



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0049025
(51)^{2020.01} C07K 16/28; C12N 15/13; A61K (13) B
39/395; A61P 35/00

(21) 1-2021-04989 (22) 22/01/2020
(86) PCT/CN2020/073803 22/01/2020 (87) WO2020/156439 06/08/2020
(30) 201910083330.4 28/01/2019 CN
(45) 25/07/2025 448 (43) 27/12/2021 405A
(73) TUOJIE BIOTECH(SHANGHAI) CO., LTD. (CN)
Room 103, No. 14 Building, No. 3728 Jinke Road, Free Trade Pilot Zone, Pudong
New Area, Shanghai 201203, China
(72) YANG, Cuiqing (CN); TANG, Renhong (CN).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD79B, THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT,
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(21) 1-2021-04989

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD79B, đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, và dược phẩm chứa nó. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến kháng thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng CDR của kháng thể kháng CD79B, dược phẩm chứa kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD79B được làm tương thích với người để bào chế thuốc để điều trị u lympho (như DLBCL).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD79B của người và đoạn gắn kết với kháng nguyên, kháng thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người chứa (các) vùng CDR của kháng thể kháng CD79B, được phẩm chứa kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, cũng như là sử dụng nó làm thuốc chống ung thư, cụ thể là thuốc điều trị u lympho (DLBCL).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

U ác tính (bệnh ung thư) là nguyên nhân đứng thứ hai gây tử vong trên toàn thế giới, chỉ xếp sau bệnh tim. U lympho là một bệnh u ác tính bắt nguồn từ hệ tạo huyết lympho và là bệnh u máu phổ biến nhất trên thế giới. Tỷ lệ mắc u lympho ở Trung Quốc đang tăng trong những năm gần đây, và tỷ lệ mắc hiện nay là khoảng 6,68 ca trên 100.000 người.

U lympho được chia làm hai loại, u lympho không Hodgkin (non-Hodgkin's lymphoma-NHL) và u lympho Hodgkin (Hodgkin's lymphoma-HL). U lympho không Hodgkin là một thuật ngữ chung của một nhóm các bệnh tăng sinh tế bào lympho bất thường với tính không đồng nhất mạnh. Tỷ lệ mắc bệnh này cao hơn nhiều so với u lympho Hodgkin, chiếm khoảng hơn 80% trong số các bệnh u lympho. Trong số chúng, bệnh u lympho tế bào B lớn lan tỏa (diffuse large B-cell lymphoma-DLBCL) là loại u lympho phổ biến ở người lớn, chiếm khoảng 32,5% trong số toàn bộ các bệnh u lympho không Hodgkin; ở châu Á, tỷ lệ này thậm chí còn cao hơn, gần bằng 40%. Bệnh này phổ biến hơn ở người già, với độ tuổi trung bình khởi phát bệnh là 60-64 tuổi. Các bệnh nhân nam nhiều hơn một chút so với bệnh nhân nữ.

Hiện phác đồ điều trị chuẩn hàng đầu để điều trị bệnh u lympho tế bào B lan tỏa (diffuse large B-cell lymphoma-DLBCL) là rituximab kết hợp với hóa trị (R-CHOP). Trước khi rituximab được đưa ra thị trường, phác đồ CHOP dựa trên

anthraxyclin (xyclophosphamit, doxorubixin, vincristin và prednison) là phác đồ điều trị chuẩn hàng đầu để điều trị DLBCL. Phác đồ điều trị R-CHOP đã cải thiện đáng kể tỷ lệ sống trong thời gian dài ở các bệnh nhân DLBCL. Các kết quả thử nghiệm lâm sàng đã chỉ ra rằng: so với phác đồ CHOP truyền thống, phác đồ R có thể kéo dài đáng kể tổng thời gian sống trung bình ở các bệnh nhân mắc DLBCL khoảng 4,9 năm, thời gian sống không còn bệnh trung bình là hơn 6,6 năm, và tỷ lệ sống không còn bệnh trong 5 năm đã tăng từ 30% đến 54%. Tuy nhiên, vẫn còn khoảng 10% đến 15% bệnh nhân mắc bệnh dai dẳng không đáp ứng với liệu pháp, và 20% đến 30% bệnh nhân tái phát bệnh và không phải toàn bộ các bệnh nhân DLBCL đều thích hợp với phác đồ R-CHOP, như các bệnh nhân cao tuổi trên 80 tuổi mà thể trạng của họ không cho phép phương pháp điều trị R-CHOP chuẩn; một ví dụ khác là các loại u lympho mạnh hơn và u lympho tái phát, phác đồ R-CHOP có thể không có giá trị. Do đó, rất cần phát triển thể hệ liệu pháp miễn dịch mới với các tác dụng phụ ít hơn để điều trị DLBCL.

Theo cách phân loại tế bào lympho theo nguồn gốc, u lympho tế bào B lan tỏa (DLBCL) thuộc u lympho tế bào B. Phức hợp thụ thể tế bào B (BCR) là phân tử phổ biến nhất trên bề mặt tế bào B. Phức hợp BCR bao gồm globulin miễn dịch màng (mIg) nhận diện và gắn kết với kháng nguyên và các heterodime $I\alpha$ (CD79a) và $I\beta$ (CD79B) truyền tín hiệu kích thích kháng nguyên. $I\alpha$ và $I\beta$ lần lượt là các glycoprotein 47kDa và 37kDa, và thuộc siêu họ globulin miễn dịch. Các gen mã hóa $I\alpha$ và $I\beta$ lần lượt được gọi là mb-1 và B29. Cả $I\alpha$ và $I\beta$ đều có miền giống Ig ở đầu amino của vùng ngoại bào. Cả $I\alpha$ và $I\beta$ có thể được sử dụng làm các cơ chất cho các protein tyrosin kinaza và tham gia vào việc truyền tín hiệu BCR. BCR được biểu hiện nhiều trên các u lympho tế bào B và các tế bào B thông thường. Dựa vào thành công lâm sàng và độ an toàn đáng tin cậy rituximab nhằm vào CD20, việc phát triển các phương pháp điều trị nhằm vào BCR cũng phải có hiệu quả điều trị và độ an toàn tốt.

Đáp lại nhu cầu y học có liên quan đến CD79B chưa được đáp ứng, nhiều công ty dược trên thế giới, kể cả Roche Pharmaceuticals, đã chủ động phát triển các kháng thể kháng CD79B và các sản phẩm có liên quan. Các sáng chế có liên quan là US9085630, WO2009012256, WO2009012268, WO2009099728, WO2014011519,

WO2014011521, WO2016090210, WO2016205176, WO2016040856, WO2016021621, WO2017009474, WO2014177615 chẳng hạn, v.v..

Dựa trên sự biểu hiện của CD79B, việc tạo ra các kháng thể điều trị kháng kháng nguyên CD79B là có lợi. Vẫn còn nhu cầu chưa được đáp ứng trong lĩnh vực kỹ thuật này về việc phát triển các kháng thể kháng CD79B của người hữu hiệu để điều trị các bệnh u máu hoặc làm chậm sự tiến triển bệnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, axit nucleic mã hóa kháng thể này, vector, tế bào chủ, thể tiếp hợp kháng thể-được chất và được phẩm chứa kháng thể này, và phương pháp sử dụng kháng thể này để điều trị hoặc làm chậm bệnh ung thư, đặc biệt là u máu.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chứa ít nhất một vùng quyết định bổ sung (HCDR) như được thể hiện trong các trình tự được chọn từ các trình tự sau: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25; và/hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể chứa ít nhất một vùng quyết định bổ sung (LCDR) như được thể hiện trong các trình tự được chọn từ các trình tự sau: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 26.

Theo một vài phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

(I) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, tương ứng; hoặc

(II) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15, tương ứng; hoặc

(III) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 23,

SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25, tương ứng;

và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm:

(I) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng; hoặc

(II) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng; hoặc

(III) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng.

Theo một số phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà chứa vùng bất kỳ được chọn từ các vùng (I) đến (III) sau:

(I) vùng biến đổi chuỗi nặng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ, bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng;

(II) vùng biến đổi chuỗi nặng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ, bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng;

(III) vùng biến đổi chuỗi nặng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ, bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng.

Theo một số phương án cụ thể sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 3; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 5; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 17; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 4; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 6; hoặc

(III) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án cụ thể, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

Theo một số phương án cụ thể khác, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án cụ thể khác, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án cụ thể, kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, trong đó:

chuỗi nặng bao gồm:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 19;

hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 21; hoặc

và/hoặc chuỗi nhẹ bao gồm:

(I) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 20 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 20; hoặc

(II) trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 22 hoặc trình tự có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 22;

Theo một số phương án cụ thể, chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19, và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 20.

Theo một số phương án cụ thể khác, chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21, và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 22.

Theo một vài phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, mà là kháng thể chuột hoặc đoạn của nó.

Theo một số phương án cụ thể, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng FR chuỗi nhẹ và/hoặc vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột hoặc biến thể của chúng.

Theo một số phương án cụ thể, kháng thể chuột kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng FR chuỗi nặng và/hoặc vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của chuột hoặc biến thể của chúng.

Theo một vài phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, mà là kháng thể khảm hoặc đoạn của nó. Theo một số phương án cụ thể, kháng thể khảm kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng FR chuỗi nhẹ và/hoặc vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của người hoặc biến thể của nó,

và/hoặc vùng FR chuỗi nặng và/hoặc vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người hoặc biến thể của nó.

Theo một vài phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, mà là kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể người hoặc đoạn của nó.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được làm tương thích với người kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, trong đó trình tự chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 20 hoặc trình tự biến thể của nó; trình tự biến thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 axit amin thay đổi trong chuỗi nhẹ, hoặc có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 20. Trình tự chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc trình tự biến thể của nó; trình tự biến thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 axit amin thay đổi trong chuỗi nặng, hoặc có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 19.

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được làm tương thích với người kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, trong đó trình tự chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 22 hoặc trình tự biến thể của nó, hoặc có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 22; trình tự biến thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 axit amin thay đổi trong chuỗi nhẹ. Trình tự chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 21 hoặc trình tự biến thể của nó; trình tự biến thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 axit amin thay đổi trong chuỗi nặng, hoặc có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 21.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn của nó như được mô tả trên đây, kháng thể này còn bao gồm vùng cố định của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người hoặc biến thể của chúng. Theo một số phương án cụ thể, kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn của nó bao gồm vùng cố định của IgG1 hoặc IgG2 của người.

Theo một vài phương án, kháng thể được làm tương thích với người kháng

CD79B của người hoặc đoạn của nó như được mô tả trên đây, kháng thể này còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là bao gồm vùng FR chuỗi nặng của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người, tốt hơn nữa là bao gồm vùng FR chuỗi nặng của IgG1 hoặc IgG2 của người.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, trong đó đoạn gắn kết với kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fv, sFv, F(ab')₂, kháng thể tuyến tính, kháng thể chuỗi đơn, scFv, sdAb, sdFv, nanobody, peptibody, kháng thể miền và kháng thể đa đặc hiệu (kháng thể đặc hiệu kép, diabody, triabody và tetrabody, di-scFv nối tiếp và tri-scFv nối tiếp).

Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng nêu trên hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó để gắn kết với CD79B của người hoặc epitop của nó.

Các gốc axit amin của CDR VH/VL của kháng thể kháng CD79B của người theo sáng chế được xác định và được đặt tên theo hệ thống đánh số Chothia.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, mà có thể là ADN hoặc ARN.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa polynucleotit như được mô tả trên đây, mà có thể là vector biểu hiện nhân thực, vector biểu hiện nhân sơ hoặc vector virus.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất tế bào chủ được biến nạp vector biểu hiện như được mô tả trên đây, mà có thể là tế bào nhân thực hoặc tế bào nhân sơ.

Theo một vài phương án, tế bào chủ là tế bào vi khuẩn, nấm men hoặc động vật có vú. Theo một số phương án cụ thể, tế bào chủ là *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, tế bào trứng chuột ham Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO) hoặc tế bào phôi thận của người (human embryonic kidney-HEK) 293.

Theo khía cạnh thứ 5, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp kháng thể-độc chất.

Thể tiếp hợp kháng thể-độc chất theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có thành

phần sau: kháng thể, yếu tố liên kết và dược chất.

Theo một phương án cụ thể, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế là kháng thể được liên kết cộng hóa trị với dược chất thông qua yếu tố liên kết.

Theo một vài phương án, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa chất gây độc tế bào. Theo một số phương án cụ thể, chất gây độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm độc tố, chất hóa trị liệu, kháng sinh, đồng vị phóng xạ và enzym phân cắt liên kết nucleotit-nucleotit.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, bao gồm các bước: biểu hiện kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó trong tế bào chủ như được mô tả trên đây, và phân lập kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó từ tế bào chủ.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất chế phẩm, ví dụ dược phẩm, mà chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD79B của người nêu trên hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Theo một số phương án cụ thể, liều đơn vị của dược phẩm chứa kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 99% khối lượng, hoặc lượng kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó trong liều đơn vị của dược phẩm là nằm trong khoảng từ 0,1 mg đến 2000 mg, và theo một số phương án cụ thể nằm trong khoảng từ 1 mg đến 1000 mg.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế còn mô tả việc sử dụng thành phần bất kỳ hoặc dạng kết hợp của chúng được chọn từ các thành phần sau để sản xuất thuốc: kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế, dược phẩm theo sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế; trong đó thuốc hay dược phẩm được dùng để điều trị bệnh tăng sinh hoặc làm chậm sự tiến triển bệnh tăng sinh; bệnh tăng sinh này có thể là bệnh ung thư hoặc khối u. Theo một vài phương án, bệnh ung thư hoặc khối u là u lympho hoặc bệnh bạch cầu. Theo một phương án cụ thể, u lympho được chọn từ nhóm bao gồm: u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào lympho

nhỏ và u lympho tế bào vỏ não. Theo một phương án cụ thể, u lympho không Hodgkin được chọn từ nhóm bao gồm: NHL tiến triển nhanh, NHL tiến triển nhanh tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng và NHL không đau dai dẳng. Theo một phương án cụ thể, bệnh bạch cầu được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh bạch cầu dòng lympho mãn tính, bệnh bạch cầu tế bào tủy và bệnh bạch cầu dòng lympho cấp tính.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tăng sinh hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh tăng sinh, trong đó phương pháp này bao gồm cho đối tượng sử dụng một lượng hữu hiệu để điều trị hoặc một lượng hữu hiệu để làm chậm sự tiến triển bệnh của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc được phẩm theo sáng chế, hoặc thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo sáng chế; trong đó, bệnh tăng sinh có thể là bệnh ung thư hoặc khối u. Theo một vài phương án, bệnh ung thư hoặc khối u là u lympho hoặc bệnh bạch cầu. Theo một phương án cụ thể, u lympho được chọn từ nhóm bao gồm: u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào lympho nhỏ và u lympho tế bào vỏ não. Theo một phương án cụ thể, u lympho không Hodgkin được chọn từ nhóm bao gồm: NHL tiến triển nhanh, NHL tiến triển nhanh tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng và NHL không đau dai dẳng. Theo một phương án cụ thể, bệnh bạch cầu được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh bạch cầu dòng lympho mãn tính, bệnh bạch cầu tế bào tủy và bệnh bạch cầu dòng lympho cấp tính.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng ELISA của hiệu giá huyết thanh của chuột Balb/c được gây miễn dịch bằng protein EDC CD79B người-hFc.

Fig.2: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng FACS của hiệu giá huyết thanh của chuột Balb/c được gây miễn dịch bằng protein EDC CD79B người-hFc.

Fig.3: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng ELISA của hiệu giá huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bằng protein EDC CD79B người-hFc.

Fig.4: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng FACS của hiệu giá huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bằng protein EDC CD79B người-hFc.

Fig.5: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng ELISA của hiệu giá huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bằng protein EDC CD79B người-his.

Fig.6: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng FACS của hiệu giá huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bằng protein EDC CD79B người-his.

Fig.7: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng ELISA của kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người, trong đó hIgG1 là kháng thể đối chứng âm và SN8 là kháng thể đối chứng dương.

Fig.8: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng FACS của các kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người, trong đó hIgG1 là kháng thể đối chứng âm và SN8 là kháng thể đối chứng dương.

Fig.9: Thể hiện các kết quả phát hiện bằng FACS về khả năng phản ứng chéo của các kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người, trong đó mIgG là kháng thể đối chứng âm; kháng thể đơn dòng của chuột kháng HR008 của khỉ cyno, kháng CD79B của khỉ cyno, trình tự kháng thể của chúng có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của khỉ cyno (số dòng 10D10) trong patent WO2009012268A1, là kháng thể đối chứng dương.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ

Để dễ dàng hiểu hơn về sáng chế, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được định nghĩa một cách cụ thể dưới đây. Trừ khi được định nghĩa rõ ràng ở đoạn khác trong tài liệu này, toàn bộ các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập đến.

Các mã ba chữ cái và mã một chữ cái của các axit amin được sử dụng trong sáng chế là như được mô tả trong tài liệu J. Biol. Chem, 243, p3558 (1968).

"CD79B" được dùng để chỉ CD79B bất kỳ có nguồn gốc từ động vật có xương sống, kể cả động vật có vú, như động vật linh trưởng (ví dụ người và khỉ *Macaca* (cyno)) và loài gặm nhấm (ví dụ chuột nhắt và chuột cống). Thuật ngữ "CD79B" bao gồm CD79B chưa xử lý, "có chiều dài đầy đủ" và dạng bất kỳ của CD79B được xử lý từ các tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể CD79B có nguồn gốc

trong tự nhiên, ví dụ các biến thể ghép nối, các biến thể alen và các phân tử đồng dạng. Polypeptit CD79B được mô tả ở đây có thể được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau, như các loại mô của người hoặc các nguồn khác, hoặc được tạo ra bằng các phương pháp tái tổ hợp hoặc tổng hợp.

Thuật ngữ "kháng thể" được mô tả trong sáng chế được dùng để chỉ globulin miễn dịch, mà là một cấu trúc chuỗi tetrapeptit gồm hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau được liên kết với nhau bằng (các) liên kết disulfua liên chuỗi. Thành phần và trình tự axit amin của vùng cố định chuỗi nặng của globulin miễn dịch là khác nhau, vì thế tính kháng nguyên của chúng cũng khác nhau. Theo định nghĩa này, có thể chia globulin miễn dịch thành năm loại, hoặc năm isotyp của globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, và các chuỗi nặng tương ứng của chúng là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ , tương ứng. Cùng một loại Ig có thể được chia thành các nhóm phụ khác nhau theo mức khác nhau về thành phần axit amin của vùng bản lề và số và vị trí của các liên kết disulfua trong chuỗi nặng. Ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Chuỗi nhẹ được chia thành chuỗi κ hoặc chuỗi λ theo mức khác nhau của vùng cố định. Mỗi loại trong số năm loại của Ig có thể có chuỗi κ hoặc chuỗi λ . Trình tự gồm khoảng 110 axit amin gần đầu N của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể rất khác nhau và được gọi là vùng biến đổi (vùng V); trình tự axit amin còn lại gần đầu C là tương đối ổn định và được gọi là vùng cố định (vùng C). Vùng biến đổi bao gồm 3 vùng siêu biến (hypervariable region-HVR) và 4 vùng khung (framework region-FR) với các trình tự tương đối bảo toàn. Ba vùng siêu biến quyết định tính đặc hiệu của kháng thể, và cũng được biến đổi là vùng quyết định bổ sung (CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm 3 vùng CDR và 4 vùng FR. Trình tự từ đầu amino đến đầu carboxy là: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Ba vùng CDR của chuỗi nhẹ được dùng để chỉ LCDR1, LCDR2 và LCDR3; 3 vùng CDR của chuỗi nặng được dùng để chỉ HCDR1, HCDR2 và HCDR3. Số và vị trí của các gốc axit amin trong CDR vùng VL và vùng VH của kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên tuân theo quy tắc đánh số Chothia (ABM) đã biết.

Thuật ngữ "kháng thể người" hoặc "kháng thể người tái tổ hợp" bao gồm các

kháng thể người được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương pháp tái tổ hợp, và các kỹ thuật và phương pháp có liên quan đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như:

(1) kháng thể được phân lập từ động vật chuyển gen và động vật chuyển nhiễm sắc thể (ví dụ chuột nhắt) mang các gen globulin miễn dịch của người, hoặc được phân lập từ tế bào lai được chuẩn bị từ đó;

(2) kháng thể được phân lập từ tế bào chủ (như các khối u chuyển nhiễm) được biến nạp để biểu hiện các kháng thể;

(3) kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người tổ hợp tái tổ hợp; và

(4) kháng thể được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các kỹ thuật khác mà được sử dụng để ghép nối các trình tự gen của globulin miễn dịch của người thành các trình tự ADN khác.

Các kháng thể người tái tổ hợp như vậy không những chứa các vùng biến đổi và các vùng cố định, mà sử dụng các trình tự globulin miễn dịch đặc hiệu dòng mầm của người được mã hóa bởi các gen dòng mầm, mà còn bao gồm cả các dạng sắp xếp lại sau đó và các đột biến như các dạng xuất hiện trong quá trình trưởng thành của kháng thể.

Thuật ngữ "kháng thể của chuột" theo sáng chế là kháng thể đơn dòng kháng CD79B của người hoặc epitop của chúng được tạo ra bằng kiến thức và kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong quá trình sản xuất, đối tượng thử nghiệm được tiêm kháng nguyên CD79B hoặc epitop của nó, và sau đó tế bào lai biểu hiện kháng thể có trình tự hoặc các đặc tính chức năng mong muốn được phân lập. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, kháng thể chuột kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể còn chứa vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột hoặc biến thể của chúng, hoặc còn chứa vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của chuột hoặc biến thể của chúng.

Thuật ngữ "kháng thể người" bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và cố định của các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Các kháng thể người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin mà không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (như các đột biến được đưa vào ngẫu nhiên hoặc gây đột biến đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc đột biến soma *in*

vivo). Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể người" không bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR thu được từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác (như chuột) được ghép lên các trình tự khung của người (gọi là "kháng thể được làm tương thích với người").

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người", cũng được biến đến là kháng thể được ghép CDR, được dùng để chỉ kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR của các loài không phải người vào khung của các vùng biến đổi của kháng thể người. Kháng thể này có thể khắc phục được các phản ứng đáp ứng miễn dịch mạnh được gây ra bởi kháng thể khảm vì nó mang một lượng lớn các thành phần protein của các loài không phải người. Để tránh làm giảm hoạt tính do giảm tính miễn dịch, vùng biến đổi của kháng thể người có thể được gây đột biến ngược tối thiểu để duy trì hoạt tính.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" là kháng thể được tạo thành bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể của loài thứ nhất với vùng cố định của kháng thể của loài thứ hai, kháng thể này có thể làm giảm đáp ứng miễn dịch do kháng thể của loài thứ nhất gây ra. Việc tạo ra kháng thể khảm đòi hỏi phải tạo ra tế bào lai tiết các kháng thể đơn dòng đặc hiệu của loài thứ nhất, sau đó tách dòng gen vùng biến đổi từ các tế bào lai của loài thứ nhất (như chuột nhắt), và sau đó tách dòng gen vùng cố định của kháng thể của loài thứ hai (như người), liên kết gen vùng biến đổi của loài thứ nhất với gen vùng cố định của loài thứ hai để tạo thành gen khảm mà được chèn vào vectơ biểu hiện, và cuối cùng biểu hiện phân tử kháng thể khảm trong hệ nhân thực sử dụng trong công nghiệp hoặc hệ nhân sơ sử dụng trong công nghiệp. Vùng cố định của kháng thể của loài thứ hai (ví dụ người) có thể được chọn từ nhóm bao gồm: vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc sử dụng IgG1 mà không có hoạt tính ADCC (tính độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể) sau khi gây đột biến axit amin.

"Đoạn gắn kết với kháng nguyên" được dùng để chỉ đoạn mà vẫn giữ được hoạt tính gắn kết với kháng nguyên của kháng thể nguyên vẹn. Cụ thể là, thuật ngữ này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đoạn Fab, đoạn Fab, đoạn F(ab')₂, và đoạn Fv hoặc đoạn sFv gắn kết với CD79B của người. Đoạn Fv chứa vùng biến

đôi chuỗi nặng của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, nhưng không bao gồm vùng cố định, và có đoạn kháng thể nhỏ nhất với toàn bộ các vị trí gắn kết với kháng nguyên. Nói chung, kháng thể Fv cũng chứa yếu tố liên kết polypeptit nằm giữa các vùng VH và VL, và có thể tạo thành cấu trúc cần để gắn kết với kháng nguyên. Các yếu tố liên kết khác nhau cũng có thể được sử dụng để liên kết hai vùng biến đổi của kháng thể thành chuỗi polypeptit, mà có thể được gọi là kháng thể chuỗi đơn hoặc Fv chuỗi đơn (sFv).

Thuật ngữ "gắn kết với CD79B" theo sáng chế được dùng để chỉ khả năng tương tác với CD79B hoặc epitop của nó. CD79B hoặc epitop của nó có thể có nguồn gốc từ người. Thuật ngữ "vị trí gắn kết với kháng nguyên" theo sáng chế được dùng để chỉ vị trí tuyến tính hoặc vị trí ba chiều gián đoạn trên kháng nguyên, được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế.

Thuật ngữ "epitop" được dùng để chỉ một vị trí trên kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc kháng thể. Epitop có thể được tạo thành nhờ axit amin liên kề hoặc axit amin không liên kề mà được đem đến gần nhau nhờ gấp bậc ba protein. Các epitop được tạo thành bởi axit amin liên kề thường vẫn còn sau khi cho tiếp xúc với dung môi gây biến tính, trong khi đó các epitop được tạo thành nhờ gấp bậc ba thường biến mất sau khi xử lý bằng dung môi gây biến tính. Các epitop thường bao gồm ít nhất 3-15 axit amin ở một cấu hình không gian duy nhất. Các phương pháp để xác định epitop nào được liên kết với kháng thể nhất định là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm thẩm tách miễn dịch, phân tích phát hiện bằng kết tủa miễn dịch, v.v.. Các phương pháp xác định cấu hình không gian của epitop bao gồm các kỹ thuật trong lĩnh vực kỹ thuật này và các kỹ thuật được mô tả ở đây, ví dụ phân tích tinh thể tia X, cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều, v.v..

"Gắn kết đặc hiệu" và "gắn kết chọn lọc" được dùng để chỉ việc gắn kết của kháng thể với epitop trên kháng nguyên tiền định. Nói chung, khi CD79B của người tái tổ hợp hoặc epitop của nó được sử dụng làm chất phân tích và kháng thể được sử dụng làm phối tử, khi được đo bằng công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance-SPR) trên thiết bị, kháng thể gắn kết với kháng nguyên tiền định hoặc epitop của nó với hằng số phân ly (K_D) xấp xỉ dưới 10^{-7} M hoặc thậm chí nhỏ hơn, và ái lực gắn kết của nó với kháng nguyên tiền định hoặc epitop của nó ít nhất

bằng hai lần ái lực gắn kết với kháng nguyên không đặc hiệu (như BSA, v.v.) ngoại trừ kháng nguyên tiền định (hoặc epitop của nó) hoặc các kháng nguyên có liên quan gần.

"Khả năng phản ứng chéo" được dùng để chỉ khả năng kháng thể theo sáng chế gắn kết với CD79B từ các loài khác nhau. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế gắn kết với CD79B người cũng có thể gắn kết với CD79B của các loài khác nhau. Phản ứng chéo được xác định bằng cách phát hiện khả năng phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên tinh khiết trong các thử nghiệm gắn kết (ví dụ SPR và ELISA), hoặc gắn kết hoặc tương tác chức năng với các tế bào biểu hiện sinh lý. Các phương pháp xác định khả năng phản ứng chéo bao gồm các thử nghiệm gắn kết chuẩn như được mô tả ở đây, ví dụ phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy.

"Ức chế" hoặc "phong bế" được sử dụng thay cho nhau và bao gồm cả ức chế/phong bế một phần và hoàn toàn. Tốt hơn là, ức chế/phong bế CD79B làm giảm hoặc thay đổi mức hoặc loại hoạt tính thông thường mà xảy ra khi CD79B gắn kết mà không bị ức chế hoặc phong bế. Ức chế và phong bế cũng được dự định là bao gồm cả việc làm giảm đáng kể ái lực gắn kết với CD79B khi tiếp xúc với kháng thể kháng CD79B, so với CD79B không tiếp xúc với kháng thể kháng CD79B.

"Ức chế sự phát triển" (ví dụ khi đề cập đến các tế bào) được dự định hiểu là làm giảm đáng kể sự phát triển của tế bào.

Phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là đã biết rõ và có thể được tìm thấy trong giải pháp kỹ thuật đã biết, như Antibody: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (chapters 5-8 và 15). Ví dụ, CD79B của người hoặc đoạn của nó có thể được sử dụng để gây miễn dịch chuột, và các kháng thể thu được có thể được phục hồi đặc tính, tinh chế và giải trình tự axit amin có thể được tiến hành bằng các phương pháp thông thường. Đoạn gắn kết với kháng nguyên cũng có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế được thao tác di truyền để đưa một hoặc nhiều vùng FR của người vào vùng CDR không phải của người. Các trình tự dòng mầm FR của người có thể được lấy từ trang web ImmunoGeneTics (IMGT) <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ tài liệu The Immunoglobulin

FactsBook, 2001 ISBN 012441351.

Kháng thể đã thao tác di truyền hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế có thể được sản xuất và tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa chuỗi nặng (SEQ ID NO: 20) và chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 21) có thể được tách dòng và tái tổ hợp trong vector biểu hiện GS. Vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định vào tế bào CHO. Theo giải pháp kỹ thuật được đề xuất nhiều, các hệ biểu hiện của động vật có vú có thể khiến kháng thể bị glycosyl hóa, đặc biệt là ở đầu N được bảo toàn cao của vùng Fc. Các dòng ổn định được tạo ra bằng cách biểu hiện kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên của người. Các dòng dương tính được nhân rộng trong môi trường không chứa huyết thanh trong bình phản ứng sinh học để sản xuất kháng thể. Môi trường nuôi cấy mà kháng thể được tiết vào có thể được tinh chế và thu gom bằng các kỹ thuật thông thường. Các kháng thể có thể được lọc và được cô bằng các phương pháp thông thường. Hỗn hợp hòa tan và polyme cũng có thể được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường, ví dụ rây phân tử và trao đổi ion. Sản phẩm thu được cần được đông lạnh ngay lập tức, như ở nhiệt độ -70°C , hoặc được đông khô.

Kháng thể theo sáng chế được dùng để chỉ kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng (mAb) được mô tả trong sáng chế được dùng để chỉ kháng thể thu được từ dòng tế bào dòng đơn, dòng tế bào này không bị giới hạn ở tế bào nhân thực, tế bào nhân sơ hoặc dòng tế bào dòng thực khuẩn thể. Kháng thể đơn dòng hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp sử dụng, ví dụ, công nghệ tế bào lai, công nghệ tái tổ hợp, công nghệ biểu hiện trên thể thực khuẩn, công nghệ tổng hợp (như ghép CDR), hoặc các công nghệ khác hiện có.

Các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để sàng lọc kháng thể để cạnh tranh gắn kết với cùng một epitop. Ví dụ, các nghiên cứu về cạnh tranh và cạnh tranh chéo có thể được tiến hành để tạo ra kháng thể cạnh tranh hoặc cạnh tranh chéo với nhau để gắn kết với kháng nguyên. Một phương pháp với năng suất cao tạo ra kháng thể gắn kết với cùng một epitop dựa trên sự cạnh tranh chéo của chúng được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO03/48731. Vì vậy, các kỹ thuật thông thường đã biết đối

với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể và đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó cạnh tranh với các phân tử kháng thể theo sáng chế để gắn kết với cùng một epitop trên CD79B.

Các thuật ngữ "cho", "sử dụng" và "điều trị", nếu được sử dụng cho động vật, người, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, được dùng để chỉ việc cho thuốc ngoại sinh, chất điều trị, chất chẩn đoán hoặc chế phẩm tiếp xúc với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học. "Cho", "sử dụng" và "điều trị" có thể được dùng để chỉ ví dụ các phương pháp điều trị, nghiên cứu dược động học, chẩn đoán, nghiên cứu và phương pháp thử nghiệm. Điều trị tế bào bao gồm cho các chất tiếp xúc với tế bào, và cho các chất tiếp xúc với dịch mà lần lượt tiếp xúc với tế bào. "Cho", "sử dụng" và "điều trị" cũng được dùng để chỉ việc điều trị ví dụ các tế bào bằng các chất, chế phẩm chẩn đoán, chế phẩm gắn kết hoặc bằng tế bào khác *in vitro* và *ex vivo*. "Điều trị" khi sử dụng cho người, thú y hoặc đối tượng nghiên cứu được dùng để chỉ điều trị chữa bệnh, điều trị phòng bệnh hoặc điều trị dự phòng, nghiên cứu và các ứng dụng chẩn đoán.

"Điều trị" được dùng để chỉ việc cho chất điều trị bên trong hoặc bên ngoài, như chế phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của chúng theo sáng chế, vào đối tượng mà đã mắc, nghi ngờ mắc hoặc dễ mắc một hoặc nhiều bệnh hoặc các triệu chứng của bệnh, và chất điều trị được biết đến là có tác dụng điều trị trên các triệu chứng này. Nói chung, chất điều trị được đưa vào với lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở đối tượng hoặc nhóm đối tượng được điều trị, để làm thoái lui các triệu chứng này hoặc ức chế sự phát triển các triệu chứng này đến mức đánh giá được về mặt lâm sàng. Lượng chất điều trị mà hữu hiệu để làm thuyên giảm triệu chứng bệnh đặc hiệu bất kỳ (cũng được gọi là "lượng hữu hiệu để điều trị") có thể khác nhau tùy thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ tình trạng bệnh của đối tượng, độ tuổi và thể trọng, và khả năng tạo ra tác dụng điều trị mong muốn của thuốc ở đối tượng. Dầu sao các triệu chứng bệnh đã được làm thuyên giảm có thể được đánh giá bằng các phương pháp thử nghiệm lâm sàng bất kỳ thường được sử dụng bởi bác sỹ hoặc chuyên gia chăm sóc sức khỏe để đánh giá mức độ nặng hoặc sự tiến triển của các triệu chứng. Mặc dù các phương án theo sáng chế (ví dụ phương pháp điều trị hoặc

sản phẩm) có thể không hiệu quả trong việc làm thuyên giảm triệu chứng bệnh đích ở đối tượng nhất định, song như được xác định theo các phương pháp kiểm định thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như kiểm định t Student, kiểm định chi bình phương, kiểm định U của Mann và Whitney, kiểm định Kruskal-Wallis (kiểm định H), kiểm định Jonckheere-Terpstra và kiểm định Wilcoxon, chúng cần làm giảm triệu chứng bệnh đích trên một số đối tượng có ý nghĩa thống kê.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" bao gồm lượng đủ để làm thuyên giảm hoặc ngăn ngừa các triệu chứng hoặc tình trạng của bệnh. Lượng hữu hiệu cũng được dùng để chỉ lượng đủ để cho phép hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc chẩn đoán. Lượng hữu hiệu dùng cho đối tượng cụ thể hoặc đối tượng thú y có thể khác nhau tùy thuộc vào các yếu tố sau: như tình trạng bệnh được điều trị, tình trạng sức khỏe chung của đối tượng, phương pháp, đường dùng và liều dùng, và mức độ nặng của các tác dụng phụ. Lượng hữu hiệu có thể là liều tối đa hoặc phác đồ dùng liều mà tránh được các tác dụng phụ đáng kể hoặc các tác dụng gây độc.

Thuật ngữ "tương đồng" được dùng để chỉ sự tương đồng trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai polypeptit. Khi các vị trí trong hai trình tự so sánh được chiếm bởi cùng một tiểu đơn vị monome axit amin hoặc bazơ, ví dụ nếu mỗi vị trí của hai phân tử ADN được chiếm bởi adenin, thì các phân tử này tương đồng ở vị trí đó. Tỷ lệ phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là một hàm của số vị trí bất cặp hoặc tương đồng có chung bởi hai trình tự chia cho tổng số vị trí cần so sánh $\times 100\%$. Ví dụ, trong trường hợp sắp thẳng thành trình tự tối ưu, nếu có 6 vị trí bất cặp hoặc tương đồng trong số 10 vị trí ở hai trình tự, thì hai trình tự đó tương đồng 60%. Nói chung, so sánh được tiến hành khi hai trình tự được sắp thẳng hàng để thu được tỷ lệ phần trăm tương đồng tối đa.

Thuật ngữ "tế bào", "dòng tế bào" và "chủng tế bào nuôi cấy" như được sử dụng ở đây có thể được sử dụng thay đổi cho nhau, và toàn bộ các thuật ngữ này bao gồm cả tế bào con của chúng. Do đó, các thuật ngữ "tế bào biến nạp" và "tế bào đã biến nạp" bao gồm các tế bào thử nghiệm sơ cấp và các chủng nuôi cấy thu được từ đó, bất kể số lần cấy chuyển. Cũng cần hiểu rằng do các đột biến cố ý hoặc không cố ý, toàn bộ thể hệ con không thể giống nhau hoàn toàn về hàm lượng ADN.

Tế bào con đột biến được sàng lọc với hoạt tính sinh học hoặc chức năng giống như hoạt tính sinh học hoặc chức năng của các tế bào đã biến nạp ban đầu được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ này. Khi một thuật ngữ được đề cập đến các chỉ dẫn khác nhau, thuật ngữ này sẽ rõ ràng dựa vào ngữ cảnh.

Thuật ngữ "tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc hoàn cảnh được mô tả sau thuật ngữ "tùy ý" có thể (nhưng không nhất thiết) xảy ra, và sự mô tả bao gồm các trường hợp mà sự kiện hoặc hoàn cảnh xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, "tùy ý bao gồm 1 đến 3 vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể" có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có các trình tự cụ thể có thể (nhưng không nhất thiết) có mặt.

Thuật ngữ "dược phẩm" có nghĩa là một hỗn hợp chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên, hoặc thể tiếp hợp được mô tả ở đây, hoặc muối được dụng/chấp nhận được về mặt sinh lý hoặc tiền dược chất của chúng, và (các) thành phần hóa học khác, cũng như là các thành phần khác như (các) chất mang và (các) tá dược được dụng/chấp nhận được về mặt sinh lý. Mục đích của dược phẩm là để thúc đẩy việc sử dụng cho cơ quan, mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu hoạt chất và nhờ đó đem lại hoạt tính sinh học.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa vào đây để mô tả thêm về sáng chế, tuy nhiên các ví dụ này không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các phương pháp thử nghiệm mà không chỉ rõ các điều kiện cụ thể trong các ví dụ hoặc ví dụ thử nghiệm theo sáng chế thường theo điều kiện thông thường, hoặc các điều kiện được đưa ra bởi nhà sản xuất nguyên liệu thô hoặc sản phẩm. Xem tài liệu Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor; *Current Protocols Molecular Biology*, Ausubel et al., Greene Publishing Associates, Wiley Interscience, NY. Các chất phản ứng mà không chỉ rõ nguồn cụ thể là các chất phản ứng thông thường được mua trên thị trường.

Ví dụ 1. Tách dòng và biểu hiện các kháng nguyên protein

Các kháng thể (bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) và các kháng nguyên được tạo ra bằng các phương pháp PCR mở rộng chồng chéo đã biết trong lĩnh vực kỹ

thuật này, và các đoạn ADN được tạo ra bằng PCR mở rộng chông chéo được chèn vào vector biểu hiện pEE6.4 (Lonza Biologics) bằng cách sử dụng hai vị trí phân cắt enzym HindIII/BstBI, và các kháng thể và kháng nguyên được biểu hiện trong các tế bào 293F (Invitrogen, Cat# R790-07). Protein tái tổ hợp thu được được sử dụng để gây miễn dịch hoặc sàng lọc. Trình tự gen CD79B của người được thu từ NCBI (NP_000617.1), và vùng ngoại bào của nó (ECD) chứa 159 axit amin (Met1-Asp159).

> Trình tự axit amin của protein dung hợp của miền ngoại bào CD79B của người (ECD) và vùng FC của người (ECD CD79B của người-hFc):

ARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNASGNVSWLW
KQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTS
EVYQGCGETELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKD
DSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEEPCKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1).

> Trình tự axit amin của protein dung hợp của miền ngoại bào CD79B của người (ECD) và đuôi His (ECD CD79B của người-His):

ARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNASGNVSWLW
KQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTS
EVYQGCGETELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKD
DSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEHHHHH
H (SEQ ID NO: 2).

Ví dụ 2. Sản xuất kháng thể đơn dòng của chuột

1. Gây miễn dịch chuột và phát hiện hiệu giá huyết thanh

Protein dung hợp của miền ngoại bào CD79B của người (ECD) và vùng FC của người (ECD CD79B của người-hFc), và protein dung hợp của vùng ngoại bào CD79B của người (ECD) và đuôi His (ECD CD79B của người-His) được sử dụng làm các chất gây miễn dịch để gây miễn dịch cho chuột Balb/c và SJL bằng cách

tiêm trong màng bụng, tương ứng, để kích thích chuột sản sinh kháng thể chống lại miền ngoại bào (extracellular domain-ECD) của CD79B của người *in vivo*.

Các bước thử nghiệm là như sau:

1) Gây miễn dịch bằng cách tiêm trong màng bụng. Lượng kháng nguyên cần để gây miễn dịch được tính toán theo quy trình gây miễn dịch. Kháng nguyên protein được pha loãng bằng PBS đến nồng độ kháng nguyên tương ứng nếu cần, và sau đó kháng nguyên được nhũ hóa. Hỗn hợp đã nhũ hóa chứa kháng nguyên và tá được chuyển vào bơm tiêm vô trùng có dung tích 2,0 mL, lưu ý đến việc đẩy bọt khí ra. Đuôi của chuột được túm bằng tay phải và da đầu và cổ của chuột được túm nhẹ bằng ngón cái và ngón trỏ của tay trái. Với khoang bụng hướng lên trên, vị trí tiêm trên bụng phải của chuột được lau bằng cục bông tẩm cồn 75%. Nạp được chất kháng nguyên vào bơm tiêm trước, với góc xiên của đầu kim tiêm hướng lên trên và đầu của chuột hướng xuống dưới. Đầu kim tiêm được xuyên qua da theo phương ngang, bơm tiêm được xuyên vào khoang bụng của chuột ở góc bằng 45 độ so với khoang bụng, và hỗn hợp chứa kháng nguyên và tá được tiêm từ từ. Sau khi hoàn tất việc gây miễn dịch, tiến hành theo dõi trong ít nhất 2 giờ.

2) Thu gom huyết thanh của chuột. Số ống huyết thanh được đánh dấu tương ứng với mỗi chuột và số tai của chuột được kiểm tra. Chuột được túm bằng một tay và khoảng 100 μ L máu toàn phần được lấy ra qua đường tĩnh mạch dưới hàm dưới. Mẫu máu toàn phần đã thu gom được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 2 giờ; sau đó huyết thanh ở phần trên của ống ly tâm được thu gom bằng cách ly tâm. Huyết thanh có thể được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong một tuần để phát hiện hiệu giá kháng thể và các thử nghiệm có liên quan khác. Huyết thanh có thể được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ -80°C để bảo quản trong một thời gian dài để tránh sự đông lạnh và rã đông lặp lại.

3) Phát hiện hiệu giá huyết thanh của chuột đã gây miễn dịch bằng thử nghiệm ELISA. Trước khi bắt đầu thử nghiệm, đĩa có 96 lỗ được dán nhãn và được phủ kháng nguyên ở nồng độ 1 μ g/mL, 50 μ L mỗi lỗ qua đêm trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Ngày tiếp theo, đĩa kháng nguyên đã phủ ngày trước đó được lấy ra và rửa bằng dung dịch rửa đĩa (dung dịch rửa: 1×PBST). Sau khi rửa, đĩa được phong bế bằng dung dịch phong bế BSA 1% được điều chế trong 1×PBST ở nhiệt độ 37°C

trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa bằng dung dịch rửa 1×PBST ba lần, các dung dịch huyết thanh pha loãng khác nhau cần thử nghiệm được bổ sung và ủ trong tủ ủ 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa bằng dung dịch rửa 1×PBST 3 lần, 100 µl kháng thể thứ cấp của dê kháng chuột đã pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 được bổ sung và ủ trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C trong 0,5 giờ. Sau khi rửa đĩa, dung dịch sinh màu TMB A và B được trộn theo tỷ lệ 1:1 và sau đó tiến hành hiện màu. Phản ứng hiện màu được kết thúc bằng axit clohydric 1 N sau 15 phút. Các giá trị huỳnh quang ở bước sóng 450nm được phát hiện trên thiết bị đọc đĩa đa chức năng Spectra Max M5.

4) Phát hiện hiệu giá huyết thanh bằng FACS ở chuột đã gây miễn dịch. Các dịch nổi tế bào DoHH2 hoặc tế bào đơn nhân máu ngoại vi của khỉ được ly tâm và các tế bào được tái huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA và được đếm. Huyết thanh cần thử nghiệm của mỗi nhóm chuột đã gây miễn dịch được bổ sung. Sau 60 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, các tế bào được rửa ba lần và sau đó kháng thể thứ cấp kháng Fc Ig của chuột-FITC được bổ sung. Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối, các tế bào được rửa ba lần và được tái huyền phù nhẹ trong PBS chứa 0,1% BSA để phát hiện trên thiết bị.

Các kết quả phát hiện hiệu giá huyết thanh bằng thử nghiệm ELISA và FACS của mỗi nhóm chuột được thể hiện trên Fig.1 đến Fig.7.

Năm con chuột Balb/c được gây miễn dịch bằng protein EDC CD79B của người-hFc, được đánh số 5491, 5492, 5493, 5494 và 5495. Các kết quả của thử nghiệm phát hiện hiệu giá huyết thanh bằng ELISA được thể hiện trên Fig.1. Các kết quả chỉ ra rằng hiệu giá huyết thanh ở chuột đã gây miễn dịch đã đạt tới mức lớn hơn 1:100K. Các kết quả của thử nghiệm phát hiện hiệu giá huyết thanh bằng FACS của chuột được thể hiện trên Fig.2. Có thể thấy rằng các kháng thể được sinh ra trong huyết thanh của chuột có thể nhận diện đặc hiệu protein CD79B trên bề mặt của các tế bào DoHH2.

Năm con chuột SJL được gây miễn dịch bằng protein EDC CD79B người-hFc, được đánh số 5496, 5497, 5498, 5499 và 5500. Các kết quả của việc phát hiện hiệu giá huyết thanh bằng ELISA được thể hiện trên Fig.3. Các kết quả chỉ ra rằng hiệu giá huyết thanh ở chuột được gây miễn dịch đạt đến mức lớn hơn 1:100K. Các kết quả của việc phát hiện hiệu giá huyết thanh bằng FACS ở chuột được thể hiện trên

Fig.4. Có thể thấy rằng các kháng thể được sinh ra trong huyết thanh của chuột có thể nhận diện đặc hiệu protein CD79B trên bề mặt của tế bào DoHH2.

Năm con chuột SJL được gây miễn dịch protein EDC CD79B người-his, được đánh số 5726, 5727, 5728, 5729 và 5730. Các kết quả của việc phát hiện hiệu giá huyết thanh bằng ELISA được thể hiện trên Fig.5. Các kết quả chỉ ra rằng hiệu giá huyết thanh ở chuột đã gây miễn dịch đạt tới mức lớn hơn 1:10K. Các kết quả của việc phát hiện hiệu giá huyết thanh bằng FACS được thể hiện trên Fig.6. Có thể thấy rằng các kháng thể sản sinh trong huyết thanh của chuột có thể nhận diện đặc hiệu protein CD79B trên bề mặt của tế bào DoHH2.

Từ các kết quả trên đây, có thể thấy rằng chuột được gây miễn dịch sẽ sản sinh kháng thể đặc hiệu chống lại CD79B, và chuột trên đây có thể được sử dụng để dung hợp tế bào để tạo ra các dòng tế bào lai có khả năng tiết các kháng thể đặc hiệu chống lại CD79B.

2. Chuẩn bị tế bào lai và sàng lọc kháng thể

Dung hợp tế bào là hoạt động tự phát hoặc được tiến hành nhân tạo để thúc đẩy sự dung hợp của các tế bào lympho của chuột và các tế bào u tủy SP2/0 (ATCC, CCL-121TM) thành các tế bào lai, mà có chức năng tiết kháng thể và có thể tăng sinh vô hạn. Các tế bào lympho của nhóm chuột đã gây miễn dịch và các tế bào u tủy được dung hợp bằng cách sử dụng phương pháp điện dung hợp, và các tế bào lai được sử dụng để sàng lọc kháng thể tiếp theo.

1) Thử nghiệm điện dung hợp. Một tuần trước khi dung hợp, các tế bào SP2/0 được nhân rộng trong môi trường DMEM 10%. Các hạch lympho và lá nách được loại bỏ khỏi chuột đã gây chết trong tủ an toàn về mặt sinh học, rửa và nghiền trong đĩa petri, và các tế bào lympho được thu gom. SP2/0 và các tế bào lympho được trộn với nhau theo tỷ lệ, và tiến hành dung hợp trong thiết bị điện dung hợp, và chương trình dung hợp được cài đặt. Sau khi dung hợp, các tế bào được đặt vào đĩa có 96 lỗ và nuôi cấy trong tủ ủ 37°C, 5% CO₂. Tình trạng tế bào được theo dõi hàng ngày, và tỷ lệ dung hợp tế bào được tính 5 ngày sau khi dung hợp. Các tế bào lai đã dung hợp được sàng lọc ở thời điểm 9-14 ngày sau khi dung hợp, và các tế bào trong lỗ dương tính được chọn để nhân lên trong đĩa có 24 lỗ.

2) Tách dòng phụ bằng phương pháp pha loãng giới hạn. Các dòng tế bào cần

tách dòng phụ được tái huyền phù từ các lỗ nuôi cấy có 24 lỗ và được đếm. Mỗi dòng tế bào được pha loãng đến nồng độ tế bào bằng 5-10 tế bào/mL. Dịch nổi tế bào đã pha loãng được bổ sung vào đĩa nuôi cấy dùng một lần có đường kính bằng 15 cm và 0,2 mL được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy có 96 lỗ, với mỗi lỗ chứa 1-2 tế bào. Đĩa có 96 lỗ đã cấy tế bào được đặt vào tủ ủ 37°C, 5% CO₂ để nuôi cấy. Sau 7-10 ngày, đĩa tách dòng phụ được phát hiện và sàng lọc theo tình trạng phát triển của tế bào, và các dòng dương tính được chọn lọc và được chuyển vào 24 lỗ để xác nhận dương tính tiếp.

3) Sàng lọc ELISA. Trước khi bắt đầu thử nghiệm, đĩa 96 lỗ được đánh dấu và được phủ kháng nguyên ở nồng độ 1 µg/mL, 50 µl mỗi lỗ qua đêm trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Ngày tiếp theo, đĩa kháng nguyên đã phủ ngày trước đó được lấy ra và rửa bằng dung dịch rửa đĩa (dung dịch rửa: 1×PBST). Sau khi rửa, đĩa được phong bế bằng dung dịch phong bế 1% BSA được điều chế trong 1×PBST ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa bằng dung dịch rửa 1×PBS ba lần, 50 µl dịch nổi tế bào cần thử nghiệm được bổ sung và ủ trong tủ ủ 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa bằng dung dịch rửa 1×PBS ba lần, 100 µl kháng thể thứ cấp của dê kháng chuột đã pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 được bổ sung và ủ trong tủ ủ 37°C trong 0,5 giờ. Sau khi rửa đĩa, dung dịch sinh màu TMB A và B được trộn ở tỷ lệ 1:1 và sau đó tiến hành hiện màu. Phản ứng hiện màu được kết thúc bằng axit clohydric 1N sau 15 phút. Các giá trị huỳnh quang ở bước sóng 450nm được phát hiện trên thiết bị đọc đĩa đa chức năng Spectra Max M5.

4) Sàng lọc bằng FACS. Các huyền phù tế bào DoHH2 được ly tâm và các tế bào được tái huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA và được đếm. Dịch nổi tế bào cần thử nghiệm được bổ sung. Sau 60 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, các tế bào được rửa ba lần và sau đó kháng thể thứ cấp kháng Fc của IgG của chuột-FITC được bổ sung. Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối, các tế bào được rửa ba lần và tái huyền phù nhẹ trong PBS chứa 0,1% BSA để phát hiện trên thiết bị.

5) Xác định các dòng tế bào lai dương tính. Sau khi dung hợp và sàng lọc dòng phụ của các tế bào lá nách của chuột, các tác giả sáng chế đã thu được một số kháng thể đặc hiệu chống lại kháng nguyên CD79B của người. Trong số các tế bào này, 17

tế bào lai có khả năng gắn kết trong thử nghiệm ELISA và FACS tốt nhất được sử dụng để sản sinh và tinh chế kháng thể. Các kết quả phát hiện bằng thử nghiệm ELISA của dịch nổi nuôi cấy của các dòng tế bào lai dương tính kháng CD79B của người được thể hiện trong Bảng 1. Các kết quả phát hiện bằng FACS của dịch nổi nuôi cấy của các dòng tế bào lai dương tính kháng CD79B của người được thể hiện trong bảng 2. mIgG được sử dụng làm đối chứng âm trong cả thử nghiệm ELISA và FACS.

Bảng 1. Các kết quả phát hiện bằng thử nghiệm ELISA của các dòng tế bào lai dương tính kháng CD79B của người

Kháng thể số	Dòng số	Các kết quả phát hiện (OD450)
Đối chứng âm	mIgG	0,05
mAb001	12A11-1G1	3,26
mAb002	19F10-1D7	3,69
mAb003	51E5G6	3,02
mAb004	67B10C1	3,41
mAb005	78A9F4	3,73
mAb006	48F11D6	3,34
mAb007	61A11F1	3,40
mAb008	63G2A2	3,56
mAb009	75F1E2	3,57
mAb010	66G3E7	3,83
mAb011	66E12H3	3,41
mAb012	73A8F3	3,45
mAb013	74C4F3	3,31
mAb014	70B8B3	3,10
mAb015	83B2G2	3,41
mAb016	83C2D4	3,46
mAb017	86F11F6	3,80

Bảng 2. Các kết quả phát hiện bằng FACS của các dòng tế bào lai dương tính kháng CD79B của người

Kháng thể số	Dòng số	Các giá trị huỳnh quang trung bình
Đối chứng âm	mIgG	58
mAb001	12A11-1G1	13032
mAb002	19F10-1D7	5943
mAb003	51E5G6	33918
mAb004	67B10C1	26000
mAb005	78A9F4	24454
mAb006	48F11D6	20120
mAb007	61A11F1	18039
mAb008	63G2A2	16453
mAb009	75F1E2	16001
mAb010	66G3E7	15897
mAb011	66E12H3	14688
mAb012	73A8F3	14073
mAb013	74C4F3	12894
mAb014	70B8B3	8776
mAb015	83B2G2	10036
mAb016	83C2D4	9990
mAb017	86F11F6	8132

3. Sản xuất, tinh chế và xác định các kháng thể đơn dòng của chuột

1) Sản xuất và tinh chế kháng thể đơn dòng của chuột. Các tế bào lai được sử dụng để sản xuất kháng thể được quan sát dưới kính hiển vi. Các tế bào được thu gom khi phát triển đến hơn 70% và ở trạng thái tế bào tốt, và được đếm bằng thiết bị đếm tế bào Countstar IC1000. Nồng độ tế bào được điều chỉnh đến mức nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 5×10^5 tế bào/mL bằng môi trường được chuẩn bị kỹ, và các tế bào được chuyển vào lọ lắc. Các lọ lắc chứa các tế bào được chuyển vào

được đưa lên tủ ủ lơ lửng để ủ ở nhiệt độ 37°C trong 10-15 ngày. Tình trạng phát triển của tế bào được theo dõi hàng ngày. Môi trường nuôi cấy được lấy ra để tinh chế sau khi môi trường chuyển sang màu cam và trong suốt. Các kháng thể được tinh chế bằng cách cho dịch nổi tế bào đi qua cột protein A, quá trình tinh chế được tiến hành theo các phương pháp thông thường.

2) Phát hiện các kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người bằng thử nghiệm ELISA. Trước khi bắt đầu thử nghiệm, đĩa có 96 lỗ được đánh dấu và được phủ kháng nguyên ở nồng độ 1 µg/mL, 50 µl mỗi lỗ qua đêm trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Ngày tiếp theo, đĩa kháng nguyên đã phủ ngày trước đó được lấy ra và rửa bằng dung dịch rửa đĩa (dung dịch rửa: 1×PBST) trong một lần. Sau khi rửa, đĩa được phong bế bằng dung dịch phong bế 1% BSA được điều chế trong 1×PBST ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa bằng dung dịch rửa 1×PBS ba lần, 50 µl kháng thể, được pha loãng đến 100 nM (theo tỷ lệ 1:10), được bổ sung và ủ trong tủ ủ 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa bằng dung dịch rửa 1×PBST trong 3 lần, 100 µl kháng thể thứ cấp của dê kháng chuột đã pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 được bổ sung và ủ trong tủ ủ 37°C trong 0,5 giờ. Sau khi rửa đĩa, dung dịch sinh màu TMB A và B được trộn ở tỷ lệ 1:1 và sau đó tiến hành hiện màu. Phản ứng hiện màu được kết thúc bằng axit clohydric 1N sau 15 phút. Các giá trị huỳnh quang ở bước sóng 450nm được phát hiện trên thiết bị đọc đĩa đa chức năng Spectra Max M5. Trong số các kháng thể, ba kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người có khả năng gắn kết mạnh nhất trong thử nghiệm ELISA, bao gồm mAb015, mAb016 và mAb017 (xem Fig.7 để biết số liệu cụ thể). Trong số các kháng thể, hIgG1 là kháng thể đối chứng âm và SN8 là kháng thể đối chứng dương. SN8 là kháng thể được sử dụng trong thuốc polatuzumab vedotin được tiếp hợp kháng thể do Roche Pharmaceuticals sản xuất (đối với trình tự, tham khảo nguồn trình tự: US20170362318A). Hiện tại, polatuzumab vedotin đã được phê duyệt bởi FDA để đưa ra thị trường. Từ các kết quả trong thử nghiệm ELISA có thể thấy rằng, khả năng gắn kết của ba kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người mAb015, mAb016 và mAb017 tốt hơn là được chọn lọc bởi sàng chế là tương tự với khả năng gắn kết của SN8.

3) Phát hiện các kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người bằng

FACS. Sau khi ly tâm dịch nổi tế bào DOHH2, các tế bào được tái huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA và được đếm. 100 μ l kháng thể được pha loãng đến 100 nM (theo tỷ lệ 1:10) được bổ sung và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa các tế bào ba lần, kháng thể thứ cấp kháng Fc của IgG của chuột-FITC được bổ sung. Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối, các tế bào được rửa ba lần và tái huyền phù nhẹ trong PBS chứa 0,1% BSA để thử nghiệm trên thiết bị. Trong số các kháng thể, ba kháng thể đơn dòng kháng CD79B của người có khả năng gắn kết mạnh nhất trong thử nghiệm FACS, bao gồm mAb015, mAb016 và mAb017 (xem Fig.8 để biết số liệu cụ thể). Trong số các kháng thể, hIgG1 là kháng thể đối chứng âm và SN8 là kháng thể đối chứng dương. Từ các kết quả có thể thấy rằng trong thử nghiệm FACS, ái lực gắn kết của ba kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người mAb015, mAb016 và mAb017 tốt hơn là được chọn lọc bởi sàng chế là tốt hơn cả ái lực gắn kết của SN8.

4) Phát hiện các kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người bằng thử nghiệm FACS. Các tế bào 293F-cynoCD79B được tạo ra bằng phương pháp chuyển nhiễm tạm thời. Sau khi huyền phù tế bào được ly tâm, các tế bào được tái huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA và được đếm. 100 μ l kháng thể được bổ sung ở nồng độ bằng 10 μ g/mL và 1 μ g/mL, tương ứng. Các tế bào được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa các tế bào ba lần, kháng thể thứ cấp kháng Fc của IgG của chuột-FITC được bổ sung. Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối, các tế bào được rửa ba lần và tái huyền phù nhẹ trong PBS chứa 0,1% BSA để phát hiện trên thiết bị. Các kết quả của việc phát hiện bằng thử nghiệm FACS cho thấy phản ứng chéo giữa các kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người được thể hiện Fig.9, trong đó mIgG1 là kháng thể đối chứng âm, kháng HR008 cyno là kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B cyno, trình tự kháng thể của nó thu được từ kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B cyno (dòng số 10D10) trong công bố đơn quốc tế số WO2009012268A1. Từ các kết quả có thể thấy rằng tất cả các kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người được sàng lọc trong sàng chế không nhận diện được CD79B cyno.

5) Phát hiện kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B của người bằng thử nghiệm SPR. Ái lực giữa kháng thể kháng CD79B của người và kháng nguyên của

nó CD79B người-His được phát hiện bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance-SPR). Protein kháng nguyên CD79B người-His được cố định vào chip CM5. Mức gắn kết được để ở 100 RU. Dung dịch đệm chạy là HBS-EP+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% dịch nổi P20). Kháng thể đã pha loãng chảy qua kênh thử nghiệm và kênh đối chứng ở tốc độ dòng 30 μ l/phút trong 3 phút, và tiến hành phân ly trong 5 phút. Sau đó dung dịch đệm tái tạo (dung dịch đệm glyxin 10 mM, pH 1,5) được chạy ở tốc độ dòng 30 μ l/phút trong 30 giây. Số liệu được phân tích bằng phần mềm đánh giá Biacore 8K.

Ví dụ 3. Xác định trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng của chuột

Các dòng tế bào lai đơn dòng ái lực cao thu được trong ví dụ 2 được xác định trình tự axit amin của vùng biến đổi. Sau đó, các kháng thể khảm của chuột và người (cAb) được biểu hiện tái tổ hợp, và sau đó tiến hành xác định tiếp kháng thể. Các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của gen kháng thể được khuếch đại bằng PCR phiên mã ngược, được nối với vector và được giải trình tự để thu được trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng. Đầu tiên, toàn bộ ARN tế bào của dòng tế bào đơn có hoạt tính tốt trong ví dụ 2 được chiết bằng cách sử dụng kit tinh chế ARN (Qiagen, số sản phẩm 74134, xem các bước trong quy trình tinh chế). Sau đó cADN mạch đơn được tạo ra bằng cách sử dụng kit tổng hợp cADN (Invitrogen, số sản phẩm 18080-051), tức là phiên mã ngược cADN sử dụng mỗi Oligo-dT. cADN được sử dụng làm khuôn mẫu để tổng hợp các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể bằng cách sử dụng phương pháp PCR, và sản phẩm PCR được tách dòng trong vector pMD-18T TA và sau đó được chuyển sang bước giải trình tự. Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể thu được được tách dòng tương ứng trong vector biểu hiện (xem ví dụ 1 để biết phương pháp), kháng thể đơn dòng tái tổ hợp được biểu hiện, và hoạt tính được kiểm tra (xem ví dụ 2 để biết phương pháp), và sau đó tiến hành thao tác làm tương thích với người.

Các gốc axit amin của VH/VL CDR của kháng thể kháng CD79B của người theo sáng chế được xác định và được ký hiệu theo hệ đánh số Chothia.

> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng từ tế bào lai của chuột

mAb015:

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGSSFTSYGINWVKQRTGQGLEWIGEI
FPRSGNTYYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAKGDLDG
FDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 3).

> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng từ tế bào lai của chuột mAb015:
DFLMTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFG
GGTKLEIK (SEQ ID NO: 4).

> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng từ tế bào lai của chuột mAb017:

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTTYGINWVKQRTGQGLEWIGEI
YPRSGNIYYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARGSDYD
GDFAYWGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 5).

> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng từ tế bào lai của chuột mAb017:
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPKLL
IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFG
GGTQLEIK (SEQ ID NO: 6).

> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng từ tế bào lai của chuột mAb016:

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYIFTNYGIIWVKQRTGQGLEWIGDIF
PGSGNTYYNENFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCSRGELGDF
DYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 17).

> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng từ tế bào lai của chuột mAb016:
VVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSDGTTYLEWYLQKPGQSPKLL
IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPWTFG
GGTKLEIK (SEQ ID NO: 18).

Các trình tự CDR của chuột theo quy tắc đánh số Chothia được thể hiện trong bảng 3:

Bảng 3. Các trình tự CDR của kháng thể chuột kháng CD79B của người

CDR	mAb015	mAb016	mAb017
CDR1 của	GSSFTSY	GYIFTNY	GYTFTTY

chuỗi nặng	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 13)
CDR2 của chuỗi nặng	FPRSGN (SEQ ID NO: 8)	FPGSGN (SEQ ID NO: 24)	YPRSGN (SEQ ID NO: 14)
CDR3 của chuỗi nặng	GDLGDFDY (SEQ ID NO: 9)	GELGDFDY (SEQ ID NO: 25)	GSDYDGDFAY (SEQ ID NO: 15)
CDR1 của chuỗi nhẹ	RSSQSIVHSDGNT YFE (SEQ ID NO: 10)	RSSQNIVHSDGTT YLE (SEQ ID NO: 26)	RSSQSIVHHDGN TYLE (SEQ ID NO: 16)
CDR2 của chuỗi nhẹ	KVSNRFS (SEQ ID NO: 11)		
CDR3 của chuỗi nhẹ	FQGSHPWT (SEQ ID NO: 12)		

Ví dụ 4. Làm tương thích với người các kháng thể kháng CD79B của người

Sau khi so sánh mức tương đồng của các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng của chuột kháng CD79B thu được trong ví dụ 3 với cơ sở dữ liệu kháng thể, mô hình kháng thể được làm tương thích với người được thiết lập. Theo mô hình này, các kháng thể đơn dòng kháng CD79B được làm tương thích với người tối ưu được chọn làm các phân tử được ưu tiên bằng cách sàng lọc đột biến ngược. Phương pháp này bắt đầu từ việc tra cứu cơ sở dữ liệu mô hình cấu trúc tinh thể của Fab của chuột đã công bố (như cơ sở dữ liệu PDB) đối với các cấu trúc tinh thể tương tự hoặc tương đồng với cấu trúc của các phân tử dự tuyển của chuột thu được, và các cấu trúc tinh thể Fab có độ phân giải cao (như $< 2,5\text{\AA}$) được chọn để thiết lập mô hình Fab của chuột. Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể chuột được so sánh với các trình tự trong mô hình. Các trình tự phù hợp với các trình tự kháng thể của chuột trong mô hình được giữ lại để tạo ra mô hình cấu trúc của kháng thể chuột; axit amin không tương thích là các vị trí đột biến ngược tiềm ẩn. Mô hình cấu trúc kháng thể chuột được chạy với phần mềm quan sát Swiss-pdb để tối ưu hóa năng lượng (tối thiểu hóa). Các vị trí axit amin khác trong mô hình (ngoại trừ các CDR) được gây đột biến ngược, và các kháng thể đột biến thu được

(được làm tương thích với người) được so sánh với các kháng thể trước khi làm tương thích với người để phát hiện hoạt tính. Các kháng thể được làm tương thích với người có hoạt tính tốt được giữ lại. Sau đó, các vùng CDR được làm tối ưu, bao gồm tránh các vị trí glycosyl hóa, khử amit và oxy hóa. Các kháng thể được mô tả trên đây được tách dòng, biểu hiện và tinh chế bằng các phương pháp biểu hiện tái tổ hợp và tách dòng gen. Sau khi phát hiện bằng SPR, v.v., các kháng thể được làm tương thích với người hAb015 và hAb017 mà vẫn giữ được hoạt tính tốt nhất cuối cùng được chọn. Xem bảng 4 để biết số liệu cụ thể. Các kháng thể được làm tương thích với người hAb015 và hAb017 vẫn giữ được ái lực tương tự và các chức năng có liên quan giống như các kháng thể đơn dòng của chuột.

Bảng 4. Các kết quả xác định của các kháng thể kháng CD79B được làm tương thích với người

Phương pháp phát hiện	Protein/dòng tế bào	SN8	hAb015	hAb017
Phát hiện SPR (K_d , nM)	Protein CD79B người-His	5,98	0,43	3,77
Thử nghiệm giết tế bào (IC_{50} , ng/ml)	Các tế bào DoHH2	4229,0	473,5	/
	Tế bào Raji	>10000	>10000	/
Khả năng phản ứng chéo giữa các loài	Protein CD79B người-His	Có	Có	Có
	Protein CD79B cyno-His	Không	Không	Không
	Protein CD79B của chuột-His	Không	Không	Không
Phát hiện độ ổn định nhiệt	DSC (T_m , °C)	63	60	65
	DLS (Tagg, °C)	61	62	67

(Lưu ý: / có nghĩa là không được tiến hành phát hiện)

Trình tự của các kháng thể được làm tương thích với người hAb015 và hAb017 được thể hiện dưới đây.

>Trình tự chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hAb015:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVVSCKASGSSSFSSYGINWVKQAPGQGLEWIGEI

FPRSGNTYYNEKFEGRATLTADKSTSTAYMELRSLRSED TAVYYCAKGDLG
 DFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19).

>Trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hAb015:

DFVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSI VHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLI
 YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFG
 GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20).

>Trình tự chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hAb017:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVKQAPGQGLEWIGEI
 YPRSGNIYYNEKFKGKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSDY
 DGDFAYWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 P EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21).

>Trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hAb017:

DVVMQTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSI VHHDGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
 IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFG
 GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22).

Ví dụ 5. Quá trình nhập bào của các kháng thể kháng CD79B

Để thử nghiệm liệu các kháng thể CD79B theo sáng chế có thể được nhập bào vào các tế bào cùng với CD79B của người sau khi gắn kết với CD79B của người hay không, thử nghiệm nhập bào được tiến hành với các tế bào DOHH-2 (DSMZ, ACC 47) với mức biểu hiện cao của protein CD79B của người để đánh giá khả năng kháng thể được nhập bào.

Các tế bào DOHH-2 được nuôi cấy theo phương pháp thông thường thích hợp với các tế bào huyền phù. Thành phần của môi trường đầy đủ là: môi trường RPMI 1640 (GIBCO, Cat No.: 11835-030), cùng với 10% (thể tích/thể tích) huyết thanh bào thai bò (FBS) (GIBCO, Cat No.: 10099-141) và penixilin/streptomycin (GIBCO, Cat No.: 15070-063).

Trong thử nghiệm này, các tế bào này được thu gom bằng cách ly tâm ở nhiệt độ thấp ở 4°C, 1000 vòng/phút trong 5 phút. Các tế bào được tái huyền phù trong 10-15 ml dung dịch đệm FACS đã làm lạnh sơ bộ trên đá. Thành phần của dung dịch đệm FACS là: dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS), pH 7,4, cùng với 2% huyết thanh bào thai bò (FBS). Trong suốt toàn bộ quá trình thử nghiệm, dung dịch đệm FACS được làm lạnh sơ bộ trên đá. Sau khi ly tâm và đếm, các tế bào được bổ sung vào đĩa có 96 lỗ ở tỷ lệ 300.000 tế bào/lỗ. Sau khi ly tâm và gạn dịch nổi, 12,5 µg/ml dung dịch phong bế Fc (BD, Cat No.: 564220) được bổ sung ở nồng độ 100 µl/lỗ. Các tế bào được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Sau đó 20 µg/ml kháng thể CD79B cần thử nghiệm được bổ sung vào lỗ tương ứng và ủ ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trong 1 giờ. Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm PBS đã làm lạnh sơ bộ để loại bỏ các kháng thể không gắn kết. Môi trường nuôi cấy tế bào đầy đủ (môi trường RPMI 1640 với 10% huyết thanh bào thai bò) được bổ sung và các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ trong 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ hoặc 4 giờ. Sau khi ly tâm và gạn dịch nổi, dung dịch đệm PFA 2% được bổ sung với lượng 100 µl/lỗ. Các tế bào được tái huyền phù và để yên trong 10 phút. Sau đó, các tế bào được rửa bằng dung dịch đệm FACS 3 lần, sau đó 100 µl dung dịch kháng thể thứ cấp (kháng thể thứ cấp của dê kháng người được đánh dấu huỳnh quang: pha loãng theo tỷ lệ 1:250 với nồng độ bằng 2 µg/ml, Biolegend, Cat#409304) được bổ sung và ủ ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trong 0,5 giờ. Dung dịch đệm PBS đã làm lạnh sơ bộ được bổ sung và ly tâm ở 4°C để gạn dịch nổi, lặp

lại bước này ba lần. Các tế bào được tái huyền phù trong dung dịch đệm FACS với lượng 200 μl /lỗ và được phát hiện bằng phép đo dòng chảy tế bào (BD FACS Calibur).

Các kết quả đã chỉ ra rằng không kháng thể nào trong số ba kháng thể này, SN8, hAb015 và hAb017, có thể được nhập bào bằng các tế bào DOHH-2 khi được ủ ở nhiệt độ 4°C. Trong khi đó, nếu ủ ở nhiệt độ 37°C, hầu hết các kháng thể đã được nhập bào bởi các tế bào DOHH-2 sau 1 giờ, và sự nhập bào kháng thể đạt đến mức tối đa sau 4 giờ. Toàn bộ 3 kháng thể được nhập bào tương đối tốt.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà chứa vùng bất kỳ được chọn từ các vùng (I) đến (III) sau:

(I) vùng biến đổi chuỗi nặng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 hoặc 27, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ, bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng;

(II) vùng biến đổi chuỗi nặng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ, bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng;

(III) vùng biến đổi chuỗi nặng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ, bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, tương ứng.

2. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, 99% tương đồng với SEQ ID NO: 3; hoặc

trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, 99% tương đồng với SEQ ID NO: 5;

trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, 99% tương đồng với SEQ ID NO: 17;

và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm:

trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, 99% tương đồng với SEQ ID NO: 4; hoặc

trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, 99% tương đồng với SEQ ID NO: 6;

trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, 99% tương đồng với SEQ ID NO: 18.

3. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18.

4. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1, mà là kháng thể chuột, kháng thể khảm, kháng thể người hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của nó.

5. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người với chuỗi nặng của nó bao gồm: trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 19; hoặc

trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 21;

và/hoặc chuỗi nhẹ bao gồm: trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 20 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 20; hoặc

trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 22 hoặc trình tự có ít nhất 90%, 95%, 98%, hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 22.

6. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19, và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 20; hoặc

chuỗi nặng của kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21, và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 22.

7. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng khung chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc biến thể của chúng;

đoạn gắn kết với kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab'-SH, Fv, scFv và/hoặc đoạn (Fab')₂.

8. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 7, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng khung chuỗi nặng của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người.

9. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 8, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng khung chuỗi nặng của IgG1 hoặc IgG2 của người.

10. Kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng của kháng thể kháng

CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19, và chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 20.

11. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất, trong đó kháng thể bao gồm kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10,

12. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 11, trong đó thở tiếp hợp kháng thể-dược chất bao gồm chất gây độc tế bào.

13. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 12, trong đó chất gây độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm độc tố, chất hóa trị, kháng sinh, chất đồng vị phóng xạ và enzym phân cắt liên kết nucleotit-nucleotit.

14. Polynucleotit mã hóa kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.

15. Vector chứa polynucleotit theo điểm 14, mà là vector biểu hiện nhân thực, vector biểu hiện nhân sơ hoặc vector virus.

16. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 15.

17. Tế bào chủ theo điểm 16, trong đó tế bào chủ là tế bào vi khuẩn, nấm men, hoặc động vật có vú.

18. Tế bào chủ theo điểm 16, trong đó tế bào chủ là *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, tế bào trứng chuột hàng Trung Quốc hoặc tế bào phôi thận của người 293.

19. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, bao gồm bước:

biểu hiện kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng

nguyên của nó trong tế bào chủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 18, và phân lập kháng thể kháng CD79B của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó từ tế bào nuôi cấy.

20. Dược phẩm, trong đó dược phẩm này chứa:

thành phần bất kỳ hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng được chọn từ nhóm sau: kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13, polynucleotit theo điểm 14, vector theo điểm 15.

21. Dược phẩm theo điểm 20, trong đó dược phẩm này còn chứa tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

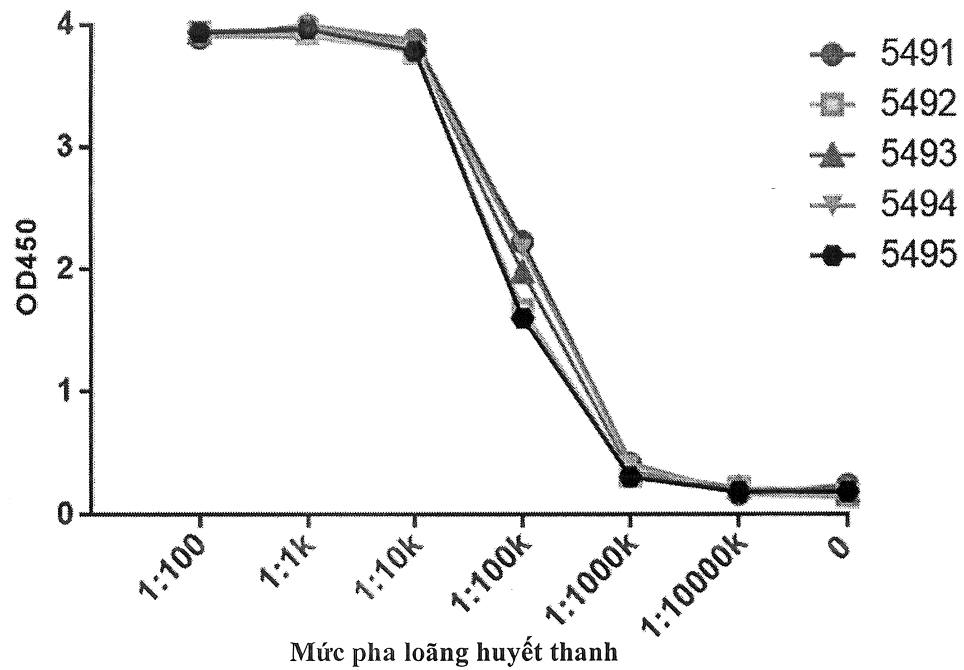


Fig.1

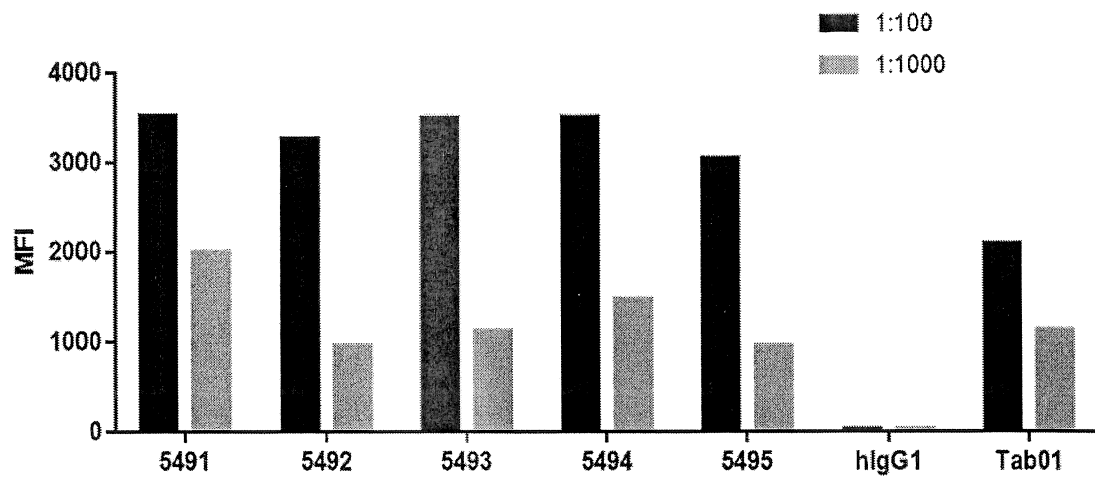


Fig.2

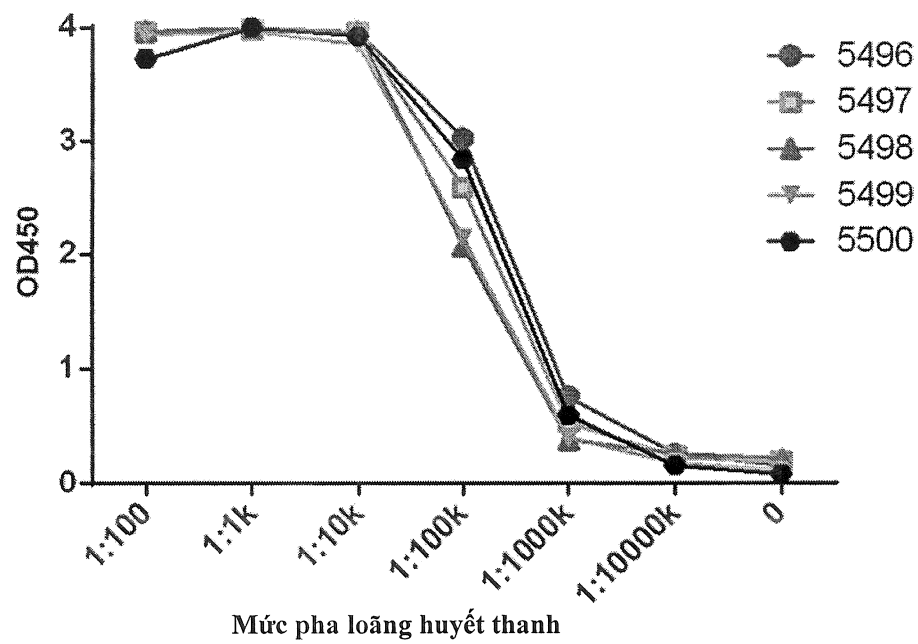


Fig.3

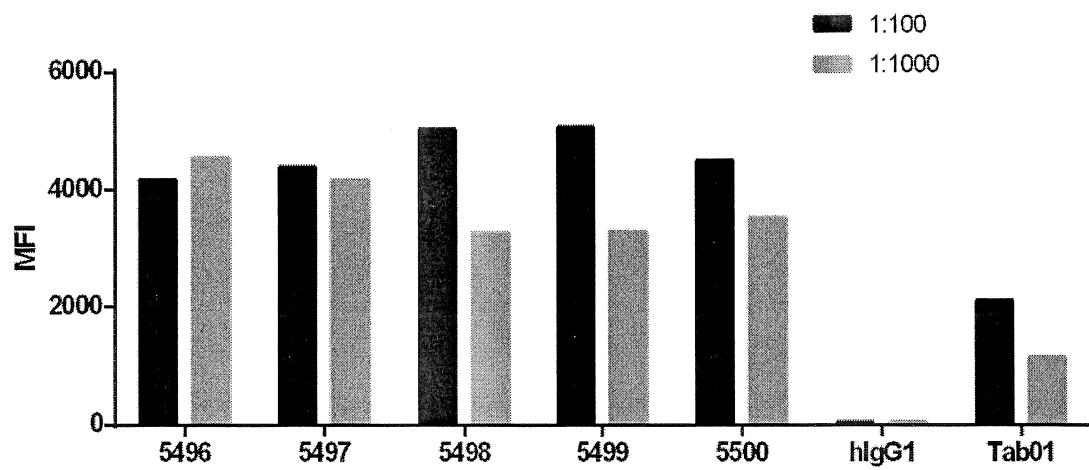


Fig.4

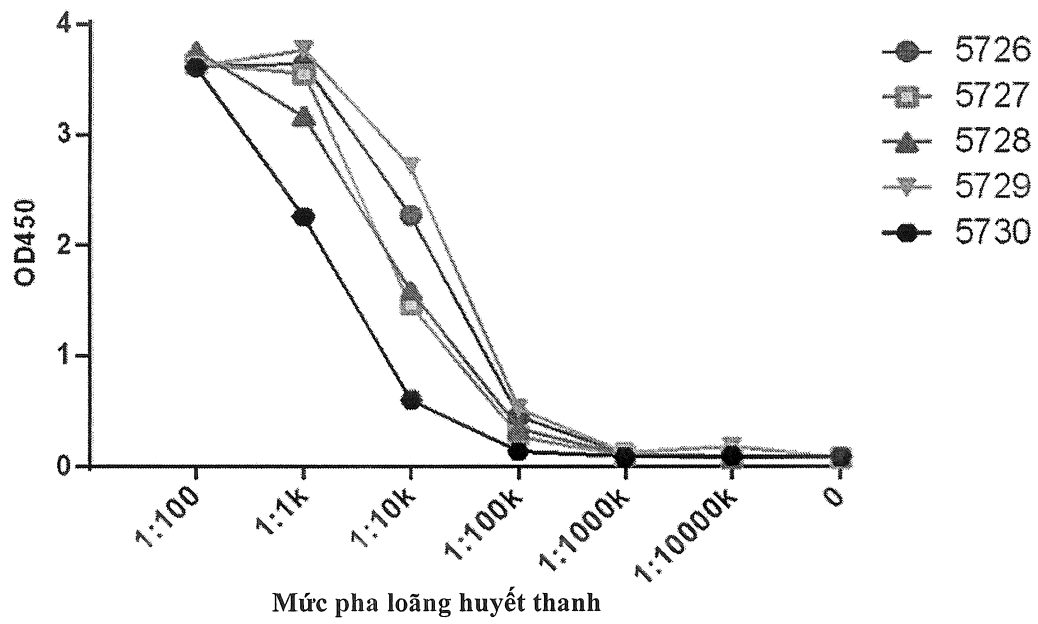


Fig.5

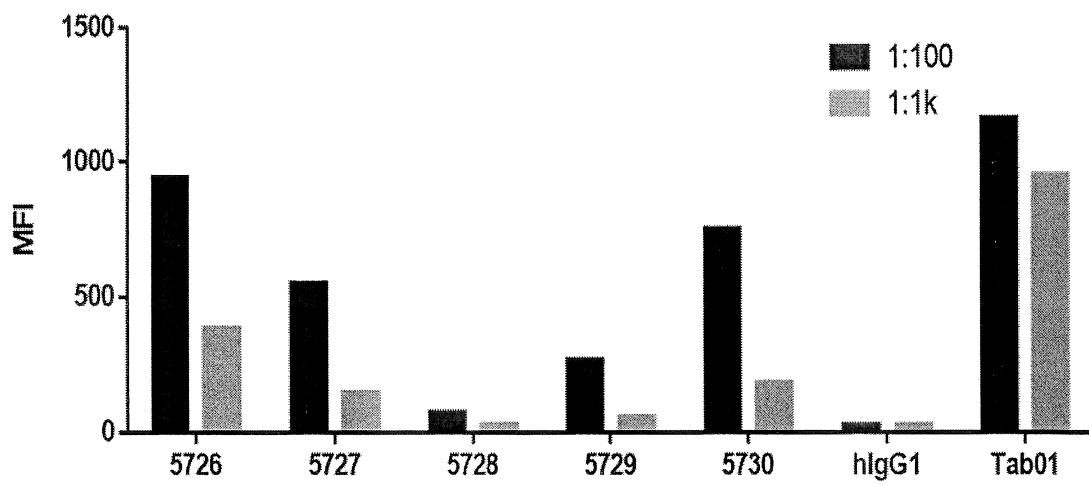


Fig.6

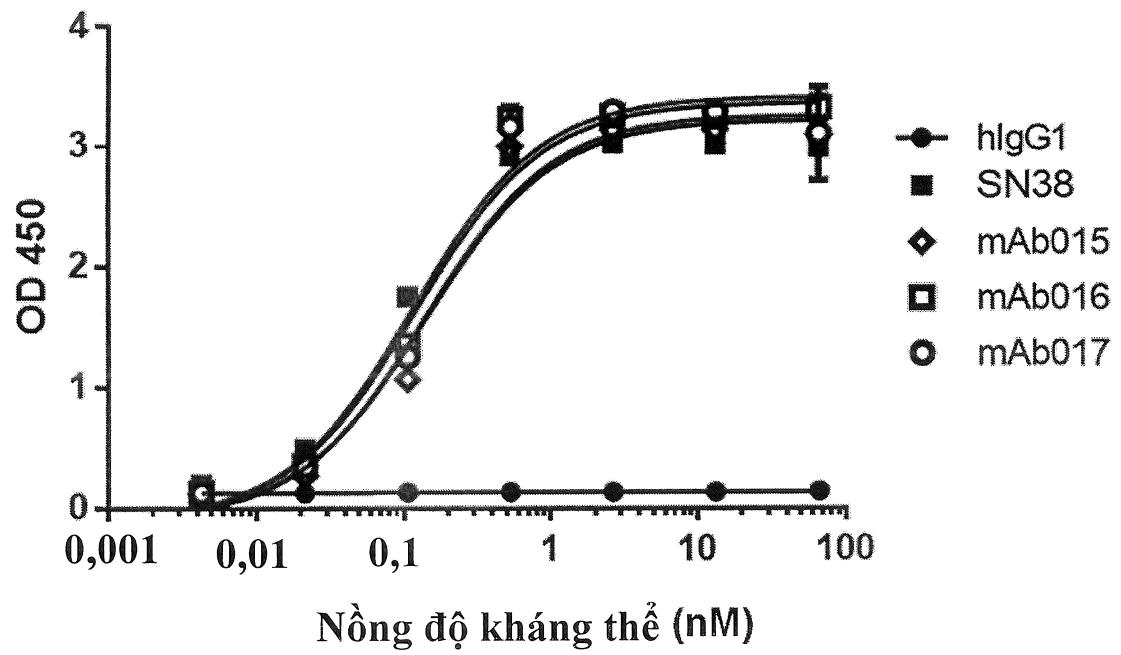


Fig.7

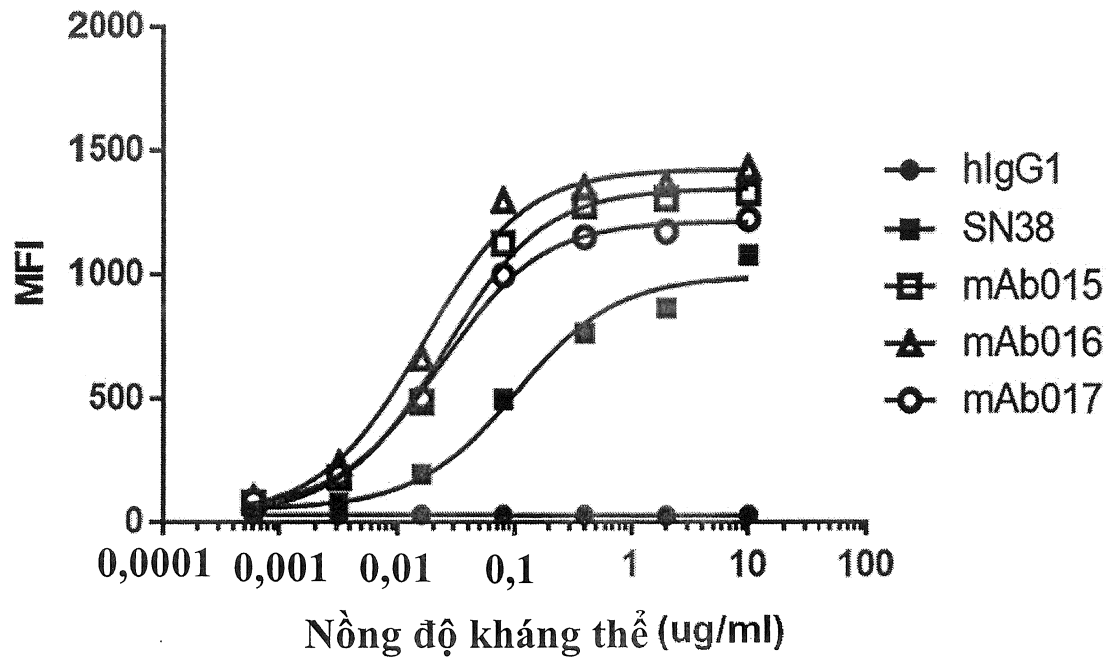


Fig.8

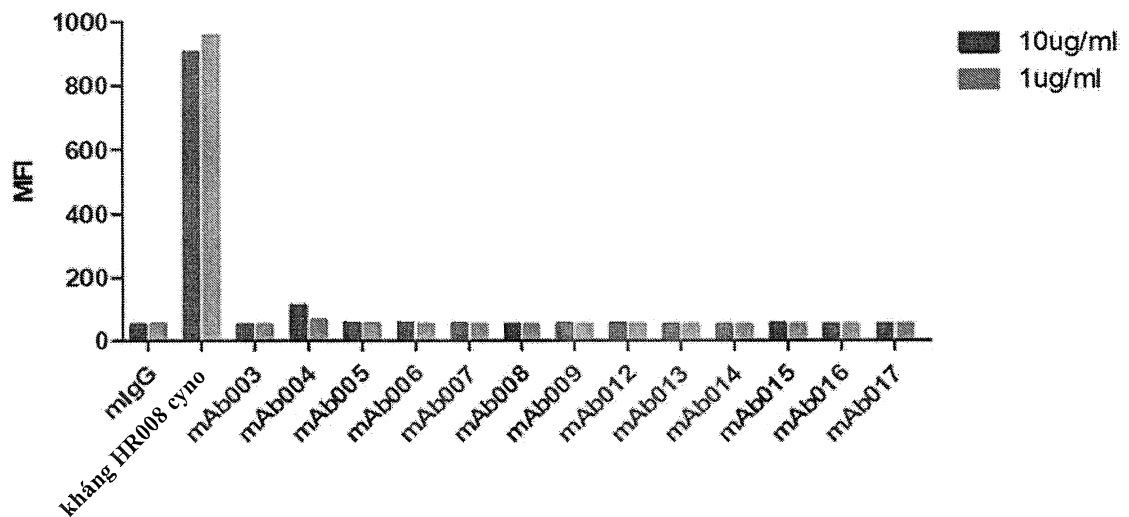


Fig.9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TUOJIE BIOTECH(SHANGHAI) CO., LTD.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG CD79B, THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT,
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHỨNG

<130> 702007CPCT

<150> 201910083330.4

<151> 2019-01-28

<160> 27

<170> Danh mục trình tự SIPO 1.0

<210> 1

<211> 433

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> PEPTIT

<222> (0)..(433)

<223> ECD CD79B người-hFc

<400> 1

```

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

```

```

      195              200              205
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
      210              215              220
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
225              230              235              240
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
      245              250              255
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
      260              265              270
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
      275              280              285
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
      290              295              300
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
305              310              315              320
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      325              330              335
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
      340              345              350
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
      355              360              365
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
      370              375              380
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
385              390              395              400
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
      405              410              415
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      420              425              430
Lys

```

```

<210> 2
<211> 207
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> PEPTIT
<222> (0)..(207)
<223> ECD CD79B người-His

```

```

<400> 2
Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
1              5              10              15
Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
      20              25              30
Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp
      35              40              45
Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu
      50              55              60
Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr

```

```

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

```

```

<210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<222> (0)..(117)
<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng mAb015 thu
được từ tế bào lai của chuột

```

```

<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Ser Tyr
      20              25              30
Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35              40              45
Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
      50              55              60
Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85              90              95
Ala Lys Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
      100              105              110
Leu Thr Val Ser Ser
      115

```

```

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

<220>

<221> CHUỖI

<222> (0)..(112)

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng mAb015 thu được từ tế bào lai của chuột

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (0)..(119)

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng mAb017 thu được từ tế bào lai của chuột

<400> 5

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
          20           25           30
Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
          50           55           60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
          85           90           95
Ala Arg Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
          115

```

<210> 6
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <222> (0)..(112)
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng mAb017 thu được từ tế bào lai của chuột

<400> 6
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

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

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (0)..(7)
 <223> CDR1 chuỗi nặng của mAb015

<400> 7
 Gly Ser Ser Phe Thr Ser Tyr
 1 5

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (0)..(6)
 <223> CDR2 chuỗi nặng của mAb015

<400> 8
Phe Pro Arg Ser Gly Asn
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (0)..(8)
<223> CDR3 chuỗi nặng của mAb015

<400> 9
Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (0)..(16)
<223> CDR1 chuỗi nhẹ của mAb015

<400> 10
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu
1 5 10 15

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (0)..(7)
<223> CDR2 chuỗi nhẹ của mAb015 mAb016 mAb017

<400> 11
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (0)..(9)

<223> CDR3 chuỗi nhẹ của mAb015 mAb016 mAb017

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1

5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (0)..(7)

<223> CDR1 chuỗi nặng của mAb017

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

1

5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (0)..(6)

<223> CDR2 chuỗi nặng của mAb017

<400> 14

Tyr Pro Arg Ser Gly Asn

1

5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (0)..(10)

<223> CDR3 chuỗi nặng của mAb017

<400> 15

Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (0)..(16)

<223> CDR1 chuỗi nhẹ của mAb017

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (0)..(117)

<223> vùng biến đổi chuỗi nặng của mAb016

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ile Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Gly Glu Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <222> (0)..(112)
 <223> vùng biến đổi chuỗi nhẹ của mAb016

<400> 18
 Val Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Thr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <222> (0)..(447)
 <223> trình tự chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hAb015

<400> 19
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

```

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                      150                      155                      160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                      165                      170                      175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
                      180                      185                      190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
                      195                      200                      205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
                      210                      215                      220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                      230                      235                      240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                      245                      250                      255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
                      260                      265                      270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
                      275                      280                      285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290                      295                      300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                      310                      315                      320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                      325                      330                      335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
                      340                      345                      350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
                      355                      360                      365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370                      375                      380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                      390                      395                      400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                      405                      410                      415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
                      420                      425                      430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                      435                      440                      445

```

<210> 20

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (0)..(219)

<223> trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hAb015

<400> 20

Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
      20           25           30
Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35           40           45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85           90           95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100          105          110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
      115          120          125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
      130          135          140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
      145          150          155          160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
      165          170          175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
      180          185          190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
      195          200          205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210          215

```

<210> 21

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (0)..(449)

<223> trình tự chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hAb017

<400> 21

```

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

```

Ala Arg Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 22

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (0)..(219)

<223> trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hAb017

<400> 22

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His
          20           25           30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85           90           95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          130          135          140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180          185          190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          195          200          205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (0)..(7)

<223> CDR1 chuỗi nặng của mAb016

<400> 23

```

Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
1           5

```

<210> 24

<211> 6

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (0)..(6)
<223> CDR2 chuỗi nhẹ của mAb016

<400> 24
Phe Pro Gly Ser Gly Asn
1 5

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (0)..(8)
<223> CDR3 chuỗi nặng của mAb016

<400> 25
Gly Glu Leu Gly Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (0)..(16)
<223> CDR1 chuỗi nhẹ của mAb016

<400> 26
Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (0)..(7)
<223> CDR1 chuỗi nặng của hAb015

<400> 7

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr

1

5

10