



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C07K 16/18; G01N 33/574; A61K (13) B
39/00; A61P 35/00

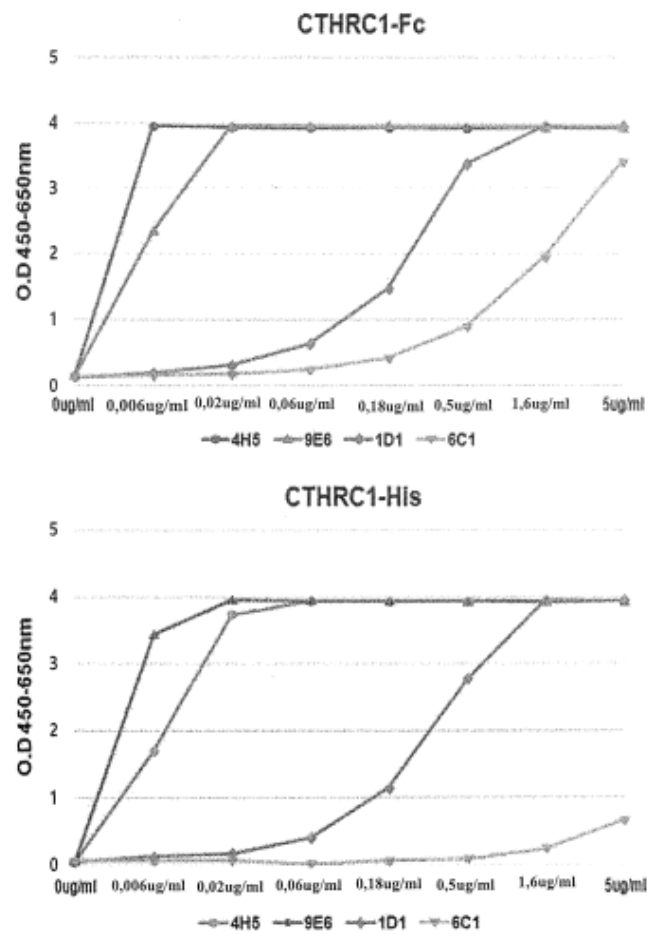
(21) 1-2022-00117 (22) 15/06/2020
(86) PCT/IB2020/055561 15/06/2020 (87) WO 2020/250204 17/12/2020
(30) 10-2019-0070048 13/06/2019 KR
(45) 25/09/2025 450 (43) 25/08/2022 413A
(73) PRESTIGE BIOPHARMA PTE. LTD. (SG)
2 Science Park Drive, #04-13/14 Ascent Tower B, Singapore Science Park,
Singapore 118222, Singapore
(72) KOH, Sang Seok (KR); KANG, Min Kyung (KR); PARK, So Yeon (KR).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN CHỨA ĐOẠN LẶP LẠI
CHUỖI XOẮN BA COLAGEN-1 (CTHRC1), VÀ POLYNUCLEOTIT, VECTO
BIỂU HIỆN, TẾ BÀO CHỦ, DƯỢC PHẨM, PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN
PROTEIN CTHRC1 VÀ KIT CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-00117

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với CTHRC1, polynucleotit mã hóa kháng thể này và các dược phẩm chứa kháng thể này.

[Fig. 1]



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với CTHRC1 mới, polynucleotit mã hóa kháng thể này và được phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thuốc chống ung thư hiện đang được sử dụng trên lâm sàng có thể được phân loại là chất hóa trị và chất điều trị sinh học. Chất hóa trị được phát triển tích cực trong quá khứ là các loại thuốc có độc tính đối với tế bào ung thư, và những loại thuốc này có vấn đề ở chỗ chúng gây độc cho các tế bào bình thường cũng như các tế bào ung thư và cũng là đối tượng của sự dung nạp. Vì vậy, có những hạn chế đối với việc phát triển và sử dụng các loại thuốc này. Do đó, trong những năm gần đây, chất điều trị sinh học mà có thể phục hồi hoặc làm tăng chức năng miễn dịch của cơ thể người và nhờ đó làm yếu hoạt động của các tế bào ung thư đang được tích cực phát triển như một giải pháp thay thế. Ví dụ về chất điều trị sinh học hiện đang được sử dụng hoặc đang được phát triển bao gồm xytokin, kháng thể tái tổ hợp (ví dụ, kháng thể đơn dòng), phương pháp điều trị phân tử axit nucleic, chất ức chế tạo mạch, v.v.

Trong số các chất điều trị sinh học, kháng thể đơn dòng trị liệu khác biệt ở chỗ có tác dụng phụ thấp do tính đặc hiệu phản ứng cao của chúng đối với các đích. Kháng thể thể hiện tác dụng điều trị thông qua các cơ chế khác nhau; ví dụ, chúng có thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tương ứng để ức chế sự truyền tín hiệu hoặc gây chết theo chương trình bằng cách liên kết chéo, và ngoài ra, có thể thể hiện tác dụng điều trị bằng cách hoạt hóa hệ miễn dịch *in vivo*. Theo đó, kháng thể đơn dòng dưới dạng tác nhân chống ung thư có thể truy vết đặc hiệu các tế bào ung thư và ức chế hoạt động của chúng cũng như gây đáp ứng miễn dịch và có thể nhờ đó loại bỏ hiệu quả các tế bào ung thư. Kết quả là, việc điều trị bằng

cách sử dụng kháng thể đơn dòng đang trở thành một phương pháp điều trị bệnh ung thư chính thống. Về vấn đề này, kháng thể đơn dòng như ramucirumab, rituximab, trastuzumab, v.v đã được phát triển và sử dụng trong điều trị bệnh ung thư dạ dày, ung thư vú, ung thư gan, v.v..

Trong khi đó, protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1) được biết đến như một loại protein tiết ra liên quan đến quá trình tái tạo mạch máu, hình thành xương và sự phát triển hình thái.

Theo các nghiên cứu gần đây, đã được báo cáo rằng CTHRC1 bị biểu hiện quá mức trong nhiều loại khác nhau của các tế bào ung thư, như ung thư tụy, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư tế bào hắc tố, v.v., và do đó có liên quan đến sự tăng sinh và di căn của bệnh ung thư. Theo đó, các kết quả này cho thấy rằng CTHRC1 có một vai trò quan trọng trong các khối u khó điều trị. Cũng đã biết rằng CTHRC1 không chỉ gây ra sự tăng sinh và sự di căn của các tế bào ung thư, mà còn kích thích các tế bào nội mô trong vi môi trường khối u và nhờ đó tham gia vào quá trình tạo mạch (Park *et al.*, *Carcinogenesis* (2013) 34:694, Lee *et al.*, *ExpMolMed* (2016) 48:e261). Với kết quả của phân tích mảng cADN khối u ở người, đã phát hiện ra rằng CTHRC1 chủ yếu được biểu hiện ở các khối u rắn ở người, và với kết quả của phép phân tích bộ sản phẩm phiên mã, đã xác nhận rằng có sự khác biệt về biểu hiện giữa ung thư biểu mô tiểu thùy vú và các tế bào ống dẫn và tiểu thùy bình thường. Cũng đã phát hiện ra rằng CTHRC1 được biểu hiện trong ung thư tế bào hắc tố nguyên phát không xâm lấn và ung thư tế bào hắc tố di căn, nhưng không được biểu hiện trong các mẫu nevi lành tính hoặc không xâm lấn. Ngoài ra, việc ức chế sự biểu hiện CTHRC1 làm giảm sự di trú của dòng tế bào bị ung thư tế bào hắc tố *in vitro*. CTHRC1 đã được xác định trong bệnh sacrom sọ bì lồi (dermatofibrosarcoma protuberans), là bệnh ung thư tiến triển khu trú thường di căn, nhưng không được thấy ở bệnh ung thư da hoặc khối u mô bào sọ bì lành tính điển hình. Ngoài ra, cũng đã được báo cáo rằng sự biểu hiện CTHRC1 cao đáng kể trong mô ung thư vú so với các mô bình thường hoặc tổn thương tiền ung thư, và có liên quan đến nguy cơ ung thư di căn xương. Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu phát triển kháng thể cải thiện sự gắn kết và ái lực với protein CTHRC1 và có tác dụng tốt trong việc chẩn đoán và điều trị đồng thời nhiều loại ung thư khác nhau.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Sự phát triển của kháng thể gắn kết đặc hiệu với CTHRC1 liên tục được yêu cầu để điều trị các bệnh ung thư khác nhau, bao gồm ung thư khó chữa. Theo đó, các tác giả sáng chế đã phát triển kháng thể mới có ái lực và tính đặc hiệu cao, và đã xác nhận rằng kháng thể này có hiệu quả chống ung thư trong các bệnh ung thư khác nhau, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Giải pháp kỹ thuật

Một mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1).

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein CTHRC1; vector biểu hiện bao gồm polynucleotit này; và tế bào chủ bao gồm vector biểu hiện này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm và kit để phát hiện kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein CTHRC1.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, bao gồm kháng thể này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng kháng thể này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm kháng thể.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp cung cấp thông tin để chẩn đoán bệnh ung thư, bao gồm: phát hiện protein CTHRC1 trong mẫu sinh học được phân lập từ đối tượng nghi ngờ bị ung thư thông qua phản ứng kháng nguyên-kháng thể, bằng cách sử dụng kháng thể này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp cung cấp thông tin để dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm: phát hiện protein CTHRC1 trong mẫu sinh học được phân lập từ đối tượng mắc bệnh ung thư thông qua phản ứng kháng nguyên-kháng thể, bằng cách sử dụng kháng thể này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất kit để chẩn đoán bệnh ung thư

hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp phát hiện protein CTHRC1 trong mẫu, bao gồm bước phát hiện phức hợp kháng nguyên CTHRC1–kháng thể bằng cách sử dụng kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein CTHRC1.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Kháng thể mới theo sáng chế có thể phát hiện một lượng rất nhỏ của CTHRC1 và cũng có thể phát hiện vắc-xin liên hợp CTHRC1, và do đó có thể được sử dụng hiệu quả để định lượng CTHRC1 và vắc-xin liên hợp CTHRC1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là kết quả của ELISA gián tiếp đối với kháng thể chuột nhất 4H5 và 9E6 có ái lực gắn kết cao với CTHRC1 (Độ nhạy: 4H5, 9E6 >> 1D1 > 6C1).

Fig. 2 là kết quả xác nhận rằng các kháng thể chuột nhất 4H5 và 9E6 có các epitop khác nhau, cho thấy rằng chúng có thể gây ra tác dụng chống ung thư thông qua các cơ chế khác nhau.

Fig. 3 là kết quả xác nhận rằng cCMAb45 và cCMAb96 không chỉ có ái lực gắn kết cao với protein CTHRC1 mà còn gắn kết đặc hiệu với nó.

Fig. 4 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96 đối với sự di trú của bệnh ung thư tụy *in vitro*.

Fig. 5 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96 đối với sự di trú của bệnh ung thư vú *in vitro*.

Fig. 6 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96 đối với sự di trú của bệnh ung thư buồng trứng *in vitro*.

Fig. 7 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96 đối với sự di trú của bệnh ung thư bàng quang *in vitro*.

Fig. 8 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96 đối với sự xâm lấn của bệnh ung thư tụy *in vitro*.

Fig. 9 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96 đối với sự xâm lấn của tế bào ung thư tụy thu được từ bệnh nhân *in vitro*.

Fig. 10 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96

đối với sự xâm lấn của bệnh ung thư vú *in vitro*.

Fig. 11 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96 đối với sự xâm lấn của bệnh ung thư buồng trứng *in vitro*.

Fig. 12 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của cCMAb45 và cCMAb96 đối với sự xâm lấn của bệnh ung thư bàng quang *in vitro*.

Fig. 13 là kết quả của quá trình sản xuất kháng thể ứng viên 4H5 và 9E6 được làm tương thích với người .

Fig. 14 là kết quả của phép đo ái lực gắn kết của kháng thể ứng viên 4H5 và 9E6 được làm tương thích với người.

Fig. 15 là kết quả kiểm tra hiệu lực của kháng thể ứng viên 4H5 và 9E6 được làm tương thích với người bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư tụy Panc-1.

Fig. 16 là kết quả đo lại ái lực gắn kết của kháng thể ứng viên 4H5 và 9E6 được làm tương thích với người được chọn làm kháng thể sơ cấp.

Fig. 17 là kết quả của việc kiểm tra lại hiệu lực của kháng thể ứng viên 4H5 và 9E6 được làm tương thích với người được chọn trước tiên.

Fig. 18 là kết quả xác nhận rằng hCMAb45 và hCMAb96 gắn kết đặc hiệu với protein CTHRC1.

Fig. 19 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của hCMAb45 và hCMAb96 đối với sự di trú của bệnh ung thư tụy *in vitro*.

Fig. 20 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của hCMAb45 và hCMAb96 đối với sự di trú của bệnh ung thư buồng trứng *in vitro*.

Fig. 21 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của hCMAb45 và hCMAb96 đối với sự di trú của bệnh ung thư vú *in vitro*.

Fig. 22 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của hCMAb45 và hCMAb96 đối với sự di trú của bệnh ung thư bàng quang, ung thư phổi, và ung thư tế bào hắc tố *in vitro*.

Fig. 23 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của hCMAb45 và hCMAb96 đối với sự xâm lấn của bệnh ung thư tụy *in vitro*.

Fig. 24 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của hCMAb45 và hCMAb96 đối với sự xâm lấn của bệnh ung thư buồng trứng *in vitro*.

Fig. 25 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của hCMAb45 và hCMAb96

đối với sự xâm lấn của bệnh ung thư vú *in vitro*.

Fig. 26 là kết quả xác nhận hiệu quả ức chế của hCMAb45 và hCMAb96 đối với sự xâm lấn của bệnh ung thư bàng quang, ung thư phổi, và ung thư tế bào hắc tố *in vitro*.

Fig. 27 là kết quả xác nhận hiệu quả chống ung thư *in vivo* của hCMAb45 và hCMAb96. Mô hình sử dụng dòng tế bào ung thư tụy BxPC-3 cho thấy thể tích khối u đã được giảm so với nhóm đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ ở đây có thể được áp dụng cho lần lượt các phần mô tả và phương án khác. Tức là, tất cả các kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ ở đây đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể được mô tả dưới đây.

Xuyên suốt phần mô tả của sáng chế, mã 1 chữ cái thông thường và mã 3 chữ cái cho các axit amin xuất hiện tự nhiên được sử dụng. Ngoài ra, các axit amin được đề cập ở dạng viết tắt trong sáng chế được mô tả theo Danh pháp IUPAC-IUB.

alanin	Ala, A	arginin	Arg, R
asparagin	Asn, N	axit aspartic	Asp, D
xystein	Cys, C	axit glutamic	Glu, E
glutamin	Gln, Q	glyxin	Gly, G
histidin	His, H	isoleuxin	Ile, I
leuxin	Leu, L	lysin	Lys, K
methionin	Met, M	phenylalanin	Phe, F
prolin	Pro, P	serin	Ser, S
threonin	Thr, T	tryptophan	Trp, W
tyrosin	Tyr, Y	valin	Val, V

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1) .

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “CTHRC1” là protein hòa tan trong

nước liên quan đến quá trình tái tạo mạch máu, sự hình thành xương và sự phát triển hình thái, và đã biết rằng protein này được biểu hiện trong các động mạch bị tổn thương và nhờ đó thúc đẩy sự di trú của tế bào, và có chức năng tái tạo lại động mạch chủ bị tổn thương bằng cách ức chế tổng hợp collagen trong nguyên bào sợi và tế bào cơ trơn. Cũng đã biết rằng sự biểu hiện của CTHRC1 trong tế bào nội mô điều hòa yếu tố tăng trưởng chuyển đổi- β (TGF- β) và do đó kìm hãm sự biểu hiện của các gen đích TGF- β bao gồm collagen. Ngoài ra, chuột chuyển gen CTHRC1 gia tăng sự hình thành xương thuộc tế bào tạo xương của nguyên bào xương, và sự biệt hóa và sự khoáng hóa của tiền tế bào tạo xương, và cũng tương tác với Wnt5a để hoạt hóa con đường phân cực tế bào phẳng. Dựa trên những điều này, vai trò của CTHRC1 trong quá trình điều hòa sự phát triển hình thái trong quá trình phát triển có thể được xác nhận.

Protein CTHRC1 theo sáng chế có thể thu được thông qua tái tổ hợp bằng phương pháp thông thường hoặc có thể được mua thương mại. CTHRC1 theo sáng chế có thể ở dạng protein đã được phân lập hoặc ở dạng được gắn kết với các protein khác hoặc polysaccarit, và cụ thể là, nó có thể ở dạng được gắn kết với ngoại độc tố của vi khuẩn, nhưng dạng này không bị giới hạn ở đó.

Kháng thể nhận biết đặc hiệu protein CTHRC1 có thể được sử dụng để chẩn đoán, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, như bệnh ung thư, trong đó CTHRC1 bị biểu hiện quá mức. Về vấn đề này, các tác giả sáng chế đã phát triển kháng thể gắn kết với protein CTHRC1 của người và chuột với ái lực cao. Kháng thể theo sáng chế gắn kết với tất cả protein CTHRC1 của người với ái lực cao, và do đó có thể được sử dụng hiệu quả trong lĩnh vực chẩn đoán bệnh trong đó protein CTHRC1 bị biểu hiện quá mức, cũng như trong lĩnh vực ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” để chỉ phân tử protein hoạt động như thụ thể có khả năng nhận biết đặc hiệu kháng nguyên, bao gồm phân tử globulin miễn dịch có khả năng phản ứng miễn dịch với kháng nguyên cụ thể. Nó có thể bao gồm tất cả các kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể nguyên vẹn, và các mảnh kháng thể. Nhằm mục đích của sáng chế, kháng thể này có thể là kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1). Ngoài ra, thuật ngữ này bao gồm các kháng thể khảm,

kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể người và phân tử hai giá hoặc đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), dime của đoạn globulin miễn dịch, trime của đoạn globulin miễn dịch, và tetrame của đoạn globulin miễn dịch. Ngoài ra, thuật ngữ này còn bao gồm kháng thể chuỗi đơn có chức năng gắn kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn), scabs (kháng thể chuỗi đơn), các dẫn xuất của vùng ổn định của kháng thể, và kháng thể nhân tạo trên cơ sở khung protein. Kháng thể nguyên vẹn có cấu trúc với hai chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ và hai chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ, trong đó mỗi chuỗi nhẹ được liên kết với chuỗi nặng bằng liên kết disulfua. Kháng thể nguyên vẹn này bao gồm các typ phụ IgA, IgD, IgE, IgM, và IgG, trong đó IgG bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Mảnh kháng thể để chỉ mảnh có chức năng gắn kết kháng nguyên và bao gồm Fd, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, v.v. Fd để chỉ phần chuỗi nặng chứa trong mảnh Fab. Fab có cấu trúc bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng ổn định của chuỗi nhẹ, và vùng ổn định thứ nhất của chuỗi nặng (miền CH1), và có một vị trí gắn kết kháng nguyên. Fab' khác với Fab ở chỗ nó có vùng bản lề bao gồm ít nhất một gốc xystein ở đầu tận cùng C của miền CH1 chuỗi nặng. Kháng thể F(ab')₂ được tạo ra khi gốc xystein trong vùng bản lề của Fab' tạo thành liên kết disulfua. Mảnh biến đổi (Fv) để chỉ mảnh kháng thể tối thiểu chỉ có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Mảnh kháng thể Fv được ổn định disulfua (dsFv) có đặc trưng là vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết bởi liên kết disulfua, trong khi Fv chuỗi đơn (scFv) thường có đặc trưng là vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết bởi liên kết cộng hóa trị thông qua cầu nối peptit. Các mảnh kháng thể này có thể thu được bằng cách sử dụng proteaza (ví dụ, Fab có thể thu được bằng cách phân cắt kháng thể nguyên vẹn bằng papain, và mảnh F(ab')₂ có thể thu được bằng cách phân cắt kháng thể nguyên vẹn bằng pepsin). Tốt hơn là, các mảnh kháng thể có thể được xây dựng nhờ công nghệ tái tổ hợp di truyền.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” để chỉ phân tử kháng thể có một thành phần phân tử duy nhất, thu được từ quần thể của các kháng thể về cơ bản giống hệt nhau. Kháng thể đơn dòng như vậy thể hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn và ái lực với epitop đặc hiệu.

Nói chung, globulin miễn dịch có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và mỗi chuỗi

nặng và chuỗi nhẹ bao gồm vùng ổn định và vùng biến đổi (các vùng này cũng được gọi là “miền”). Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng bao gồm ba vùng siêu biến được gọi là vùng quyết định bổ sung (dưới đây gọi là “CDR”) và bốn vùng khung. CDR chịu trách nhiệm chính về việc gắn kết với epitop của kháng nguyên. CDR của mỗi chuỗi thường được gọi là CDR1, CDR2, và CDR3, được đánh số tuần tự bắt đầu từ đầu tận cùng N, và cũng được xác định bởi chuỗi mà CDR cụ thể được đặt trong đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể người” để chỉ phân tử có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của người, trong đó trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của kháng thể, bao gồm các vùng quyết định bổ sung và vùng khung, bao gồm trình tự axit amin của globulin miễn dịch của người. Kháng thể người thường được sử dụng để điều trị bệnh của người và có thể có ba hoặc nhiều ưu điểm tiềm năng. Thứ nhất, kháng thể người có thể dễ dàng tương tác hơn với hệ thống miễn dịch của người nhờ đó các tế bào đích có thể được dung giải hiệu quả hơn bởi, ví dụ, tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) hoặc tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC). Thứ hai, có một ưu điểm là hệ thống miễn dịch của người không nhận diện kháng thể này là kháng thể ngoại lai. Thứ ba, có một ưu điểm là ngay cả khi thuốc được sử dụng với lượng nhỏ hơn ở tần suất thấp hơn, thời gian bán thải của chúng trong hệ tuần hoàn của người là tương tự như của kháng thể xuất hiện tự nhiên.

Ngoài ra, khi kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng ổn định, nó có thể bao gồm vùng ổn định có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hoặc các tổ hợp hoặc thể lai của chúng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tổ hợp” nghĩa là các polypeptit mã hóa các vùng ổn định globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc được liên kết với polypeptit chuỗi đơn có nguồn gốc khác để tạo ra dime hoặc multime. Ví dụ, dime hoặc multime có thể được tạo thành từ hai hoặc nhiều vùng ổn định được chọn từ nhóm bao gồm các vùng ổn định IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thể lai” nghĩa là các trình tự tương ứng với hai hoặc nhiều vùng ổn định chuỗi nặng globulin miễn dịch có nguồn gốc khác nhau có mặt trong chuỗi đơn của vùng ổn định chuỗi nặng globulin miễn dịch. Ví dụ, miền lai hóa có thể có thể bao gồm một đến bốn miền được chọn từ

nhóm bao gồm CH1, CH2, CH3, và CH4 của IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1)” để chỉ kháng thể có khả năng ức chế hoạt tính của protein CTHRC1 bằng cách gắn kết với protein CTHRC1.

Kháng thể gắn kết đặc hiệu với CTHRC1 theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó gắn kết với protein CTHRC1 của người với ái lực cao.

Kháng thể này có thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 1 hoặc 11, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 2 hoặc 12, và CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 3 hoặc 13; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 4 hoặc 14, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 5 hoặc 15, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 6 hoặc 16.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, 17, 21, hoặc 25; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9, 19, 23, hoặc 27.

Theo một ví dụ của sáng chế, kháng thể theo sáng chế với ái lực và tính đặc hiệu cải thiện đối với protein CTHRC1 có thể bao gồm cụ thể là vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 1, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 2, và CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 3; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 6; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 11, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 12, và CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 13; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 14, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 15, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 16, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 được đặt tên là “4H5” hoặc “cCMAb45”, và kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19

được đặt tên là “9E6” hoặc “cCMAb96”.

Ngoài ra, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 được đặt tên là “4H5” hoặc “hCMAb45”, và kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 được đặt tên là “9E6” hoặc “hCMAb96”.

Theo một phương án của sáng chế, bốn kháng thể 4H5, 9E6, 6C1, và 1D1 mới với ái lực cao nhất với kháng nguyên được chọn lọc bằng cách sàng lọc lympho bào B gắn kết với protein CTHRC1, và kết quả của việc xác nhận các epitop của 4H5 và 9E6 trong số bốn kháng thể là đã xác nhận được rằng 4H5 và 9E6 gắn kết đặc hiệu với protein CTHRC1 với ái lực cao, nhờ đó tạo ra hai kháng thể mới nêu trên.

Các kết quả này cho thấy rằng kháng thể gắn kết với protein CTHRC1 theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả trong lĩnh vực yêu cầu nhận diện protein CTHRC1, ví dụ, trong chẩn đoán hoặc điều trị bệnh trong đó protein CTHRC1 bị biểu hiện quá mức.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể.

Kháng thể theo sáng chế có thể dễ dàng được tạo ra bằng công nghệ sản xuất kháng thể thông thường. Ví dụ, phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng có thể được thực hiện bằng cách tạo ra thể lai bằng cách sử dụng lympho bào B thu được từ động vật đã được gây miễn dịch (Koeher và Milstein, 1976, *Nature*, 256:495) hoặc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng công nghệ hiển thị thể thực khuẩn, nhưng không bị giới hạn ở đó. Phương pháp tạo ra kháng thể đa dòng có thể dễ dàng được thực hiện bằng cách sử dụng công nghệ sản xuất kháng thể thông thường.

Thư viện kháng thể sử dụng công nghệ hiển thị thể thực khuẩn là phương pháp biểu hiện kháng thể trên bề mặt của thể thực khuẩn với các gen của kháng thể trực tiếp thu được từ Lympho bào B mà không cần tạo ra thể lai. Nhiều khó khăn liên quan đến việc tạo ra kháng thể đơn dòng bằng kỹ thuật làm bất tử tế bào B có thể được khắc phục bằng công nghệ hiển thị thể thực khuẩn này. Hiển thị thể thực khuẩn thông thường bao gồm các bước: 1) gắn xen oligonucleotit có trình tự

ngẫu nhiên vào vùng tương ứng với đầu tận cùng N của protein vỏ bọc thể thực khuẩn pIII (hoặc pIV); 2) biểu hiện protein dung hợp chứa một phần của protein vỏ bọc tự nhiên và polypeptit được mã hóa bởi oligonucleotit có trình tự ngẫu nhiên nêu trên; 3) xử lý vật liệu có thể gắn kết với polypeptit được mã hóa bởi oligonucleotit này; 4) rửa giải hạt peptit-thể thực khuẩn đã gắn kết với vật liệu nêu trên ở độ pH thấp hoặc sử dụng phân tử có khả năng gắn kết cạnh tranh; 5) khuếch đại thể thực khuẩn đã được rửa giải trong tế bào chủ bằng cách phân tích trọng lượng; 6) lặp lại các bước nêu trên để thu được lượng thể thực khuẩn mong muốn; và 7) xác định trình tự của kháng thể hoạt động từ các trình tự ADN của dòng vô tính thể thực khuẩn được chọn bằng cách phân tích trọng lượng.

Phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được thực hiện bằng công nghệ hiển thị thể thực khuẩn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể dễ dàng thực hiện các bước nêu trên có tham khảo các kỹ thuật hiển thị thể thực khuẩn đã biết, được bộc lộ trong, ví dụ, Barbas *et al.* (*METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 2:119, 1991 *J. Virol.* 2001 July; 75(14):6692–9) và Winter *et al.* (*Ann. Rev. Immunol.* 12:433, 1994). Các ví dụ về thể thực khuẩn mà có thể được sử dụng để xây dựng thư viện kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể thực khuẩn dạng sợi, như fd, M13, fl, Ifl, Ike, Zj/Z, Ff, Xf, Pfl, và Pf3. Ngoài ra, các ví dụ về vectơ mà có thể được sử dụng để biểu hiện gen không đồng nhất trên bề mặt của thể thực khuẩn dạng sợi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vectơ thể thực khuẩn, như fUSE5, fAFF1, fd-CAT1, hoặc fdtetDOG, hoặc vectơ phagemit, như pHEN1, pComb3, pComb8, hoặc pSEX. Ngoài ra, các ví dụ về thể thực khuẩn trợ giúp, mà có thể được sử dụng để cung cấp protein vỏ bọc tự nhiên, mà cần thiết để tái gây nhiễm thành công thể thực khuẩn tái tổ hợp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, M13K07 hoặc VSCM13.

Polynucleotit mã hóa dòng vô tính của kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được phân lập và giải trình tự dễ dàng bằng cách sử dụng các quy trình thông thường, ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn mồi oligonucleotit được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu các vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cần quan tâm từ ADN khuôn mẫu thể thực khuẩn. Khi polynucleotit được phân lập, nó có thể được đặt vào vectơ biểu hiện, mà sau đó được đưa vào các tế bào chủ thích hợp, và kháng

thể đơn dòng mong muốn có thể được tạo ra từ các tế bào chủ đã được biến nạp (tức là các thể biến nạp). Do đó, phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng của người có thể bao gồm bước khuếch đại polynucleotit mã hóa kháng thể đơn dòng của người trong vector biểu hiện bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể đơn dòng của người, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể, vector biểu hiện bao gồm polynucleotit này, và tế bào chủ được đưa vector biểu hiện này vào.

Kháng thể là như được mô tả trên đây.

Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là vector có khả năng sao chép và/hoặc biểu hiện polynucleotit ở các tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào không có nhân điển hình, bao gồm tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào người, khỉ, thỏ, chuột đồng, chuột hamster hoặc chuột nhắt), tế bào thực vật, tế bào nấm men, tế bào côn trùng và tế bào vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*). Tốt hơn là, nó có thể là vector, mà bao gồm ít nhất một gen đánh dấu chọn lọc và được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động thích hợp nhờ đó nucleotit này có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Ví dụ, vector này có thể ở dạng trong đó polynucleotit được đưa vào thể thực khuẩn, plasmid, cosmit, nhiễm sắc thể nhỏ, vector virus hoặc virus retro, v.v.

Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể có thể là vector biểu hiện bao gồm mỗi polynucleotit mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc vector biểu hiện bao gồm tất cả các polynucleotit mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể.

Tế bào chủ mà vector biểu hiện được đưa vào trong đó có thể là, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, các thể biến nạp được đưa vector biểu hiện vào, ví dụ, tế bào vi khuẩn như *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, v.v.; tế bào nấm men; tế bào nấm như *Pichia pastoris*, v.v.; tế bào côn trùng như tế bào *Drosophila*, *Spodoptera Sf9*, v.v.; tế bào động vật như tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (CHO), SP2/0 (u tủy chuột nhắt), nguyên bào lympho người, COS (nguyên bào sợi thận khỉ), NSO (u tủy chuột nhắt), 293T, tế bào u hắc tố Bowes, HT-1080, BHK (tế bào thận của chuột hamster con), HEK (tế bào thận phôi người), PERC.6 (tế bào võng mạc người), v.v.; và tế bào thực vật.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đưa vào” để chỉ sự phân phối vector bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể vào tế bào chủ. Việc đưa vào như vậy có thể được thực hiện bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như, đồng kết tủa canxi phosphat-ADN, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-dextran, chuyển nhiễm qua trung gian polybren, điện chuyển, vi tiêm, chuyển nhiễm qua trung gian liposom, dung hợp liposom, bao gói trong liposom và dung hợp thể nguyên sinh. Ngoài ra, chuyển nhiễm nghĩa là phân phối vật liệu mong muốn vào tế bào bằng cách gây nhiễm sử dụng các hạt virus. Ngoài ra, vector này có thể được đưa vào tế bào chủ bằng cách bắn phá gen, v.v. Theo sáng chế, thuật ngữ đưa vào có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với chuyển nhiễm.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, bao gồm kháng thể.

Kháng thể gắn kết với ái lực cao với protein CTHRC1, mà bị biểu hiện quá mức trong bệnh ung thư và được biết là đóng một vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng và sự di căn của các tế bào ung thư, dẫn đến tác dụng ức chế, trung hòa và/hoặc phản ứng gây độc tế bào của protein CTHRC1, và nhờ đó dẫn đến tác dụng ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh mà trong đó protein CTHRC1 bị biểu hiện quá mức. Kháng thể này là như được mô tả trên đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ung thư” để chỉ loại bệnh ung thư bất kỳ có thể được ngăn ngừa hoặc điều trị bằng kháng thể theo sáng chế mà không bị giới hạn. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư tụy, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư tế bào hắc tố, ung thư gan, ung thư cổ tử cung, ung thư dạ dày, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư miệng và ung thư bàng quang. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ngăn ngừa” để chỉ tất cả các tác dụng mà ức chế hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh ung thư bằng cách sử dụng chế phẩm, và thuật ngữ “điều trị” để chỉ tất cả các tác dụng mà khôi phục hoặc thay đổi theo cách có lợi các triệu chứng của bệnh ung thư bằng cách sử dụng chế phẩm.

Dược phẩm này có thể còn bao gồm chất mang được dụng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất mang được dụng” để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây kích ứng cho sinh vật và không làm mất hoạt tính sinh học và các tính chất của hợp chất được sử dụng. Các ví dụ về chất mang

được dụng, mà có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm ở dạng dung dịch lỏng, bao gồm dung dịch nước muối, nước vô trùng, dung dịch Ringer, dung dịch nước muối có đệm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol, và hỗn hợp của một hoặc nhiều trong số chúng. Nếu cần, chế phẩm cũng có thể chứa các chất phụ gia thông thường khác, như chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm khuẩn, v.v. Ngoài ra, chế phẩm này có thể chứa thêm chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính và chất bôi trơn để bào chế chế phẩm thành dạng bào chế tiêm được, như dung dịch nước, huyền phù, nhũ tương, v.v, viên tròn, viên nang, cốm hoặc viên nén.

Dược phẩm có thể ở dạng của nhiều dạng bào chế dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa khác nhau. Dược phẩm được bào chế bằng cách sử dụng chất pha loãng hoặc tá dược thông thường, bao gồm chất độn, chất kéo dài, chất kết dính, chất thấm ướt, chất gây rã, chất hoạt động bề mặt, v.v. Các dạng bào chế rắn để dùng qua đường miệng bao gồm viên nén, viên tròn, bột, cốm, viên nang, v.v. Các dạng bào chế rắn này có thể được tạo ra bằng cách trộn ít nhất một hợp chất với một hoặc nhiều tá dược, ví dụ, tinh bột, canxi cacbonat, sucroza, lactoza, gelatin, v.v. Ngoài tá dược đơn giản, chất bôi trơn như magie stearat, bột talc, v.v. có thể cũng được sử dụng. Ngoài ra, các dạng bào chế lỏng để sử dụng qua đường miệng bao gồm huyền phù, dung dịch để sử dụng bên trong, nhũ tương và si-rô, v.v. Ngoài nước, thường được sử dụng làm chất pha loãng đơn giản và parafin lỏng, nhiều tá dược khác nhau, ví dụ, chất thấm ướt, chất tạo ngọt, chất điều vị, chất bảo quản, v.v. có thể được bao gồm. Các dạng bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch nước tiệt trùng, dung môi không chứa nước, chất tạo huyền phù, nhũ tương, chất làm đông-khô, thuốc đạn, v.v. Propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ô liu, este tiêm được như etyl oleat, v.v. có thể được sử dụng làm dung môi không chứa nước và chất tạo huyền phù. Nền cho thuốc đạn có thể bao gồm witepsol, macrogol, tween 61, bơ cacao, bơ laurin, gelatin đã được glyxerin hóa, v.v.

Dược phẩm có thể có công thức bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm viên nén, viên tròn, bột, cốm, viên nang, huyền phù, dung dịch để sử dụng bên trong, nhũ tương, si-rô, dung dịch nước tiệt trùng, dung dịch không chứa nước, chất làm đông-khô và thuốc đạn.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng với lượng hữu hiệu điều trị.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu điều trị” để chỉ lượng đủ để điều trị bệnh, với tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý áp dụng được cho phương pháp điều trị y tế bất kỳ. Mức liều hữu hiệu của chế phẩm có thể được xác định phụ thuộc vào loại đối tượng, mức độ nghiêm trọng của bệnh, tuổi và giới tính của đối tượng, loại bệnh ung thư, hoạt tính của thuốc, độ nhạy với thuốc, thời gian sử dụng, đường sử dụng, tốc độ thải trừ, thời gian điều trị, các yếu tố bao gồm thuốc được sử dụng kết hợp với chế phẩm này, và các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực y tế. Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các dược chất khác, và có thể được sử dụng lần lượt hoặc đồng thời với các dược chất thông thường. Ngoài ra, chế phẩm này có thể được sử dụng ở dạng đơn liều hoặc đa liều. Điều quan trọng là sử dụng chế phẩm này với lượng tối thiểu mà có thể gây hiệu quả tối đa mà không gây ra tác dụng phụ, khi xem xét tất cả các yếu tố được mô tả trên đây, và lượng tối thiểu này có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng kháng thể.

Kháng thể và bệnh ung thư là như được mô tả trên đây.

Phương pháp điều trị bệnh ung thư có thể là phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước sử dụng dược phẩm bao gồm kháng thể cùng với chất mang được dùng cho đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc nghi ngờ mắc bệnh ung thư. Ở đây, chất mang được dùng là như được mô tả trên đây. Phương pháp điều trị bệnh ung thư có thể cụ thể là phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước sử dụng chế phẩm bao gồm kháng thể cho đối tượng mắc bệnh ung thư.

Các ví dụ về đối tượng này bao gồm động vật có vú, bao gồm gia súc, lợn, cừu, gà, chó, người, v.v. và chim. Đối tượng này có thể là đối tượng bất kỳ trong đó bệnh ung thư sẽ được điều trị bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế.

Cụ thể là, chế phẩm này có thể được sử dụng với lượng hữu hiệu điều trị ở dạng đơn liều hoặc đa liều. Ở đây, chế phẩm này có thể được sử dụng ở dạng chất lỏng, bột, khí dung, viên nang, viên nén được bao tan trong ruột hoặc viên nang, hoặc thuốc đạn. Ngoài ra, chế phẩm này có thể được sử dụng trong phúc mạc, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong da, qua miệng, khu trú, trong mũi,

trong phổi, hoặc trong trực tràng, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Tuy nhiên, khi chế phẩm này được sử dụng qua đường miệng, peptit được tiêu hóa trong dạ dày, và vì lý do này, chế phẩm sử dụng qua đường miệng nên được bào chế để thành phần hoạt chất được bao hoặc được bảo vệ khỏi sự phân hủy trong dạ dày. Ngoài ra, được phẩm có thể được sử dụng bằng cách sử dụng thiết bị bất kỳ có khả năng phân phối thành phần hoạt chất đến tế bào đích.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp cung cấp thông tin để chẩn đoán bệnh ung thư, bao gồm bước phát hiện protein CTHRC1 trong mẫu sinh học được phân lập từ đối tượng nghi ngờ bị ung thư thông qua phản ứng kháng nguyên-kháng thể, bằng cách sử dụng kháng thể. Ngoài ra, phương pháp này có thể là phương pháp để chẩn đoán bệnh ung thư.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp cung cấp thông tin để dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm bước phát hiện protein CTHRC1 trong mẫu sinh học được phân lập từ đối tượng mắc bệnh ung thư thông qua phản ứng kháng nguyên-kháng thể, bằng cách sử dụng kháng thể. Ngoài ra, phương pháp này có thể là phương pháp để dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư. Kháng thể, bệnh ung thư, đối tượng và protein CTHRC1 là như được mô tả trên đây. Do protein CTHRC1 đã được biết là bị biểu hiện quá mức trong nhiều bệnh ung thư khác nhau, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả để chẩn đoán bệnh ung thư mà trong đó protein CTHRC1 đã được biết là bị biểu hiện quá mức. Ngoài ra, cũng đã được báo cáo rằng sự biểu hiện quá mức của protein CTHRC1 gây ra sự chuyển đổi biểu mô-trung mô (EMT) liên quan đến sự di căn và do đó có liên quan đến tiên lượng xấu của bệnh ung thư. Do đó, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả để dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư.

Phương pháp cung cấp thông tin để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư cho phép phát hiện protein CTHRC1 bằng cách cho kháng thể đơn dòng của người đặc hiệu với CTHRC1 theo sáng chế phản ứng với mẫu sinh học được phân lập từ đối tượng nghi ngờ bị mắc bệnh ung thư hoặc mắc bệnh ung thư và phát hiện sự hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể, nhờ đó cung cấp thông tin để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư.

Cụ thể là, phương pháp này có thể là phương pháp cung cấp thông tin để

chẩn đoán bệnh ung thư hoặc phương pháp để chẩn đoán bệnh ung thư, bao gồm các bước: (a) xử lý mẫu sinh học được phân lập từ đối tượng nghi ngờ bị mắc bệnh ung thư bằng kháng thể, để phát hiện protein CTHRC1 bằng phản ứng kháng nguyên-kháng thể; và (b) so sánh mức protein CTHRC1 được phát hiện trong bước (a) với mức này trong nhóm đối chứng, và đánh giá đối tượng là bệnh nhân ung thư nếu mức protein CTHRC1 trong mẫu sinh học là cao hơn so với mức này trong nhóm đối chứng.

Cụ thể là, phương pháp này có thể là phương pháp cung cấp thông tin để dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư hoặc phương pháp để dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm các bước: (a) xử lý mẫu sinh học được phân lập từ đối tượng mắc bệnh ung thư bằng kháng thể, để phát hiện protein CTHRC1 bằng phản ứng kháng nguyên-kháng thể; và (b) so sánh mức protein CTHRC1 được phát hiện trong bước (a) với mức này trong nhóm đối chứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mẫu sinh học” nghĩa là bao gồm mô, tế bào, máu toàn phần, huyết thanh, huyết tương, mẫu mô tử thi (não, da, hạch bạch huyết, tủy sống, v.v.), dịch nội bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào, tế bào có nhân điển hình bị vỡ, và hệ biểu hiện vi khuẩn, v.v, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Các mẫu sinh học này có thể được phản ứng với kháng thể ở trạng thái được thao tác hoặc không được thao tác để xác định sự có mặt của protein CTHRC1 hoặc sự có mặt hoặc không có mặt của bệnh ung thư.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phức hợp kháng nguyên-kháng thể” để chỉ sự liên hợp giữa kháng nguyên protein CTHRC1 trong mẫu và kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận biết kháng nguyên protein CTHRC1. Sự tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể như vậy có thể được phát hiện bằng phương pháp bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp đo màu, phương pháp điện hóa, phương pháp đo flo, phương pháp đo quang, phương pháp đếm hạt, phương pháp đánh giá bằng mắt thường và phương pháp đếm nhấp nháy, nhưng phương pháp này không bị giới hạn ở đó, và các phương pháp khác nhau có thể được sử dụng.

Theo sáng chế, các nhãn khác nhau có thể được sử dụng để phát hiện phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Các ví dụ cụ thể về nhãn này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, enzym, vật liệu huỳnh quang, phối tử, vật liệu phát quang, vi hạt,

và đồng vị phóng xạ.

Các ví dụ về enzym được sử dụng làm nhãn phát hiện bao gồm axetylcholinesteraza, phosphataza kiềm, β D-galactosidaza, peroxidaza cây củ cải ngựa, β -lactamaza, v.v. Các ví dụ về vật liệu huỳnh quang bao gồm fluorescein, Eu^{3+} , Eu^{3+} chelat, cryptat, v.v. Các ví dụ về phối tử bao gồm dẫn xuất biotin, v.v, và các ví dụ về vật liệu phát quang bao gồm este acridini, dẫn xuất isoluminol, v.v. Ngoài ra, các ví dụ về vi hạt bao gồm vàng coloit, latec màu, v.v., và các ví dụ về đồng vị phóng xạ bao gồm chất phản ứng ^{57}Co , ^3H , ^{125}I , và ^{125}I -Bonton Hunter, v.v.

Tốt hơn là, phức hợp kháng nguyên-kháng thể này có thể được phát hiện bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết với enzym (ELISA). Các ví dụ về ELISA bao gồm ELISA khác nhau, như ELISA trực tiếp sử dụng kháng thể đã được dán nhãn nhận diện kháng nguyên gắn vào nền rắn, ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể thứ cấp đã được dán nhãn nhận diện kháng thể bắt giữ trong phức hợp kháng thể nhận diện kháng nguyên gắn vào nền rắn, ELISA trực tiếp kiểu bánh kẹp (sandwich ELISA) sử dụng kháng thể đã được dán nhãn khác nhận diện kháng nguyên trong phức hợp kháng nguyên-kháng thể gắn với nền rắn, ELISA gián tiếp kiểu bánh kẹp (sandwich ELISA) bao gồm cho kháng nguyên phản ứng với kháng thể khác trong phức hợp kháng nguyên-kháng thể gắn với nền rắn và sử dụng kháng thể thứ cấp đã được dán nhãn nhận diện kháng thể khác, và ELISA cạnh tranh bao gồm sự cạnh tranh giữa các kháng nguyên khác nhau với cùng vị trí gắn kết kháng thể, v.v.

Kháng thể đơn dòng có thể có nhãn phát hiện. Nếu kháng thể đơn dòng không có nhãn phát hiện, nó có thể được bắt giữ và phát hiện bằng cách xử lý bằng kháng thể khác có nhãn phát hiện.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư.

Kháng thể và bệnh ung thư là giống như được mô tả trên đây. Có thể chẩn đoán bệnh liên quan đến sự biểu hiện hoặc mức biểu hiện của protein CTHRC1, như ung thư, hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bằng cách sử dụng chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm kháng thể đặc hiệu với protein CTHRC1 theo sáng chế.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất kit để chẩn đoán bệnh ung thư

hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư.

Chế phẩm và bệnh ung thư là giống như được mô tả trên đây. Ngoài ra, kit để chẩn đoán bệnh ung thư có thể còn bao gồm chế phẩm, dung dịch hoặc dụng cụ có một hoặc nhiều các thành phần khác thích hợp cho các phương pháp thử nghiệm.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất chế phẩm và kit để phát hiện protein CTHRC1, bao gồm kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1).

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện protein CTHRC1 trong mẫu, bao gồm bước phát hiện phức hợp kháng nguyên CTHRC1–kháng thể bằng cách sử dụng kháng thể gắn kết đặc hiệu với CTHRC1. Phương pháp phát hiện có thể được sử dụng để định lượng vắc-xin liên hợp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phức hợp kháng nguyên–kháng thể” để chỉ thể liên hợp giữa kháng nguyên liên quan trong mẫu và kháng thể nhận diện kháng nguyên này. Việc phát hiện phức hợp kháng nguyên–kháng thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, phương pháp quang phổ, quang hóa, sinh hóa, hóa miễn dịch, điện, đo quang phổ hấp thụ, hóa học và các phương pháp khác. Cụ thể, nó có thể được phát hiện bằng phương pháp bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp đo màu, phương pháp điện hóa, phương pháp đo flo, phương pháp đo độ sáng, phương pháp đếm hạt, phương pháp đánh giá bằng mắt thường và phương pháp đếm nhấp nháy, và phương pháp tách chiết Western, ELISA, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, phương pháp khuếch tán miễn dịch phóng xạ, phương pháp khuếch tán miễn dịch Ouchterlony, điện di miễn dịch tên lửa, nhuộm miễn dịch mô, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm cố định bổ thể, phương pháp đo tế bào theo dòng (FACS), chip protein, v.v, nhưng phương pháp này không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, các nhãn khác nhau có thể được sử dụng để phát hiện phức hợp kháng nguyên–kháng thể. Các ví dụ cụ thể về nhãn này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, enzym, vật liệu huỳnh quang, phối tử, vật liệu phát quang, vi hạt và đồng vị phóng xạ.

Các ví dụ về enzym được sử dụng làm nhãn phát hiện bao gồm axetyl-

cholinesteraza, phosphataza kiềm, β D-galactosidaza, peroxidaza cây củ cải ngựa, β -lactamaza, v.v. Các ví dụ về vật liệu huỳnh quang bao gồm fluorescein, Eu^{3+} , Eu^{3+} chelat, cryptat, v.v. Các ví dụ về phối tử bao gồm dẫn xuất biotin, v.v, và các ví dụ về vật liệu phát quang bao gồm este acridini, dẫn xuất isoluminol, v.v. Ngoài ra, các ví dụ về vi hạt bao gồm vàng coloit, latec màu, v.v, và các ví dụ về đồng vị phóng xạ bao gồm chất phản ứng ^{57}Co , ^3H , ^{125}I , và ^{125}I -Bonton Hunter, v.v. Các vật liệu này không bị giới hạn ở đó.

Kit theo sáng chế có thể ở dạng kit thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA). Cụ thể, kit này có thể bao gồm kháng thể được mô tả trên đây làm kháng thể bắt giữ, và ELISA có thể bao gồm (i) kháng thể đa dòng gắn kết với CTHRC1; (ii) kháng thể bắt giữ ở dạng kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1); và (iii) kháng thể gắn kết với IgG Fc đã được dán nhãn phát hiện, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA)” cũng được gọi là phương pháp thử nghiệm miễn dịch enzym, và là phương pháp để định lượng bằng cách sử dụng sự hấp thụ bằng cách gắn kết enzym với kháng thể để tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể thông qua phản ứng của enzym với cơ chất. Các ví dụ về ELISA bao gồm ELISA khác nhau, như ELISA trực tiếp bằng cách sử dụng kháng thể đã được dán nhãn nhận diện kháng nguyên gắn vào nền rắn, ELISA gián tiếp bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp đã được dán nhãn nhận diện kháng thể bắt giữ trong phức hợp kháng thể mà nhận diện kháng nguyên gắn vào nền rắn, ELISA trực tiếp kiểu bánh kẹp (sandwich ELISA) sử dụng kháng thể đã được dán nhãn khác nhận diện kháng nguyên trong phức hợp kháng nguyên-kháng thể gắn với nền rắn, ELISA gián tiếp kiểu bánh kẹp (sandwich ELISA) bao gồm cho kháng nguyên phản ứng với kháng thể khác trong phức hợp kháng nguyên-kháng thể gắn với nền rắn và sử dụng kháng thể thứ cấp đã được dán nhãn nhận diện kháng thể khác, và ELISA cạnh tranh liên quan đến sự cạnh tranh giữa các kháng nguyên khác nhau với cùng vị trí gắn kết kháng thể, v.v.

Một lượng rất nhỏ của protein CTHRC1 có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein CTHRC1 theo sáng chế; chế phẩm để phát hiện chứa kháng thể này; kit; và phương pháp phát hiện protein CTHRC1

bằng cách sử dụng chúng. Lượng protein cần được phát hiện có thể cụ thể là ít hơn 1 mg, ít hơn 100 μ g, và cụ thể hơn là ít hơn 10 μ g, ít hơn 1 μ g, ít hơn 100 ng, ít hơn 10 ng, và ít hơn 1 ng.

Theo một phương án của sáng chế, đã xác nhận rằng các mức vài ng của protein CTHRC1 có thể được phát hiện bằng cách thực hiện ELISA gián tiếp sử dụng các kháng thể 4H5 và 9E6 gắn kết đặc hiệu với CTHRC1 làm kháng thể bắt giữ, và các vắc-xin liên hợp cũng có thể được phát hiện thông qua ELISA.

Như được mô tả trên đây, lượng protein CTHRC1 có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế là nhỏ hơn nhiều so với kit thông thường để phát hiện protein CTHRC1. Theo đó, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng hiệu quả để định lượng protein CTHRC1 và vắc-xin bằng cách sử dụng chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn qua các ví dụ và ví dụ thực nghiệm. Tuy nhiên, các ví dụ và ví dụ thực nghiệm được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không được dự định bị giới hạn ở hoặc bởi các ví dụ và ví dụ thực nghiệm này.

<Ví dụ 1: Kháng thể chuột nhất cCMAb45 và cCMAb96 >

Ví dụ 1-1: Phát hiện 4H5 và 9E6

Để phát triển kháng thể gắn đích protein CTHRC1, kháng thể chuột nhất đơn dòng gắn kết với protein CTHRC1 được phát hiện. Cụ thể, khi kháng thể cho protein CTHRC1 được tạo ra bằng cách tiêm protein CTHRC1 vào chuột nhất, các lympho bào B được phân lập từ lá lách của chuột nhất. Các lympho bào đã được phân lập được pha loãng do đó chỉ một lympho bào B được cho phép đi vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng được phủ protein CTHRC1. Sau đó, lympho bào B gắn kết với protein CTHRC1 được sàng lọc bằng cách sử dụng phân tử kháng kháng thể chuột nhất được dán nhãn peroxidaza cây củ cải ngựa (HRP).

Kết quả là, bốn loại kháng thể đơn dòng chuột nhất kháng CTHRC1 (4H5, 9E6, 6C1, và 1D1) được phát hiện.

Ví dụ 1-2: Xác nhận ái lực với CTHRC1

ELISA gián tiếp được thực hiện để xác định kháng thể có ái lực cao nhất với protein CTHRC1 trong số bốn loại kháng thể chuột nhất đơn dòng kháng CTHRC1 được phát hiện trong Ví dụ 1-1.

Đĩa miễn dịch được phủ CTHRC1-Fc và CTHRC1-His được xử lý bằng bốn loại kháng thể (4H5, 9E6, 6C1, và 1D1) ở các nồng độ khác nhau và được phản ứng trong 2 giờ, và giá trị OD (mật độ quang) được đo bằng cách sử dụng phân tử kháng kháng thể chuột nhất được dán nhãn HRP làm kháng thể thứ cấp. Cụ thể là, giá trị OD cao hơn chỉ ra rằng các kháng thể này gắn kết với CTHRC1 với ái lực cao hơn.

Kết quả là, đã xác nhận rằng mặc dù giá trị OD của tất cả bốn kháng thể tăng theo nồng độ của protein CTHRC1, hai loại kháng thể (4H5 và 9E6) gắn kết với protein CTHRC1 với ái lực cao hơn so với các kháng thể còn lại (Fig. 1)

Ví dụ 1-3: Xác nhận về epitop

Để xác nhận các epitop của 4H5 và 9E6 có ái lực cao trong số bốn loại kháng thể chuột nhất kháng CTHRC1, ELISA cạnh tranh được thực hiện. Cụ thể là, epitop đề cập đến vị trí của kháng nguyên được nhận diện bởi kháng thể.

Đĩa miễn dịch được phủ protein CTHRC1, và sau đó, kháng thể 4H5 và 9E6 được dán nhãn biotin và kháng thể không được dán nhãn bằng biotin được bổ sung vào đó ở tỷ lệ là 1:0, 1:3, 1:6, 1:12,5, 1:25, 1:50, và 1:100. Giá trị OD của mỗi kháng thể được đo bằng cách sử dụng streptavidin-HRP làm kháng thể thứ cấp. Cụ thể là, khi hai kháng thể (4H5 và 9E6) có epitop tương tự, giá trị OD giảm khi nồng độ của kháng thể không được đánh dấu tăng, trong khi đó, khi các epitop của hai kháng thể khác nhau, giá trị OD không thay đổi ngay cả khi nồng độ của kháng thể không được đánh dấu tăng.

Kết quả là, đã xác nhận rằng 4H5 và 9E6 có các epitop khác nhau (Fig. 2).

Ví dụ 1-4: Tạo ra kháng thể khảm cCMAb45 và cCMAb96

Để giảm thiểu khả năng gây miễn dịch của các kháng thể chuột nhất 4H5 và 9E6 đặc hiệu với CTHRC1 và có ái lực cao, các kháng thể khảm được tạo ra trong đó vùng biến đổi của kháng thể chuột nhất được giữ lại và chỉ có vùng ổn định của chúng được thay thế bằng protein có nguồn gốc từ người. Kháng thể thu

được đặt tên là cCMAB45 và cCMAB96.

Ví dụ 1-5: Phân tích ái lực (ELISA gián tiếp)

Ái lực của cCMAB45 và cCMAB96, là kháng thể khả kháng CTHRC1, được tạo ra trong Ví dụ 1-3 với protein CTHRC1 được xác minh. ELISA gián tiếp được thực hiện để kiểm tra ái lực của kháng nguyên và kháng thể.

100 μL CTHRC1 được phân tán ở nồng độ là 5 $\mu\text{g/mL}$ lên đĩa miễn dịch và được phủ ở 4°C qua đêm. Ngày tiếp theo, dung dịch CTHRC1 đã được phủ được loại bỏ và phong bế trong 2 giờ. Sau đó, kháng thể cCMAB45 và cCMAB96 được xử lý ở các nồng độ khác nhau và được cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, và kháng thể được gạn để loại bỏ kháng thể không được gắn kết, và sau đó đĩa được rửa. Giá trị OD được đo bằng cách sử dụng phân tử kháng Fc người-HRP làm kháng thể thứ cấp nhận diện vùng ổn định của người. Cụ thể là, giá trị OD cao hơn chỉ ra ái lực cao hơn giữa CTHRC1 và kháng thể.

Kết quả là, cCMAB45 thể hiện giá trị K_D là $5,2 \times 10^{-10}$ M, và cCMAB96 thể hiện giá trị K_D là $4,3 \times 10^{-10}$ M. Đã xác nhận rằng cả hai kháng thể đều thể hiện ái lực rất cao với protein CTHRC1 (Fig. 3).

Ví dụ 1-6: Phân tích tính đặc hiệu (ELISA gián tiếp)

ELISA gián tiếp được thực hiện để xác nhận cCMAB45 và cCMAB96 có gắn kết đặc hiệu với CTHRC1 hay không. Như trong phân tích ái lực, đĩa miễn dịch được phủ protein CTHRC1 và một số protein kháng nguyên không đặc hiệu. Ngày tiếp theo, dung dịch phủ được gạn và phong bế, và cCMAB45 và cCMAB96 được bổ sung vào đó ở các nồng độ là 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, và 5 $\mu\text{g/mL}$ và được phản ứng trong 2 giờ. Sau đó, dung dịch chứa kháng thể được gạn và rửa để loại bỏ kháng thể không được gắn kết. Phân tử kháng chuỗi nhẹ kappa người-HRP được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để đo giá trị OD.

Kết quả là, đã xác nhận rằng cCMAB45 và cCMAB96 thể hiện tính đặc hiệu cao với CTHRC1 (Fig. 3).

Ví dụ 1-7: Xác nhận về hiệu quả ức chế sự di trú của các tế bào ung thư

Để xác minh hiệu quả điều trị của cCMAB45 và cCMAB96, hiệu quả ức

chế đối với sự di trú được xác nhận bằng cách sử dụng các dòng tế bào của bệnh ung thư tụy, ung thư vú, ung thư buồng trứng, và ung thư bàng quang.

Cụ thể là, cCMAb45 và cCMAb96 được tạo ra ở các nồng độ là 1 $\mu\text{g/mL}$ và 5 $\mu\text{g/mL}$ hoặc 1 $\mu\text{g/mL}$ và 10 $\mu\text{g/mL}$, được pha loãng trong môi trường không có huyết thanh cùng với các dòng tế bào, và được phân tán vào buồng trên của Transwell. Môi trường chứa huyết thanh được đặt trong buồng dưới để tạo ra môi trường trong đó các tế bào có thể di trú. Số tế bào đã được di trú được đo bằng cách nuôi cấy kháng thể trong mỗi dòng tế bào trong thời gian thích hợp.

Kết quả là, đã xác nhận rằng mức độ di trú của các tế bào ung thư được giảm một cách đáng kể trong các nhóm được xử lý bằng cCMAb45 và cCMAb96 so với nhóm IgG đối chứng (Fig. 4 đến 7).

Ví dụ 1-8: Xác nhận về hiệu quả ức chế sự xâm lấn của các tế bào ung thư

Theo cách giống như trong các Ví dụ 1 đến 7, để xác minh hiệu lực của cCMAb45 và cCMAb96, hiệu quả ức chế sự xâm lấn của các tế bào ung thư được xác nhận. Thí nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng bệnh ung thư tụy, dòng tế bào ung thư tụy thu được từ bệnh nhân, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, và bệnh ung thư bàng quang.

Buồng dưới của Transwell được phủ Matrigel, mà có thể bắt chước nhân tạo chất nền ngoại bào, và khả năng xâm lấn của các tế bào ung thư được quan sát. cCMAb45 và cCMAb96 được tạo ra ở các nồng độ là 1 $\mu\text{g/mL}$ và 5 $\mu\text{g/mL}$ hoặc 1 $\mu\text{g/mL}$ và 10 $\mu\text{g/mL}$, được pha loãng trong môi trường không chứa huyết thanh cùng với các dòng tế bào, và được phân tán vào buồng trên của Transwell. Môi trường chứa huyết thanh được đặt trong buồng dưới. Sau khi nuôi cấy kháng thể trong một khoảng thời gian nhất định, số tế bào được di trú bằng cách xâm lấn Matrigel được đo.

Kết quả là, đã xác nhận rằng khả năng xâm lấn của các tế bào ung thư được giảm đi trong các nhóm được xử lý bằng cCMAb45 và cCMAb96 so với nhóm IgG đối chứng (Fig. 8 đến 12).

<Ví dụ 2: Kháng thể hCMAb45 và hCMAb96 được làm tương thích với người>

Ví dụ 2-1: Xây dựng thư viện kháng thể được làm tương thích với người

Để làm giảm khả năng gây miễn dịch của cCMAb45 và cCMAb96, là kháng thể kháng kháng CTHRC1, các kháng thể được làm tương thích với người, trong đó vùng khung (dưới đây gọi là “FR”) mang vùng CDR được thay thế bằng vùng của người, được tạo ra ngoại trừ vùng CDR, là phần quan trọng nhất để gắn kết kháng nguyên.

Thư viện kháng thể được làm tương thích với người có các vùng FR khác nhau bao gồm các vùng CDR của cCMAb45 và cCMAb96 được xây dựng bằng cách sử dụng kỹ thuật ghép CDR.

Ví dụ 2-2: Chọn lọc kháng thể được làm tương thích với người và hoán chuyển IgG

Các dòng vô tính đặc hiệu cho CTHRC1 và có ái lực cao được lựa chọn từ thư viện kháng thể được làm tương thích với người được xây dựng trên đây. Thử nghiệm biểu hiện tạm thời IgG được thực hiện trên các tế bào HEK293F để tinh chế mỗi trong số tám kháng thể đối với 4H5 và 9E6, và độ tinh khiết được xác nhận bằng SDS-PAGE.

Kết quả là, năng suất của kháng thể được làm tương thích với người 4H5 được đo nằm trong khoảng từ 15 mg/L đến 67,3 mg/L, và năng suất của kháng thể được làm tương thích với người 9E6 được đo nằm trong khoảng từ 3,1 mg/L đến 33,3 mg/L (Fig. 13)

Ví dụ 2-3: Phân tích ái lực của kháng thể được làm tương thích với người

ELISA gián tiếp được thực hiện trên tám dòng vô tính ứng viên của 4H5 được tạo ra trong Ví dụ 2-2 để phân tích ái lực. Đĩa miễn dịch được phủ CTHRC1-His, và vào ngày tiếp theo, nồng độ của tám kháng thể ứng viên được làm tương thích với người và cCMAb45 được pha loãng từng bước 1/3 từ nồng độ tối đa là 500 ng/mL và được bổ sung vào đĩa. Giá trị OD được đo bằng cách sử dụng phân tử kháng Fc người-HRP làm kháng thể thứ cấp. Ái lực được biểu diễn bằng các giá trị K_D . Giá trị K_D thấp chỉ ra ái lực cao.

Kết quả là, giá trị K_D của kháng thể được làm tương thích với người được

đo là tương tự hoặc thấp hơn so với của cCMAb45.

Kết quả của việc phân tích tám dòng vô tính ứng viên của kháng thể được làm tương thích với người 9E6 theo cách giống như nêu trên là giá trị K_D của kháng thể được làm tương thích với người 9E6 được đo là tương tự hoặc cao hơn một chút so với của cCMAb96.

Cụ thể là, đã xác nhận rằng ái lực của kháng thể 4H5 được làm tương thích với người được đo nằm trong khoảng từ $0,82 \times 10^{-10}$ M đến $2,5 \times 10^{-10}$ M, và ái lực của kháng thể 9E6 được làm tương thích với người được đo nằm trong khoảng từ $1,61 \times 10^{-10}$ M đến $4,8 \times 10^{-10}$ M (Fig. 14).

Ví dụ 2-4: Thử nghiệm hiệu lực của kháng thể được làm tương thích với người

Để thử nghiệm hiệu lực của các dòng vô tính ứng viên của kháng thể 4H5 và 9E6 được làm tương thích với người, thử nghiệm di trú được thực hiện bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư tụy Panc-1. 5 $\mu\text{g/mL}$ mỗi kháng thể và 5×10^4 tế bào được pha loãng bằng môi trường không chứa huyết thanh và được phân tán vào buồng trên của Transwell. Sau đó, môi trường chứa huyết thanh được đặt trong buồng dưới để tạo ra môi trường trong đó tế bào có thể di trú. Số tế bào đã được di trú được đo bằng cách nuôi cấy kháng thể trong 24 giờ, và hiệu lực của các kháng thể ứng viên được đánh giá.

Kết quả là, đã xác nhận rằng mức độ di trú của các tế bào ung thư được làm giảm một cách đáng kể trong các nhóm được xử lý bằng cCMAb45 và cCMAb96 so với IgG đối chứng (Fig. 4 đến 7)

Kết quả là, các dòng vô tính ứng viên của kháng thể 4H5 được làm tương thích với người làm giảm khả năng di trú của tế bào 30% đến 50% so với IgG đối chứng, và các dòng vô tính ứng viên của kháng thể 9E6 được làm tương thích với người làm giảm khả năng di trú của tế bào 30% đến 40%. Kết luận là, đã xác nhận rằng tất cả các ứng viên cho kháng thể 4H5 và 9E6 được làm tương thích với người đều có hiệu lực tương tự hoặc cao hơn so với cCMAb45 và cCMAb96 (Fig. 15).

Ví dụ 2-5: Lựa chọn kháng thể được làm tương thích với người và đánh

giá lại ái lực và hiệu lực

Kháng thể được lựa chọn bằng cách đánh giá các dòng vô tính ứng viên của kháng thể 4H5 và 9E6 được làm tương thích với người trên cơ sở ba tiêu chí: ái lực, hiệu lực, và hiệu suất. SA2759, SA2761, SA2762 và SA2765 được lựa chọn đối với kháng thể 4H5 được làm tương thích với người, và SA2768, SA2769, và SA2770 được lựa chọn đối với kháng thể 9E6 được làm tương thích với người.

Để đánh giá lại ái lực và hiệu lực của kháng thể được chọn trên cơ sở các tiêu chí nêu trên, ELISA gián tiếp được sử dụng để đánh giá ái lực, và thử nghiệm di trú được sử dụng để đánh giá hiệu lực. Phương pháp thí nghiệm là giống như được mô tả trong các Ví dụ 2-3 và 2-4.

Kết quả là, như đối với ái lực, đã xác nhận rằng giá trị K_D được đo là tương tự hoặc thấp hơn so với giá trị của cCMAb45 và cCMAb96, tương tự với phép đo thứ nhất, và khả năng di trú của tế bào cũng giảm 30% đến 50%. Cụ thể, đã xác nhận rằng kháng thể 4H5 được làm tương thích với người được chọn có ái lực vài pM và làm giảm khả năng di trú của tế bào 40%, và kháng thể 9E6 được làm tương thích với người có ái lực khoảng vài chục pM và làm giảm khả năng di trú của tế bào 50% (Fig. 16 và 17).

Cuối cùng, SA2765 được đặt tên là hCMAb45, và SA2770 được đặt tên là hCMAb96.

Ví dụ 2-6: Phân tích tính đặc hiệu của hCMAb45 và hCMAb96

ELISA gián tiếp được thực hiện để xác định hCMAb45 và hCMAb96 có gắn kết đặc hiệu với CTHRC1 hay không. Địa miễn dịch được phủ CTHRC1-His và một số kháng nguyên không đặc hiệu. Vào ngày tiếp theo, hCMAb45 và hCMAb96 được phản ứng với kháng nguyên ở các nồng độ là 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, và 5 $\mu\text{g/mL}$, và sau đó giá trị OD được đo bằng cách sử dụng phân tử kháng chuỗi nhẹ kappa người-HRP làm kháng thể thứ cấp.

Kết quả là, đã xác nhận rằng hCMAb45 và hCMAb96 gắn kết đặc hiệu với CTHRC1 (Fig. 18).

Ví dụ 2-7: Xác nhận về hiệu quả ức chế sự di trú của các tế bào ung thư

Để xác minh hiệu quả điều trị của hCMAb45 và hCMAb96, hiệu quả ức

chế sự di trú của các tế bào ung thư được xác nhận. Ung thư tụy, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư phổi, và ung thư tế bào hắc tố ác tính được sử dụng, và phương pháp thí nghiệm là giống như được mô tả trong Ví dụ 1-7.

Kết quả là, đã xác nhận rằng khả năng di trú của các tế bào ung thư được làm giảm một cách đáng kể trong các nhóm được xử lý bằng hCMAb45 và hCMAb96 so với IgG đối chứng (Fig. 19 đến 22).

Ví dụ 2-8: Xác nhận về hiệu quả ức chế sự xâm lấn của các tế bào ung thư

Theo cách giống như trong phương pháp thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1-8, hiệu quả ức chế sự xâm lấn của các tế bào ung thư của hCMAb45 và hCMAb96 được xác nhận.

Kết quả là, khả năng xâm lấn của các tế bào ung thư được làm giảm một cách đáng kể trong các nhóm được xử lý bằng hCMAb45 và hCMAb96 so với IgG đối chứng (Fig. 23 đến 26).

Ví dụ 2-9: Xác nhận về hiệu quả chống ung thư *in vivo* ở mô hình động vật ung thư tụy

Khả năng ức chế của kháng thể hCMAb45 và hCMAb96 được làm tương thích với người mà gắn kết đặc hiệu với protein CTHRC1 đối với sự di trú và xâm lấn của tế bào ung thư được xác nhận *in vitro* qua các Ví dụ 2-7 và 2-8. Theo đó, đã xác nhận được là hiệu quả chống ung thư có được quan sát thấy giống nhau *in vivo* hay không. Cụ thể, mô hình chuột nhắt ghép dị loại dưới da được tạo ra bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư tụy BxPC-3 biểu hiện quá mức CTHRC1. 1×10^6 tế bào được cấy dưới da ở chân phải của chuột, và sau 6 ngày, chuột phát triển với khối u có kích thước nằm trong khoảng từ 73 mm³ đến 77 mm³ được chọn và chia thành các nhóm. Thuốc được tiêm vào tĩnh mạch đuôi, và IgG đối chứng và nhóm thí nghiệm hCMAb45 và hCMAb96 được sử dụng với liều 10 mg/kg hai lần một tuần trong tổng số 4 tuần, và kích thước của khối u được đo hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước cặp. Sau khi xử lý bằng kháng thể, và thí nghiệm được chấm dứt vào ngày 28 (lần điều trị 8), và kích thước khối u được so sánh với kích thước khối u của IgG đối chứng.

Kết quả là, đã xác nhận rằng kích thước của khối u trong các nhóm được

sử dụng hCMAb45 và hCMAb96 được giảm so với nhóm được sử dụng IgG đối chứng (Fig. 27). Cụ thể là, đã xác nhận rằng nhóm được xử lý bằng hCMAb96 có hiệu quả kháng chống ung thư vượt trội so với nhóm được xử lý bằng hCMAb45.

Qua các ví dụ nêu trên, hiệu quả chống ung thư *in vivo* của kháng thể hCMAb45 và hCMAb96 được làm tương thích với người mà gắn kết đặc hiệu với CTHRC1 được xác nhận, và tiềm năng của chúng làm các chất làm chậm hoặc ức chế sự phát triển của khối u được xác minh.

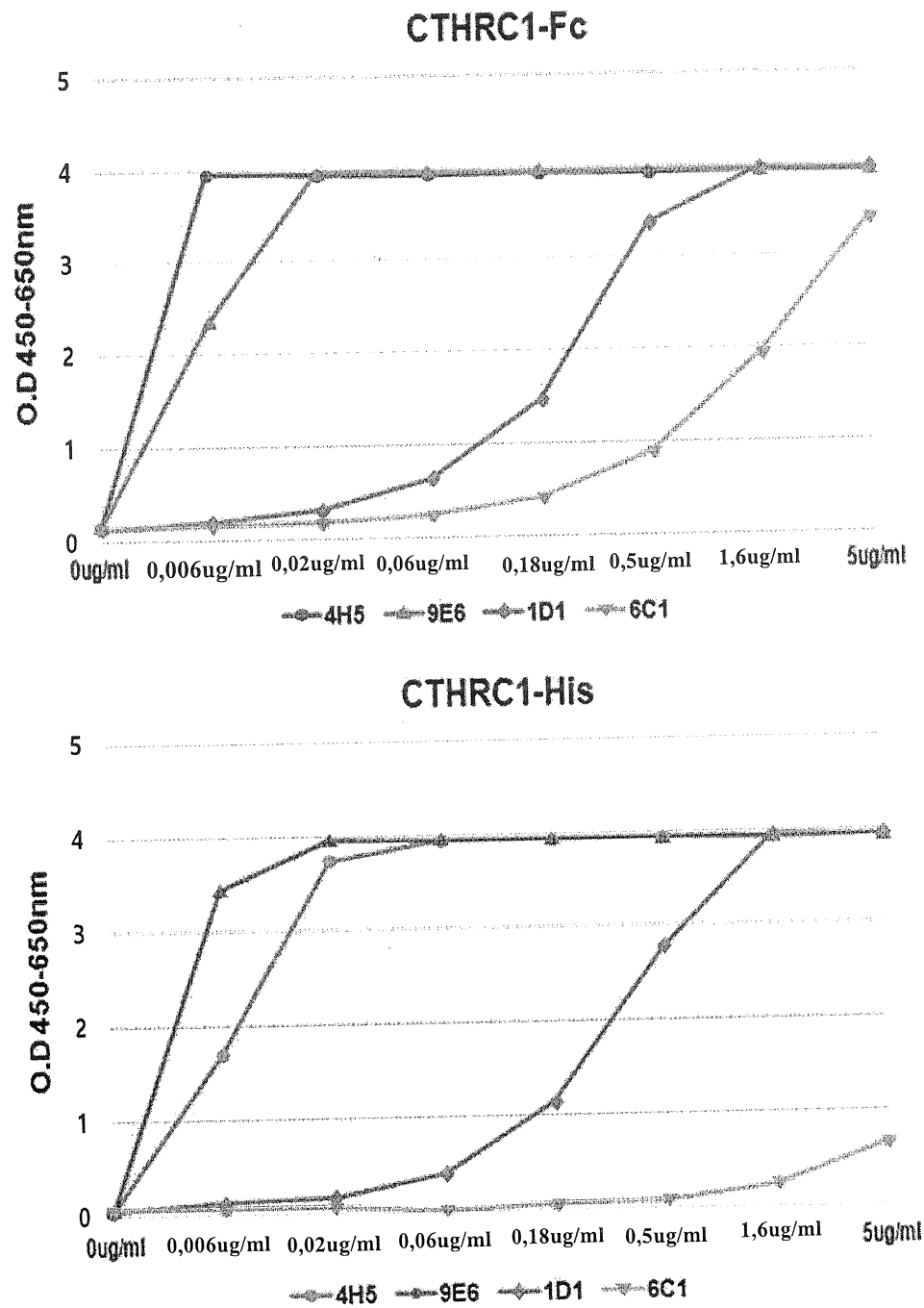
Từ phần mô tả trên đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể hiểu được rằng sáng chế có thể được thể hiện trong các dạng cụ thể khác mà không cần cải biến các khái niệm kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án được lấy làm ví dụ được bộc lộ ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Phạm vi của sáng chế do đó được chỉ ra bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải bởi phần mô tả trên đây. Tất cả các thay đổi trong phạm vi ý nghĩa và phạm vi tương đương của các điểm yêu cầu bảo hộ sẽ được bao hàm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

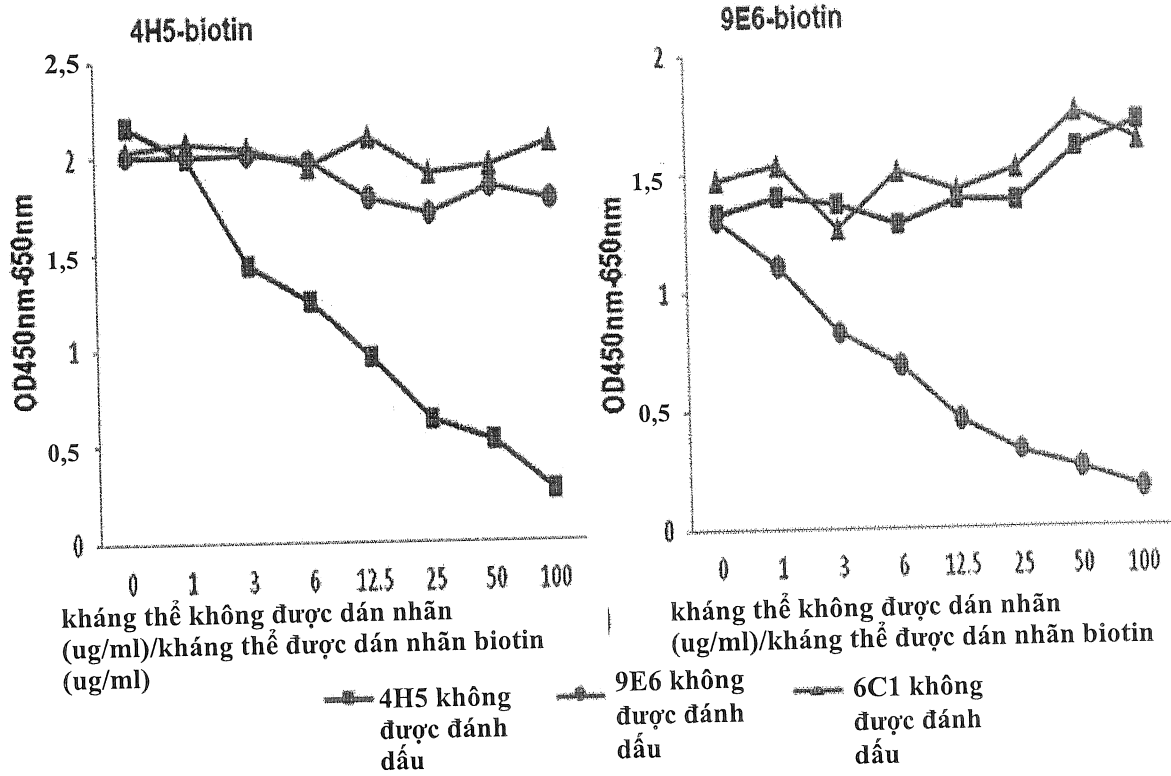
1. Kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1), bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 11, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 12, và CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 13; và
(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 14, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 15, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 16.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17, hoặc 25, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, hoặc 27.
3. Polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm 1 hoặc 2.
4. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm 3.
5. Tế bào chủ chứa vector biểu hiện theo điểm 4.
6. Dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2.
7. Chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm kháng thể theo điểm 1 hoặc 2.
8. Kit để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc dự đoán tiên lượng của bệnh ung thư, bao gồm chế phẩm theo điểm 7.
9. Kit để phát hiện CTHRC1, chứa kháng thể theo điểm 1 hoặc 2.
10. Kit theo điểm 9, trong đó kit này là ở dạng ELISA.

11. Kit theo điểm 10, trong đó kháng thể là kháng thể bất giữ.
12. Kit theo điểm 10, trong đó ELISA là ELISA gián tiếp bao gồm:
- (i) kháng thể đa dòng gắn kết với CTHRC1;
 - (ii) kháng thể bất giữ ở dạng kháng thể theo điểm 1 hoặc 2; và
 - (iii) kháng thể gắn kết với IgG Fc đã được dán nhãn phát hiện.
13. Phương pháp phát hiện protein CTHRC1 trong mẫu, trong đó phương pháp này bao gồm bước phát hiện phức hợp kháng nguyên CTHRC1–kháng thể bằng cách sử dụng kháng thể theo điểm 1 hoặc 2.

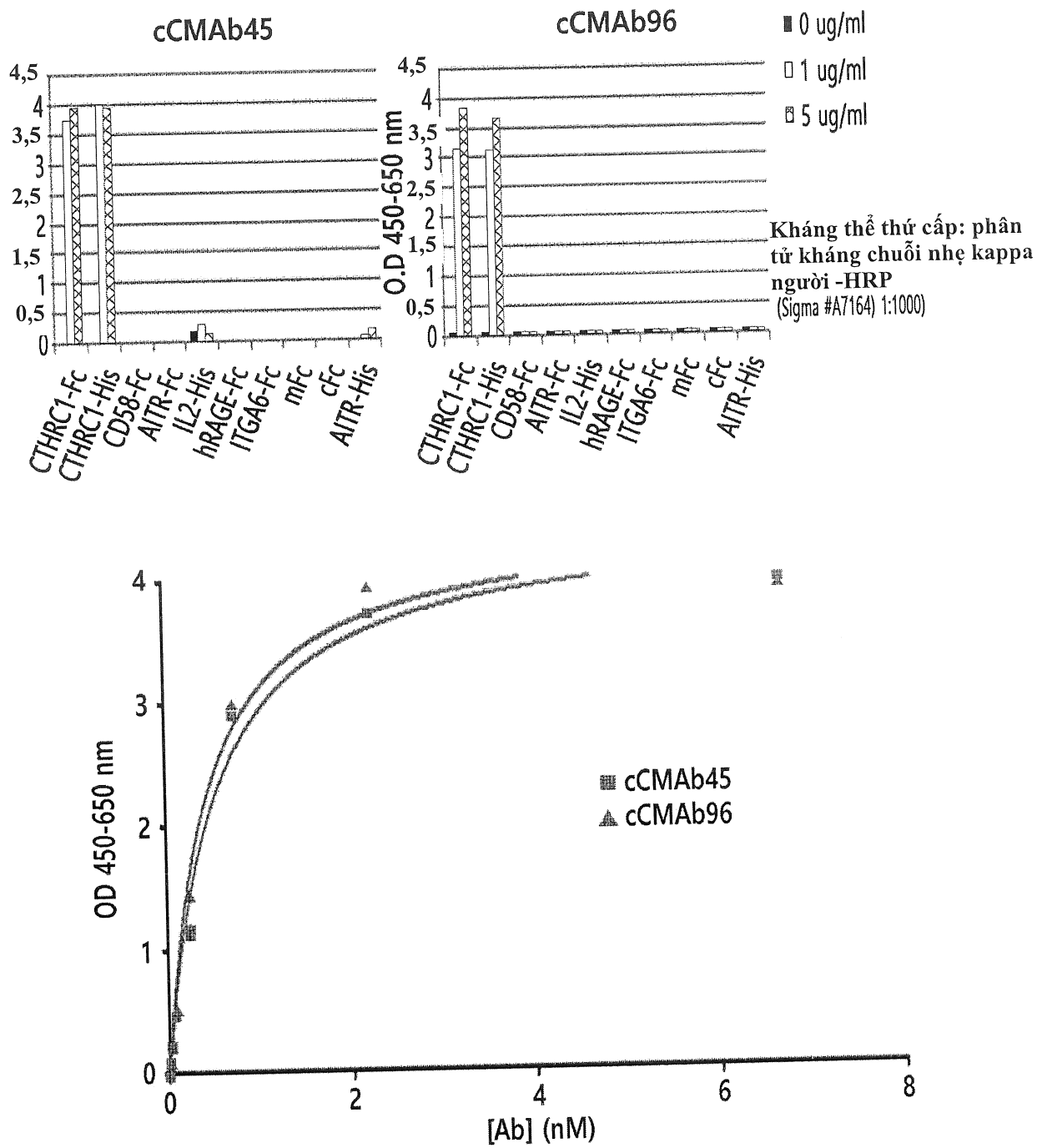
[Fig. 1]



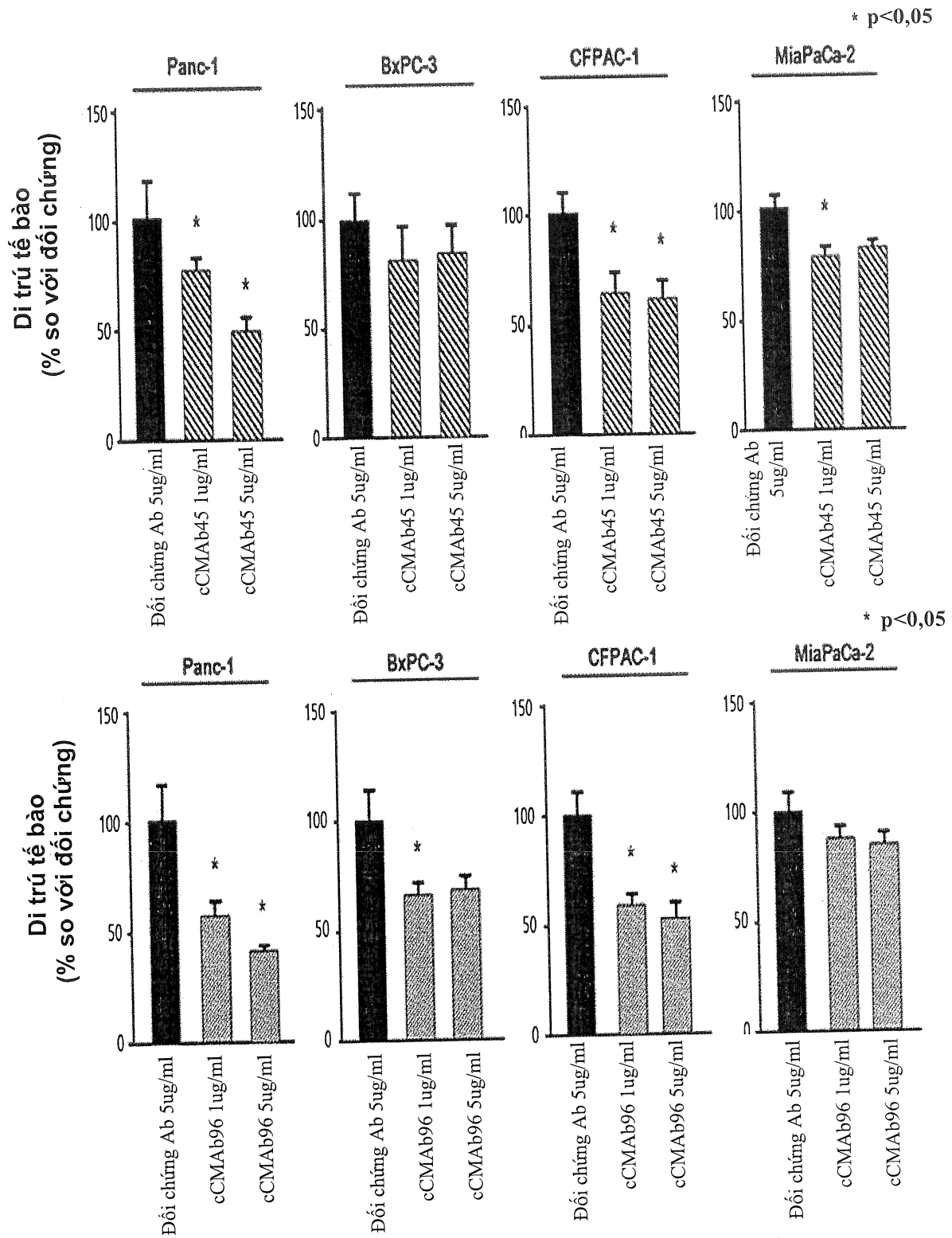
[Fig. 2]

ELISA cạnh tranh

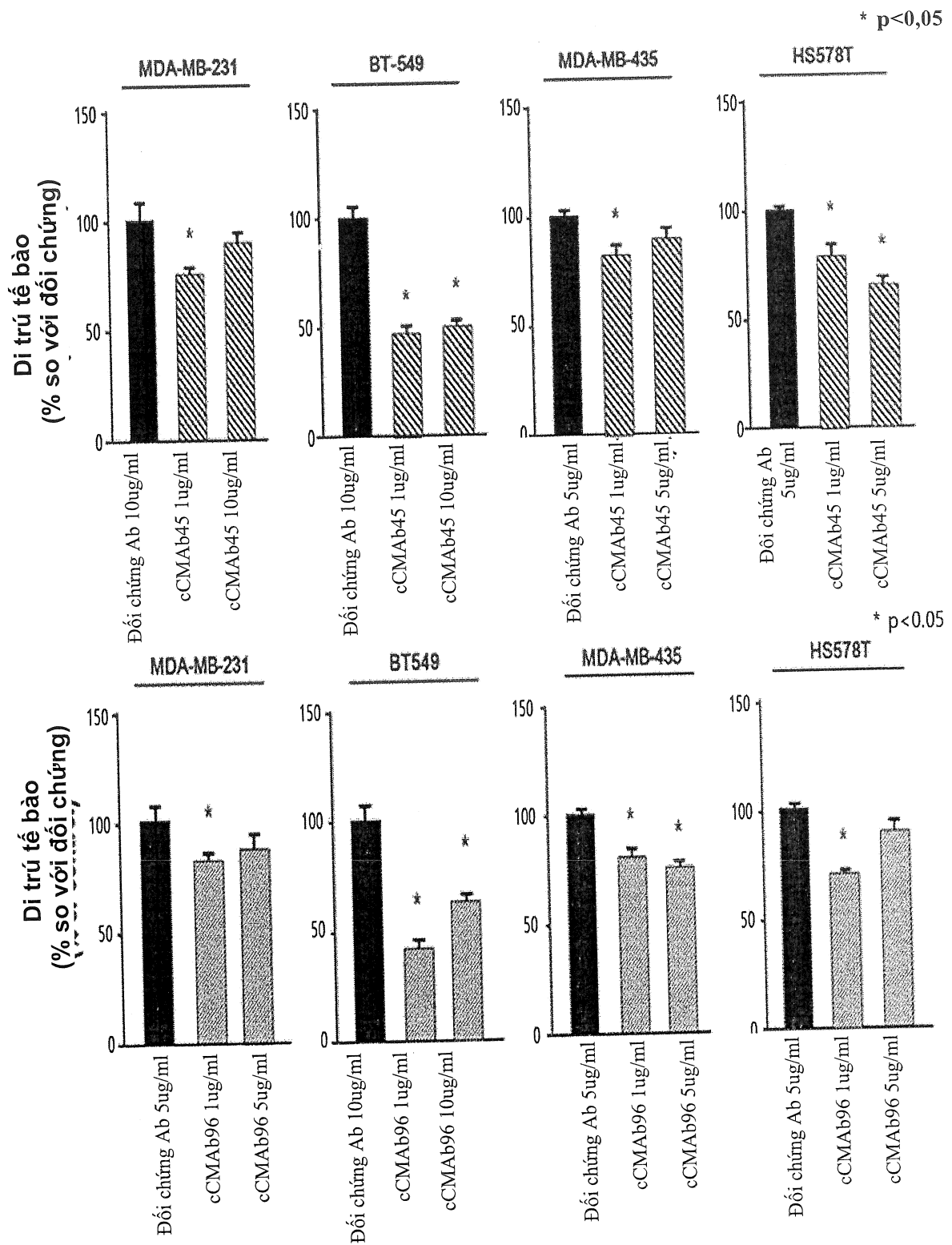
[Fig. 3]



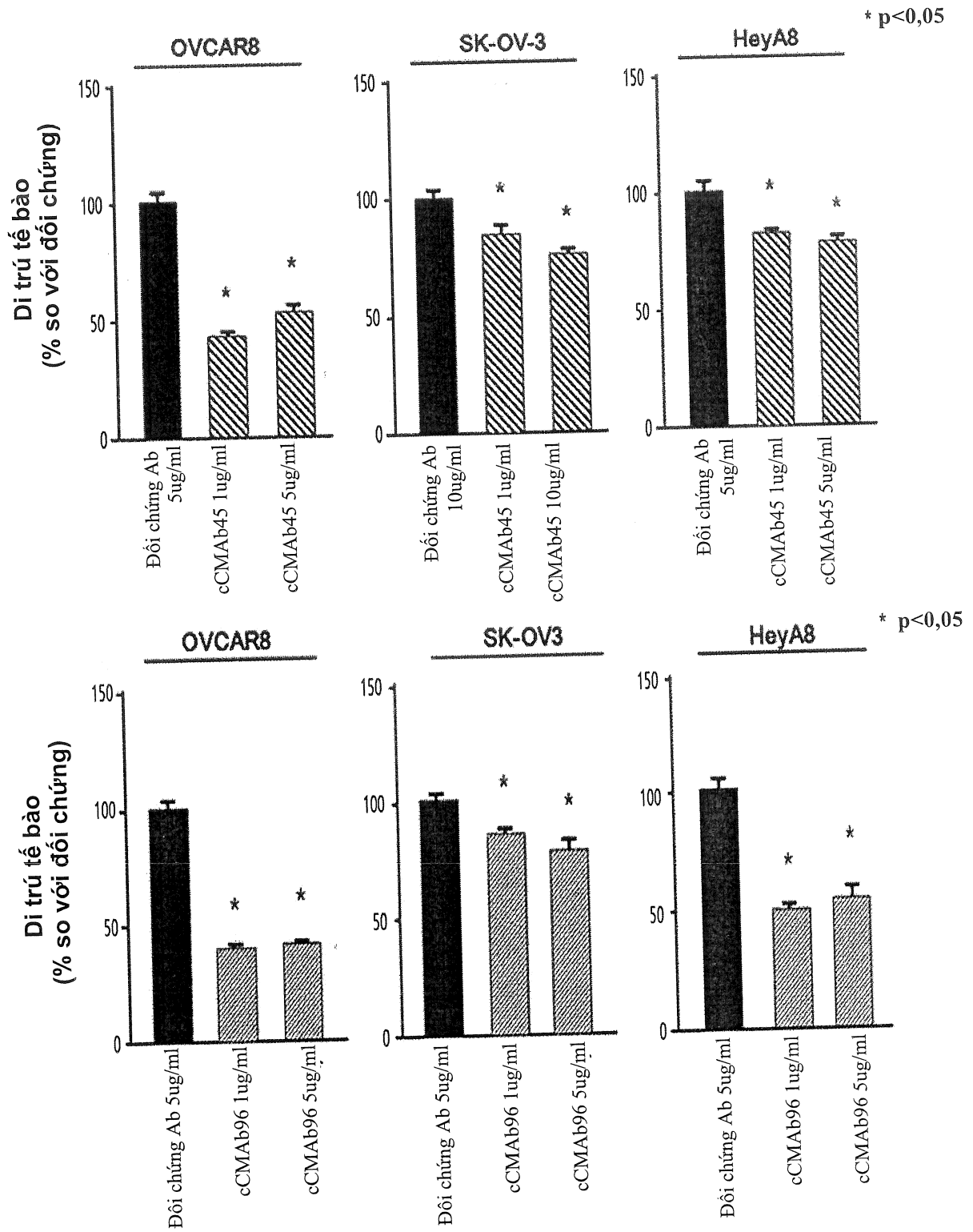
[Fig. 4]



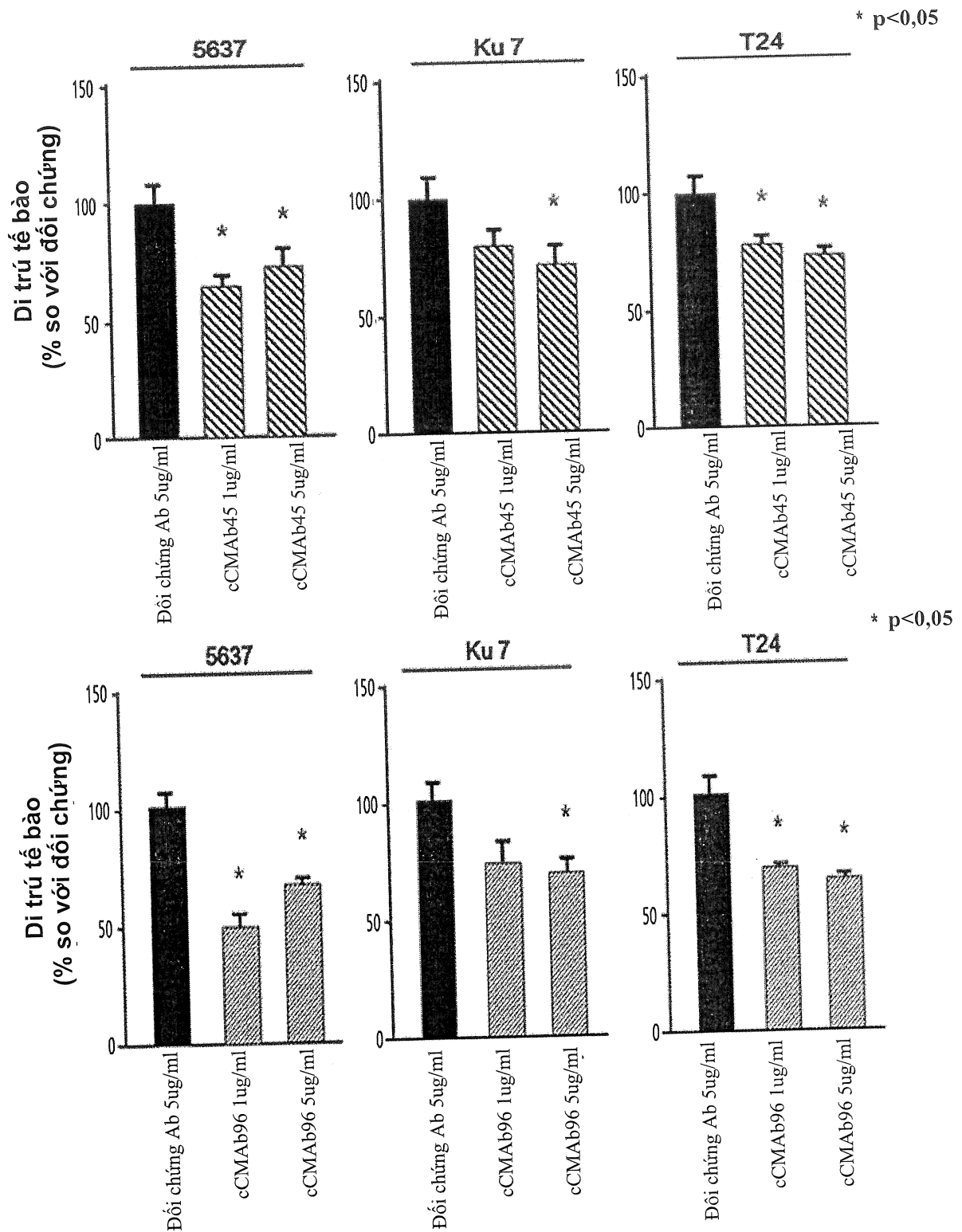
[Fig. 5]



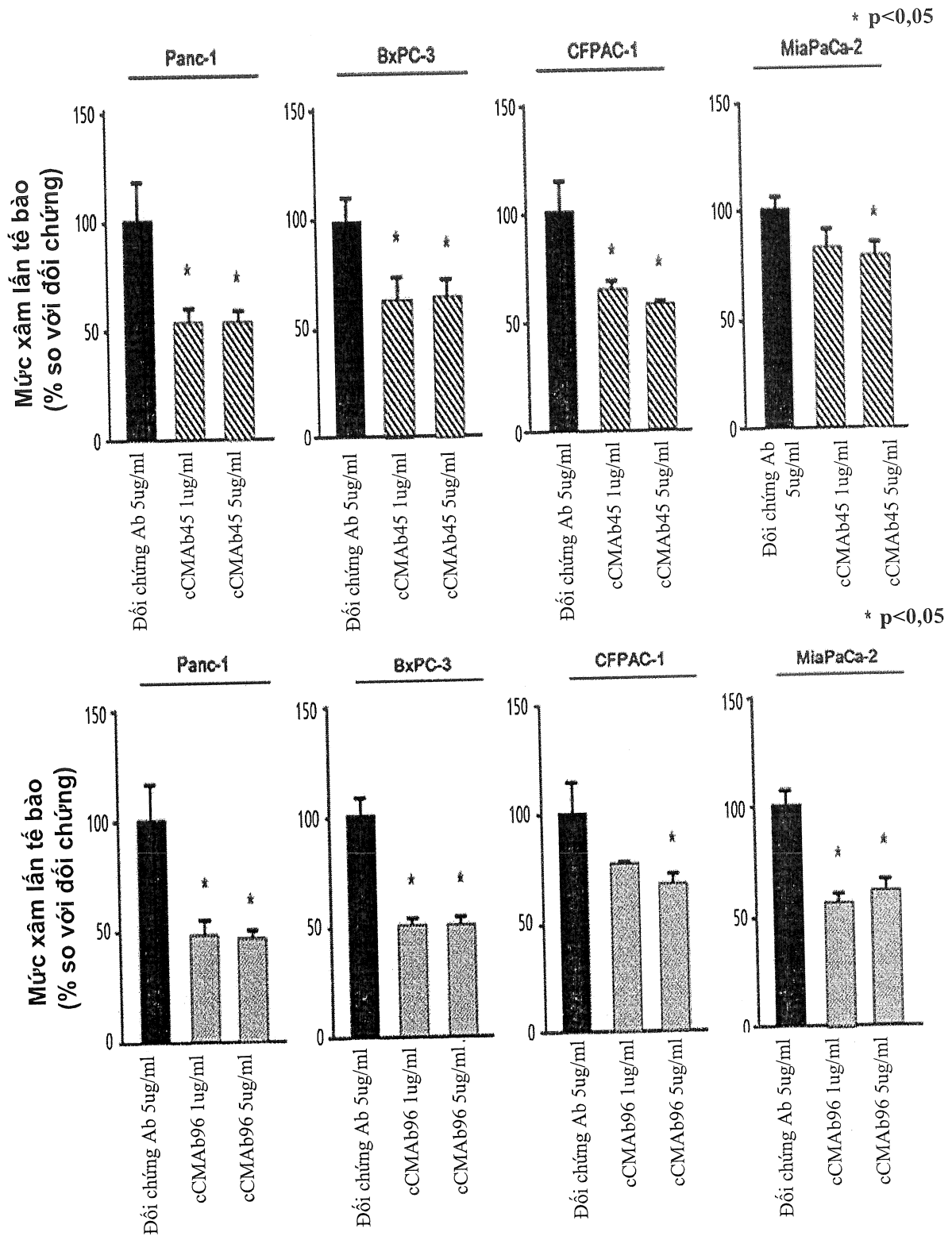
[Fig. 6]



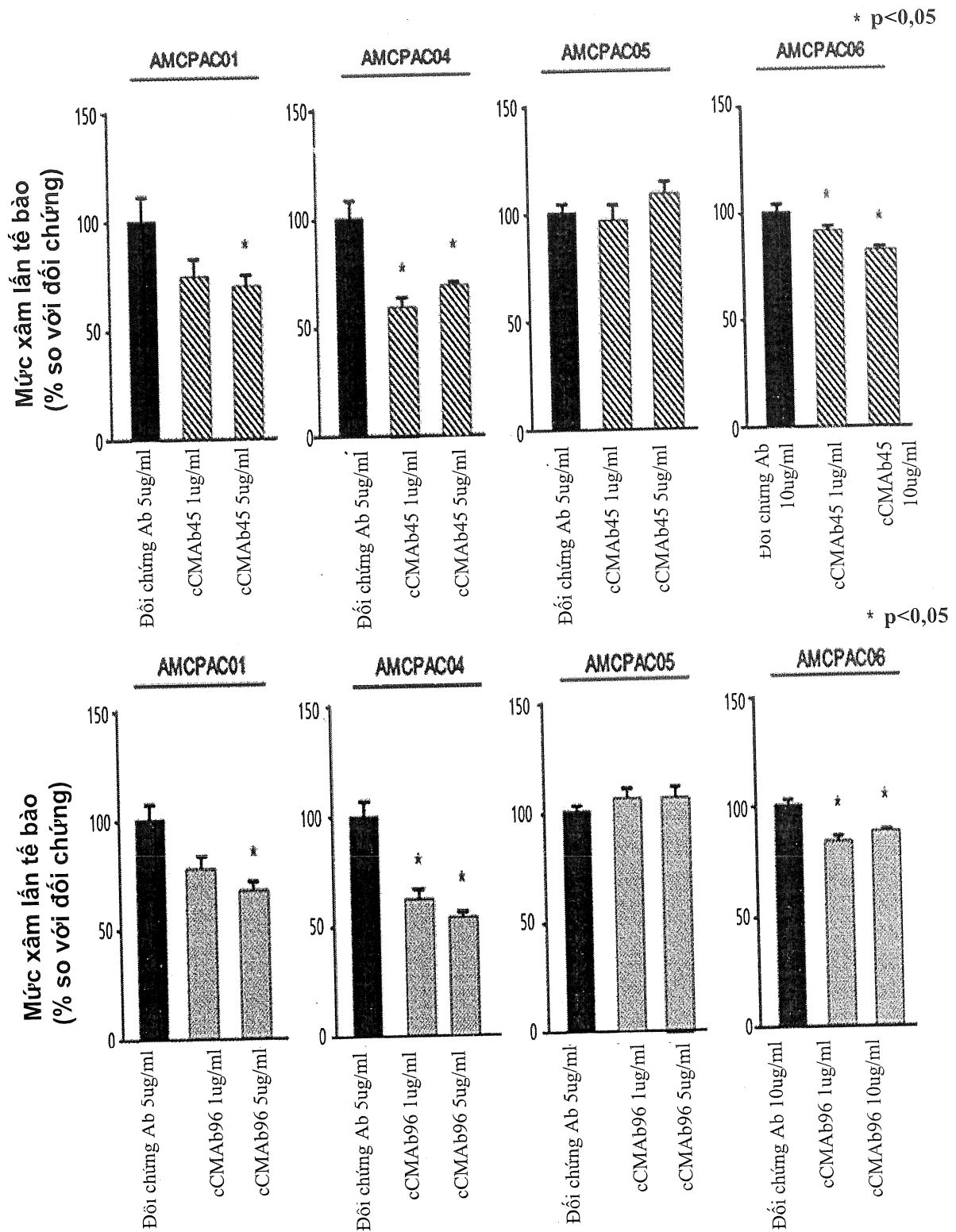
[Fig. 7]



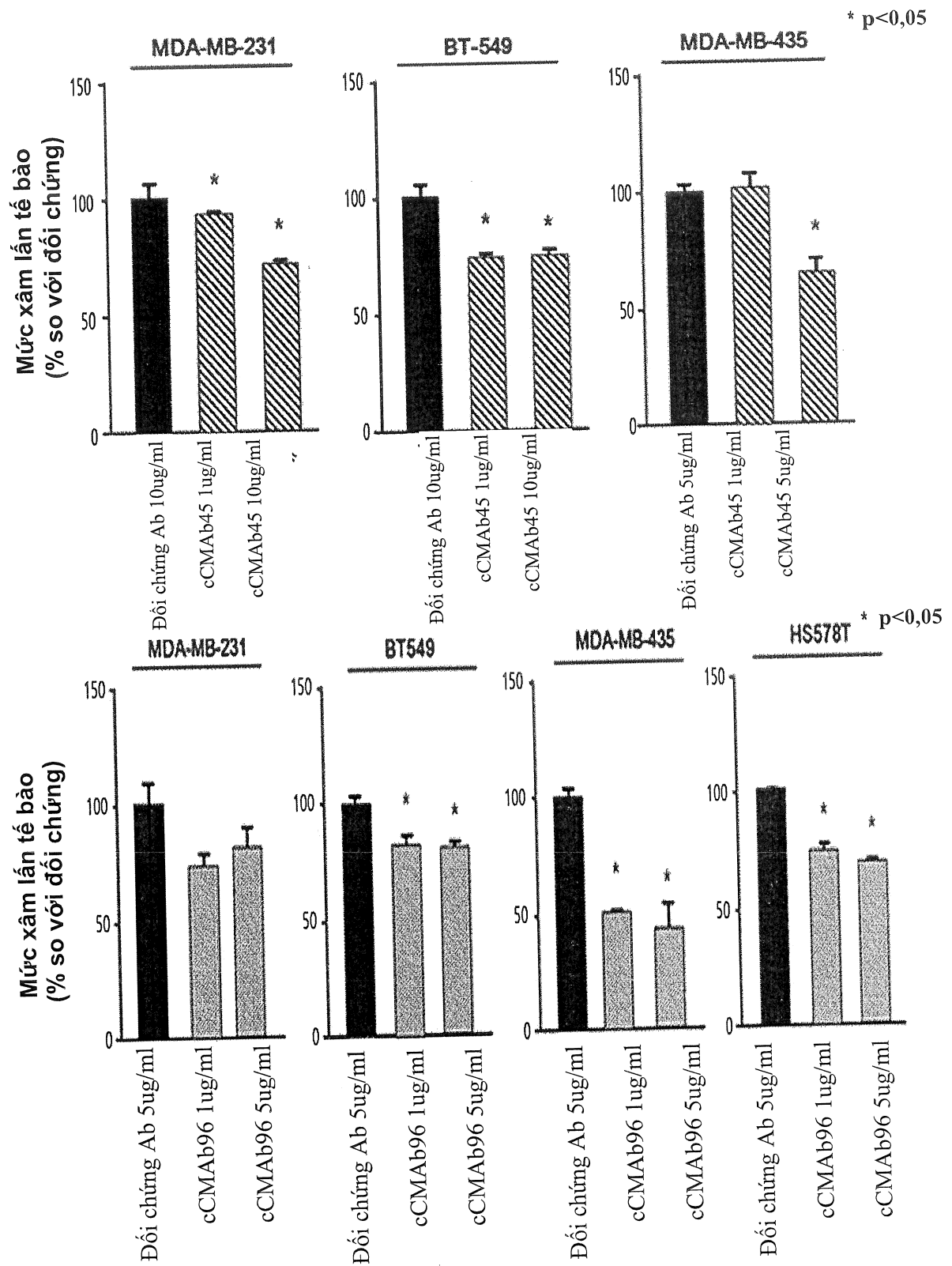
[Fig. 8]



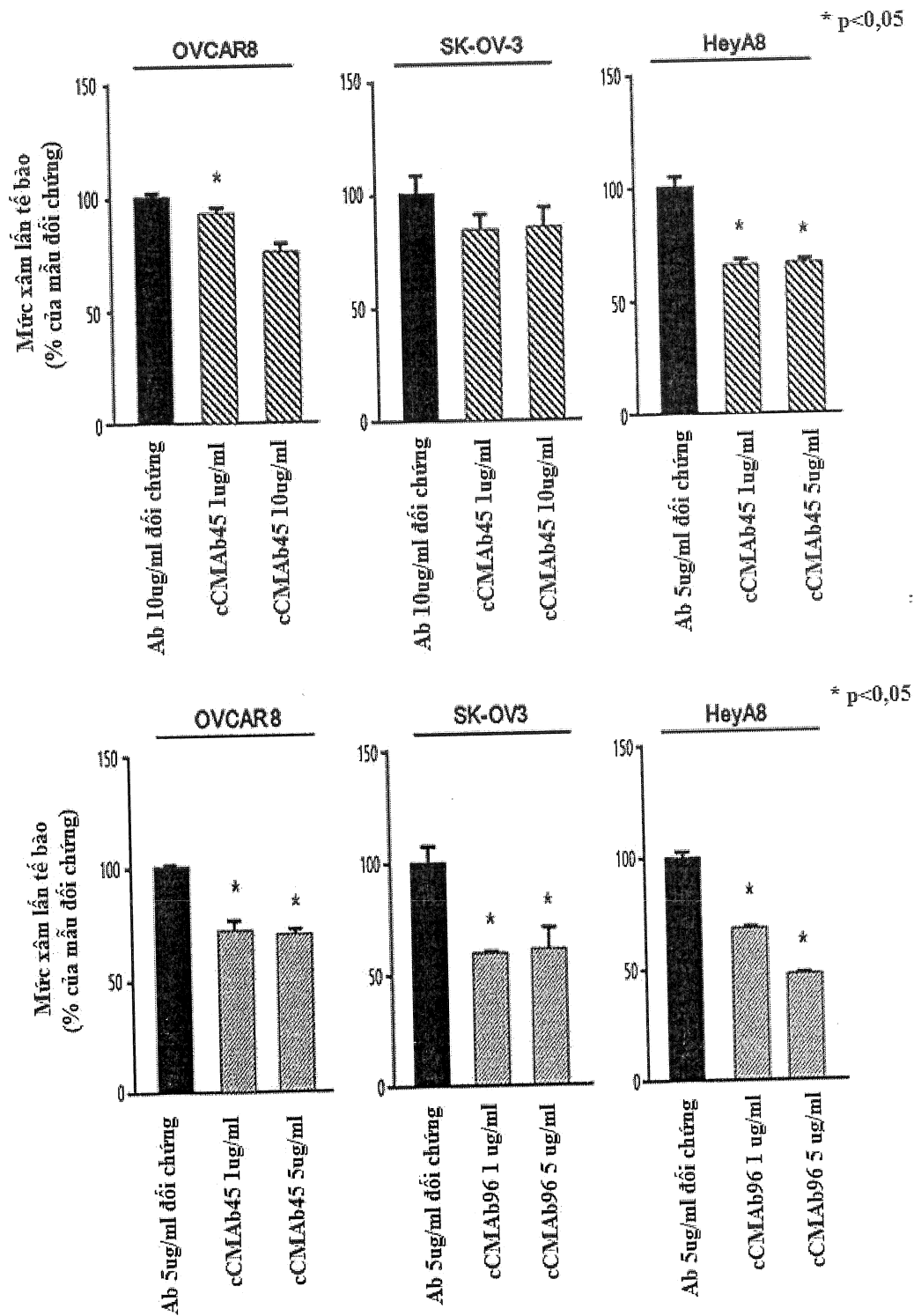
[Fig. 9]



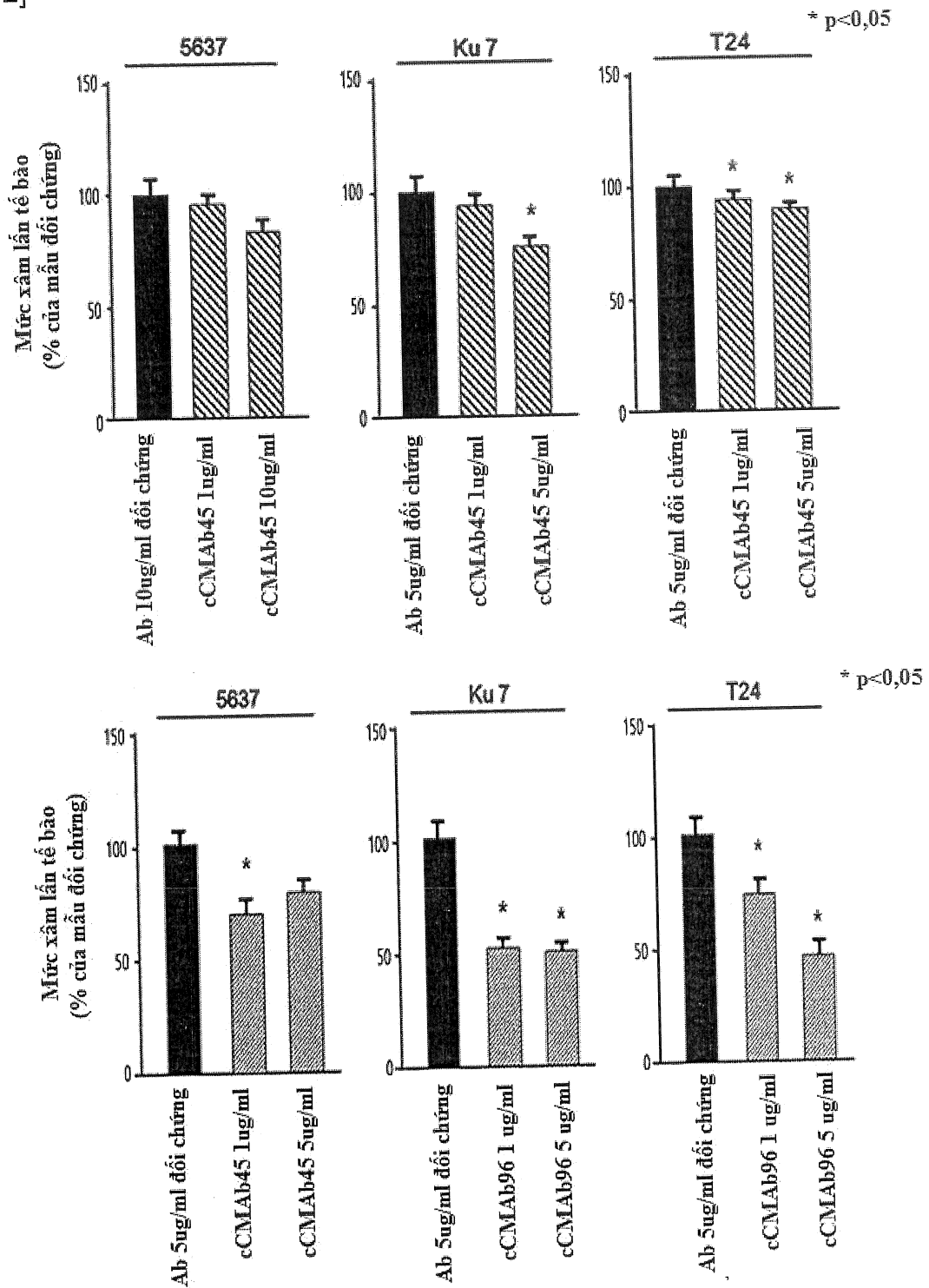
[Fig. 10]



[Fig. 11]

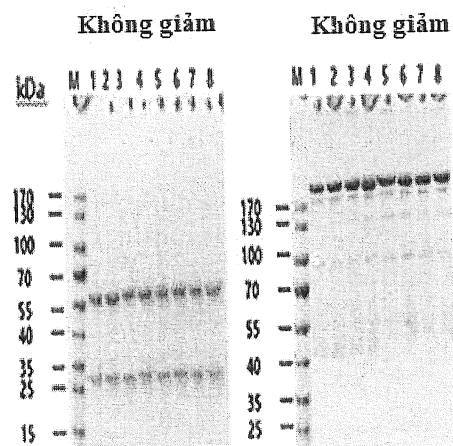


[Fig. 12]



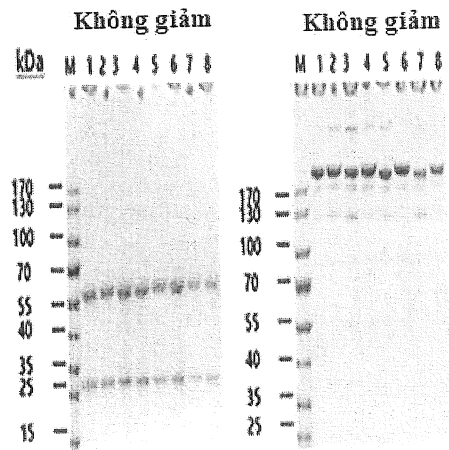
[Fig. 13]

Tinh chế kháng thể CTHRC1-4H5
được làm tương thích với người



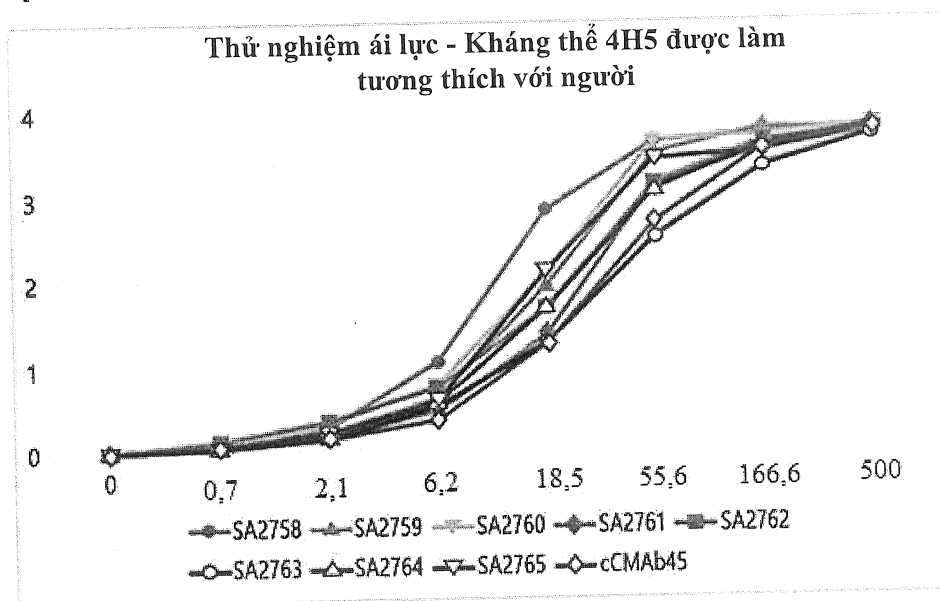
ID	Nồng độ (mg/ml)	Protein (mg)	Năng suất (mg/L)
SA2758	0,35	0,86	21,6
SA2759	0,74	1,83	45,7
SA2760	0,74	1,83	5,7
SA2761	1,09	2,69	67,3
SA2762	0,76	1,88	46,9
SA2763	0,61	1,51	37,7
SA2764	0,81	2,00	50,0
SA2765	0,25	0,62	15,4

Tinh chế kháng thể CTHRC1-9E6
được làm tương thích với người

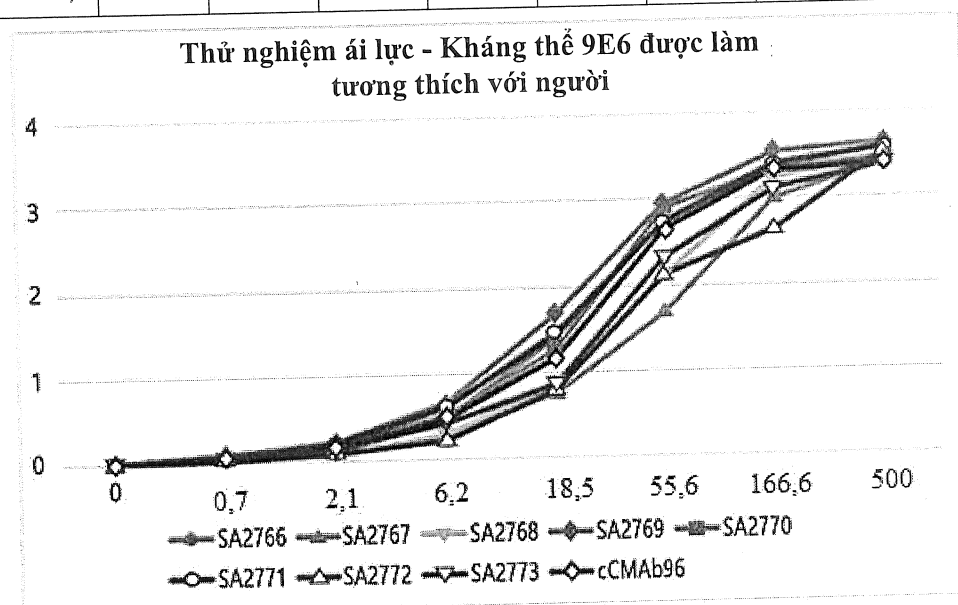


ID	Nồng độ (mg/ml)	Protein (mg)	Năng suất (mg/L)
SA2766	0,29	0,72	17,9
SA2767	0,14	0,35	8,6
SA2768	0,23	0,57	14,2
SA2769	0,54	1,33	33,3
SA2770	0,33	0,82	20,4
SA2771	0,27	0,67	16,7
SA2772	0,05	0,12	3,1
SA2773	0,08	0,20	4,9

[Fig. 14]

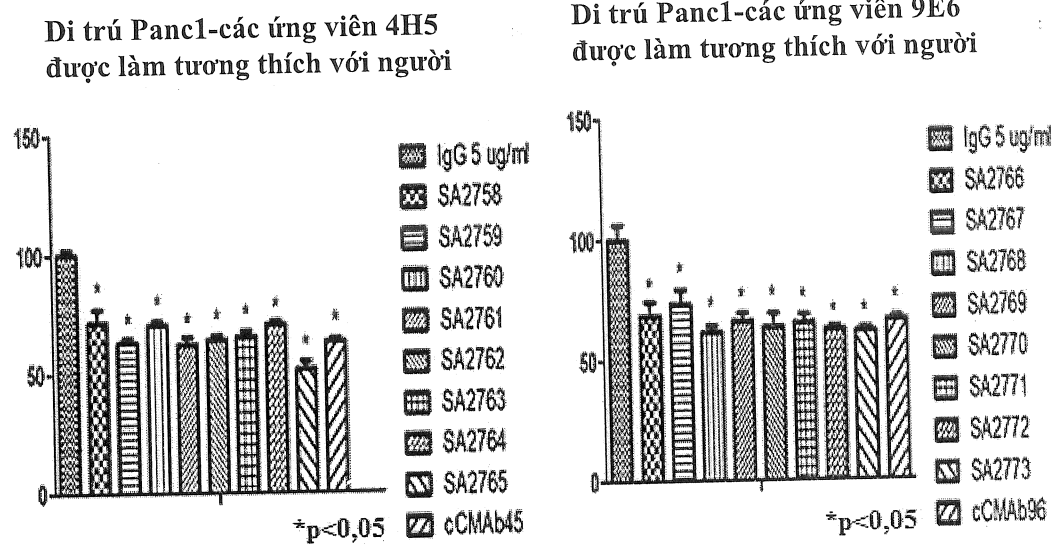


	SA2758	SA2759	SA2760	SA2761	SA2762	SA2763	SA2764	SA2765	cCMab45
K_D ($10^{-10}M$)	0,82	1,41	1,18	1,99	1,52	2,50	1,75	1,28	2,57

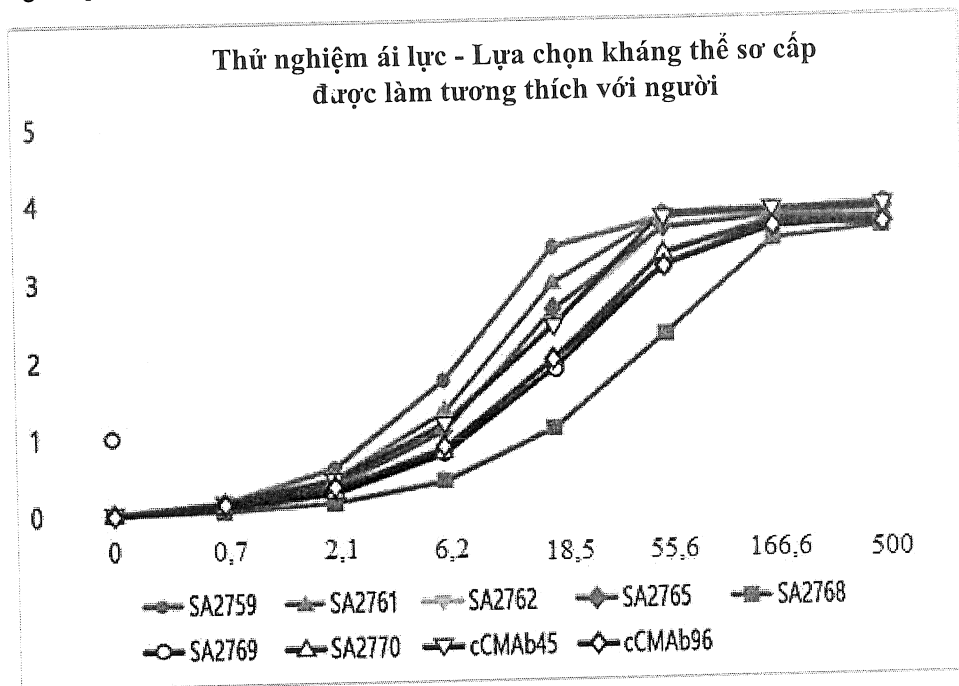


	SA2766	SA2767	SA2768	SA2769	SA2770	SA2771	SA2772	SA2773	cCMab96
K_D ($10^{-10}M$)	2,02	4,80	3,52	1,61	1,96	2,21	4,06	3,00	1,87

[Fig. 15]



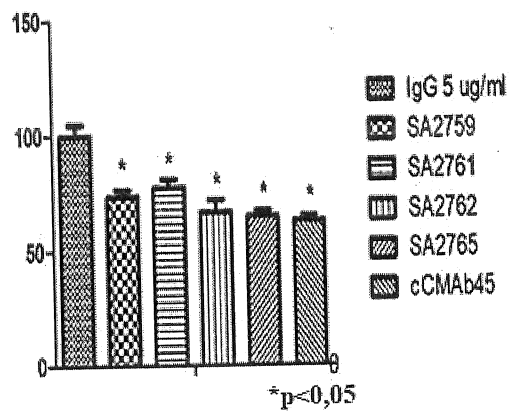
[Fig. 16]



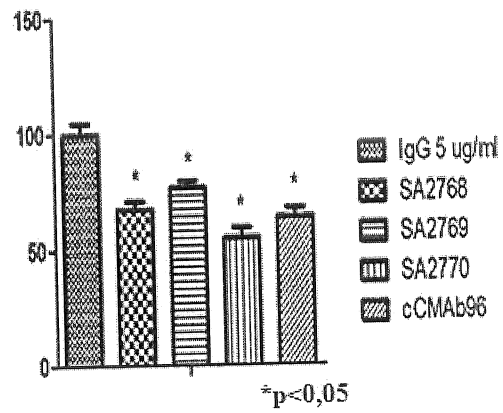
	SA2759	SA2761	SA2762	SA2765	SA2768	SA2769	SA2770	cCMAB45	cCMAB96
K _D (10 ⁻¹⁰ M)	0,51	0,71	0,91	0,89	3,17	1,42	1,31	0,93	1,28

[Fig. 17]

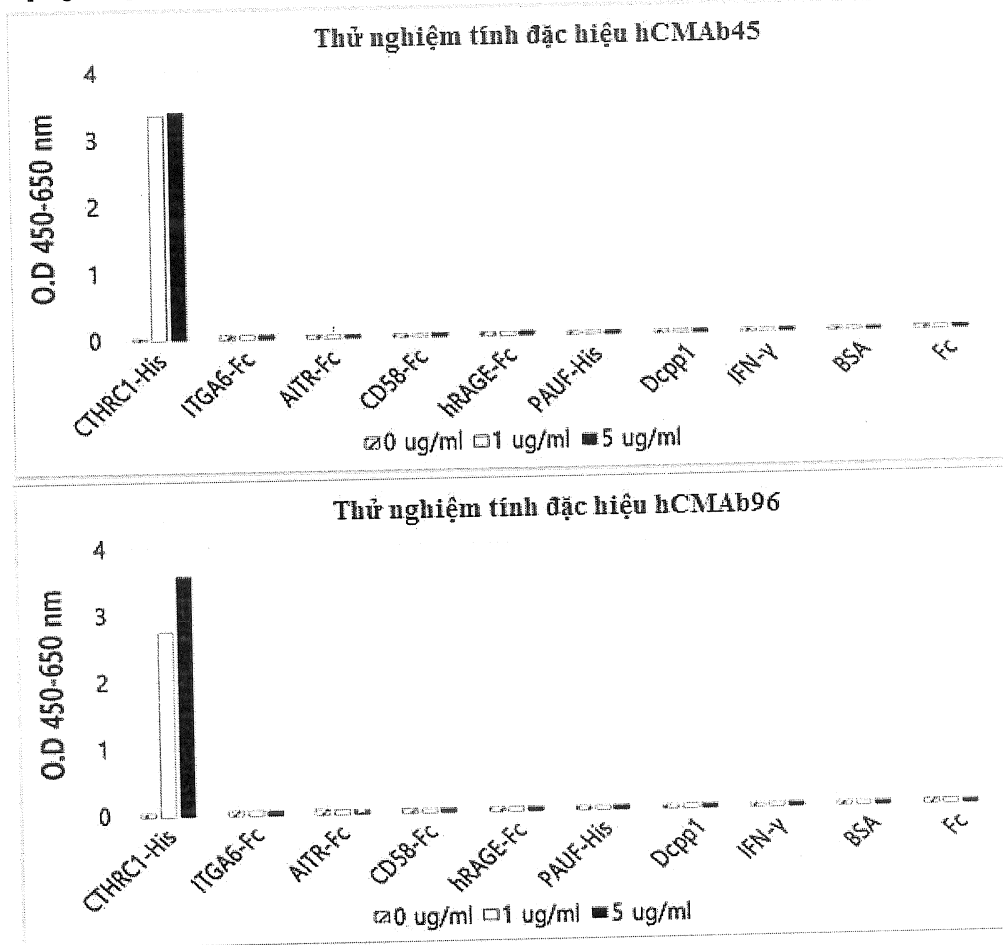
Di trú Panc1-lựa chọn kháng thể sơ cấp 4H5 được làm tương thích với người



Di trú Panc1-lựa chọn kháng thể sơ cấp 9E6 được làm tương thích với người



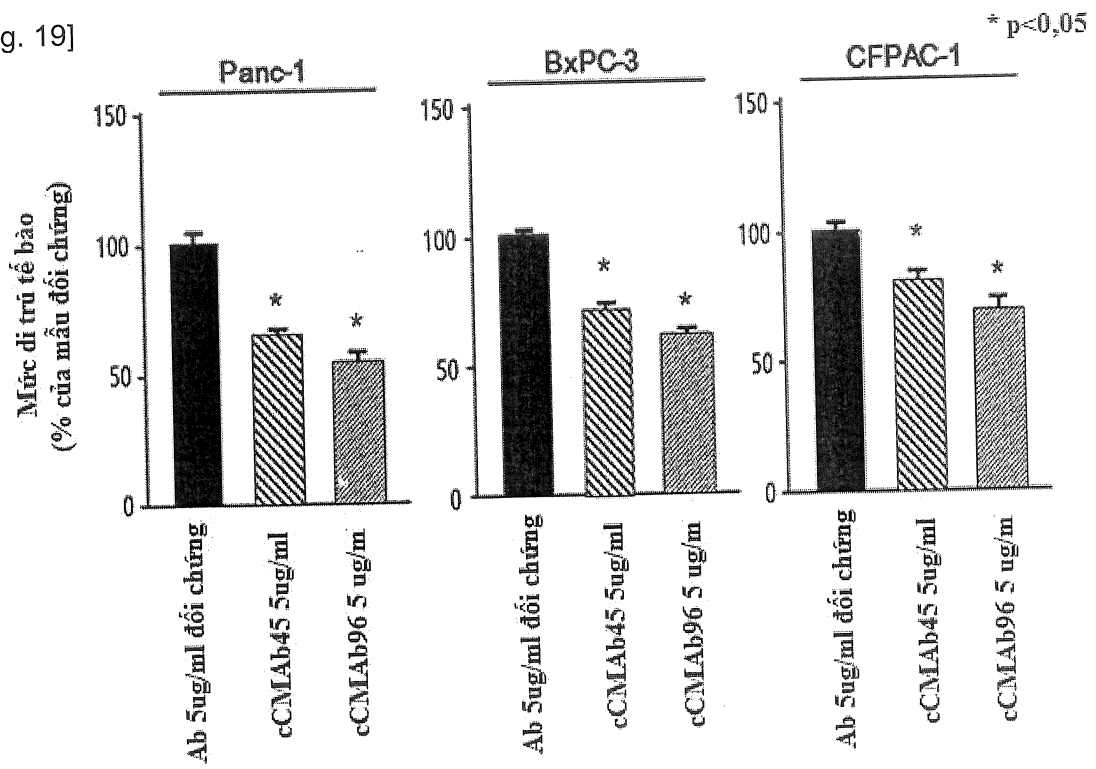
[Fig. 18]

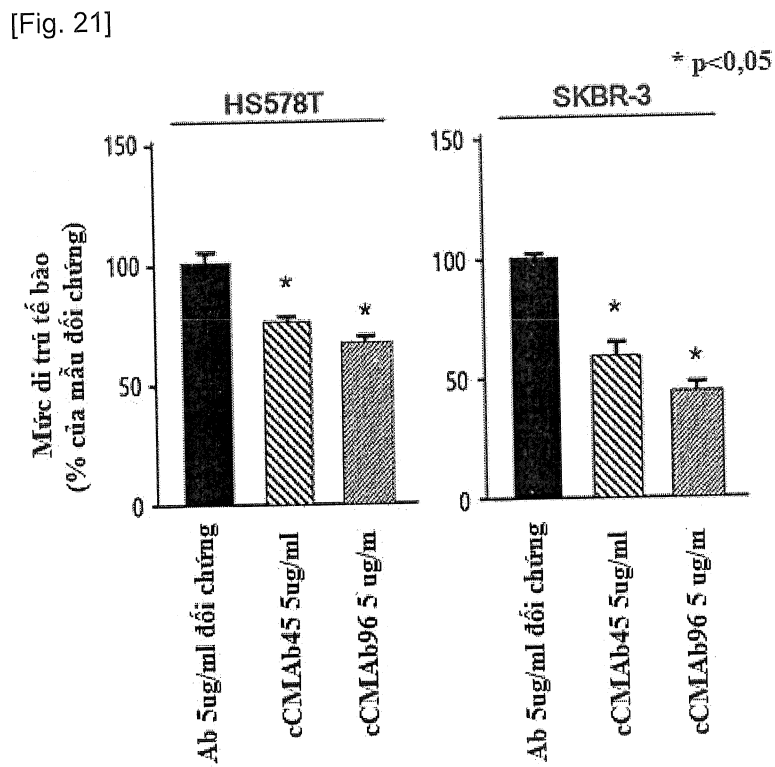
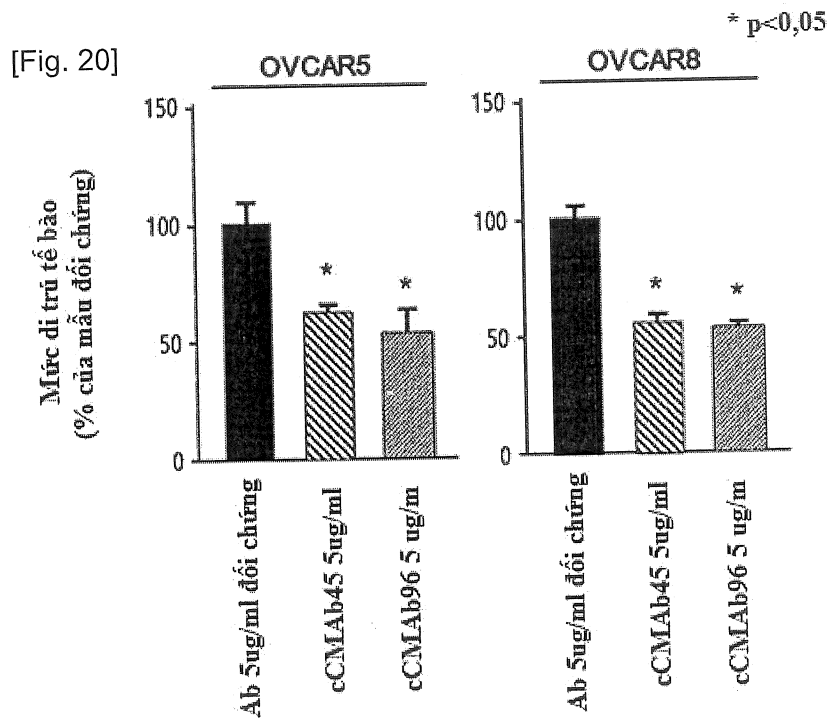


hCMA b45	450-650nm	CTHR C1-His	ITGA6-Fc	AITR-Fc	CD58-Fc	hRAGE-Fc	PAUF-His	Dcpp1	IFN-γ	BSA	Fc
	0ug/ml	0,0064	0,0397	0,0323	0,0192	0,0239	0,0135	0,0066	0,0091	0,0087	0,0363
	1ug/ml	3,3369	0,0386	0,0296	0,0189	0,024	0,0111	0,0082	0,0077	0,0089	0,0273
	5ug/ml	3,3784	0,0431	0,0341	0,0234	0,0287	0,0112	0,0068	0,0083	0,0085	0,0286

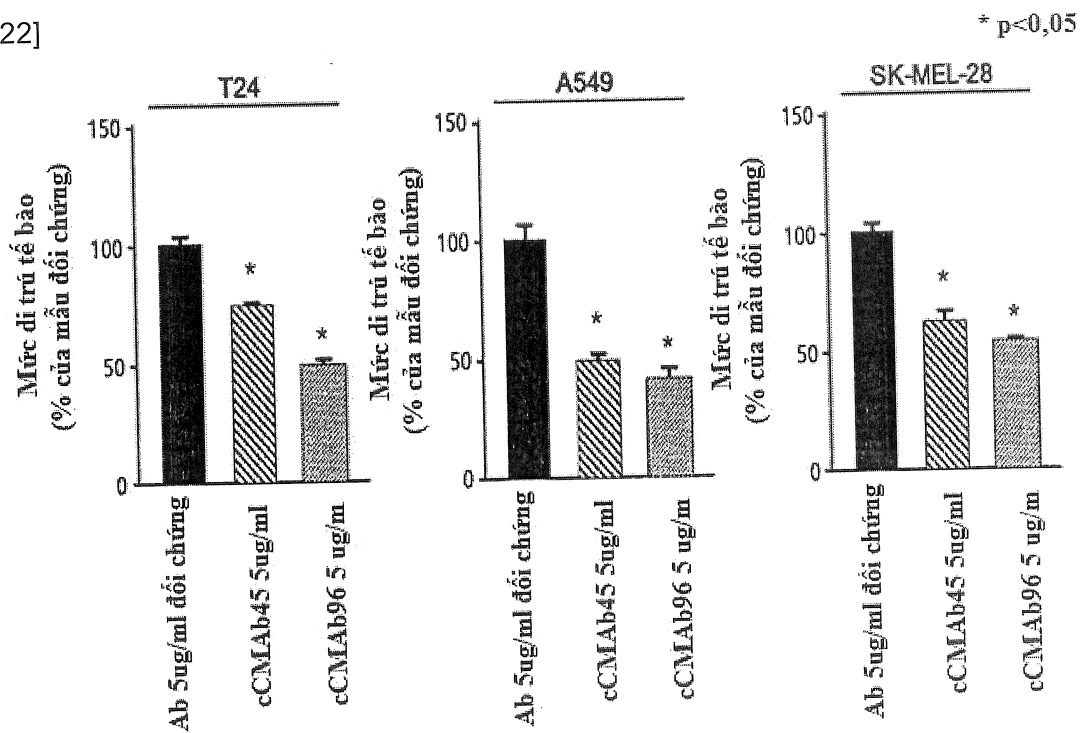
hCMA b96	450-650nm	CTHR C1-His	ITGA6-Fc	AITR-Fc	CD58-Fc	hRAGE-Fc	PAUF-His	Dcpp1	IFN-γ	BSA	Fc
	0ug/ml	0,0074	0,0398	0,0381	0,0241	0,0257	0,0118	0,0073	0,0074	0,008	0,0281
	1ug/ml	2,755	0,0371	0,0317	0,0217	0,0238	0,0104	0,0078	0,0075	0,0073	0,0261
	5ug/ml	3,5633	0,0436	0,0352	0,0275	0,0298	0,0107	0,0079	0,0073	0,0074	0,0325

[Fig. 19]

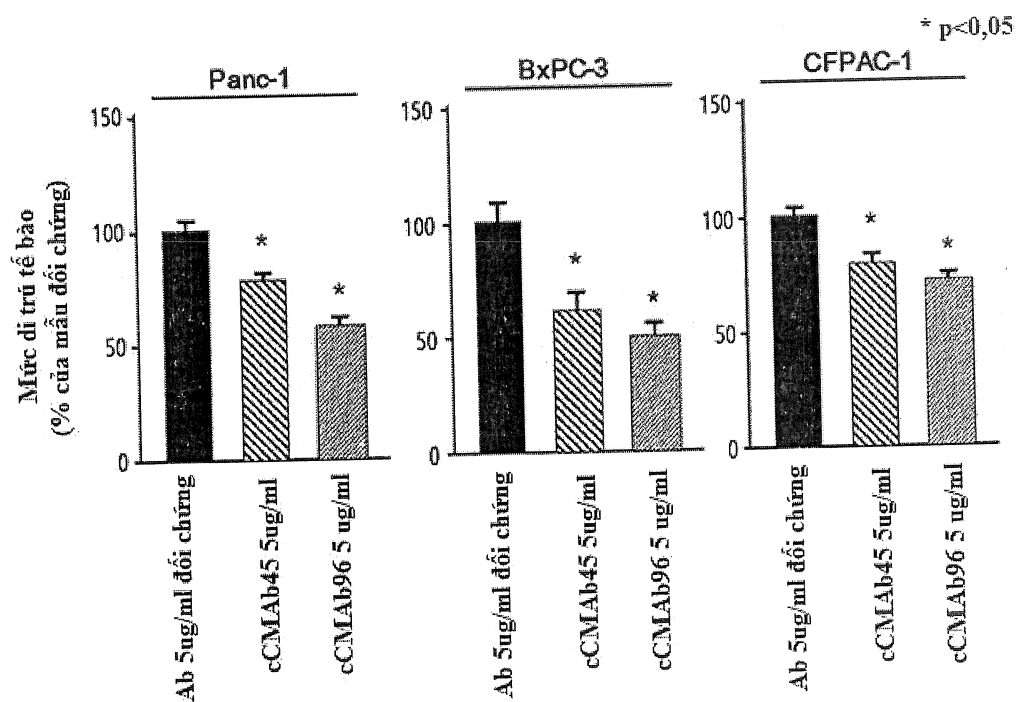




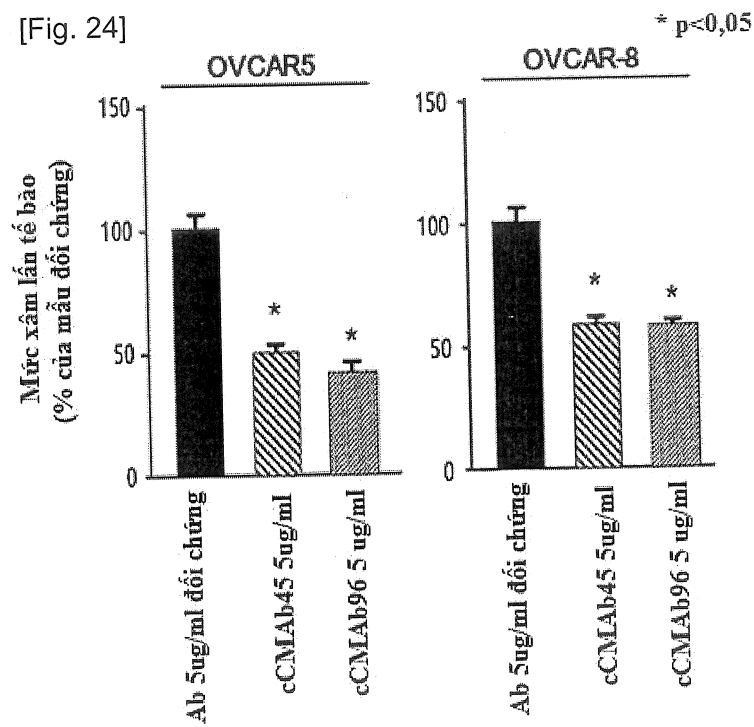
[Fig. 22]



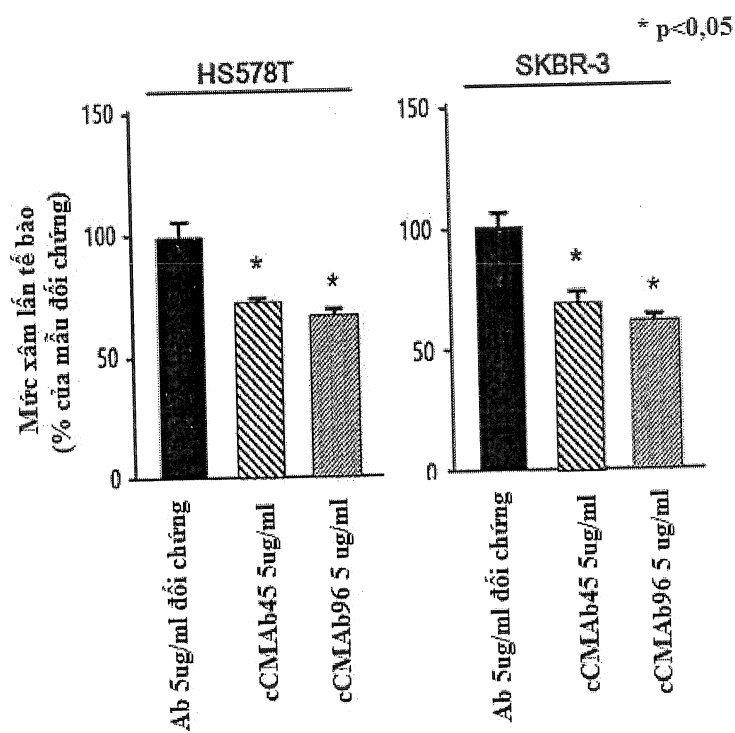
[Fig. 23]



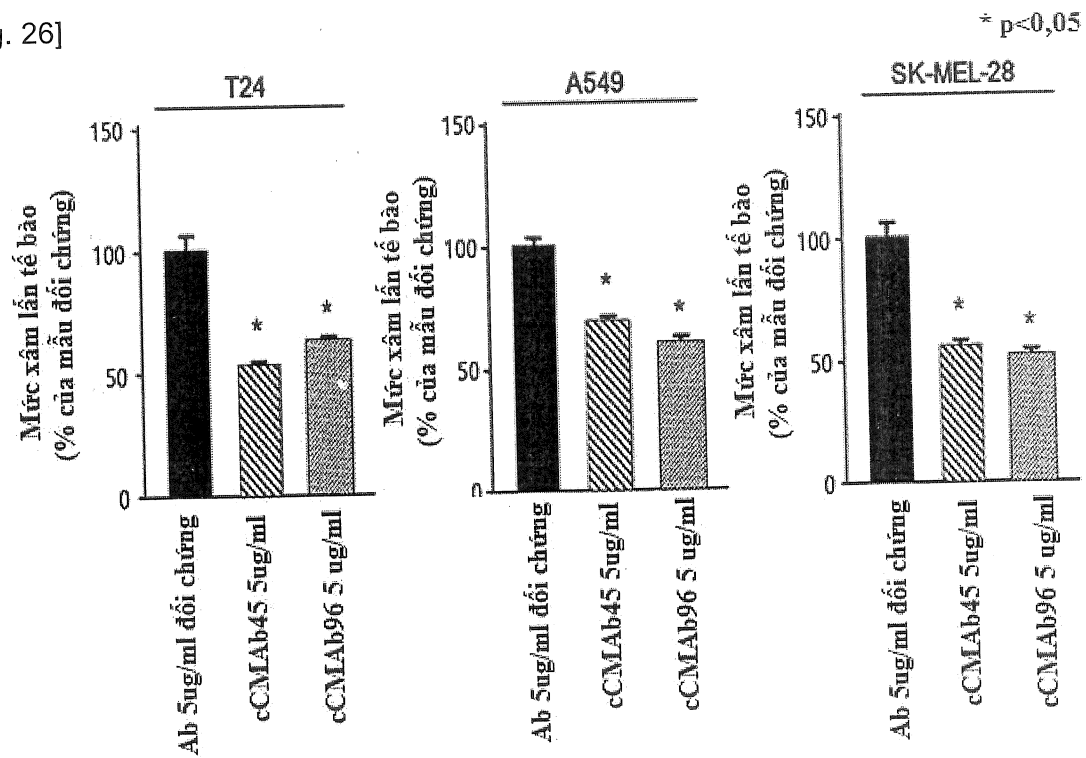
[Fig. 24]



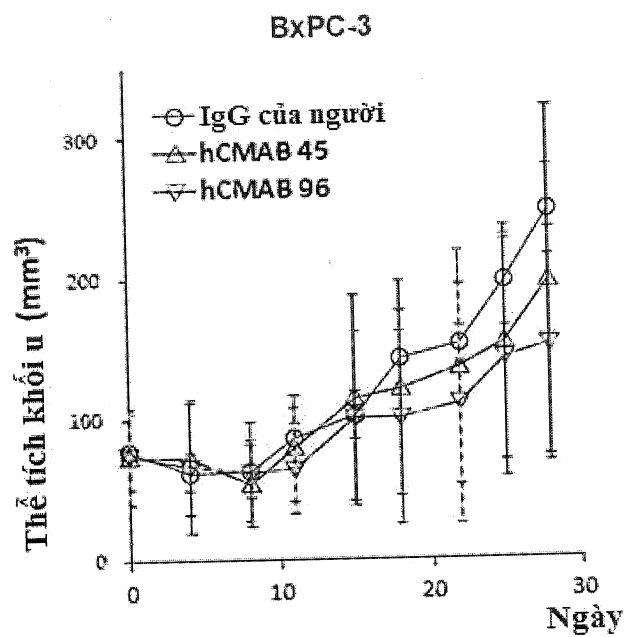
[Fig. 25]



[Fig. 26]



[Fig. 27]



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Prestige BioPharma Pte. Ltd.

<120> Kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein chứa đoạn lặp lại chuỗi xoắn ba collagen-1 (CTHRC1), và polynucleotit, vectơ biểu hiện, tế bào chủ, dược phẩm, phương pháp phát hiện các chế phẩm protein CTHRC1 và kit chứa kháng thể này

<130> OPA20050

<150> KR 10-2019-0070048

<151> 2019-06-13

<160> 28

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 4H5-VH-CDR1

<400> 1

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Ile
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 4H5-VH-CDR2

<400> 2

Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr
1 5

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 4H5-VH-CDR3

<400> 3

Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Tyr Asp Glu Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4H5-VL-CDR1

<400> 4
 Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr
 1 5 10

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4H5-VL-CDR2

<400> 5
 Leu Val Ser
 1

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4H5-VL-CDR3

<400> 6
 Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cCMAB45-Chuỗi nặng

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Ile Met Leu Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Leu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Tyr Asp Glu Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cCMAB45-Chuỗi nặng

<400> 8
gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctgggta ttcattcact gactacatca tgctctgggt gaagcagagc 120
catggaaaga gccttgagtg gattggaaat attaatcctt actatggtag tactagctac 180
aatctgaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcttccag cacagcctac 240
atgcagctca acagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatcgggc 300
tatggttacg acgagagtgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cCMAB45-Chuỗi nhẹ

<400> 9
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu 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 Ser
 85 90 95
 Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 10
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cCMAb45-Chuỗi nhẹ

<400> 10
 gatgttttga tgacccaaac tccactctct ctgcctgtca atattggaga tcaagcctct 60
 atctcttgca agtctactaa gagtcttctg aatagtgatg gattcactta tttggactgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctaatat atttggtttc taatcgattt 180
 tctggagttc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct tccagagtaa ctatcttcct 300
 ctcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 9E6-VH-CDR1

<400> 11
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 9E6-VH-CDR2

<400> 12
 Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Thr Thr
 1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 9E6-VH-CDR3

<400> 13
Thr Thr Glu Ser Tyr
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 9E6-VL-CDR1

<400> 14
Gln Asn Ile Asn Val Trp
1 5

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 9E6-VL-CDR2

<400> 15
Lys Ala Ser
1

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 9E6-VL-CDR3

<400> 16
Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 17
<211> 112
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cCMAB96-Chuỗi nặng

<400> 17

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

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

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

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Glu Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 18

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cCMAB96-Chuỗi nặng

<400> 18

caggtccaac tgcagcagcc tgggtctgag ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacattcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggaaat atttatccta gtagtggtac tactaactac 180
gatgagaagt tcaagaacaa ggccacactg actgtagaca catcctccac cacagcctac 240
atgcacctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aacagagtct 300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cCMAB96-Chuỗi nhẹ

```

<400>      19
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1              5              10              15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
      20              25              30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60

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

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

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

```

```

<210>      20
<211>      321
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      cCMAb96-Chuỗi nhẹ

```

```

<400>      20
gacattgtga tgaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc      60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca      120
ggaaatattc ctaaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca      180
aggttttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atcctctgac gttcggtgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa a      321

```

```

<210>      21
<211>      121
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223>      hCMAb45-Chuỗi nặng

```

```

<400>      21
Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ile Ile Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Val Tyr Gly Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Leu Thr Ile Thr Ala Asp Gly Ser Met Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Tyr Asp Glu Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hCMAb45-Chuỗi nặng

<400> 22
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctgggta ttcattcact gactacatca tattatgggt gcggcaggcg 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagca attaatcctt actatggtag tactgtgtac 180
 gggcagaagt tccagggcag actcaccatt accgcggacg ggtctatgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatcgggc 300
 tatgggttacg acgagagtgc tatggactac tgggggtcaag gaaccctagt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 23
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hCMAb45-Chuỗi nhẹ

<400> 23
 Asp Ile 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 Lys Ser Leu Leu Asn Ser

	20		25		30
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser					
	35		40		45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu 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
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser					
		85		90	95
Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		110

<210> 24
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hCMAb45-Chuỗi nhẹ

<400> 24	
gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctct	60
atctcttgcc ggtctagtaa gagtcttctg aatagtgatg gattcactta tttggactgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctccataatat atttggtttc taatcgattt	180
tctggagtgc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tgttgaggtt tattattgct tccagagtaa ctatcttcct	300
ctcacgttcg gccaggggac aaagttggaa ataaaa	336

<210> 25
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hCMAb96-Chuỗi nặng

<400> 25	
Gln 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 Ser Tyr	
20 25 30	
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Pro Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Glu Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 26
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hCMAb96-Chuỗi nặng

<400> 26
 caggtccaac tggtagctc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtc 60
 tcctgtaagg cttctggcta cacattcacc agctactgga tgcactgggt ccgtcaagct 120
 ccgggacaag ggctggagtg gattggatat atttatccta gtagtggtac tactaactac 180
 aaccaaagt tccagggcag agtcacgatt accgoggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gccccctgag atctgaggac acagcgggtct attactgtac aacagagtct 300
 tactggggcc agggaaccac tgtcaccgtc tcctca 336

<210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hCMAb96-Chuỗi nhẹ

<400> 27
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 28
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hCMAb96-Chuỗi nhẹ

<400> 28
 gacattcaga tgacccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60
 atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacagtgg cgtcccatca 180
 aggttttagtg gcagtggatc tggaacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atcctctgac gttcgggccag 300
 gggaccaagg tggaatcaa a 321