (American Home Products), vacxin RSV (Avant Immunotherapeutics), và F-50077 (Pierre Fabre).

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các phương pháp điều trị khác (ví dụ, liệu pháp hormon, liệu pháp miễn dịch, và các chất chống viêm). Nói chung, ưu tiên sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc loài hoặc phản ứng loài (trong trường hợp kháng thể cùng loài với sản phẩm của bệnh nhân. Do đó, theo phương án được ưu tiên, kháng thể người hoặc kháng thể được làm giống như của người, dẫn xuất của các mảnh, các chất tương tự, hoặc axit nucleic, được dùng cho bệnh nhân là người để điều trị hoặc

phòng bệnh.

“Đối tượng” có thể là động vật có vú như người, chó, mèo, ngựa, bò, chuột nhắt, chuột cống, khỉ (ví dụ, khỉ đầu chó, ví dụ, *Macaca fascicularis*) hoặc thỏ. Theo các phương án được ưu tiên theo sáng chế, đối tượng là người.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) có thể được sử dụng một mình, hoặc kết hợp với liệu pháp kháng virus.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) có thể được sử dụng một mình, hoặc kết hợp với kháng thể đơn dòng RSV khác.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) có thể được sử dụng một mình, hoặc kết hợp với vacxin RSV khác.

Thuật ngữ “kết hợp với” dùng để chỉ các thành phần được dùng trong phương pháp theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó (ví dụ, RB1) cùng với, ví dụ, palivizumab) có thể được bào chế thành một chế phẩm đơn để phân phối đồng thời hoặc được bào chế riêng rẽ thành hai hoặc nhiều chế phẩm (ví dụ, bộ kit). Mỗi thành phần có thể được dùng cho đối tượng ở thời điểm khác nhau khi thành phần còn lại được dùng; ví dụ, mỗi lần dùng có thể không đồng thời (ví dụ, riêng rẽ hoặc tuần tự) ở một số khoảng thời gian trong một khoảng thời gian nhất định. Ngoài ra, các thành phần riêng rẽ có thể được dùng cho đối tượng theo cùng một đường dùng hoặc theo đường dùng khác nhau.

Ứng dụng trong chẩn đoán và thử nghiệm

Kháng thể kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) có thể được sử dụng làm chất tinh chế bằng ái lực. Trong quá trình này, kháng thể kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được giữ cố định trên pha rắn như Sephadex®, thủy tinh hoặc nhựa agaroza hoặc giấy lọc, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Kháng thể hoặc mảnh được cố định được tiếp xúc với mẫu chứa protein F của hRSV (hoặc mảnh của nó) được tinh chế, và sau đó chất hỗ trợ

được rửa bằng dung môi thích hợp mà sẽ loại bỏ đáng kể tất cả nguyên liệu trong mẫu ngoại trừ protein F của hRSV, được liên kết với kháng thể hoặc mảnh được cố định. Cuối cùng, chất hỗ trợ được rửa bằng dung môi rửa giải protein F của hRSV liên kết (ví dụ, protein A). Kháng thể và mảnh được cố định tạo ra một phần của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất kháng nguyên để tạo ra kháng thể thứ cấp là hữu ích ví dụ để thực hiện thẩm tách Western và các thử nghiệm miễn dịch khác được thảo luận trong bản mô tả. Cụ thể, các polypeptit được bộc lộ chứa vùng biến đổi và/hoặc trình tự CDR của kháng thể điều trị được bộc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) và có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng idiotyp để sử dụng trong phát hiện đặc hiệu sự có mặt của kháng thể, ví dụ, trong ngữ cảnh điều trị.

Kháng thể kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó cũng có thể hữu ích trong các thử nghiệm chẩn đoán đối với protein F của hRSV, ví dụ, phát hiện sự biểu hiện của nó trong các tế bào, mô, hoặc huyết thanh cụ thể. Các phương pháp chẩn đoán như vậy có thể hữu ích trong các chẩn đoán bệnh khác nhau.

Sáng chế bao gồm các thử nghiệm ELISA (thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym) kết hợp việc sử dụng kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1).

Ví dụ, phương pháp như vậy bao gồm các bước sau:

- (a) phủ cơ chất (ví dụ, bề mặt lỗ của tấm vi chuẩn, ví dụ, tấm nhựa) với kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó;
- (b) áp dụng mẫu được kiểm tra sự có mặt của protein F của RSV đối với cơ chất;
- (c) rửa tấm, sao cho nguyên liệu không liên kết trong mẫu được loại bỏ;
- (d) áp dụng kháng thể được đánh dấu có thể phát hiện (ví dụ, kháng thể gắn enzym) cũng đặc hiệu đối với kháng nguyên protein F của RSV;
- (e) rửa cơ chất, sao cho kháng thể được đánh dấu không liên kết được loại bỏ;
- (f) nếu kháng thể được đánh dấu là enzym được gắn, áp dụng hóa chất được chuyển hóa bởi enzym thành tín hiệu huỳnh quang; và

(g) phát hiện sự có mặt của kháng thể được đánh dấu.

Việc phát hiện đánh dấu liên quan đến cơ chất chỉ ra sự có mặt của protein F của hRSV.

Theo phương án khác, kháng thể được đánh dấu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đánh dấu bằng peroxidaza phản ứng với ABTS (ví dụ, axit 2,2'-azino-bis(3-etylbenzthiazolin-6-sulphonic)) hoặc 3,3',5,5'-Tetrametylbenzidin để tạo ra sự thay đổi màu sắc phát hiện được. Theo cách khác, kháng thể được đánh dấu hoặc mảnh được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ có thể phát hiện được (ví dụ, ^3H) có thể được phát hiện bằng thiết bị đếm nhấp nháy với sự có mặt của chất nhấp nháy.

Kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế (ví dụ, RB1) có thể được sử dụng trong thẩm tách Western hoặc quy trình thẩm tách protein miễn dịch. Quy trình như vậy tạo ra phần của sáng chế và bao gồm ví dụ:

(1) tùy ý chuyển protein từ mẫu được kiểm tra với sự có mặt của protein F của hRSV (ví dụ, từ tách điện di PAGE hoặc SDS-PAGE của protein trong mẫu) trên màng hoặc cơ chất rắn khác bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, thẩm tách nửa khô hoặc thẩm tách bể); tiếp xúc màng hoặc cơ chất rắn khác được kiểm tra sự có mặt của protein F của hRSV được liên kết hoặc mảnh của nó với kháng thể kháng hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Màng như vậy có thể là dạng của màng dựa trên nitroxenluloza hoặc vinyl (ví dụ, polyvinyliden florua (PVDF)) mà protein được kiểm tra với sự có mặt của hRSV trên đó trong gel PAGE không biến tính (điện di gel polyacrylamit) hoặc gel SDS-PAGE (điện di gel natri dodexyl sulfat polyacrylamit) được chuyển đổi (ví dụ, tách điện di sau đó trong gel). Trước khi tiếp xúc màng với kháng thể kháng hRSV hoặc mảnh, màng này tùy ý được phong bế, ví dụ, bằng sữa khô không béo hoặc chất tương tự để liên kết các vị trí liên kết protein không đặc hiệu trên màng.

(2) rửa màng một hoặc nhiều lần để loại bỏ kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh không liên kết và các chất không liên kết khác; và

(3) phát hiện kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh được liên kết.

Phát hiện kháng thể hoặc mảnh được liên kết chỉ ra rằng protein hRSV có mặt trên màng hoặc cơ chất và trong mẫu. Phát hiện kháng thể hoặc mảnh được liên kết có thể liên kết kháng thể hoặc mảnh với kháng thể thứ cấp (kháng thể kháng globulin miễn dịch) được đánh dấu có thể phát hiện được và, sau đó, phát hiện sự có mặt của kháng thể thứ cấp.

Kháng thể kháng protein F của hRSV và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) cũng có thể được sử dụng đối với hóa mô miễn dịch. Phương pháp như vậy tạo thành một phần của sáng chế và bao gồm các bước, ví dụ:

(1) cho tế bào được kiểm tra sự có mặt của protein F của hRSV tiếp xúc với kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế; và

(2) phát hiện kháng thể hoặc mảnh trên hoặc trong tế bào.

Nếu chính kháng thể hoặc mảnh được đánh dấu có thể phát hiện được, nó có thể được phát hiện trực tiếp. Theo cách khác, phát hiện kháng thể hoặc mảnh có thể được liên kết bởi kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được.

Dược phẩm và cách dùng

Để điều chế dược phẩm và chế phẩm vô trùng chứa kháng thể kháng protein F của hRSV và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế (ví dụ, RB1), kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được trộn lẫn với chất mang hoặc tá dược được dụng. Xem, ví dụ, *Remington's Pharmaceutical Sciences* và *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Dạng bào chế chứa chất trị liệu và chất chẩn đoán có thể được điều chế bằng cách trộn với chất mang, tá dược, hoặc chất làm ổn định có thể chấp nhận ở dạng, ví dụ, bột được làm khô lạnh, bột nhão, dung dịch chứa nước hoặc huyền phù (xem, ví dụ, Hardman, *et al.* (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, và Wilkins, New York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage: Parenterally Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage: Tables*, Marcel

Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner và Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY). Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được pha loãng đến nồng độ thích hợp trong dung dịch đệm histidin có độ pH=5-7, ở 1-20 mM và NaCl hoặc sucroza (ví dụ, 2-15 % (khối lượng/thể tích)) tùy ý được bổ sung đối với lực trương. Các chất bổ sung, như polysorbat 20 hoặc polysorbat 80, nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,10% (khối lượng/thể tích) có thể được bổ sung để tăng cường độ ổn định. Dạng bào chế tiêu biểu là 10 mM L-Histidin, 7% (khối lượng/thể tích) Sucroza, và 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat-80, độ pH=6,0.

Tính độc và hiệu quả trị liệu của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, được dùng một mình hoặc kết hợp với một chất trị liệu khác, có thể được xác định bằng các quy trình được chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật thử nghiệm, ví dụ, để xác định LD₅₀ (liều gây chết đến 50% quần thể) và ED₅₀ (liều điều trị hiệu quả trong 50% quần thể). Tỷ lệ liều giữa độc tố và hiệu quả trị liệu là chỉ số điều trị (LD₅₀/ ED₅₀). Dữ liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu động vật này có thể được sử dụng trong việc bào chế khoảng liều lượng để sử dụng ở người. Liều lượng của các hợp chất như vậy tốt hơn là nằm trong khoảng của nồng độ tuần hoàn mà bao gồm ED₅₀ với ít hoặc không có tính độc. Liều lượng này có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào dạng liều lượng được sử dụng và đường dùng.

Cách thức dùng có thể thay đổi. Đường dùng bao gồm đường miệng, trực tràng, qua niêm mạc, ruột, ngoài đường tiêu hóa; trong cơ, dưới da, trong da, trong tủy, nội tủy mạc, trong tâm thất trực tiếp, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong mũi, trong mắt, hít, bơm, khu trú, da, qua da, hoặc trong động mạch. Cách thức dùng liều được ưu tiên là trong cơ, trong tĩnh mạch và trong mũi.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế (ví dụ, RB1) có thể được dùng bằng đường xâm lấn như bằng cách tiêm. Theo các phương án khác của sáng chế, kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm của nó, được dùng trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, trong động mạch, trong

khối u, hoặc bằng cách hít, phân phối sol khí. Việc dùng bằng đường không xâm lấn (ví dụ, miệng; ví dụ, trong viên tròn, viên nang hoặc viên nén) cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đề xuất bình (ví dụ, lọ nhỏ bằng nhựa hoặc thủy tinh, ví dụ, có nắp hoặc cột sắc ký, kim lỗ rỗng hoặc bơm tiêm xi lanh) chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ theo sáng chế (ví dụ, RB1) hoặc dược phẩm chứa chúng. Sáng chế cũng đề xuất dụng cụ tiêm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ theo sáng chế (ví dụ, RB1) hoặc dược phẩm chứa chúng. Dụng cụ tiêm là thiết bị đưa chất vào cơ thể bệnh nhân qua đường ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong cơ, dưới da hoặc trong tĩnh mạch. Ví dụ, dụng cụ tiêm có thể là bơm tiêm (ví dụ, được làm đầy trước bằng dược phẩm, như dụng cụ tiêm tự động) mà, ví dụ, bao gồm xi lanh hoặc ống để giữ chất lỏng được tiêm (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh hoặc dược phẩm chứa nó), kim để nối da và/hoặc mạch máu để tiêm chất lỏng; và ống bơm để đẩy chất lỏng ra khỏi xi lanh và qua lỗ kim. Theo phương án của sáng chế, dụng cụ tiêm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa nó là dụng cụ tiêm trong tĩnh mạch (intravenous - IV). Thiết bị như vậy chứa kháng thể hoặc mảnh hoặc dược phẩm chứa nó trong canun hoặc dùi/kim có thể được gắn với ống mà có thể được gắn với túi hoặc túi chứa để giữ chất lỏng (ví dụ, nước muối; hoặc dung dịch ringer được lactat hóa chứa NaCl, natri lactat, KCl, CaCl_2 và tùy ý chứa glucoza) được đưa vào cơ thể bệnh nhân qua canun hoặc dùi/kim. Kháng thể hoặc mảnh hoặc dược phẩm chứa nó có thể, theo phương án của sáng chế, được đưa vào thiết bị một khi dùi và canun được chèn vào tĩnh mạch của đối tượng và dùi được loại bỏ khỏi canun được chèn. Thiết bị IV có thể, ví dụ, được chèn vào tĩnh mạch ngoại vi (ví dụ, trong tay hoặc cánh tay); tĩnh mạch chủ trên hoặc tĩnh mạch chủ dưới, hoặc trong tâm nhĩ phải của tim (ví dụ, IV trung tâm); hoặc vào dưới xương đòn, trong cổ, hoặc tĩnh mạch đùi và, ví dụ, hướng đến tim cho đến khi tiến đến tĩnh mạch chủ trên hoặc tâm nhĩ phải (ví dụ, đường tĩnh mạch trung tâm). Theo phương án của sáng chế, dụng cụ tiêm là dụng cụ tiêm tự động; thiết bị tiêm tia hoặc bơm truyền bên ngoài. Dụng cụ tiêm tia sử dụng tia hẹp áp suất cao của chất lỏng thâm nhập biểu bì để đưa vào kháng thể hoặc mảnh hoặc dược phẩm chứa nó vào cơ thể bệnh nhân. Bơm truyền bên ngoài là dụng cụ y tế mà phân phối kháng thể hoặc mảnh hoặc dược phẩm chứa nó vào cơ thể bệnh nhân ở lượng được kiểm soát. Bơm truyền

bên ngoài có thể được cấp nguồn bằng điện hoặc bằng cơ. Các bơm khác nhau hoạt động theo nhiều cách khác nhau, ví dụ, bơm tiêm giữ chất lỏng trong túi chứa của bơm tiêm, và pit-tông di chuyển kiểm soát sự phân phối chất lỏng, bơm đàn hồi giữ chất lỏng trong vật chứa có thể kéo căng, và áp suất từ thành đàn hồi của bong bóng dẫn sự phân phối dịch lỏng. Trong bơm nhu động, bộ con lăn chụm xuống chiều dài của ống, đẩy chất lỏng ra. Trong bơm nhiều kênh, chất lỏng có thể được phân phối từ nhiều túi chứa với nhiều tốc độ.

Dược phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể được dùng với dụng cụ tiêm dưới da không dùng kim tiêm; như các thiết bị được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,620,135; 6,096,002; 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 hoặc 4,596,556. Các thiết bị không dùng kim tiêm này chứa dược phẩm cũng là một phần của sáng chế. Dược phẩm được bộc lộ trong bản mô tả cũng có thể được dùng bằng cách truyền. Ví dụ về mảnh cấy và mô đun đã biết để dùng dược phẩm bao gồm mảnh cấy và mô đun được bộc lộ trong: patent Mỹ số 4,487,603, bộc lộ bơm vi truyền có thể cấy được để phân tán thuốc với tốc độ được kiểm soát; patent Mỹ số 4,447,233, bộc lộ bơm truyền thuốc để phân phối thuốc ở tốc độ truyền chính xác; patent Mỹ số 4,447,224, bộc lộ thiết bị truyền có thể cấy dòng có thể biến đổi để phân phối thuốc liên tục; patent Mỹ số 4,439,196, bộc lộ hệ phân phối thuốc thẩm thấu có khoang nhiều buồng. Nhiều mảnh cấy, hệ thống phân phối khác, và mô đun được biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật và nhiều mảnh cấy, hệ thống phân phối chứa dược phẩm theo sáng chế nằm trong phạm vi của sáng chế.

Phác đồ điều trị tùy thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm cường độ vòng tuần hoàn huyết thanh hoặc mô của kháng thể điều trị hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, mức độ của các triệu chứng, tính gây miễn dịch của kháng thể phòng bệnh/trị liệu, và khả năng tiếp cận của các tế bào đích trong chất nền sinh học. Tốt hơn là, phác đồ điều trị phân phối đủ kháng thể hoặc mảnh điều trị để ảnh hưởng đến việc cải thiện tình trạng bệnh đích, trong khi đồng thời giảm thiểu tác dụng phụ không mong muốn. Ngoài ra, lượng sinh học được phân phối phụ thuộc một phần vào kháng thể phòng bệnh/trị liệu cụ thể và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh được điều trị. Hướng dẫn chọn liều thích hợp của kháng thể hoặc mảnh điều trị là sẵn có (xem, ví dụ, Wawrzynczak, (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.)

(1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptit Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, *et al.*, 2003, *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom *et al.*, 1999, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon *et al.*, 2001, *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz *et al.*, 2000, *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh *et al.*, 2003, *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky *et al.*, 2000, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Xác định của liều thích hợp được thực hiện bởi bác sĩ lâm sàng, ví dụ, bằng cách sử dụng các thông số hoặc yếu tố đã biết hoặc bị nghi ngờ trong lĩnh vực kỹ thuật này để ngăn ngừa hoặc điều trị. Nói chung, liều này bắt đầu với lượng mà ít hơn liều tối ưu và nó được làm tăng bằng lượng tăng nhỏ sau đó cho đến khi tác dụng tối ưu hoặc mong muốn đạt được liên quan đến tác dụng phụ bất kỳ giảm. Phép đo chẩn đoán quan trọng bao gồm phép xác định các triệu chứng, ví dụ, viêm hoặc mức xytokin gây viêm được tạo ra. Nói chung, có thể mong đợi rằng tính sinh học sẽ được sử dụng có được từ cùng loài là động vật được hướng đích để điều trị, theo đó giảm thiểu đáp ứng miễn dịch bất kỳ đối với chất thử. Trong trường hợp đối tượng là người, ví dụ, kháng thể được làm giống như của người và kháng thể ở người đầy đủ có thể được mong đợi.

Kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả (ví dụ, RB1) có thể được cung cấp bằng việc truyền liên tục, hoặc bằng liều được dùng, ví dụ, hàng ngày, 1-7 lần mỗi tuần, hàng tuần, hai tuần, hằng tháng, hai tháng, hàng quý, nửa năm, hàng năm v.v. Các liều có thể được cung cấp, ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, khu trú, miệng, mũi, trực tràng, trong cơ, trong não, trong xương sống, hoặc bằng cách hít. Lượng hàng tuần tổng cộng thường ít nhất là 0,05 µg/kg thể trọng, thông thường hơn ít nhất là 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,25 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/ml, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg hoặc nhiều hơn (xem, ví dụ, Yang, *et al.*, 2003, *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, *et al.*, 2002, *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, *et al.*, 1999, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, *et al.*, 2003, *Cancer Immunol. Immunother.* 52:151-144). Các liều này cũng có thể được cung cấp để đạt được nồng độ nồng độ đích định trước của kháng thể kháng hRSV trong huyết thanh của đối tượng, như 0,1, 0,3, 1, 3, 10,

30, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ hoặc cao hơn. Theo các phương án khác, kháng thể kháng hRSV theo sáng chế được dùng, ví dụ, dưới da hoặc trong tĩnh mạch, hàng tuần, hai tuần, "mỗi 4 tuần", hằng tháng, hai tháng, hoặc cơ bản hàng quý với lượng 10, 20, 50, 80, 100, 200, 500, 1000 hoặc 2500 mg/đối tượng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" dùng để chỉ lượng kháng hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế (ví dụ, RB1) mà, khi được dùng một mình hoặc kết hợp với chất trị liệu/chất phòng bệnh bổ sung vào tế bào, mô, hoặc đối tượng, có hiệu quả để trung hòa RSV và/hoặc ngăn ngừa hoặc gây ra sự cải thiện có thể xác định được trong một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến nhiễm RSV. Liều hiệu quả còn đề cập đến lượng kháng thể hoặc mảnh đủ để dẫn đến ít nhất việc ngăn ngừa hoặc cải thiện một phần các triệu chứng. Khi được áp dụng đối với hoạt chất riêng lẻ được dùng một mình, liều hữu hiệu đề cập đến thành phần một mình. Khi được áp dụng cho hỗn hợp, liều hữu hiệu đề cập đến lượng kết hợp của hoạt chất mà dẫn đến tác dụng phòng bệnh hoặc điều trị, khi được dùng kết hợp, lần lượt hoặc đồng thời. Theo các phương án nhất định, lượng hữu hiệu là lượng mà tạo ra nồng độ huyết thanh hướng đích lâm sàng bằng 10 $\mu\text{g/mL}$ - 30 $\mu\text{g/mL}$ trong 5 tháng. Theo một phương án, lượng hữu hiệu là liều cho người mà tạo ra đích Ctrough bằng 10 $\mu\text{g/ml}$ - 30 $\mu\text{g/ml}$ đối với tính hiệu quả, như được xác định trong mô hình chuột bông tiền lâm sàng tiêu chuẩn.

Kit

Sáng chế đề cập đến kit bao gồm một hoặc nhiều thành phần gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, như được thảo luận trong bản mô tả này (ví dụ, RB1) liên kết với một hoặc nhiều thành phần bổ sung gồm, nhưng không giới hạn ở chất mang được dùng và/hoặc chất phòng bệnh/trị liệu, như được thảo luận trong bản mô tả này. Kháng thể hoặc mảnh và/hoặc chất phòng bệnh/trị liệu có thể được bào chế là chế phẩm tinh khiết hoặc kết hợp với chất mang được dùng, trong được phẩm.

Theo một phương án, kit bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế (ví dụ, RB1) hoặc được phẩm chứa nó trong một vật chứa (ví dụ, trong bình nhỏ bằng nhựa hoặc thủy tinh vô trùng) và được phẩm chứa nó và/hoặc chất phòng bệnh/trị liệu trong vật chứa khác (ví dụ, trong

bình nhỏ bằng nhựa hoặc thủy tinh vô trùng).

Theo phương án khác, kit bao gồm dạng kết hợp theo sáng chế, bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế (ví dụ, RB1) cùng với chất mang được dụng, tùy ý kết hợp với một hoặc nhiều chất phòng bệnh/trị liệu được bào chế cùng nhau, tùy ý, trong dược phẩm, trong vật chứa đơn, phổ biến.

Nếu kit bao gồm dược phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng, kit bao gồm dụng cụ để xác định việc dùng này. Ví dụ, bộ kit có thể bao gồm một hoặc nhiều kim dưới da hoặc các dụng cụ tiêm khác như được thảo luận ở trên.

Kit có thể bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng bao gồm thông tin liên quan đến dược phẩm và dạng liều trong kit. Nói chung, thông tin này hỗ trợ bệnh nhân và bác sĩ khi sử dụng dược phẩm và dạng liều dùng kèm theo một cách hiệu quả và an toàn. Ví dụ, thông tin sau đây liên quan đến sự kết hợp theo sáng chế có thể được cung cấp trong tờ hướng dẫn sử dụng: dược động học, dược lực học, nghiên cứu lâm sàng, các thông số hiệu lực, chỉ định và cách sử dụng, chống chỉ định, cảnh báo, biện pháp phòng ngừa, phản ứng phụ, quá liều, liều lượng và cách dùng thích hợp, cách cung cấp, điều kiện bảo quản thích hợp, tài liệu tham khảo, thông tin nhà sản xuất/nhà phân phối và thông tin bằng sáng chế.

Kit phát hiện và kit phòng bệnh/trị liệu

Để thuận tiện, kháng thể kháng hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế (ví dụ, RB1) có thể được cung cấp trong kit, nghĩa là, tổ hợp chất thử được đóng gói ở lượng định trước cùng với hướng dẫn để thực hiện thử nghiệm chẩn đoán hoặc phát hiện. Trong trường hợp kháng thể hoặc mảnh được đánh dấu bằng enzym, kit sẽ bao gồm cơ chất và đồng yếu tố theo yêu cầu của enzym (ví dụ, tiền chất cơ chất cung cấp nhóm mang màu hoặc nhóm huỳnh quang có thể phát hiện được). Ngoài ra, các phụ gia khác có thể được bao gồm như chất làm ổn định, dung dịch đệm (ví dụ, dung dịch đệm phong bế hoặc dung dịch đệm phân giải) và các chất tương tự. Lượng tương đối của các chất thử khác nhau có thể rất khác nhau để cung cấp nồng độ trong dung dịch chất thử giúp tối ưu hóa đáng kể độ nhạy của thử nghiệm. Cụ thể, chất thử có thể được cung cấp ở dạng bột khô, thường được đông khô, bao

gồm tá dược khi hòa tan sẽ tạo ra dung dịch chất thử có nồng độ thích hợp.

Sáng chế cũng đề xuất chất thử chẩn đoán hoặc phát hiện và kit bao gồm một hoặc nhiều chất thử để sử dụng trong nhiều thử nghiệm phát hiện, bao gồm ví dụ, thử nghiệm miễn dịch như ELISA (loại kẹp hoặc dạng cạnh tranh). Các thành phần của kit có thể được gắn sẵn vào giá thể rắn hoặc có thể được dán lên bề mặt của giá thể rắn khi sử dụng kit. Theo một số phương án theo sáng chế, thiết bị tạo tín hiệu có thể được liên kết trước với kháng thể hoặc mảnh theo sáng chế hoặc có thể yêu cầu sự kết hợp với một hoặc nhiều thành phần, ví dụ, dung dịch đệm, thể liên hợp kháng thể-enzym, cơ chất enzym, hoặc các chất tương tự, trước khi sử dụng. Kit cũng có thể bao gồm các chất thử bổ sung, ví dụ, phong bế các chất thử để làm giảm liên kết không đặc hiệu với bề mặt pha rắn, chất thử rửa, cơ chất enzym, và các chất tương tự. Bề mặt pha rắn có thể ở dạng ống, hạt, tấm vi chuẩn độ, vi cầu, hoặc nguyên liệu khác thích hợp để cố định protein, peptit, hoặc polypeptit. Theo các khía cạnh cụ thể, enzym xúc tác cho sự hình thành sản phẩm phát quang hóa học hoặc tạo sắc tố hoặc khử cơ chất phát quang hóa học hoặc cơ chất sinh màu là thành phần của phương pháp tạo tín hiệu. Các enzym như vậy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Kit có thể bao gồm bất kỳ chất bất giữ và chất thử phát hiện nào được mô tả trong bản mô tả. Tùy ý, kit này cũng có thể bao gồm các hướng dẫn để thực hiện các phương pháp theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất kit bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bao gói trong vật chứa, như lọ nhỏ hoặc chai, và còn bao gồm nhãn được gắn hoặc được bao gói cùng với vật chứa, nhãn này mô tả hàm lượng của vật chứa và cung cấp các chỉ dẫn và/hoặc hướng dẫn liên quan đến việc sử dụng hàm lượng của vật chứa để ngăn ngừa/điều trị một hoặc nhiều tình trạng bệnh như được mô tả trong bản mô tả.

Theo một khía cạnh, kit để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh/tình trạng bệnh lý liên quan đến nhiễm RSV và bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và còn bao gồm chất phòng bệnh/trị liệu hoặc vaccin. Kit có thể tùy ý còn bao gồm bơm tiêm dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, dùng trong tĩnh mạch. Theo một khía cạnh khác, kit bao gồm kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và nhãn được gắn với hoặc

được bao gói với vật chứa mô tả việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh với vaccin hoặc chất phòng bệnh/trị liệu. Theo một khía cạnh khác, kit bao gồm vaccin hoặc cả chất phòng bệnh/trị liệu và nhãn được gắn với hoặc được bao gói với vật chứa mô tả việc sử dụng vaccin hoặc cả chất phòng bệnh/trị liệu với kháng thể kháng protein F của hRSV hoặc mảnh. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng protein F của hRSV và vaccin hoặc chất phòng bệnh/trị liệu trong các lọ nhỏ riêng rẽ hoặc được kết hợp trong cùng được phẩm.

Đối với phòng bệnh hoặc điều trị kết hợp, việc dùng đồng thời hai chất phòng bệnh/trị liệu không yêu cầu các chất đó phải được dùng cùng một lúc hoặc theo cùng một đường, miễn là có sự trùng lặp về khoảng giai đoạn thời gian mà các chất phát huy tác dụng phòng bệnh/trị liệu của chúng. Việc dùng đồng thời hoặc tuần tự được dự tính, cũng như việc dùng vào các ngày hoặc các tuần khác nhau.

Kit phòng bệnh/trị liệu và phát hiện được bộc lộ trong bản mô tả cũng có thể được chuẩn bị bao gồm ít nhất một kháng thể, peptit, mảnh liên kết kháng nguyên, hoặc polynucleotit được bộc lộ trong bản mô tả này và hướng dẫn sử dụng chế phẩm là chất phản ứng phát hiện hoặc chất phòng bệnh/trị liệu. Vật chứa để sử dụng trong các kit như vậy có thể thường bao gồm ít nhất một lọ nhỏ, ống nghiệm, bình thót cổ, chai, bơm tiêm hoặc vật chứa thích hợp khác, trong thể đặt một hoặc nhiều chế phẩm phát hiện và/hoặc (các) chế phẩm phòng/điều trị, và tốt hơn là được phân bổ phù hợp. Trong trường hợp chất phòng bệnh/trị liệu thứ hai cũng được cung cấp, kit cũng có thể chứa vật chứa riêng biệt thứ hai để có thể đặt chế phẩm phát hiện thứ hai và/hoặc chế phẩm phòng bệnh/trị liệu. Theo cách khác, nhiều hợp chất có thể được điều chế trong một được phẩm duy nhất, và có thể được đóng gói trong một phương tiện chứa duy nhất, như lọ nhỏ, bình thót cổ, bơm tiêm, chai, hoặc vật chứa duy nhất thích hợp khác. Kit được bộc lộ trong bản mô tả cũng thường bao gồm phương tiện để chứa (các) lọ nhỏ được bảo quản kín để bán thương mại, như, ví dụ, hộp nhựa dạng tiêm hoặc đúc thổi để chứa (các) lọ nhỏ mong muốn. Trong trường hợp nhãn phóng xạ, sinh màu, chất huỳnh quang, hoặc loại nhãn có thể phát hiện khác hoặc phương tiện phát hiện được bao gồm trong kit, chất đánh dấu có thể được cung cấp trong cùng vật chứa là chính chế phẩm phát hiện hoặc chế phẩm phòng bệnh/trị liệu, hoặc có thể thay vào đó được đặt trong vật chứa riêng biệt thứ hai mà chế phẩm thứ hai này có

thể được đặt vào và được chia lượng thích hợp. Theo cách khác, chất thử và nhãn phát hiện có thể được chuẩn bị trong một phương tiện chứa duy nhất và trong hầu hết các trường hợp, kit cũng sẽ thường bao gồm phương tiện để chứa (các) lọ nhỏ ở nơi kín để bán thương mại và/hoặc đóng gói và phân phối thuận tiện.

Thiết bị hoặc dụng cụ để thực hiện phương pháp phát hiện hoặc giám sát được mô tả trong bản mô tả cũng được đề xuất. Dụng cụ này có thể bao gồm buồng hoặc ống mà mẫu có thể được đưa vào, hệ thống xử lý chất lỏng tùy ý bao gồm van hoặc bơm để hướng dòng chảy mẫu qua thiết bị, tùy ý đến bộ lọc để phân tách huyết tương hoặc huyết thanh từ máu, trộn buồng để bổ sung chất bắt giữ hoặc chất phản ứng phát hiện, và tùy ý thiết bị phát hiện để phát hiện lượng nhãn có thể phát hiện được liên kết với chất bắt giữ phức chất miễn dịch. Dòng chảy mẫu có thể thụ động (ví dụ, bởi mao mạch, thủy tĩnh, hoặc các lực khác mà không yêu cầu vận hành thêm bằng tay của thiết bị một khi mẫu được áp dụng) hoặc chủ động (ví dụ, bằng cách tác dụng lực được tạo ra nhờ bơm cơ học, bơm thẩm thấu điện tử, lực ly tâm, hoặc áp suất không khí tăng), hoặc bằng sự kết hợp của các lực chủ động và thụ động.

Theo các phương án khác, sáng chế cũng đề xuất bộ xử lý, bộ nhớ có thể đọc của máy tính, và thường được bảo quản trên bộ nhớ có thể đọc của máy tính và thích hợp để được thực hiện trên bộ xử lý để thực hiện phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trong bản mô tả. Ví dụ về các hệ thống máy tính thích hợp, môi trường, và/hoặc cấu hình bao gồm máy tính cá nhân, máy chủ, thiết bị cầm tay hoặc laptop, hệ thống đa xử lý, hệ thống dựa trên bộ vi xử lý, hộp đặt ở trên, thiết bị điện tử sử dụng chương trình, mạng lưới PC, máy tính mini, máy tính lớn, môi trường điện toán phân tán mà bao gồm hệ thống hoặc dụng cụ bất kỳ trong số các hệ thống hoặc thiết bị nêu trên, hoặc hệ thống bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp chung

Các phương pháp chuẩn trong sinh học phân tử được mô tả Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982, 1989 2nd Edition, and 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook và Russell (2001) *Molecular Cloning, 3rd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Các phương pháp chuẩn cũng xuất hiện trong

Ausbel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley và Sons, Inc. New York, NY, mô tả sự tách dòng trong tế bào vi khuẩn và sự gây đột biến ADN (Vol. 1), tách dòng trong các tế bào động vật có vú và nấm men (Vol. 2), thể liên hợp glyco và sự biểu hiện protein (Vol. 3), và tin sinh học (Vol. 4).

Phương pháp tinh chế protein bao gồm phương pháp kết tủa miễn dịch, sắc ký, điện di, ly tâm, và kết tinh được mô tả (Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Sự phân tích hóa học, cải biến hóa học, cải biến sau dịch mã, sản xuất protein dung hợp, glycosyl hóa các protein được mô tả (xem, ví dụ, Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Sản xuất, tinh chế, và sự phân mảnh của các kháng thể đa dòng và đơn dòng được mô tả (Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, *ở trên*). Các kỹ thuật chuẩn để xác định các tương tác phối tử/thụ thể là sẵn có (xem, ví dụ, Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Kháng thể chuỗi đơn và kháng thể tổ hợp kép được mô tả (xem, ví dụ, Malecki *et al.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson and Kortt, 1999, *J. Immunol. Methods* 231:177-189; và patent Mỹ số 4,946,778). Kháng thể hai chức được đề xuất (xem, ví dụ, Mack, *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248:7-15; Volkel, *et al.* (2001) *Protein Engineering* 14:815-823; Segal, *et al.* (2001) *J. Immunol. Methods* 248:1-6; Brennan, *et al.* (1985) *Science* 229:81-83; Raso, *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Traunecker, *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659; và các patent Mỹ số 5,932,448, 5,532,210, và 6,129,914).

Kháng thể đặc hiệu kép cũng được đề xuất (xem, ví dụ, Azzoni *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:3493; Kita *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:6901; Merchant *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:9115; Pandey *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:2214; Long (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

Kháng thể có thể được liên hợp, ví dụ, với các phân tử dược chất nhỏ, enzym, liposom, polyetylen glycol (PEG). Kháng thể hữu ích để điều trị, chẩn đoán, kit hoặc các mục đích khác, và bao gồm các kháng thể được ghép cặp, ví dụ, với chất nhuộm, các đồng vị phóng xạ, enzym, hoặc kim loại, ví dụ, vàng keo (xem, ví dụ, Le Doussal *et al.* (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

Các phương pháp dòng chảy tế bào, bao gồm phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (florescence activated cell sorting - FACS), là sẵn có (xem, ví dụ, Owens, *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Chất phản ứng huỳnh quang thích hợp để cải biến axit nucleic, bao gồm các đoạn môi và đoạn dò axit nucleic, polypeptit, và kháng thể, để sử dụng ví dụ, làm chất phản ứng chẩn đoán, là sẵn có (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

Các phương pháp chuẩn trong nghiên cứu mô học của hệ miễn dịch được mô tả (xem, ví dụ, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology và Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, và Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text và Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Các gói phần mềm và cơ sở dữ liệu để xác định, ví dụ, mảnh kháng nguyên, trình tự dẫn đầu, sự gấp nếp protein, miền chức năng, vị trí glycosyl hóa, và sắp xếp trình tự, là sẵn có (xem, ví dụ, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatic* 16: 741-

742; Menne, *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren, *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Xác định kháng thể trung hòa RSV đầy đủ ở người

Để xác định kháng thể trung hòa HRSV mạnh, huyết thanh được lấy từ người hiến tặng dưới sự đồng ý có hiểu biết và được thử nghiệm về khả năng trung hòa virus HRSV *in vitro*. Đối với thử nghiệm trung hòa, các mẫu huyết thanh trước tiên được pha loãng liên tục và sau đó được ủ với 600 pfu của chủng hRSV-A biểu hiện protein huỳnh quang màu xanh lá cây được tăng cường (RSV-GFP). RSV-GFP được trộn theo tỷ lệ 1:1 với các dung dịch pha loãng huyết thanh với tổng thể tích 200 μ l mỗi lỗ trong các đĩa đáy chữ U 96 lỗ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau đó, 100 μ l hỗn hợp trên mỗi lỗ được chuyển sang các đĩa cấy tế bào HEp-2 (15.000 tế bào mỗi lỗ). Các đĩa này được quét trên acumen® Cellista (TTP LabTech, Cambridge, MA) và dữ liệu được xuất dưới dạng số sự kiện GFP và tổng cường độ huỳnh quang trên mỗi lỗ. Các giá trị NT50 được tính toán bằng cách sử dụng GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) bằng cách làm phù hợp đường cong bốn thông số. Độ chuẩn liên kết ELISA với protein F của RSV tiền dung hợp và protein F của RSV sau dung hợp được thực hiện như dưới đây. Các đĩa Nunc C96 Maxisorp® Nunc-Immuno™ (Thermo Scientific, Inc.) được phủ 50 μ l mỗi lỗ chứa hRSV F tiền dung hợp (Xem McLellan *et al.*, 2013, *Science* 342:592) hoặc protein F sau dung hợp (protein F sau dung hợp LZf21 bao gồm vùng ngoại bào F kiểu đại mà không có peptit dung hợp (Xem McLellan *et al.*, 2011, *J. Virol* 85:7788)) ở 1 μ g/ml trong PBS ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các đĩa được rửa bằng PBS/Tween 20 và sau đó được phong bế bằng 3% sữa không béo trong PBS. Sau đó, 50 μ l mẫu huyết thanh được pha loãng lần lượt được bổ sung vào mỗi lỗ và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 90 phút. Các đĩa được rửa và IgG ở người kháng thể được liên hợp HRP (SouthernBiotech, Birmingham, AL) được bổ sung vào với tỷ lệ pha loãng 1:2.000. Một giờ sau, các đĩa được rửa và phát triển bằng dung dịch SuperBlu Turbo TMB (ViroLabs, Inc., Sterling, VA). Số đọc OD450nm thu được bằng cách sử dụng máy đếm nhiều nhãn Wallac 1420 VICTOR2™ (Perkin Elmer, Waltham, MA). Các giá trị EC50 được tính toán

bằng cách sử dụng GraphPad Prism 6 bằng cách làm phù hợp đường cong bốn thông số. Nhóm nhỏ người hiến tặng chứng minh sự trung hòa HRSV cao và độ chuẩn liên kết bị thu hồi để thu được thể tích máu lớn hơn cho việc tạo PBMC. Việc chuẩn bị PBMC được thực hiện bởi nhà cung cấp thương mại và PBMC đã mua được bảo quản bằng nitơ lỏng cho đến khi sử dụng tiếp.

PBMC từ một đối tượng được chứng minh độ chuẩn trung hòa tốt và cũng có độ chuẩn cao nhất trong thử nghiệm liên kết ELISA với protein F sau dung hợp cũng như một trong số các chất kết dính cao cấp với protein F tiền dung hợp (dữ liệu không được thể hiện). Do đó, PBMC của người hiến tặng được lựa chọn để phân lập các tế bào B ghi nhớ đặc hiệu F sau dung hợp bằng cách phân loại FACS.

Protein F sau dung hợp trime được biotinyl hóa (LZF21) được điều chế bằng cách biotinyl hóa LZF21 (McLellen *et al.*, 2011, J. Virol 85:7788) bằng cách sử dụng kit biotinyl hóa E-Z Link™ Sulfo-NHS-LC (Life Technologies, Grand Island, NY) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Protein LZF21 bao gồm vùng ngoại bào protein F kiểu đại mà không có peptit dung hợp (McLellen *et al.*, 2011, J. Virol 85:7788). Khôi lai 4D7 ở chuột đặc hiệu protein F dung hợp (4D7 là khôi lai ở chuột nhất mà được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch chuột nhất Balb/c bằng virus RSV A2). Chuột nhất Balb/c được tạo miễn dịch hai lần, trong màng bụng, bằng virus RSV A2 và được tăng cường ba ngày trước khi dung hợp, bằng cách sử dụng 20 µg RSV A2 được tinh chế (Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD), bằng cách tiêm trong tĩnh mạch. Lá lách được thu và các tế bào lá lách được dung hợp với các tế bào u tủy SP2/0 bằng cách sử dụng polyetylen glycol. Các tế bào được bổ sung vào môi trường D (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC), được đặt trong 245 mm x 245 mm đĩa petri vuông và được ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong 2 tuần. Các khuẩn lạc riêng lẻ được lấy ra bằng cách sử dụng ClonePix (Genetix), được chuyển vào đĩa 96 lỗ và được ủ như trên trong 1 tuần. Dịch nổi bề mặt sau đó được sàng lọc đối với hoạt tính kháng RSV bằng ELISA kháng lại RSV A2 được tinh chế. Các dòng vô tính dương tính, bao gồm 4D7, được mở rộng và còn được tách dòng phụ bằng cách hạn chế pha loãng. Dòng vô tính phụ được sàng lọc như được mô tả ở trên và 4D7-8 được xác định và được sử dụng để tối ưu hóa sự nhuộm LZF21-biotin đối với các tế bào B ghi nhớ bằng FACS (dữ liệu không được thể hiện). Thông qua các thử nghiệm tối ưu hóa này, được xác định

là 1,5 µg/ml LZF21-biotin là nồng độ tốt nhất để nhuộm các tế bào B ghi nhớ F đặc hiệu sau dung hợp. Tính đặc hiệu của phản ứng nhuộm được chứng minh bằng cách sử dụng khối lai chuột không thích hợp làm đối chứng âm và cạnh tranh liên kết với sự dư 100-1000X của LZF21 không được đánh dấu.

Các tế bào B ghi nhớ đặc hiệu kháng nguyên được mô tả là CD3⁺CD19⁺IgG⁺LZF21⁺. Các tế bào này được phân loại vào các đĩa 96 lỗ (một tế bào/lỗ) chứa phối tử CD40 biểu hiện dòng tế bào HEK293 (được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn) và IL-21 (Sino Biological Inc., North Wales, PA). Ngoài 30 mẫu được phân loại, dịch nổi bề mặt từ 6 lỗ được chứng minh liên kết với protein F sau dung hợp trong thử nghiệm ELISA (được thực hiện như được mô tả ở trên). Các mẫu này cũng được liên kết với protein F tiền dung hợp (dữ liệu không được thể hiện). Sáu mẫu này sau đó được kiểm tra trong thử nghiệm trung hòa, như được mô tả ở trên, mà không pha loãng. Sự có mặt của hoạt tính trung hòa được xác định dựa trên sự giảm của sự kiện GFP. Trong sáu mẫu, hai trong số chúng (RB1 và RB11 được thiết kế) thể hiện sự trung hòa hoàn toàn chủng HRSV-A (Xem bảng 3).

Bảng 3

Well ID	ELISA 450nm			Sự trung hòa	
	IgG	F sau dung hợp	F tiền dung hợp	GFP Đối tượng#	% Trung hòa
A8	0,641	1,743	1,222	783	
A9	1,743	1,915	1,754	689	
A11	1,81	1,905	1,555	500	
B1	1,82	1,925	1,910	0	100%
B11	1,851	1,748	1,900	1	100%
B12	1,801	1,838	1,679	548	
Đối chứng	0,037	0,038	0,044	596	

Chiết ARN và RT-PCT đối với môi trường nuôi cấy tế bào B ghi nhớ được phân loại một lần

Phần 1:

ARN từ đĩa 96 lỗ từ dịch tan RB1 hit được chiết bằng cách sử dụng RNeasy[®] Micro Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ ARN được xác định bằng NanoDrop[™] 2000C (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE) dưới UV 260 nm. ARN được chiết từ lỗ RB1 được sử dụng làm khuôn trong kỹ thuật khuếch đại RT-PCR của gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể bằng cách sử dụng trình tự đoạn môi bằng cách sử dụng trình tự dẫn đầu (xuôi) và đầu C' của IgG JH, vùng hằng định Kapa hoặc vùng hằng định Lamda (ngược).

Kit RT-PCR một bước (OneStep RT-PCR kit) (Qiagen Inc, Valencia, CA) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất để khuếch đại trình tự kháng thể. Điều kiện của PCR như sau đây: 50°C trong 30 phút, 95°C trong 15 phút, [94°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút] x 40, 72°C trong 10 phút, và giữ ở nhiệt độ 4°C.

Sản phẩm RT-PCR được sử dụng trực tiếp làm khuôn đối với PCR lồng ghép.

Phần 2: PCR lồng ghép

Các sản phẩm RT-PCR được sử dụng làm khuôn trong PCR lồng ghép để khuếch đại vùng biến đổi kháng thể bằng pfx50 ADN polymeaza (Invitrogen, danh mục số: 12355-012). Thiết kế đối với các đoạn môi PCR lồng ghép là dựa trên trình tự dòng mầm của vùng khung làm việc 1 của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ IgG ở người.

1 µl sản phẩm RT-PCR được trộn với 2,5 µl 10X đệm PCR, 2,5 µl 10X PCRX chất tăng cường (Invitrogen), 0,5 µl dNTP hỗn hợp, 0,5 µl tập hợp môi xuôi (mỗi môi 10 µM), 0,5 µl môi ngược (10 µM), 0,5 µl pfx50 ADN polymeaza và 17 µl nước. Điều kiện của PCR lồng ghép là: 2 phút ở nhiệt độ 94°C, 10 chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, 50°C trong 30 giây, 68°C trong 1 phút, sau đó là 30 chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây, 68°C trong 1 phút, sau đó 7 phút kéo dài ở nhiệt độ 68°C, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C để bảo quản ngắn hạn.

Sản phẩm RB1 PCR lồng ghép của các sản phẩm PCR được khuếch đại VH và VK hoặc VH và VL được sử dụng làm khuôn trong PCR lắp với liên kết đặc hiệu để gắn môi kháng thể gen chuỗi nhẹ và chuỗi nặng cùng nhau để hỗ trợ sự tách dòng truyền bước kế tiếp.

Phần 3. PCR lắp và tách dòng truyền

pfx50 ADN polymeaza (Invitrogen) được sử dụng trong phản ứng này. Mỗi xuôi và ngược được thiết kế để hỗ trợ sự tách dòng truyền của các sản phẩm PCR lắp thành vector tách dòng. 1 μ l sản phẩm PCR lồng ghép chuỗi nặng, 1 μ l sản phẩm PCR lồng ghép chuỗi nhẹ và 1 μ l chất liên kết được trộn với 5 μ l 10x đệm PCR, 5 μ l 10x chất tăng cường PCRX, 1 μ l dNTP hỗn hợp, 1 μ l mỗi xuôi (10 μ M), 1 μ l mỗi ngược (10 μ M), 1 μ l pfx50 ADN polymeaza và 33 μ l nước.

Các điều kiện PCR như sau đây: 94°C trong 2 phút, [94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây, 68°C trong 2 phút] x 10, [94°C trong 30 giây, 65°C trong 30 giây, 68°C trong 2 phút] x 30, 68°C trong 7 phút, giữ ở nhiệt độ 4°C.

Các sản phẩm PCR lắp được tinh chế trên gel agarosa để tách dòng truyền (sản phẩm RB1 VH+VK PCR lắp xung quanh 1,2 kb được thu). Sản phẩm RB1 VH+VK PCR lắp được tách dòng thành vector pMab11Exp2 (với trình tự dẫn đầu OmpA để biểu hiện chuỗi nhẹ, với trình tự dẫn đầu PelB để biểu hiện chuỗi nặng) bằng việc áp dụng việc tách dòng truyền. Kit tách dòng HD® truyền (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) được sử dụng và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thẻ biến nạp được lấy ra và được gửi tới GeneWiz, Inc. (South Plainfield, NJ) để giải trình tự.

Các kết quả giải trình tự được phân tích bằng Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Nucleotit và trình tự axit amin của RB1 được mô tả trong bảng 7 (trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi của RB1 được phân lập ở bệnh nhân được thể hiện bằng SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 8, một cách tương ứng). Do thiết kế của các môi ngược Jh có sự thay đổi nucleotit, isoleuxin có mặt trong trình tự tự nhiên ở vị trí 125 được thay đổi thành threonin trong các protein được biểu hiện (chuỗi nặng biến đổi RB1 tạo thành được thể hiện bằng SEQ ID NO: 7). Trình tự axit amin của gen miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể RB1 được gửi tới GenScript USA, Inc. (Piscataway, NJ) để tối ưu hóa codon và biến đổi IgG1 ở người và sự biểu hiện và sản xuất tạm thời CHO. ADN được tổng hợp được tách dòng phụ thành vector pTT5 đối với sự biểu hiện tế bào CHO-3E7. Plasmid tái tổ hợp mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mỗi kháng thể được chuyển nhiễm đồng thời tạm thời

vào môi trường nuôi cấy tế bào CHO-3E7. Dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào được thu vào ngày 6 được sử dụng để tinh chế qua cột Protein A. IgG1 ở người RB1 đã tinh chế được sử dụng trong thử nghiệm trung hòa và các thí nghiệm xác định đặc tính khác như được mô tả trong ví dụ 2.

Ví dụ 2: Xác định đặc tính của kháng thể kháng hRSV

RB1 được liên kết với cả protein F tiền dung hợp và protein F sau dung hợp trong thử nghiệm ELISA như được mô tả trong ví dụ 1 với EC₅₀ nằm trong khoảng từ 1 đến 10 ng/ml, trong đó kháng thể D25 (Xem Kwakkenbos *et al.*, 2010, *Nature Medicine* 16:123–128) được liên kết ưu tiên với F tiền dung hợp. Xem các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1B.

mAb ID	F tiền dung hợp (EC ₅₀ ng/ml)	F sau dung hợp (EC ₅₀ ng/ml)
D25	8,939	>10.000
palivizumab	17,37	10,5
RB1	7,053	14,08

Sự trung hòa đối với RB1, RB 11, và một số kháng thể tiêu chuẩn được báo cáo trong tài liệu tham khảo (D25, palivizumab, chiều dài đầy đủ [kháng thể D25 được tạo ra trong nhà dựa trên trình tự được công bố và SYNAGIS® (palivizumab) được mua từ Myoderm, Norristown, PA]) được so sánh trong chủng RSV A Long (ATCC số VR-26™) và RSV B Washington chủng 18537 chủng (ATCC số VR-1580™). Các mẫu thử nghiệm được pha loãng lần lượt ba lần trong EMEM có bổ sung 2% FBS được bất hoạt bởi nhiệt, đối với mười một điểm pha loãng. Các mẫu được pha loãng lần lượt sau đó được trộn với thể tích bằng nhau của EMEM có bổ sung 2% FBS được bất hoạt bởi nhiệt chứa 100 pfu/lỗ của các chủng RSV A hoặc B. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, 100 µl tế bào HEp-2 ở nồng độ 1,5x10⁵ tế bào/ml được chuyển vào đĩa 96 lỗ chứa hỗn hợp virus/kháng thể. Vào 3 ngày sau khi nhiễm, các tế bào được rửa một lần bằng PBS và sau đó được cố định trong 80% axeton trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp chứa mAbs chuột nhắt đặc hiệu RSV F (mAb143-F3-B138) và RSV N (34C9) (thu được trong nhà) được bổ sung vào các đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa bằng PBS/0,05% Tween 20 và IgG kháng chuột nhắt ở ngựa được biotinyl hóa được bổ sung vào các đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa bằng

PBS/0,05% Tween. Streptavidin nhuộm tia hồng ngoại được sử dụng để phát hiện tín hiệu đặc hiệu RSV và hai lần nhuộm tế bào đối với sự tiêu chuẩn hóa thử nghiệm được bổ sung vào đĩa 96 lỗ và được ủ trong 1 giờ trong bóng tối. Sau 1 giờ ủ, các đĩa được rửa, được làm khô trong không khí trong 20 phút trong bóng tối và được đọc trên hệ thống hình ảnh tự động Licor Aeries® (Licor Aeries® Automated Imaging System) sử dụng laze kênh 700 để tiêu chuẩn hóa tế bào và laze kênh 800 để phát hiện tín hiệu cụ thể RSV. Tỷ lệ 800/700 và sự tiêu chuẩn hóa theo phần trăm được tính toán và các giá trị IC50 được xác định bằng sự phù hợp đường cong bốn thông số trong GraphPad.

RB1 có thể trung hòa các chủng RSV-A và RSV-B với hiệu lực bằng nhau (IC50 bằng 1-5 ng/ml). RB1 cũng chứng minh sự trung hòa kháng RSV cao hơn so với các kháng thể tiêu chuẩn. Xem các hình vẽ từ Fig.2A đến Fig.2B và Bảng 4.

Bảng 4: Hiệu lực liên kết và trung hòa của RB1 so với kháng thể tiêu chuẩn

	Liên kết F tiền dung hợp	Liên kết F sau dung hợp	Hoạt tính trung hòa, IC50 (ng/mL)	
			RSV A/Long	RSV B/washington
RB1	+	+	3	1,7
D25	+	-	3,6	25,9
AM22	+	-	50	172,8
131-2A, chuột nhất (Millipore)	+/-	+	1046	>10.000
4D7 (Merck), chuột nhất	+/-	+	2408	>10.000
palivizumab	+	+	211,5	166
MPE8	+	-	106,6	46
101F, chuột nhất	+	+	67	43,6
AM14	+	-	3,2	1,9

Việc xác định ái lực đối với liên kết của RB1 đối với protein F tiền dung hợp và sau dung hợp: Hoạt động liên kết động học của kháng thể RB1 kháng protein F của RSV ở người (thực hiện như được mô tả trong ví dụ 1) được xác định bằng cộng

hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng hệ thống Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Xấp xỉ 5000 RU của IgG kháng chuột nhất, GE Healthcare Catalog Number BR-1008-38, hoặc xấp xỉ 13.000 RU của IgG Fc gamma chuột nhất kháng dê, mảnh cụ thể, Jackson ImmunoResearch Catalog Number 112-006-071, được cố định nhờ hóa học liên kết amin trên chip cảm ứng Series S CM5, catalog số BR-1005-30.

Biểu đồ cảm biến liên kết phép trừ nền (Background subtraction binding sensorgram) được sử dụng để phân tích hằng số tốc độ liên kết (k_a) và phân ly (k_d), và hằng số phân ly cân bằng K_D . Bộ dữ liệu tạo thành được làm phù hợp với mô hình liên kết Langmuir (Langmuir Binding Model) 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 (phiên bản 2.0). Bảng 5 tóm tắt ái lực của kháng thể kháng protein F của RSV ở người dạng tiền dung hợp và sau dung hợp của protein F của RSV.

Bảng 5: Xác định ái lực đối với RB1 với RSV F tiền dung hợp và F sau dung hợp bằng cách sử dụng BIAcore

Protein	$K^{\text{bật}}$ (M-1S-1)	$K^{\text{tắt}}$ (S-1)	K_D (nM)
F tiền dung hợp	$4,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-4}$	0,031
F sau dung hợp	$2,2 \times 10^6$	9×10^{-4}	0,41

RB1 là chất kết dính rất tiềm năng của protein F tiền dung hợp với K_d bằng ~ 31 pM. K_d đối với liên kết sau dung hợp là cường độ thấp hơn ở 0,41 nM. K_d đối với D25 như được báo cáo trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014121021 A1 bằng 57 pM. Ngoài ra, kháng thể RB1 tồn tại lâu hơn trên F tiền dung hợp so với sau dung hợp như đã thấy với tốc độ giảm chậm hơn là $1,4 \times 10^{-4}$ so với protein F sau dung hợp.

Ví dụ 3: Lập bản đồ epitop của kháng thể RB1

Epitop liên kết của RB1 trên protein F dung hợp được lập bản đồ bằng cách thực hiện thử nghiệm gây đột biến quét alanin. Việc lập bản đồ epitop được thực hiện bằng cách gây đột biến bằng súng bắn gen ở Integral Molecular như được mô tả. (Davidson and Doranz, 2014, Immunology 143(1): 13-20). Để xây dựng thư viện gây đột biến bằng súng bắn gen, vectơ biểu hiện protein F của RSV được gây đột biến để tạo ra thư viện dòng vô tính, mỗi vectơ thể hiện đột biến điểm riêng rẽ và tích tụ bao gồm tất cả các góc từ trong protein. Thư viện được xây dựng bằng cách sử dụng

phương pháp gây đột biến quét alanin, cung cấp một phương pháp được kiểm soát nhiều hơn để xác định các đóng góp chuỗi bên của từng gốc. Bằng cách sử dụng các giao thức rô-bốt bán tự động, mỗi plasmit đột biến được tách dòng riêng lẻ, được giải trình tự, lắp lại nhỏ và được sắp xếp theo dãy ở định dạng vi đĩa 384 lỗ cho các thử nghiệm chuyển nhiễm được lắp lại, biểu hiện và các thử nghiệm liên kết kháng thể ở các tế bào của người. Thư viện đột biến quét alanin được sàng lọc kháng lại RB1 để làm mất liên kết kháng thể. Hai gốc arginin-429 và isoleuxin-432 được xác định là rất quan trọng đối với liên kết RB1. Xem dưới đây và Fig.3A. RB1 dường như là mAb vị trí IV (như 101F) và kháng thể liên kết vị trí IV trong tài liệu đã được báo cáo là liên kết cả F tiền dung hợp và sau dung hợp.

Tính phản ứng liên kết (% WT)			
Đột biến	RB1 MAb	RB1 Fab	D25 MAb
R429A	33,1 (27)	5,1 (4)	385,0 (13)
I432A	36,7 (39)	3,6 (7)	327,8 (161)

Chúng tôi còn được tạo kết tinh đồng thời RB1 Fab với protein F tiền dung hợp để hiểu hơn về epitop liên kết. Dữ liệu nhiễu xạ được thu từ các tinh thể ở 3,4-3,5Å°. Kháng thể RB1 liên kết với protein F tiền dung hợp thông qua các tương tác với vòng CDR của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vòng CDR3 chuỗi nhẹ tương tác với chuỗi bên của Arg 429 thông qua việc tạo thành hai liên kết hydro giữa oxy thuộc nhóm cacbonyl của Phe 91 và Leu 92 và nitơ thuộc nhóm guanidino của Arg 429. Ngoài ra trên chuỗi nhẹ, Asp 50 và Glu 55 trên vòng CDR2 được định vị để tạo ra liên kết hydro với Asn 426 và Lys 445 của RSV. Tương tác rộng hơn được thực hiện thông qua vòng CDR3 của chuỗi nặng của RB1, với Tyr 104 và Tyr 110 tạo ra bề mặt cho tương tác van der Waals với Ile 432 trên RSV. Lys 433 của RSV tạo ra liên kết hydro với Asn 107 của vòng CDR3. Từ cấu trúc tinh thể, chuỗi nhẹ của RB1 cũng sắp xếp chống lại Glu 161 và Ser 182 hoặc monome liền kề của trime RSV tiền dung hợp.

Epitop liên kết được xác định đối với RB1 được bảo toàn ở mức cao trong số các trình tự protein F từ 944 đến 946 được báo cáo trong tài liệu. Điều này gợi ý rằng sự kháng lại các kháng thể với vùng này sẽ được mong đợi là thấp.

Ví dụ 4: Hoạt tính kháng RSV của kháng thể RSV trong mô hình động vật

Kháng thể RB1 được so sánh với D25 và palivizumab về khả năng bảo vệ trong

mô hình thử thách chuột bông. Nghiên cứu này bao gồm palivizumab, các kháng thể D25 và RB1 được đưa ra ở 2,5 mg/k và được pha loãng lần lượt từ 10 lần đến 0,25 mg/mk. Trong mô hình của liệu pháp miễn dịch thụ động, chuột bông là RB1, D25 hoặc palivizumab nhất định ở nồng độ khác nhau ở d0 và được thử thách bằng 10^5 pfu chứa RSV một ngày sau đó. Độ chuẩn mũi và phổi của virus RSV được thử thách bốn ngày sau khi thử thách và được sử dụng để xác định virus chảy nhờ thử nghiệm màng bám.

Chuột bông: Ít nhất năm con chuột bông (*Sigmodon hispidus*), 3-7 tuần tuổi có thể trọng trung bình xấp xỉ 100 gam thu được từ phòng thí nghiệm SAGE (SAGE Lab) (Boyertown, PA). Thức ăn cho động vật gặm nhấm thông thường và nước được cung cấp tùy ý.

Chất thử kháng thể: Palivizumab 100 mg được làm đông khô (Myoderm, Norristown, PA) được bào chế trong nước ở 100 mg/ml. Các kháng thể khác được biểu hiện và được tinh chế trong nhà.

Dạng bào chế của các chất thử kháng thể: Dung dịch đệm bào chế là đặc hiệu đối với mỗi kháng thể để làm ổn định protein và ngăn ngừa sự kết tủa. Dạng bào chế là như sau: RB1 và D25 được pha loãng trong 1x Nước muối Đệm Phosphat, độ pH=7,2. Palivizumab được bào chế theo đề nghị của nhà sản xuất bằng cách hòa tan trong H₂O chưng cất mà sẽ đệm hiệu quả protein trong 25 mM histidin và 1,3 mM glyxin có độ pH=6,0.

Dạng bào chế dung dịch theo liều dùng, cách dùng, và phân tích:

Năm con vật được cân ngẫu nhiên để xác định khối lượng trung bình của các tập hợp được sử dụng. Các dạng bào chế được chuẩn bị khoảng một giờ trước khi dùng cho con vật. Dung dịch gốc của kháng thể đông lạnh được làm tan bằng trên đá ướt trong một lần tan băng. Mỗi kháng thể được pha loãng đến nồng độ liều thích hợp được phân phối cho từng nhóm. Vào ngày 0 (bắt đầu nghiên cứu) các con vật được chỉ định ngẫu nhiên vào mỗi nhóm được gây mê nhẹ bằng thuốc gây mê 1-4% isofluran và tiêm 0,1 ml vào cơ tứ đầu bên phải trong cơ bằng ống tiêm và kim tiêm 26G. Các con vật được hồi phục sau tác dụng của thuốc gây mê trong hai phút. Khoảng 24 giờ sau (+/- 2 giờ), chuột bông được gây mê bằng 1-4% isofluran, dẫn

máu qua đám rối sau hốc mắt và sau đó ngay lập tức được đưa qua lỗ mũi với 0,1 ml chứa $1 \times 10^{5,5}$ pfu của virus kiểu đại Washington RSV A2 hoặc RSV B trong môi trường Williams E. Bốn ngày sau khi ủ, các con vật bị cho chết trợ tử bằng cách hít CO_2 và phổi (thùy trái) và xương xoắn trong mũi được loại bỏ và được làm đồng nhất trong 10 thể tích dung dịch muối cân bằng Hanks (Lonza) chứa dung dịch đệm Sucroza Phosphat Glutamin (SPG) trên đá ướt. Các mẫu được làm trong bằng cách ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 10 phút, chia phần mẫu, đông lạnh nhanh, và bảo quản đông lạnh ngay lập tức ở nhiệt độ -70°C cho đến khi được thử nghiệm trong thử nghiệm mảng bám.

Như được mô tả trên các hình vẽ từ Fig.4A đến Fig.4D và các hình vẽ từ Fig.5A đến Fig.5D, RB1 có thể đạt được sự giảm 2-3 log về hiệu giá virus đối với cả RSV A và RSV B trong phổi và mũi ở liều 2,5 mpk liều tương tự như D25 nhưng tốt hơn palivizumab mà không thể tác động hiệu giá virus trong mũi.

Ví dụ 5: Thiết kế Fc của RB1

Thụ thể Fc mới tạo ra đối với IgG (FcRn) được xác định đặc điểm tốt trong việc chuyển miễn dịch thể dịch thụ động từ mẹ sang thai nhi. Ngoài ra, trong suốt cuộc đời, FcRn bảo vệ IgG khỏi sự phân hủy, theo đó giải thích thời gian bán thải kéo dài của lớp này của kháng thể trong huyết thanh. Xem, ví dụ, Israel et al., 1996, *Immunology* 89:573-8. FcRn liên kết với phần Fc của IgG ở vị trí khác biệt với vị trí liên kết của FcγRs cổ điển hoặc thành phần C1q của bổ thể. Cấu trúc đồng tinh thể FcRn–Fc chỉ ra rằng FcRn liên kết với vùng bản lề CH2–CH3 của kháng thể IgG. Đặc điểm riêng biệt của con đường IgG–FcRn bắt buộc phụ thuộc vào độ pH. Liên kết IgG–FcRn thu được bằng độ pH có tính axit (6,0) trong lysosom, trong khi sự phân ly xảy ra ở độ pH trung tính (7,4) của môi trường ngoại bào. Sự axit hóa (độ pH=6,0– 6,5) trong lysosom làm cho liên kết của FcRn với vùng Fc của IgG bằng ái lực micromol thấp và bảo vệ nó khỏi sự dị hóa. IgG liên kết FcRn được bảo vệ sau đó được đưa lên bề mặt tế bào và giải phóng vào môi trường ngoại bào. Quá trình này bảo vệ kháng thể bằng cách làm giảm sự tiếp xúc của chúng với sự phân hủy ngoại bào.

Kháng thể RB1 được thiết kế Fc trong nỗ lực để cải thiện thời gian bán thải. RB1+YTE là dẫn xuất của RB1 với đột biến ba (M252Y/S254T/T256E (YTE)) được

đưa vào phần Fc của RB1. Bộ đột biến YTE này cải thiện kháng thể liên kết với các thụ thể Fc mới dẫn đến thời gian bán thải dài hơn ở người. Xem, ví dụ, Dall'Acqua *et al.*, 2006, J Biol Chem. 281:23514-24. Các đột biến trong 3 axit amin (YTE: M252Y/S254T/T256E) nằm trong vùng Fc của motavizumab dẫn đến sự tăng gấp 10 lần trong liên kết FcRn *in vitro* ở độ pH=6,0 đối với cả ở người và khỉ kết quả là dẫn đến sự tăng gấp 4 lần thời gian bán thải trong huyết thanh *in vitro* ở khỉ. Xem Robbie *et al.*, 2013, Antimicrob Agents Chemother. 57:6147-53.

Các trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể RB1+YTE được gửi đến GenScript USA, Inc. (Piscataway, NJ) cho việc tối ưu hóa codon và chuyển hóa IgG1 ở người và sự biểu hiện và sản xuất tạm thời CHO. Nucleotit và trình tự axit amin của RB1+YTE được mô tả trong bảng 7.

Các ADN đã tổng hợp được tách dòng phụ thành vectơ pTT5 đối với sự biểu hiện tế bào CHO-3E7. Plasmid tái tổ hợp mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mỗi kháng thể được chuyển nhiễm đồng thời tạm thời vào môi trường nuôi cấy tế bào CHO-3E7. Dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào được thu vào ngày 6 được sử dụng để tinh chế thông qua cột Protein A. IgG1 ở người RB1+YTE được tinh chế được sử dụng trong thử nghiệm trung hòa và các thử nghiệm xác định đặc tính khác.

Ví dụ 6: Xác định đặc tính của RB1+YTE

RB-1+YTE liên kết với protein F trong thử nghiệm ELISA được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 1 với EC50 nằm trong khoảng từ 1,97 đến 2,457 ng/ml. Xem Fig.6. Sự trung hòa đối với RB1+YTE, và kháng thể tiêu chuẩn được báo cáo trong tài liệu (Motavizumab, MedImmune, Gaithersburg, MD; xem Công bố đơn sáng chế Mỹ số US20110158985) được thực hiện trong nhà dựa trên trình tự được công bố, được so với chủng RSV A Long (ATCC số VR-26™) và chủng RSV B Washington chủng 18537 (ATCC số VR-1580™). Các mẫu kiểm tra được pha loãng lần lượt ba lần trong EMEM được bổ sung 2% FBS bị bất hoạt bởi nhiệt, đối với mười một điểm pha loãng. Các mẫu được pha loãng lần lượt sau đó được trộn bằng thể tích bằng nhau của EMEM có bổ sung 2% FBS bị bất hoạt bởi nhiệt chứa 100 pfu/lỗ chứa các chủng RSV A hoặc B. Sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, 100 µl chứa các tế bào HEp-2 ở nồng độ $1,5 \times 10^5$ tế bào/ml được chuyển vào đĩa 96 lỗ chứa hỗn hợp virus/kháng thể. 3 ngày sau nhiễm trùng, các tế bào được rửa một lần bằng PBS và sau đó được cố

định trong 80% axeton trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp chứa RSV F (mAb143-F3-B138) và RSV N (34C9) mAbs ở chuột nhất đặc hiệu (mAb143-F3-B138 và 34C9 là kháng thể trong nhà thu được bằng cách tạo miễn dịch chuột nhất với kháng nguyên tương ứng và sự cố định của các tế bào B bằng cách sử dụng kỹ thuật lai) được bổ sung vào các đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa bằng PBS/0,05% Tween 20 và IgG kháng chuột nhất ở ngựa được biotyl hóa được bổ sung vào các đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa bằng PBS/0,05% Tween. Streptavidin nhuộm tia hồng ngoại được sử dụng để phát hiện tín hiệu đặc hiệu RSV và sự lần nhuộm hai tế bào đối với sự tiêu chuẩn hóa thử nghiệm được bổ sung vào đĩa 96 lỗ và được ủ trong 1 giờ trong bóng tối. Sau 1 giờ ủ, các đĩa này được rửa, được làm khô trong không khí trong 20 phút trong bóng tối và được đọc trên Hệ thống hình ảnh tự động Licor Aeries® (Licor Aeries® Automated Imaging System) bằng cách sử dụng laze kênh 700 đối với sự tiêu chuẩn hóa tế bào và laze kênh 800 để phát hiện tín hiệu đặc hiệu RSV. Tỷ lệ 800/700 và sự tiêu chuẩn hóa theo phần trăm được tính toán và các giá trị IC₅₀ được xác định bằng sự phù hợp đường cong bốn thông số trong GraphPad.

RB-1+YTE có thể trung hòa các chủng RSV-A và RSV-B với hiệu lực bằng nhau (IC₅₀ bằng 5-10 ng/ml). Xem bảng 6.

Bảng 6: Xác định sự trung hòa và ái lực đối với RB1+YTE với RSV F tiền dung hợp và F sau dung hợp

Mab	Trung hòa IC ₅₀ <i>In vitro</i> (ng/ml)		Hằng số động học (F tiền dung hợp)			Hằng số động học (F sau dung hợp)		
	RSV A	RSV B	K _{hà} (M-1s-1)	K _{tắt} (s-1)	K _D (nM)	K _{hà} (M-1s-1)	K _{tắt} (s-1)	K _D (nM)
RB-1	3	1,7	4,4x10 ⁶	1,4x10 ⁻⁴	0,031	2,2x10 ⁶	9x10 ⁻⁴	0,41
RB-1+ YTE	3,6	3,49	3,2x10 ⁶	2,3x10 ⁻⁴	0,071	1,4x10 ⁶	7x10 ⁻⁴	0,48

Việc đưa vào các đột biến YTE trong phần Fc của RB1 không thay đổi hiệu lực của kháng thể *in vitro* để trung hòa các chủng RSV A và B. Hiệu lực trung hòa *in vitro* đối với RSV A là 3 và 3,6 ng/ml đối với RB1 và RB1+YTE, một cách tương ứng. Hiệu lực đối với sự trung hòa *in vitro* đối với RSV B là 1,7 và 3,49 ng/m đối với RB1 và RB1+YTE, một cách tương ứng. Hằng số động học được xác định bằng

Biocore tương tự đối với RB1 và RB1+YTE gợi ý rằng việc đưa vào YTE trong vùng Fc của kháng thể không làm thay đổi các đặc tính liên kết kháng nguyên của nó.

Nghiên cứu được động học không GLP (Thực hành phòng thí nghiệm tốt - Good Laboratory Practice) được thực hiện ở New Iberia Research Center (UL Lafayette, LA). Tám con khỉ Rhesus được chưa qua thử nghiệm sinh học được chọn ngẫu nhiên và được chỉ định vào một trong hai nhóm nghiên cứu ($n=4$ cho mỗi nhóm). Mỗi con vật dùng liều đơn trong tĩnh mạch (i.v.) chứa RB1+YTE) hoặc Motavizumab-YTE với lượng 10 mg/kg. Các mẫu máu được rút trước khi dùng liều vào ngày 0, ở thời điểm 0,5, 1, 3, 8 giờ sau khi dùng liều, và ở thời điểm 1, 2, 3, 5, 7 và 10 ngày sau khi dùng liều. Các thử nghiệm miễn dịch dựa vào ECL được sử dụng để định lượng cả RB1+YTE (người x [RSV] mAb (RB1-YTE) IgG1 / Kapa (CE)) và Motavizumab_YTE (được làm giống người x[RSV] mAb IgG1 / Kapa) trong huyết thanh của khỉ Rhesus.

Thử nghiệm sử dụng chuột nhắt chuỗi kapa kháng IgG ở người được biotinyl hóa (BD Biosciences, San Jose, CA) là chất phản ứng bắt giữ và Fc của chuột kháng IgG ở người sulfoTAG là chất thử phát hiện (SouthernBiotech Birmingham, AL). Giới hạn định lượng thấp hơn (Lower Limit of Quantification - LLOQ) của thử nghiệm được xác định là 1,37 ng/ml với sự pha loãng được yêu cầu tối thiểu (Minimum Required Dilution - MRD) là 20.

Dược động học của RB1+YTE và Motavizumab-YTE được đánh giá lên đến 10 ngày ở khỉ đuôi ngắn Rhesus được dùng liều trong tĩnh mạch ở 10 mg/kg bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch tương tự để định lượng RB1+YTE và Motavizumab-YTE. Đối với mỗi con vật, mô hình không khoan vùng được làm phù hợp với dữ liệu nồng độ trong huyết thanh của mỗi con vật bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 6.3 (Certara, NJ) để ước tính diện tích dưới đường cong (AUC_{0-10 ngày}). AUC_{0-10 ngày} được tính trung bình qua 4 con vật đối với mỗi nhóm điều trị và được báo cáo là $\pm$ độ lệch chuẩn trung bình. Đối với RB1+YTE, AUC_{0-10 ngày} = 1159 ± 116 $\mu\text{g/mL} \cdot \text{ngày}$ và đối với Motavizumab-YTE, AUC_{0-10 ngày} = $1381 \pm 63,0$ $\mu\text{g/mL} \cdot \text{ngày}$

RB1+YTE (được miêu tả là RB1-YTE trong chú thích trên hình vẽ) và Motavizumab-YTE thể hiện profin nồng độ huyết thanh tương tự và được động học

ở khi đuôi ngắn Rhesus. Xem Fig. 7. RB1+YTE PK trong NHP cũng được phát hiện có thể so sánh được với motavizumab-YTE PK ở khi đầu chó được báo cáo trong tài liệu. Xem Dall'Acqua et al., 2006, J Biol Chem, 281:23514-24.

Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa đây bằng cách viện dẫn ở cùng mức độ như thể mỗi công bố riêng lẻ, mục nhập cơ sở dữ liệu (ví dụ, các trình tự ngân hàng gen (Genbank) hoặc mục nhập GeneID), đơn sáng chế, hoặc bằng sáng chế, được chỉ ra cụ thể và riêng rẽ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Phần trình bày được đưa vào bằng cách viện dẫn được dự định bởi chủ đơn, theo 37 C.F.R. §1.57(b)(1), liên quan đến mỗi và mọi công bố đơn riêng lẻ, mục nhập cơ sở dữ liệu (ví dụ các trình tự ngân hàng gen (Genbank) hoặc mục nhập GeneID), đơn sáng chế, hoặc bằng sáng chế, mỗi trong số các tài liệu này được xác định rõ ràng theo 37 C.F.R. §1.57(b)(2), ngay cả khi trích dẫn này không liên ngay với phần trình bày riêng đưa vào bằng cách viện dẫn. Việc bao gồm các phần trình bày riêng đưa vào bằng cách viện dẫn, nếu có, nằm trong bản mô tả không làm ảnh hưởng đến phần trình bày chung đưa vào bằng cách viện dẫn theo bất kỳ cách nào. Việc trích dẫn các tài liệu tham khảo trong bản mô tả này không nhằm mục đích thừa nhận rằng tài liệu tham khảo là tình trạng kỹ thuật thích hợp, cũng như không cấu thành bất kỳ sự thừa nhận nào về nội dung hoặc ngày của các công bố hoặc tài liệu này.

Sáng chế không bị giới hạn phạm vi ở các phương án cụ thể được mô tả trong bản mô tả. Thật vậy, nhiều cải biến khác nhau của sáng chế ngoài các nội dung được mô tả trong bản mô tả này sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan từ mô tả nêu trên và các hình vẽ kèm theo. Các cải biến như vậy được dự định là nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ bổ sung.

Bảng 7: Thông tin trình tự

SEQ ID NO:	Mô tả	TRÌNH TỰ
1	RB1 H - CDR1	DSAMS
2	RB1 H - CDR2	FIKSKTYGGTKEYAASVKG
3	RB1 H - CDR3	GAPYGGNSDYYYGLDV
4	RB1 L - CDR1	RTSQDVRGALA
5	RB1 L - CDR2	DASSLET
6	RB1 L - CDR3	QQFLDFPFT
7	RB1 VH	EVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCTVSGFSFDDSDAMSWVRQAPGKGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSKNIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGAPYGGNSDYYYGLDVWGQGT TVTVSS
8	RB1 VL (được phân lập ở bệnh nhân)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSQDVRGALAWYQQKPGKAPKLLIFDASSLETGVPSPRFGSGSGTVFTLTISSLQPEDFAAYYCQQFLDFPFTFGQGT RL EIKRT
9	RB1 VH (được phân lập ở bệnh nhân)	EVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCTVSGFSFDDSDAMSWVRQAPGKGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSKNIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGAPYGGNSDYYYGLDVWGQGT TVIVSS
10	Trình tự dẫn đầu	MGWSCIILFLVATATGVHS
11	RB1 VH + đoạn dẫn đầu	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVLRPGRSLRLSCTVSGFSFDDSDAMSWVRQAPGKGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSKNIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGAPYGGNSDYYYGLDVWGQGT TVTVSS
12	RB1 VL + đoạn dẫn đầu	MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSQDVRGALAWYQQKPGKAPKLLIFDASSLETGVPSPRFGSGSGTVFTLTISSLQPEDFAAYYCQQFLDFPFTFGQGT RL EIKRT
13	Vùng hằng định chuỗi nặng-IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	Vùng hằng định chuỗi nhẹ kapa	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
15	Axit nucleic mã hóa RB1 VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACGGCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCCTGCACAGTTTCTGGATTCA GCTTTGACGACTCTGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGAAGGGGCTGGAATGGATAAGTTTCATTAAAAGTAAAAC TTATGGTGGGACAAAAGAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCA GGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAACATCGCCTAT CTGCAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTA TTATTGTACTAGAGGGGCGCCTTACGGCGGTAAC TCCGATT ACTACTACGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACTGTCTCCTCA
16	Axit nucleic mã hóa RB1 VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGACAAAGTCAGG ACGTTAGAGGTGCTTTAGCCTGGTATCAACAGAAACAGGG AAAGCTCCTAAACTCCTGATCTTTGATGCCTCCAGTTTGGA GACTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGTTTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGAT TTTGCAGCTTATTACTGTGAGCAGTTTCTTGATTTCCCTTT CACCTTCGGCCAGGGGACACGACTGGAAATCAAACGTACG
17	Axit nucleic mã hóa RB1	GAGGTGCAGCTGGTTCGAGAGCGGGGGGGGGCTGGTGCGGCC

	VH (codon được tối ưu hóa)	TGGCAGGTCTCTGAGACTGAGCTGCACCGTGAGCGGCTTCTCCTTTGACGATTCTGCCATGAGCTGGGTGCGGCAGGCTCCA GGCAAGGGACTGGAGTGGATCTCCTTCATCAAGTCTAAGAC CTACGGCGGCACAAAGGAGTACGCCGCTTCCGTGAAGGGCC GGTTTACCATCAGCAGGGACGATTCCAAGAACATCGCCTAT CTGCAGATGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACAGCCGTGTA CTATTGCACAAGAGGAGCTCCTTACGGAGGCAACAGCGACT ACTATTACGGACTGGACGTGTGGGGACAGGGAACACAGTG ACCGTGAGCTCC
18	Axit nucleic mã hóa RB1 VL (codon được tối ưu hóa)	GACATTTCAGATGACTCAGTCCCCTTCAAGTCTGAGCGCCTC CGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCCGGACCAGCCAGG ATGTGCGGGGCGCCCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGC AAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTTTGACGCTAGCTCCCTGGA GACCGGCGTGCCCTCCAGGTTTTCTGGCAGCGGCTCC GGCACAGTGTTTACCCTGACAATCTCTAGCCTGCAGCCTGA GGACTTTGCCGCTTACTATTGCCAGCAGTTCTTGATTTCC CCTTCACCTTCGGCCAAGGCACACGGCTGGAGATCAAGAGG ACC
19	Axit nucleic mã hóa Trình tự dẫn đầu chuỗi nặng	ATGGGTGGTCTGTATTATCCTGTTCTGGTGGCCACTGC TACTGGGTCCACTCA
20	Axit nucleic mã hóa Trình tự dẫn đầu chuỗi nhẹ	ATGGGTGGTCTGTATTATCCTGTTCTGGTGGCAACCGC AACTGGTGTGCATAGC
21	Axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng-IgG1	GCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCACTGGCTCCCTC TTCCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGACACATTTCCAGC TGTGCTGCAGTCCTCTGGCCTGTATTCCCTGAGCTCCGTGG TGACCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGCACCCAGACATACATC TGTAACGTGAATCACAAGCCAAGCAATACAAAGGTGGACAA GAAGGTCGAGCCCAAGTCCTGTGATAAGACCCACACATGCC CCCCTTGTCCTGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTG TTCTGTGTTCCACCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTC TAGGACCCCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCC ACGAGGATCCTGAGGTGAAGTTTAACTGGTACGTGATGGC GTGGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCCAGAGAGGAGCA GTATAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTGTCCAATAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAGACCAT CTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTATA CACTGCCTCCATCCAGAGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTG TCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCTGATAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAATT ATAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCCTTC TTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGATAAGTCCCGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGTTCTGTGATGCACGAAGCCC TGCACAATCACTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTACCT GGTA
22	Axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa	GTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCCCTTCTGACGA GCAGCTGAAGTCTGGCACAGCTAGCGTGGTGTGCCTGTGA ACAATTTCTACCCTCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGGAAGGTGGATAACGCTCTGCAGTCTGG CAATAGCCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCTAAGGATA GCACATATTCCCTGTCTCTACCCTGACACTGTCTAAGGCC GATTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCTTGTGAAGTCAACCA CCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACCAAGTCATTCAATCGGG GCGAGTGC
23	Chuỗi nặng RB1+YTE	EVQLVESGGGLVPRGSLRLSCTVSGFSFDDSSMSWVRQAP GKGLEWISFIKSKTYGGTKEYAASVKGRFTISRDDSKNIAY LQMNSLKTEDTAVYYCTRGAPYGGNSDYFGLDVGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT

		QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTA KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLS LSPGK
24	Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng RB1+YTE (codon được tối ưu hóa)	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGGCGGACTGGTCAGACC TGGCAGATCCCTGAGGCTCAGCTGTACCGTGAGCGGCTTCA GCTTCGACGACTCCGCCATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGATCAGCTTCATCAAGAGCAAAAC CTATGGCGGAACCAAGGAATACGCCGCTCCGTGAAGGGCA GGTTCACCATTTCCAGGGACGACAGCAAGAATCGCTTAC CTCCAGATGAACCTCCCTCAAGACCGAGGATACCGCCGTGTA TTATTGCACACAGAGGCGCCCCCTACGGCGGCAATTCCGACT ATTACTACGGCCTGGATGTCTGGGGCCAAGGCACAACAGTG ACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCT CCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAAGCGGAGGAACAGCCG CCCTCGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCTGTG ACAGTCAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTCCA CACCTTTCCTGCTGTCTGCAGAGCTCCGGCCTGTACAGCC TGTCTTCCTGGTGCAGTGCCTCCTCCAGCCTGGGCACA CAAACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAGGTCGAACCCAAATCCTGTGACAAGA CCCACACATGCCCCCCCCCTGCCCGCCCCCTGAGCTGCTG GGCGGCCCTTCCGTGTTCCCTGCCCTCCCAAGCCCAAGGA TACCTGTATATCACCAGAGAACCCGAGGTGACCTGTGTGG TGGTCGACGTCAGCCACGAAGATCCTGAGGTCAAGTTC AAC TGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAACGCCAAAACCAA GCCCAGGGAGGAACAGTATAACAGCACCTACAGGTGGTGT CCGTCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAG GAGTACAAATGTAAGGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCGTCC TATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAAGGCCAGCCCAGAG AACCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTG ACCAAAAACAGGTCTCCCTGACCTGCCTGGTGAAAGGCTT CTACCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAAAGCAACGGCC AGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTCGAC AGCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAACAAGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCG TGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTATACCCAGAAGTCC CTGAGCCTCAGCCCCGAAAATGA
25	Chuỗi nhẹ RB1+YTE	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSQDVRGALAWYQQKPG KAPKLLIFDASSLETGVPSTRFSGSGSGTVFTLTISSLQPED FAAYYCCQFLDFPFTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPV TKSFNRGEC
26	Axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ RB1+YTE	GACATTGAGTACTGAGTCCCCTTCAAGTCTGAGCGCCTC CGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCCGGACAGCCAGG ATGTGCGGGGCGCCCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGC AAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTTTGACGCTAGCTCCCTGGA GACCGGCGTGCCCTCCAGGTTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCA CAGTGTTACCCCTGACAATCTCTAGCCTGCAGCCTGAGGAC TTTGCCGCTTACTATTGCCAGCAGTTCTGGATTTCCCTT CACCTTCCGGCCAAGGCACACGGCTGGAGATCAAGAGGACCG TGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCCCTTCTGACGAG CAGCTGAAGTCTGGCACAGCTAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CAATTTCTACCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG ATAACGCTCTGCAGTCTGGCAATAGCCAGGAGTCCGTGACC GAGCAGGACTCTAAGGATAGCACATATCCCTGTCTCTAC CCTGACACTGTCTAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTGT ATGCTTGTGAAGTCAACCCAGGGGCTGAGTTCACACAGTC ACCAAGTCATTCAATCGGGGCGAGTGC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với protein F của RSV ở người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6.
2. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với protein F tiền dung hợp RSV ở người có giá trị KD nằm trong khoảng từ khoảng từ khoảng 1×10^{-9} M đến khoảng 1×10^{-12} M như được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc kỹ thuật tương tự (ví dụ, KinExa hoặc OCTET).
3. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.
4. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, là kháng thể có chiều dài đầy đủ có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, trong đó mỗi chuỗi nhẹ bao gồm: vùng biến đổi bao gồm SEQ ID NO: 8 và chuỗi nhẹ kappa ở người (SEQ ID NO: 14); và mỗi chuỗi nặng bao gồm: vùng biến đổi bao gồm SEQ ID NO: 7 và vùng hằng định IgG1 ở người (SEQ ID NO: 13).
5. Kháng thể được phân lập theo điểm 3, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.
6. Kháng thể được phân lập theo điểm 4, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và trình tự axit amin của chuỗi

nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25.

7. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 là kháng thể IgG.

8. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, là kháng thể, trong đó kháng thể này được tạo ra trong tế bào CHO.

9. Polypeptit được phân lập bao gồm trình tự axit amin nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 7 hoặc 8.

10. Polypeptit được phân lập theo điểm 9, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự axit amin nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 23 hoặc 25.

11. Axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit theo điểm 9 hoặc 10.

12. Vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập theo điểm 11.

13. Tế bào chủ chứa kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên của nó, polypeptit, polynucleotit hoặc vector biểu hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.

14. Tế bào chủ theo điểm 13, là tế bào *Pichia* hoặc tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc.

15. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và chất mang hoặc chất pha loãng được dùng.

16. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó chế phẩm này còn chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó kháng lại tác nhân gây bệnh đường hô hấp được chọn từ nhóm bao gồm virus cúm, virus cự bào ở người (human cytomegalovirus - hCMV), virus gây viêm phổi cho người (human metapneumovirus - hMPV), virus ái cúm ở người (human parainfluenza - hPIV), rhinovirus ở người (human rhinovirus - hRV), virus viêm phổi do mycoplasma, virus phế cầu khuẩn, adenovirus, bocavirus, virus ruột non, norovirus hoặc BK virus.

17. Chế phẩm theo điểm 16, trong đó tác nhân gây bệnh đường hô hấp là virus cúm, hCMV, hMPV, hPIV, norovirus, hoặc BK virus.

18. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm các

bước:

a) nuôi cấy tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện polynucleotit; và

b) tùy ý, thu hồi kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ tế bào chủ và/hoặc môi trường nuôi cấy.

19. Chế phẩm gây miễn dịch chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và kháng nguyên được chọn từ protein F của RSV và protein G của RSV và các mảnh của nó.

20. Phương pháp phát hiện sự có mặt của protein F tiền dung hợp RSV ở người hoặc mảnh của nó trong mẫu bao gồm các bước: cho mẫu này tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và phát hiện sự có mặt của phức hợp giữa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và peptit; trong đó bước phát hiện phức hợp chỉ ra sự có mặt của protein F tiền dung hợp RSV.

1/7

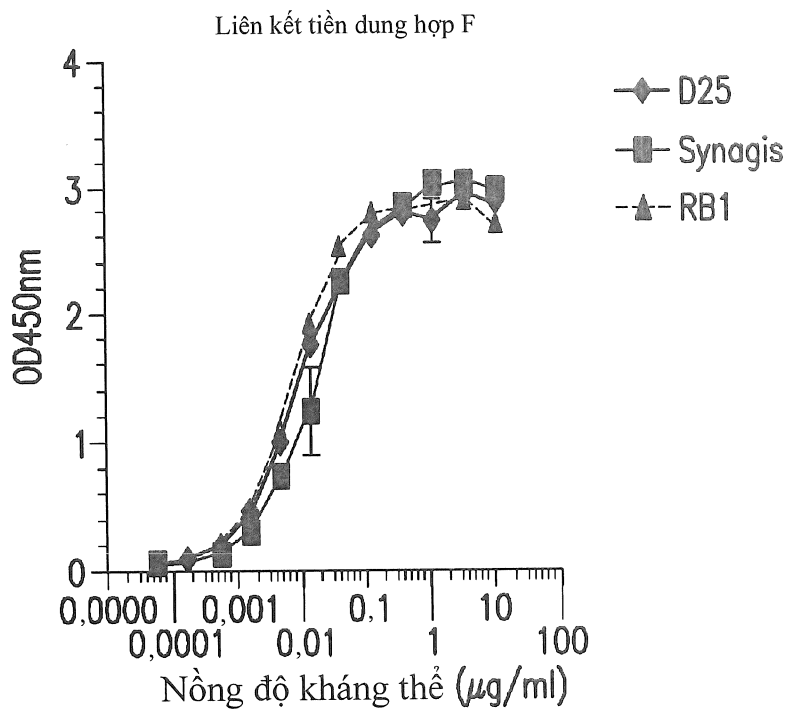


FIG.1A

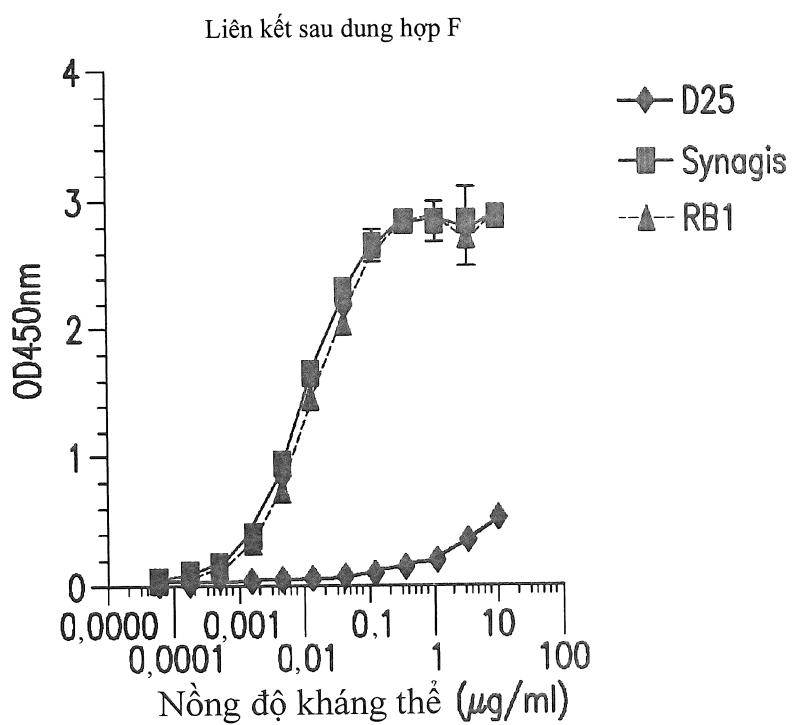


FIG.1B

2/7

Sự trung hòa chủng RSV A Long

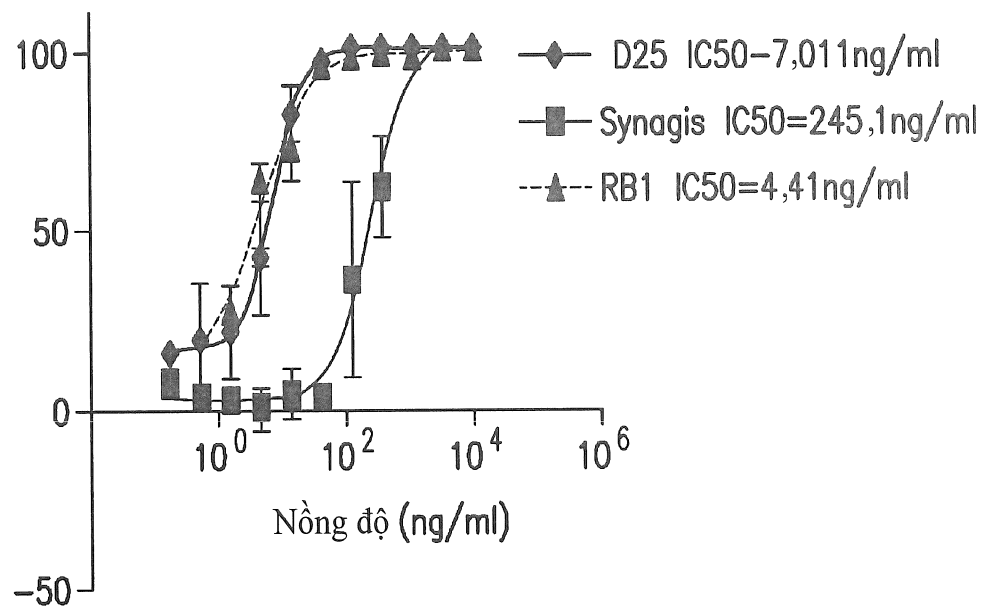


FIG.2A

Sự trung hòa chủng RSV B Washington

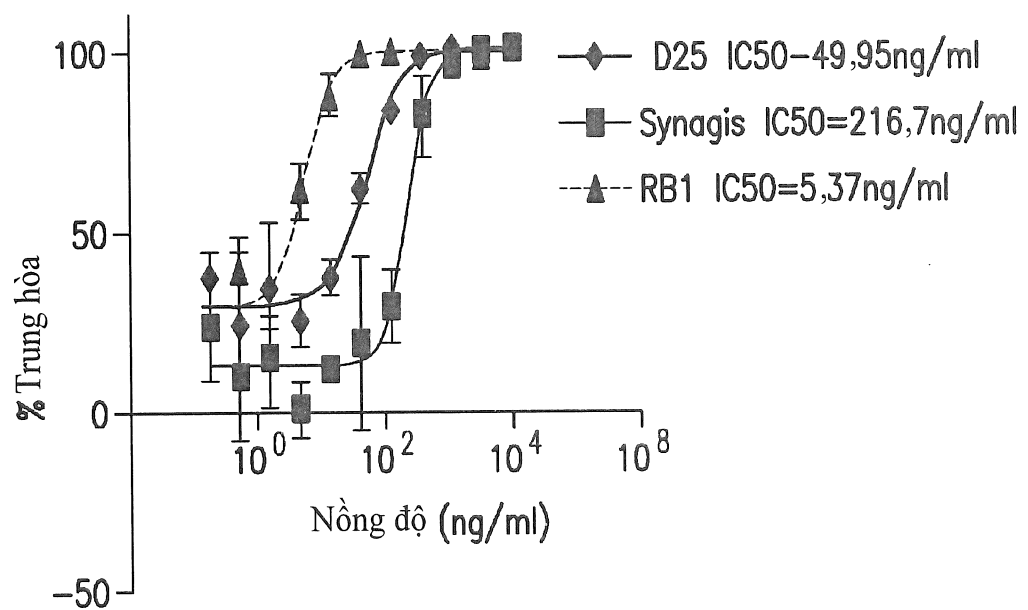


FIG.2B

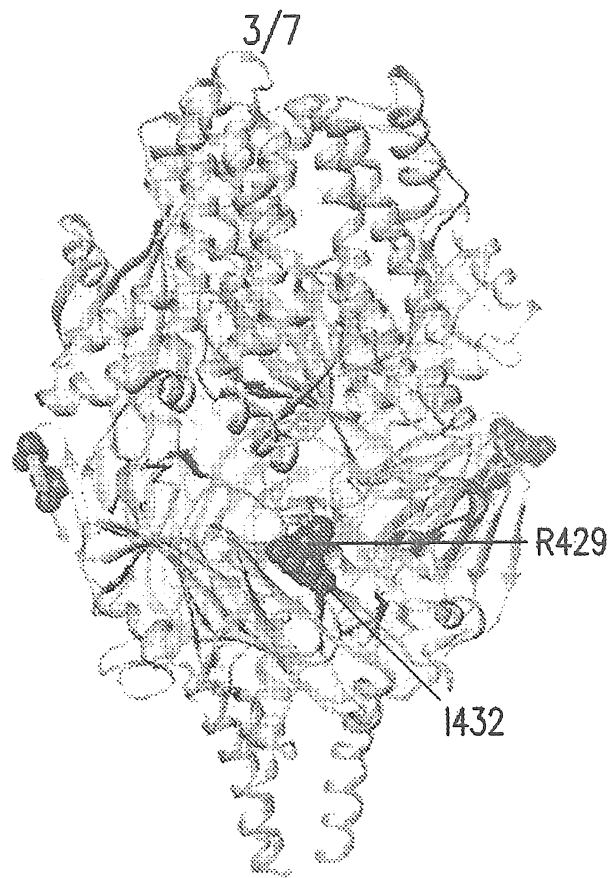


FIG.3A

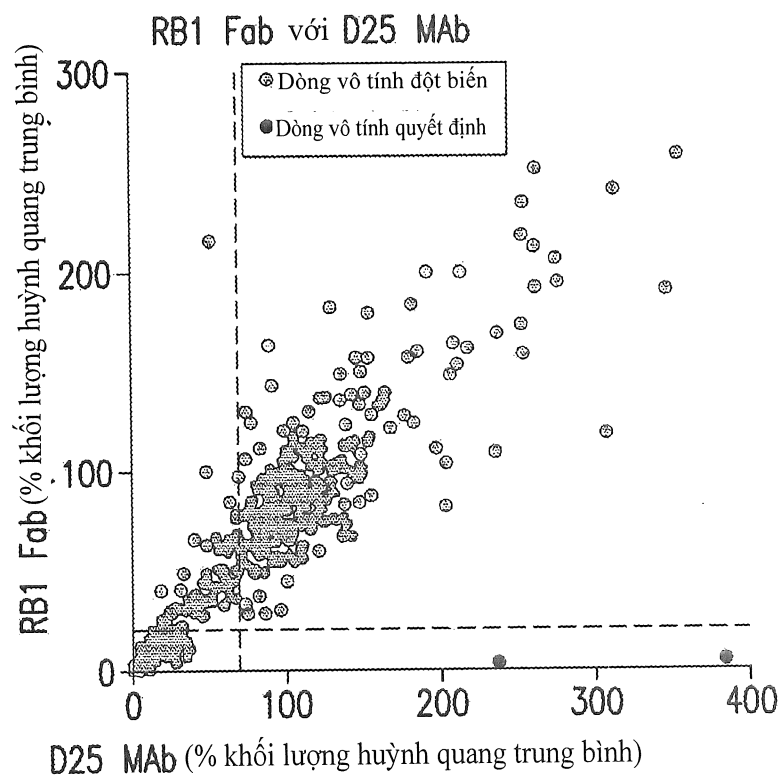


FIG.3B

4/7

RSV-A hiệu quả trong phổi

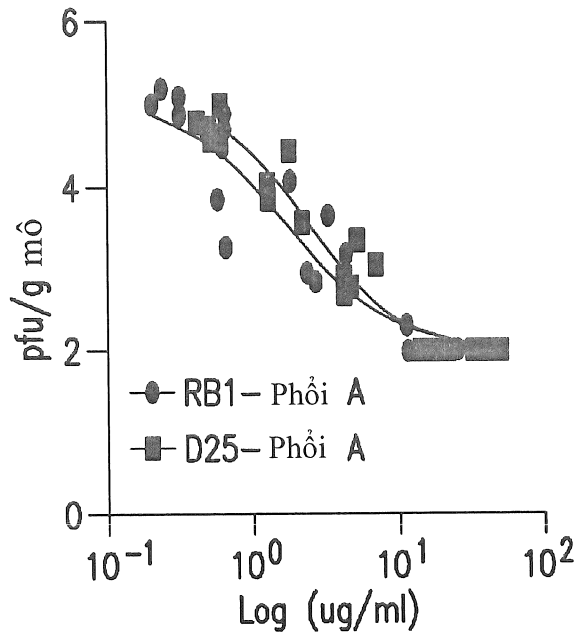


FIG.4A

RSV-B hiệu quả trong phổi

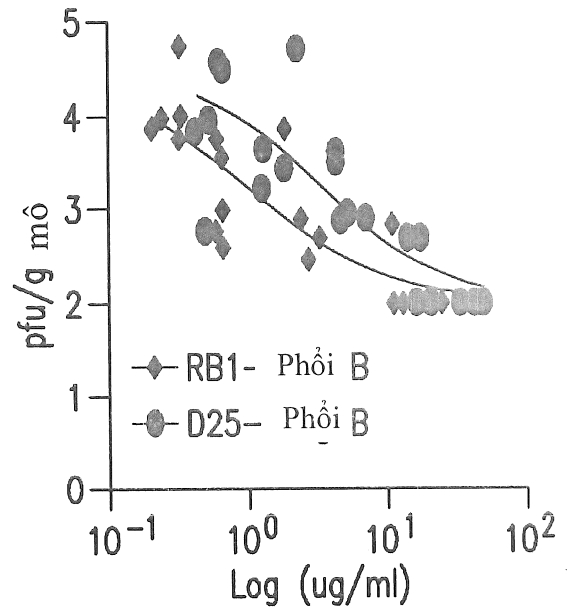


FIG.4B

Phổi: RSV-A (Long)

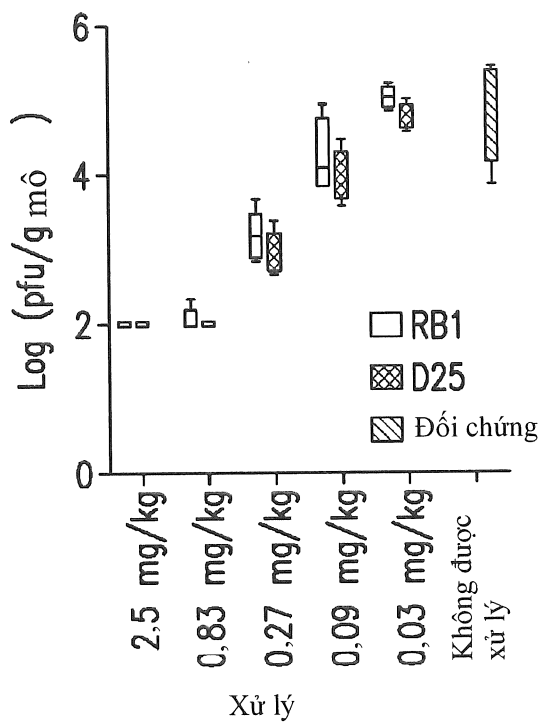


FIG.4C

Phổi: RSV-B (Wash)

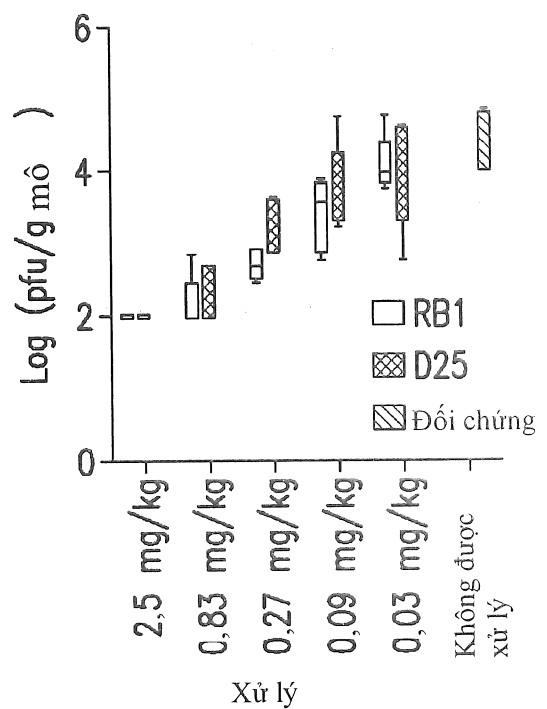


FIG.4D

5/7

RSV-A hiệu quả trong mũi

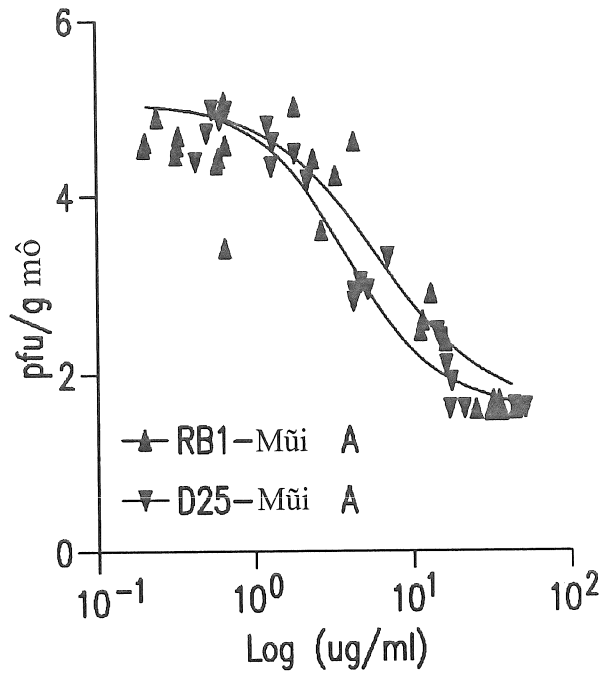


FIG.5A

RSV-B hiệu quả trong mũi

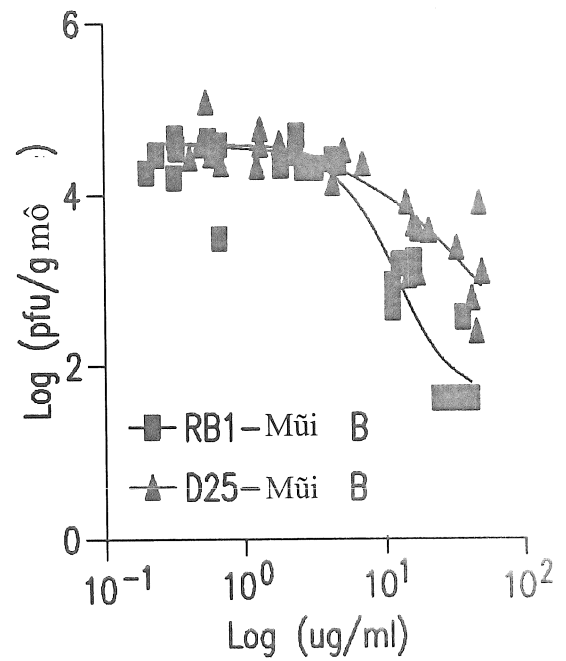


FIG.5B

Mũi: RSV-A (Long)

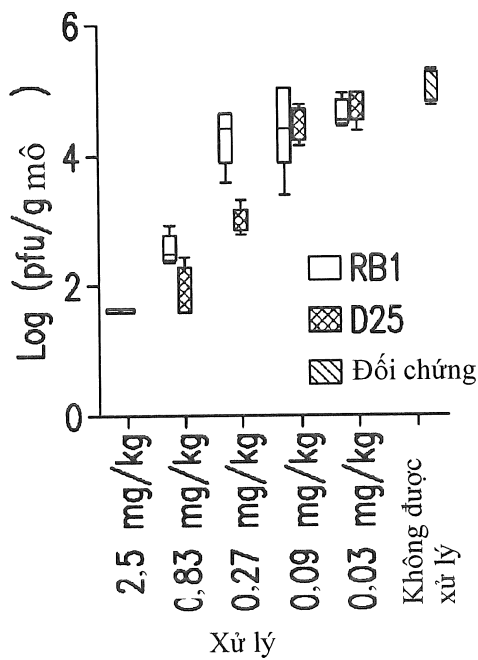


FIG.5C

Mũi: RSV-B (Wash)

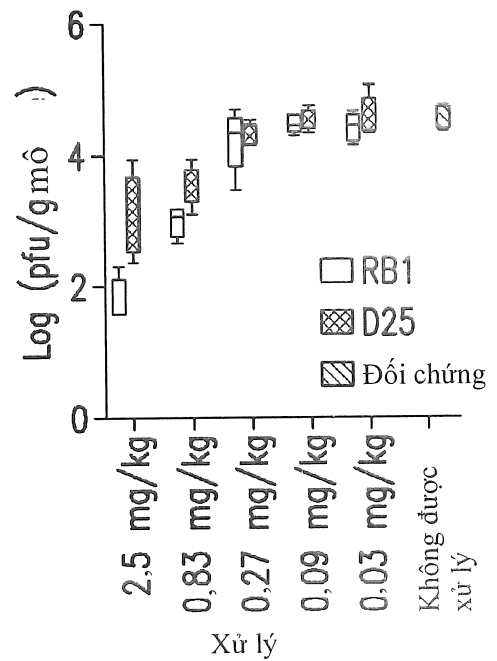


FIG.5D

6/7

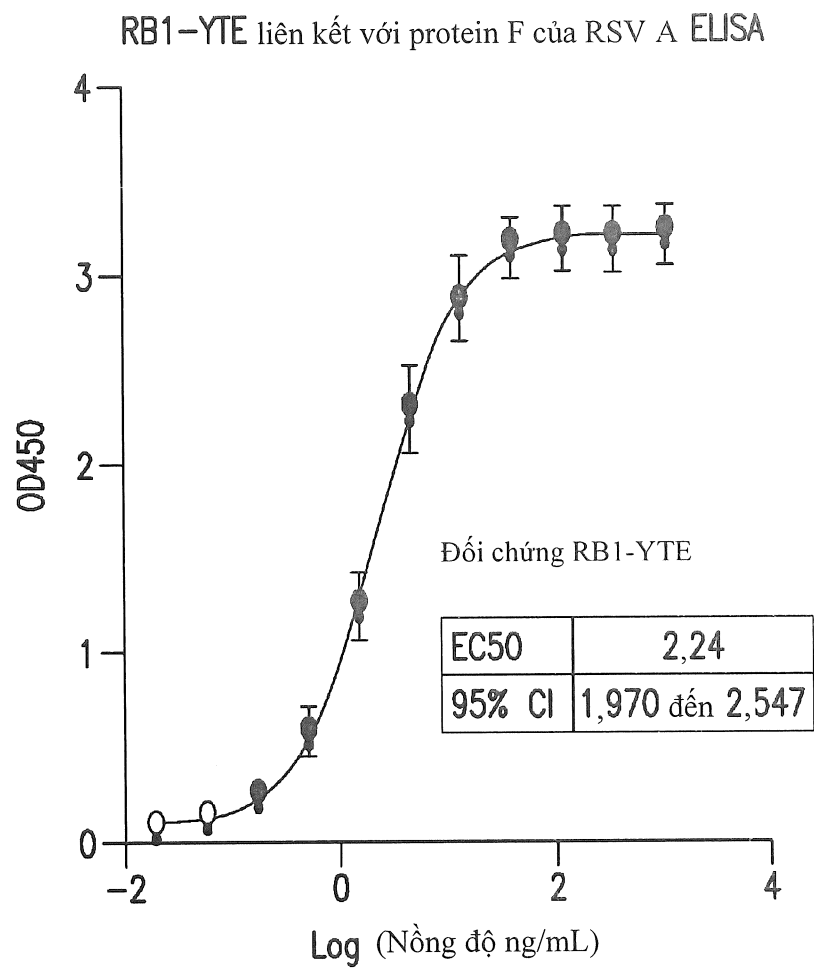


FIG.6

7/7

Dược động học ở khỉ Rhesus 15-M100-7265

IV 10 mg/kg

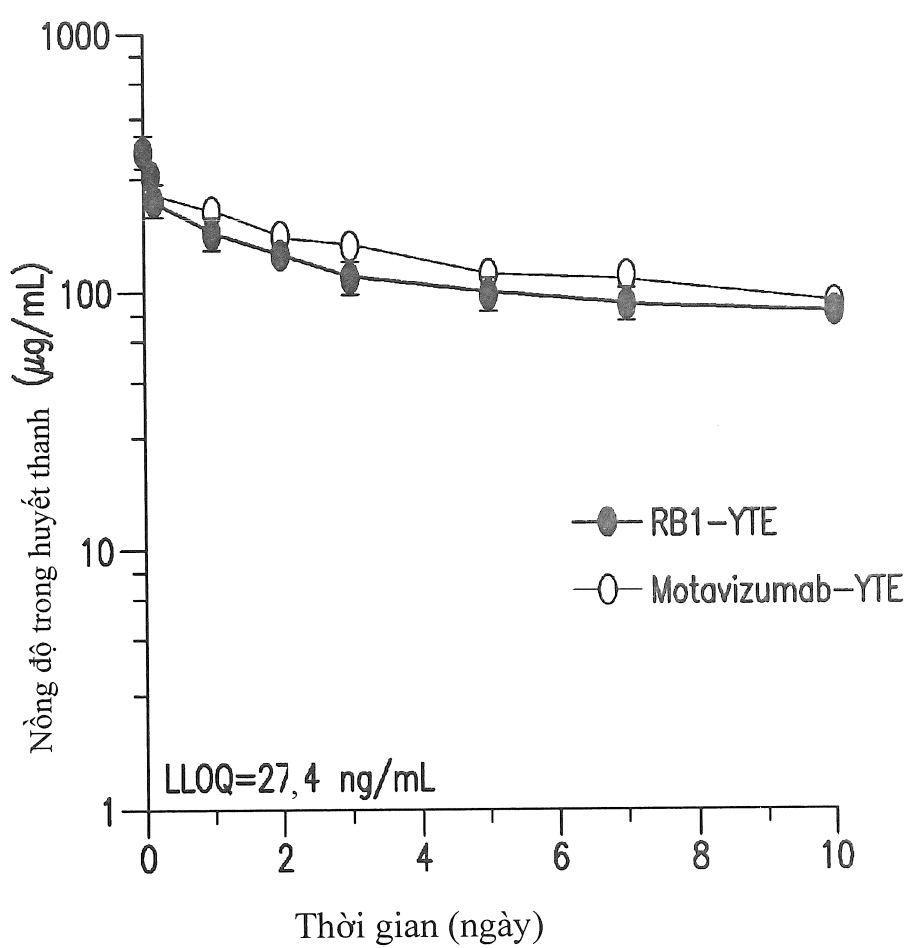


FIG.7

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Vora, Kalpit A.
 Cox, Kara S.
 Tang, Aimin
 Chen, Zhifeng
 DiStefano, Daniel
 Zhang, Lan
 Su, Hua-Poo

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP HOẶC MẢNH LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ
 LIÊN KẾT VỚI PROTEIN F CỦA VIRUT HỢP BÀO HÔ HẤP Ở NGƯỜI, TẾ BÀO CHỦ CHỨA
 KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ

<130> 24158-US-PCT

<140> US62/247,841

<141> 2015-10-29

<140> US 62/367,359

<141> 2016-07-27

<160> 22

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ser Ala Met Ser
 1 5

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Ile Lys Ser Lys Thr Tyr Gly Gly Thr Lys Glu Tyr Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 16

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Thr Ser Gln Asp Val Arg Gly Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Phe Leu Asp Phe Pro Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng RB1 có sự thay thế axit amin

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Arg

3

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 9
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Asp Ser
20 25 30

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

Ser Phe Ile Lys Ser Lys Thr Tyr Gly Gly Thr Lys Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ile
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Gly Ala Pro Tyr Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 10

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn dẫn đầu

<400> 10

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 11
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Axit amin VH RB1 được thể bằng đoạn dẫn đầu

<400> 11

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe
 35 40 45

Asp Asp Ser Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Ser Phe Ile Lys Ser Lys Thr Tyr Gly Gly Thr Lys Glu
 65 70 75 80

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95

Lys Asn Ile Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Gly Ala Pro Tyr Gly Gly Asn Ser Asp
 115 120 125

Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 130 135 140

Ser Ser
 145

<210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL RB1 và đoạn dẫn đầu

<400> 12

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

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

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Val
 35 40 45

Arg Gly Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95

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

Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 6

```

115                               120                               125

<210>  13
<211>  330
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  13

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35                               40                               45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                               70                               75                               80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85                               90                               95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100                              105                              110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115                              120                              125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130                              135                              140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                              150                              155                              160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165                              170                              175

```

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 14
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 1 5 10 15

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 8

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

<210> 15
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RBl có sự thay thế axit amin

<400> 15
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacggc cagggcggtc cctgagactc
 60

tcctgcacag tttctggatt cagctttgac gactctgcta tgagctgggt ccgccaggct
 120

ccaggggaagg ggctggaatg gataagtttc attaaaagta aaacttatgg tgggacaaaa
 180

gaatacgccg cgtctgtgaa aggcaggttc accatctcaa gagatgattc caaaaacatc
 240

gcctatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ttgtactaga
 300

ggggcgcctt acggcggtaa ctccgattac tactacgggt ttgacgtctg gggccaaggg
 360

accacggtca ctgtctcctc a
 381

<210> 16
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60
 atcacttgcc ggacaagtca ggacgttaga ggtgctttag cctggatatca acagaaacca
 120
 gggaaagctc ctaaactcct gatctttgat gcctccagtt tggagactgg ggtcccatca
 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagtt ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
 240
 gaagattttg cagcttatta ctgtcagcag tttcttgatt tccctttcac cttcggccag
 300
 gggacacgac tggaaatcaa acgtacg
 327

<210> 17
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Codon VH RB1 được tối ưu hóa

<400> 17
 gaggtgcagc tggtcgagag cggggggggg ctggtgcggc ctggcaggtc tctgagactg
 60
 agctgcaccg tgagcggctt ctcccttgac gattctgcca tgagctgggt gcggcaggct
 120
 ccaggcaagg gactggagtg gatctccttc atcaagtcta agacctacgg cggcacaag
 180
 gagtacgccg cttccgtgaa gggccggttt accatcagca gggacgattc caagaacatc
 240
 gcctatctgc agatgaacag cctgaagacc gaggacacag ccgtgtacta ttgcacaaga
 300
 ggagctcctt acggaggcaa cagcgactac tattacggac tggacgtgtg gggacaggga
 360

accacagtga ccgtgagctc c
381

<210> 18
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Codon VL RB1 được tối ưu hóa

<400> 18
gacattcaga tgactcagtc cccttcaagt ctgagcgcct ccgtgggcga cagagtgacc
60

atcacatgcc ggaccagcca ggatgtgcgg ggcgccctgg cttggtacca gcagaagcca
120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctttgac gctagctccc tggagaccgg cgtgccctcc
180

aggttttctg gcagcggctc cggcacagtg ttcacctga caatctctag cctgcagcct
240

gaggactttg ccgcttacta ttgccagcag ttcttgatt tccccttcac cttcggccaa
300

ggcacacggc tggagatcaa gaggacc
327

<210> 19
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự chuỗi nặng đoạn dẫn đầu

<400> 19
atgggttggt cctgtattat cctgttcctg gtcgccactg ctactggggg ccactca
57

<210> 20
<211> 57
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự chuỗi nhẹ đoạn dẫn đầu

<400> 20

atgggctggt cctgtattat cctgttcctg gtggcaaccg caactggtgt gcatagc
57

<210> 21

<211> 990

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 21

gcctctacaa agggccctag cgtgttccca ctggctccct cttccaagtc taccagcgga
60

ggaacagccg ctctgggatg tctggtgaag gattacttcc cagagcccggt gaccgtgtcc
120

tggaaactctg gcgccctgac cagcggagtg cacacatttc cagctgtgct gcagtcctct
180

ggcctgtatt ccctgagctc cgtggtgacc gtgccctcta gtcacctggg caccagaca
240

tacatctgta acgtgaatca caagccaagc aatacaaagg tggacaagaa ggtcgagccc
300

aagtcctgtg ataagacca cacatgcccc ctttgtcctg ctccagagct gctgggagga
360

cctagcgtgt tcctgtttcc acccaagcct aaggacaccc tgatgatctc taggaccccc
420

gaggtgacat gcgtggtggt ggacgtgagc cagcaggatc ctgaggtgaa gtttaactgg
480

tacgtcgatg gcgtggaggt gcacaatgcc aagacaaagc ccagagagga gcagtataac
540

tccacctacc ggggtggtgtc tgtgctgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag
600

gagtacaagt gcaaggtgtc caataaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatctct
660

aaggccaagg gccagcctag ggagccacag gtgtatacac tgcctccatc cagagacgag
720

ctgaccaaga accaggtgtc tctgacatgt ctggtgaagg gcttctaccc ttctgatatc
780

gccgtggagt gggagagcaa tggccagcca gagaacaatt ataagaccac accccctgtg
840

ctggacagcg atggctcctt ctttctgtac agcaagctga ccgtggataa gtcçcggtgg
900

cagcagggca acgtgttcag ctgttctgtg atgcacgaag ccctgcacaa tcactacact
960

cagaagagcc tgtccctgtc acctggtaaa
990

<210> 22
<211> 315
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 22
gtggccgctc cctccgtgtt tatcttcccc cttcttgacg agcagctgaa gtctggcaca
60

gctagcgtgg tgtgcctgct gaacaatttc taccctcggg aggccaaggt gcagtggaag
120

gtggataacg ctctgcagtc tggcaatagc caggagtccg tgaccgagca ggactctaag
180

gatagcacat attccctgtc ctctaccctg aactgtcta aggccgatta cgagaagcac
240

aaggtgtatg cttgtgaagt caccaccag gggctgagtt caccagtcac caagtcattc
300

aatcggggcg agtgc
315