



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

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

(11)



1-0052827

(51)^{2020.01} C07K 16/28; A61P 1/00; A61P 35/00; (13) B
C12N 5/10; C12N 15/13; C12N 15/63;
A61K 39/395; A61P 37/00

(21) 1-2021-04544

(22) 24/12/2019

(86) PCT/RU2019/050257 24/12/2019

(87) WO2020/139171 02/07/2020

(30) 2018146029 25/12/2018 RU

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/04/2022 409A

(73) JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD" (RU)

Liter A, bld. 34, Svyazi st., Strelna, Petrodvortsoviy district, Saint Petersburg,
198515, Russian Federation

(72) BRITANOVA, Olga Vladimirovna (RU); STAROVEROV, Dmitry Borisovich (RU);
EVSTRATEVA, Anna Valentinovna (RU); MISORIN, Alexey Konstantinovich
(RU); NEMANKIN, Timofey Aleksandrovich (RU); SHCHEMELEVA, Mariia
Aleksandrovna (RU); VLADIMIROVA, Anna Konstantinovna (RU); ANIKINA,
Arina Vitalevna (RU); IVANOV, Roman Alekseevich (RU); MOROZOV, Dmitry
Valentinovich (RU); IAKOVLEV, Pavel Andreevich (RU); LUKYANOV, Sergey
Anatolievich (RU).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI TRBV9 CỦA NGƯỜI,
PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ
NÀY

(21) 1-2021-04544

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được làm cho giống với của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vectơ biểu hiện, phương pháp tạo ra kháng thể này, và kháng thể này dùng để điều trị các bệnh hoặc rối loạn liên quan đến họ thụ thể tế bào T của người. Sáng chế đề cập đến việc tạo ra kháng thể có thể được sử dụng để điều trị, cụ thể là bệnh viêm đốt sống dạng thấp (AS), bệnh Celiac và các bệnh về máu ác tính mà sinh bệnh học của chúng có liên quan đến các thụ thể TCR họ TRBV9.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học và y sinh, cụ thể là đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, cũng như mô tả việc sử dụng chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được làm cho giống với của người gắn kết đặc hiệu với họ thụ thể tế bào T của người. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vector biểu hiện, phương pháp tạo ra kháng thể này, và mô tả việc sử dụng kháng thể này trong việc điều trị các bệnh hoặc rối loạn liên quan đến họ thụ thể tế bào T của người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh tự miễn là do các tế bào lymphô T có khả năng tự phản ứng gây ra (Haroony et al., *Arthritis Rheum.* 2013 Oct;65(10):2645-54., Duarte J. et al., *PloS One* 2010 May 10;5(5):e10558; Konig M. et al., *Front Immunol* 2016 Jan 25;7:11). Các tài liệu đã biết bộc lộ rằng trình tự của thụ thể tế bào T (T cell receptor: TCR) là dấu ấn cho phép nhận biết dòng vô tính của tế bào lymphô T liên quan đến sinh bệnh học của bệnh tự miễn. Về mặt cấu trúc, cấu trúc dưới phân tử của các thụ thể tế bào T là thành viên của họ chung globulin miễn dịch và được tạo ra từ vài mảnh gen. Các vùng biến đổi của thụ thể TCR tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên của TCR. Điều này có nghĩa là chúng đặc hiệu với dòng vô tính, nghĩa là khác biệt với các tế bào lymphô T về sự đáp ứng với các kháng nguyên riêng biệt.

Liên quan đến tính tương đồng axit amin của các mảnh gen biến đổi (V) trong miền biến đổi của TCR, các thụ thể tế bào T được chia thành hai họ khác nhau. Theo danh pháp IMGT, chuỗi beta được phân biệt thành 26 họ khác biệt, và chuỗi alpha được phân biệt thành 41 họ (Turner SJ et al., *Nature Reviews Immunology* 2006, V.6, 883–894). Để xác định họ của chuỗi của TCR, có thể sử dụng phương pháp đóng thẳng hàng nhiều trình tự của axit amin thử nghiệm và các trình tự của chuỗi TCR đã biết, thông tin về phương pháp này được tóm tắt trong cơ

sở dữ liệu IMGT ("The international ImMunoGeneTics information system", Lefranc M-P., Nucl Acids Res 2001; 29:207-209) có sẵn trên internet ở trang web <http://www.imgt.org>. Sự đóng thẳng hàng nhiều trình tự và việc xác định họ của chuỗi TCR có thể được thực hiện bằng cách sử dụng gói phần mềm IgBlast.

Công bố đơn quốc tế số WO9006758 bộc lộ các kháng thể đơn dòng W112 và các vùng từ 2D1 đến chuỗi β của các miền biến đổi của thụ thể tế bào T của người, thuộc về họ TRBV5-3 và TRBV8-1, được đề xuất làm phương tiện để chẩn đoán và liệu pháp của bệnh viêm đa khớp dạng thấp. Các kháng thể đơn dòng nêu trên nhận biết từ 0,3 đến 5% các tế bào lymphô T ngoại vi mang TRBV5-3 và từ 0,5 đến 13% các tế bào lymphô T ngoại vi mang TRBV8-1, tương ứng. Các kết quả của nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự liên quan của các tế bào lymphô T trong sinh bệnh học của bệnh viêm đa khớp dạng thấp dẫn đến việc sử dụng các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với các vùng chuỗi beta của thụ thể T. Cụ thể, tài liệu của Brennan và các đồng tác giả, Clin Exp Immunol. 1988 Sep; 73(3): 417–423 đã chứng minh tỷ lệ % các tế bào lymphô T mang TRBV5 và TRBV8 tăng lên trong các mẫu hoạt dịch của bệnh nhân mắc bệnh viêm đa khớp dạng thấp so với người khỏe mạnh. Công bố đơn quốc tế số WO9405801 bộc lộ các kháng thể đơn dòng để chẩn đoán và liệu pháp của bệnh viêm đa khớp dạng thấp tương tác với epitop của vùng biến đổi VB3.1 của thụ thể tế bào T của người, tương tác với phân họ TCR V(beta)3.1.

Các kháng thể đơn dòng nhận biết đặc hiệu chuỗi beta của họ thứ 13 của TRC của chuột cũng đã được mô tả. Các mô hình động vật đã chứng minh rằng, với sự trợ giúp của các kháng thể này, có thể loại bỏ theo cách phòng ngừa quần thể nhỏ của các tế bào T, thụ thể T của nó bao gồm chuỗi beta của VB13 (các tế bào T VB13+), và đã chứng minh được rằng quy trình này bảo vệ cho chuột thuộc dòng dễ mắc bệnh đái tháo đường đối với sự phát triển của bệnh đái tháo đường typ I, và cũng làm giảm đáng kể nguy cơ phát triển bệnh đái tháo đường do virus gây ra (Zhijun Liu et al., Diabetes. 2012 May; 61(5): 1160–1168.). Đồng thời, kết quả của việc loại bỏ các tế bào T, thụ thể T của nó chứa họ chuỗi beta khác biệt (VB16), không có sự khác biệt so với nhóm đối chứng. Điều quan trọng cần lưu ý là ngay cả việc sử dụng lần đầu kháng thể đơn dòng kháng VB13 cũng làm giảm 60% số lượng tế bào T VB13+ trong lách chuột.

Biến thể tương đồng của các thụ thể TCR tự miễn ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm đốt sống dạng thấp ((ankylosing spondylitis: AS) hoặc bệnh Bekhterev) đã được mô tả, đã chứng minh được rằng nó có mặt trong dịch hoạt dịch và máu ngoại vi ở các bệnh nhân mắc

bệnh AS và không có mặt ở cùng mức độ phân tích chuyên sâu ở những người cho khỏe mạnh, bất kể trạng thái alen HLA*B27 của họ (Faham M. et al., *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(4):774-784; Komech E et al. 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3-7; Strbske Pleso, Slovakia. Abstract book p. 39). Các thụ thể TCR nêu trên là thành viên của họ TRBV9 (theo danh pháp IMGT). Đã chứng minh được rằng các thụ thể tế bào T mang chuỗi beta họ TRBV9 cũng có liên quan đến sự phát triển của bệnh tự miễn như bệnh Celiac (Petersen J et al., *J Immunol.* 2015; 194(12): 6112-22). Chúng cũng được phát hiện trên bề mặt tế bào T bị ác tính hóa trong u lymphô tế bào T và bệnh bạch cầu tế bào T, bao gồm cả u lymphô tế bào T do virus Epstein-Barr (Epstein-Barr virus: EBV) gây ra (Toyabe S et al., *Clin Exp Immunol.* 2003; 134(1): 92–97).

Công bố đơn sáng chế Nga số RU2017145662 gần đây đã mô tả các kháng thể đơn dòng thể khảm có thể gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể T của người, kháng thể này có thể được sử dụng trong liệu pháp của bệnh tự miễn và bệnh về khối u, sinh bệnh học của chúng liên quan đến các thụ thể TCR thuộc về họ TRBV9, ví dụ, bệnh AS, bệnh Celiac và một số u lymphô tế bào T và bệnh bạch cầu tế bào T.

Các kháng thể nêu trên là kháng thể duy nhất đã biết hiện nay có thể được sử dụng để loại bỏ các tế bào T mang thụ thể TCR họ TRBV9. Nhược điểm chính của các kháng thể nêu trên là mức độ giống với kháng thể của người tương đối thấp, nghĩa là chúng chứa các vùng ổn định và thành phần cấu trúc tương tự của người, nhưng có miền biến đổi tương tự của chuột. Mức độ giống với của người của mảnh biến đổi chuỗi nặng của kháng thể nêu trên là 72%, trong khi mức độ giống với của người của mảnh biến đổi chuỗi nhẹ là 69%.

Kháng thể đơn dòng bố-mẹ nêu trên bao gồm:

1) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của chúng, chứa 3 vùng siêu biến, HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó

HCDR1 (theo sơ đồ đánh số của Kabat) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1,

HCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2

HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 3;

2) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của chúng, chứa 3 vùng siêu biến, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó:

LCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4,

LCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5,

LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

Kháng thể đơn dòng bố-mẹ nêu trên bao gồm các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và 10.

Kháng thể đơn dòng bố-mẹ nêu trên bao gồm chuỗi nhẹ, có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID No. 12, và chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 14.

Ví dụ về các trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin nêu trên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể bố-mẹ nêu trên được thể hiện trong SEQ ID NO: 13 và 11.

Sáng chế đề cập đến việc tạo ra kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng để loại bỏ tế bào T mang các thụ thể TCR họ TRBV9, cụ thể là dùng cho liệu pháp của bệnh AS, bệnh Celiac và các bệnh về máu ác tính mà sinh bệnh học chúng có liên quan đến các thụ thể TCR họ TRBV9, và được đặc trưng bởi mức độ giống với của người cao. Đồng thời, việc làm cho giống với của người thường dẫn đến sự giảm đáng kể về ái lực và/hoặc độ tan của kháng thể. Do đó, nhiệm vụ liên quan là tạo ra các kháng thể có chức năng được làm cho giống với của người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được làm cho giống với của người và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có khả năng gắn kết đặc hiệu với ái lực cao với vùng chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể T của người. Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc để điều trị bệnh tự miễn và bệnh về khối u mà sinh bệnh học của chúng có liên quan đến thụ thể TCR thuộc về họ TRBV9, ví dụ, bệnh AS, bệnh Celiac và một số u lymphô tế bào T và bệnh bạch cầu tế bào T.

Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể của sáng chế bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) có ba vùng siêu biến

1) HCDR 1 (theo sơ đồ đánh số của Kabat) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1,

2) HCDR 2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2

3) HCDR 3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 3;

miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) có ba vùng siêu biến, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó:

LCDR 1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4,

LCDR 2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5,

LCDR 3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

Nếu không được chỉ rõ cụ thể theo cách khác, sơ đồ đánh số của Kabat đã biết rõ được sử dụng sau đây để xác định các vùng CDR của kháng thể.

Nhờ đó, các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể chứa sự thay thế axit amin trong mảnh FR của các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, làm gia tăng mức độ giống với của người của kháng thể này so với kháng thể bố-mẹ.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất 10 sự thay thế axit amin giống với của người so với miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bố-mẹ, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 8.

Theo các phương án được ưu tiên, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có trình tự được thể hiện trong SEQ ID No: 16.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế chứa sự thay thế axit amin khác mà không làm thay đổi độ đặc hiệu của kháng thể.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất 10 sự thay thế axit amin giống với của người so với miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bố-mẹ, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Theo các phương án được ưu tiên, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế chứa sự thay thế axit amin khác mà không làm thay đổi độ đặc hiệu của kháng thể.

Theo một số phương án, các kháng thể đơn dòng của sáng chế là kháng thể IgG của người có chiều dài đầy đủ, ví dụ, IgG1 hoặc IgG2 hoặc IgG3 hoặc IgG4.

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế bao gồm chuỗi nặng mà trình tự axit amin của nó có tính đồng nhất ít nhất 85%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 90%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 91%, hoặc ít nhất 92%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 93%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 94%, hoặc ít nhất 95%, hoặc ít nhất 96%, hoặc ít nhất 97%, hoặc ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20.

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế bao gồm chuỗi nhẹ mà trình tự axit amin của nó có tính đồng nhất ít nhất 85%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 90%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 91%, hoặc ít nhất 92%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 93%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 94%, hoặc ít nhất 95%, hoặc ít nhất 96%, hoặc ít nhất 97%, hoặc ít nhất 98% hoặc ít

nhất 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22.

Theo một số phương án, kháng thể có chuỗi nhẹ mà trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 22, và chuỗi nặng mà trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 20.

Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế, các axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế và các mảnh chức năng của nó.

Sáng chế cũng đề xuất các cat xet biểu hiện và vector biểu hiện chứa axit nucleic của sáng chế và các yếu tố điều hòa cần thiết cho sự biểu hiện của axit nucleic trong tế bào chủ đã chọn. Vector hoặc cat xet biểu hiện này có thể có mặt trong tế bào chủ dưới dạng yếu tố ngoài nhiễm sắc thể hoặc được tích hợp vào hệ gen của tế bào nhờ việc đưa vào (bằng cách chuyển nhiễm) cat xet biểu hiện hoặc vector biểu hiện nêu trên vào tế bào.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào và dòng tế bào ổn định chứa các axit nucleic, vector hoặc cat xet biểu hiện của sáng chế, và phương pháp tạo ra chúng.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ nêu trên trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện đảm bảo cho sự tạo ra kháng thể này. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước phân lập và tinh chế kháng thể tạo thành sau đó.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn do vùng chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể T của người làm trung gian gây ra, được phẩm này chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó kết hợp với một hoặc nhiều tá được dùng.

Theo một trong số các phương án, được phẩm được dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh viêm loét ruột dạng thấp, bệnh Celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T.

Sáng chế cũng đề xuất tổ hợp được phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn do thụ thể tế bào T của người mang chuỗi beta họ TRBV9 làm trung gian gây ra, tổ hợp này chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và ít nhất một hợp chất có hoạt tính điều trị khác.

Theo một trong số các phương án, tổ hợp được phẩm được dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh viêm loét ruột dạng thấp, bệnh Celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T.

Theo một phương án, tổ hợp được phẩm hoặc được phẩm chứa hợp chất có hoạt tính điều trị khác được chọn từ phân tử nhỏ, kháng thể hoặc các hormon steroid, như corticosteroid.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế hoạt tính sinh học của thụ thể tế bào T có chuỗi beta của nó thuộc về họ TRBV9, ở đối tượng cần ức chế hoạt tính này, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn do thụ thể tế bào T của người mang chuỗi beta họ TRBV9 làm trung gian gây ra, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm nêu trên, với lượng có hiệu quả điều trị.

Theo một trong số các phương án của phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn, bệnh hoặc rối loạn này được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh viêm ruột sống dạng thấp, bệnh Celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm nêu trên để điều trị cho đối tượng cần điều trị bệnh hoặc rối loạn do thụ thể tế bào T của người mang chuỗi beta họ TRBV9 làm trung gian gây ra.

Theo một trong số các phương án của việc sử dụng, bệnh được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh viêm ruột sống dạng thấp, bệnh Celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T.

Hiệu quả kỹ thuật của sáng chế bao gồm việc thu được các kháng thể có mức độ giống với của người cao, để gắn kết đặc hiệu với ái lực cao với các thụ thể TCR có chuỗi beta của nó thuộc về họ TRBV9, và có thể được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn và các bệnh về khối u mà sinh bệnh học của chúng liên quan đến thụ thể TCR, có chuỗi beta của nó thuộc về họ TRBV9.

Theo các phương án được ưu tiên, mảnh biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được đặc trưng bởi mức độ giống với của người 87%. Theo các phương án được ưu tiên, mảnh biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được đặc trưng bởi mức độ giống với của người 85%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả của việc phân loại các tế bào lymphô T bằng cách sử dụng kháng thể MA-042.

Fig.2 thể hiện kết quả của phương pháp đếm tế bào theo dòng của các tế bào lymphô T sau khi thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào với sự có mặt của kháng thể MA-042 ở nồng độ 1 ng/ml (hình bên phải) và 1 µg/ml (hình bên trái). Hình chữ nhật thể hiện quần thể của CD45+ CD3+TRBV9+.

Fig.3 thể hiện số lượng các tế bào lymphô T đã chết theo hàm số của nồng độ MA-042 để xác định nồng độ có hiệu quả một nửa của MA-042 (EC50) trong thử nghiệm về tính gây độc tế bào.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng được phân lập và các mảnh chức năng của chúng có khả năng gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể T của người, với mức độ giống với của người tăng lên so với các chất tương tự. Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa kháng thể và các mảnh của nó theo sáng chế, cat xet biểu hiện và vector biểu hiện chứa axit nucleic của sáng chế và các yếu tố điều hòa cần thiết cho sự biểu hiện của axit nucleic trong tế bào chủ đã chọn. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào và dòng tế bào ổn định chứa các axit nucleic, vector hoặc cat xet biểu hiện của sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc mảnh chức năng của nó, được phẩm và tổ hợp được phẩm chứa lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng, và phương pháp để chẩn đoán và liệu pháp của bệnh AS và các bệnh khác bằng cách sử dụng kháng thể của sáng chế.

Các định nghĩa

Sáng chế sẽ được hiểu dễ dàng hơn dựa vào định nghĩa của một số thuật ngữ trước tiên.

Cần hiểu rằng các chất và phương pháp được đề xuất ở đây không làm giới hạn các thành phần và các bước của phương pháp cụ thể, do các thành phần và bước này có thể thay đổi. Cần lưu ý rằng khi được sử dụng trong bản mô tả này và trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều tương ứng, nếu ngữ cảnh không chỉ rõ theo cách khác.

Thuật ngữ "thụ thể tế bào T" của người còn được gọi là "TCR", "thụ thể T", là phức chất protein heterodime được tìm thấy trên bề mặt của tế bào lymphô T. Thụ thể T chỉ có mặt trên các tế bào lymphô T. Chức năng chính của TCR là để nhận biết đặc hiệu các kháng

nguyên đã xử lý được gắn kết với các phân tử của phức hợp tương thích mô chính (HLA).

TCR của người gồm hai cấu trúc dưới phân tử, chuỗi α và β , hoặc chuỗi γ và δ , được liên kết bằng liên kết disulfua và được gắn vào màng tế bào. Mỗi chuỗi của chuỗi TCR có miền biến đổi (V) ở đầu tận cùng N, miền liên kết, và miền ổn định (C) được liên kết với miền xuyên màng để cố định thụ thể này trong màng sinh chất của tế bào lymphô T. Chiều dài miền ổn định của chuỗi alpha và chuỗi beta gồm 91 và 129 gốc axit amin tương ứng. Chiều dài của miền liên kết và miền xuyên màng của chuỗi alpha gồm 30 và 17 gốc axit amin (amino acid residue: AAR), và chiều dài của miền liên kết và miền xuyên màng của chuỗi beta là 21 và 22 AAR. Chiều dài của các miền biến đổi của thụ thể T thay đổi từ 104 đến 125 AAR.

Tỷ lệ nhỏ của các tế bào lymphô T có thụ thể T loại γ/δ . Chúng được sắp xếp tương tự với thụ thể α/β , nhưng khác biệt về cấu trúc bậc nhất của chúng và có nhiều dấu hiệu chức năng. Chúng có tính biến đổi thấp hơn nhiều (độ đặc hiệu của dòng vô tính bị giới hạn), chúng nhận biết các kháng nguyên trong phức chất với các phân tử trình diện kháng nguyên "không cổ điển" (không phải MHC) hoặc thậm chí các kháng nguyên tự do.

Thụ thể T phản ứng với phức chất MHC/kháng nguyên thông qua sáu vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) của chúng: ba vùng chuỗi alpha và ba vùng chuỗi beta. Các vùng CDR này là các vùng siêu biến, các vòng của miền biến đổi của thụ thể tế bào T, Valpha và Vbeta.

Các thuật ngữ "TRBV9" hoặc "họ TRBV9" để chỉ họ thứ chín của các chuỗi beta của thụ thể tế bào T, khi được phân biệt theo danh pháp IMGT, khác biệt ở chỗ, trình tự axit amin miền biến đổi của nó chứa các motif đặc biệt của vùng CDR1 (trình tự axit amin là S-G-D-L-S) và vùng CDR2 (trình tự axit amin là Y-Y-N-G-E-E). Thuật ngữ "TCR họ TRBV9" để chỉ thụ thể tế bào T có chuỗi beta của nó thuộc về họ TRBV9.

Thuật ngữ "bệnh học" liên quan đến các tế bào lymphô T hoặc TCR có nghĩa là TCR này hoặc tế bào lymphô T mang TCR có liên quan đến bệnh hoặc bệnh học và/hoặc gây ra bệnh và/hoặc góp phần vào sự phát triển của bệnh.

Thuật ngữ "tự miễn" liên quan đến TCR có nghĩa là TCR này có liên quan đến sự phát triển của bệnh tự miễn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" được dự định để chỉ phân tử globulin miễn dịch gồm bốn chuỗi polypeptit (hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L)) được liên kết bằng các liên kết disulfua. Các chuỗi nhẹ được phân loại là kappa hoặc

lambda. Các chuỗi nặng được phân loại là gama, mu, alfa, delta hoặc epsilon; chúng xác định isotyp của kháng thể như IgG, IgM, IgA, IgD và IgE tương ứng, và một số thành phần của chúng có thể được chia nhỏ thêm thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2. Mỗi loại chuỗi nặng được đặc trưng bởi vùng ổn định đặc hiệu.

Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là HCVR hoặc VH) và vùng ổn định chuỗi nặng. Vùng ổn định chuỗi nặng chứa ba miền, CH1, CH2, và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc VL) và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Vùng ổn định chuỗi nhẹ chứa một miền CL. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ thêm thành các vùng có tính siêu biến, được gọi là các vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR), được bao quanh bởi các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là vùng khung (framework region: FR). Mỗi vùng VH và VL gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Trong đơn sáng chế này, 3 vùng CDR của chuỗi nặng được gọi là "HCDR1, HCDR2 và HCDR3", trong khi 3 vùng CDR của chuỗi nhẹ được gọi là "LCDR1, LCDR2 và LCDR3". Các vùng CDR chứa phần lớn các gốc tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Các gốc amin của CDR trong vùng HCVR và LCVR của kháng thể theo sáng chế được đánh số và định vị theo sơ đồ đánh số của Kabat đã biết rõ, trừ khi có quy định theo cách khác. Đơn sáng chế này bao gồm chữ cái thông thường để mã hóa axit amin, trừ khi có quy định theo cách khác.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng TRBV9", "kháng thể với TRBV9", "kháng thể gắn kết đặc hiệu với chuỗi beta họ TRBV9" và "kháng thể kháng chuỗi beta họ TRBV9" có thể thay thế cho nhau trong ngữ cảnh của đơn sáng chế này và đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop của chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người.

Ngoài ra, "kháng thể đơn dòng" được sử dụng trong đơn sáng chế này có thể là mảnh Fv chuỗi đơn, mảnh này có thể thu được bằng cách gắn kết ADN mã hóa vùng LCVR và HCVR với trình tự của nhóm liên kết (xem tài liệu: Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315, 1994). Dự định rằng bất kể các mảnh hoặc phân đoạn được đề cập, thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng trong đơn sáng chế này bao gồm các mảnh hoặc phân đoạn như vậy cũng như các dạng chuỗi đơn. Miễn là protein này duy trì được khả năng gắn kết đặc hiệu hoặc ưu tiên với đích của nó (ví dụ, epitop hoặc kháng nguyên), nó được bao gồm bởi

thuật ngữ "kháng thể". Các kháng thể có thể được glycosyl hóa hoặc không được glycosyl hóa và vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các thuật ngữ "kháng thể" và "kháng thể đơn dòng" dùng cho mục đích của đơn sáng chế này để chỉ kháng thể đơn dòng kháng TCR họ TRBV9. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" để chỉ kháng thể của động vật gặm nhấm, động vật linh trưởng hoặc họ Lạc đà, tốt hơn là để chỉ kháng thể của chuột, khỉ, lạc đà hoặc lạc đà không bướu, kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người hoàn toàn, trừ khi có quy định theo cách khác.

Quần thể "các kháng thể đơn dòng" để chỉ quần thể kháng thể đồng nhất hoặc gần như đồng nhất (nghĩa là ít nhất khoảng 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96%, tốt hơn là ít nhất khoảng 97 hoặc 98%, hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 99% kháng thể trong quần thể này sẽ cạnh tranh với cùng kháng nguyên/epitop trong thử nghiệm ELISA, hoặc tốt hơn nữa là các kháng thể có tính đồng nhất về các trình tự axit amin của chúng). Các kháng thể có thể được glycosyl hóa hoặc không được glycosyl mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế. Các kháng thể đơn dòng có thể là đồng nhất nếu chúng có trình tự axit amin đồng nhất, mặc dù chúng có thể khác nhau về sự cải biến sau dịch mã, ví dụ, kiểu glycosyl hóa.

Các vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo thành các vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên", hoặc "vùng gắn kết kháng nguyên", hoặc "miền gắn kết kháng nguyên" hoặc "vị trí gắn kết kháng nguyên" có thể thay thế cho nhau để chỉ phần của phân tử kháng thể chứa các gốc axit amin tương tác với kháng nguyên và tạo ra độ đặc hiệu và ái lực của kháng thể liên quan đến kháng nguyên. Phần kháng thể này bao gồm các gốc axit amin "khung" cần thiết để duy trì cấu dạng thích hợp của các gốc gắn kết kháng nguyên.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể của người" để chỉ kháng thể mà trong đó trình tự của miền biến đổi và miền ổn định có nguồn gốc từ các trình tự của người. Các kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin thường là không phải của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến không có định hướng hoặc gây đột biến đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc đột biến soma *in vivo*), ví dụ, trong vùng CDR, và cụ thể là trong vùng CDR3.

Thuật ngữ "được làm cho giống với của người", khi được sử dụng liên quan đến kháng thể, dùng để chỉ các kháng thể được đặc trưng bởi sự có mặt của các vùng ổn định và thành phần cấu trúc tương tự của người, nhưng có vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) là

vùng điển hình của globulin miễn dịch có nguồn gốc khác, hoặc của các mảnh tương ứng của kháng thể được cải biến.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ kháng thể "bố-mẹ" là kháng thể được mã hóa bằng trình tự axit amin được sử dụng để thu được biến thể. Kháng thể bố-mẹ có thể là kháng thể từ động vật gặm nhấm, lạc đà không bướu, kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người.

Thuật ngữ "mức độ giống với của người" liên quan đến kháng thể được dùng để chỉ tỷ lệ % tính đồng nhất của trình tự vùng khung của kháng thể được làm cho giống với của người với vùng khung của thể nhận có nguồn gốc từ người được sử dụng để tạo ra kháng thể được làm cho giống với của người và kháng thể có thể thu được từ thư viện của người. Tốt hơn nếu kháng thể theo sáng chế chứa vùng khung có tính đồng nhất ít nhất 80%, thông thường là ít nhất 82%, phổ biến hơn là ít nhất 83%, ví dụ, tính đồng nhất ít nhất 84%, hoặc ít nhất 85%, hoặc ít nhất 86%, hoặc ít nhất 87% so với vùng khung thu được từ thư viện của người.

Thuật ngữ "sự thay thế giống với của người" để chỉ sự thay thế axit amin làm gia tăng mức độ giống với của người của kháng thể hoặc mảnh của nó.

Thuật ngữ "thể khảm" liên quan đến các kháng thể của sáng chế được dùng để chỉ các kháng thể được đặc trưng bởi các vùng ổn định tương tự của người nhưng có các vùng biến đổi có nguồn gốc khác. Trong các kháng thể này, các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng không có nguồn gốc từ người (ví dụ, có nguồn gốc từ chuột nhắt) được liên kết khi hoạt động với các miền ổn định của các chuỗi tương ứng có nguồn gốc từ người.

Thuật ngữ "được liên kết khi hoạt động" hoặc thuật ngữ tương tự, khi được sử dụng để mô tả kháng thể, để chỉ các trình tự polypeptit được tạo vào mối quan hệ vật lý (cộng hóa trị, nếu không được chỉ rõ theo cách khác) và mối quan hệ chức năng với nhau. Theo các phương án được ưu tiên nhất, các chức năng của thành phần polypeptit của phân tử thể khảm không bị thay đổi so với các đặc tính chức năng của thành phần polypeptit được phân lập. Thuật ngữ "được liên kết khi hoạt động" hoặc thuật ngữ tương tự, khi được sử dụng để mô tả các axit nucleic, có nghĩa là các axit nucleic này được liên kết cộng hóa trị sao cho không có sự dịch chuyển khung đọc và codon kết thúc có mặt ở các điểm mà chúng được liên kết với. Như rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, các trình tự nucleotit mã hóa protein thể khảm chứa các thành phần "được liên kết khi hoạt động" (các protein, polypeptit, trình tự của nhóm liên kết, các miền protein, v.v.) gồm các mảnh mã hóa

các thành phần nêu trên, trong đó các mảnh nêu trên được liên kết cộng hóa trị sao cho protein thể khảm có chiều dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể thể khảm theo sáng chế, được tạo ra trong quá trình dịch mã và phiên mã của trình tự nucleotit.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được phân lập" để chỉ phân tử hoặc tế bào có mặt trong môi trường khác với môi trường mà phân tử hoặc tế bào này có mặt *in vivo*.

Theo các phương án được ưu tiên, các kháng thể của sáng chế là kháng thể tái tổ hợp, nghĩa là thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp" bao gồm tất cả các kháng thể thu được, được biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được đưa vào tế bào chủ, các kháng thể được phân lập từ tập hợp thư viện kháng thể của người kết hợp, tái tổ hợp đã biết, các kháng thể được phân lập từ động vật là động vật chuyển gen đối với các gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, xem tài liệu: Taylor L.D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295). Theo một số phương án, các kháng thể của người tái tổ hợp được gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi động vật chuyển gen đối với các trình tự Ig của người được sử dụng, sự gây đột biến soma *in vivo*) và do đó, các trình tự axit amin của vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà trong khi có nguồn gốc từ và liên quan đến các trình tự vùng VH và VL dòng mầm của người, không thể tồn tại trong tự nhiên trong kho dòng mầm kháng thể của người *in vivo*.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" để chỉ trường hợp mà trong đó một thành viên của cặp gắn kết đặc hiệu không gắn kết đáng kể với các phân tử không phải (các) đối tác gắn kết đặc hiệu của nó. Thuật ngữ này cũng có thể áp dụng khi, ví dụ, miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế đặc hiệu đối với epitop cụ thể được mang bởi nhiều kháng nguyên; trong trường hợp này, kháng thể cụ thể chứa miền gắn kết kháng nguyên sẽ có thể gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác nhau mang epitop. Theo đó, kháng thể đơn dòng của sáng chế gắn kết đặc hiệu với epitop của chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể tế bào T của người, trong khi kháng thể này không gắn kết đặc hiệu với các chuỗi beta của TCR của các họ khác và các chuỗi alpha của TCR.

Thuật ngữ "epitop" để chỉ phần phân tử có khả năng được nhận biết và được gắn kết bởi kháng thể ở một hoặc nhiều vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Các epitop thường bao gồm nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như các axit amin hoặc

mạch bên của đường và có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc trưng, cũng như các đặc điểm điện tích đặc trưng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop", ngoài các thành phần khác, để chỉ mảnh polypeptit, có hoạt tính kháng nguyên và/hoặc sinh miễn dịch ở động vật, tốt hơn là ở động vật có vú, ví dụ, chuột, chuột nhắt hoặc người. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop kháng nguyên" là mảnh polypeptit có thể gắn kết đặc hiệu kháng thể và có thể được phát hiện bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch tiêu chuẩn. Các epitop kháng nguyên không nhất phải có tính sinh miễn dịch, tuy nhiên, chúng có thể có tính sinh miễn dịch. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop sinh miễn dịch" được định nghĩa là mảnh polypeptit kích thích sự đáp ứng của kháng thể ở động vật, khi được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. "Epitop không có mạch thẳng" hoặc "epitop cấu dạng" chứa các polypeptit (hoặc các axit amin) không liên kề trong protein của kháng nguyên gắn kết với kháng thể đặc hiệu epitop.

Các cụm từ "đặc tính sinh học" hoặc "đặc điểm sinh học", hoặc các thuật ngữ "hoạt tính" hoặc "hoạt tính sinh học" liên quan đến kháng thể hoặc các mảnh chức năng của nó theo sáng chế có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong đơn sáng chế này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ái lực và độ đặc hiệu của epitop/kháng nguyên, khả năng làm trung hòa hoặc đối kháng hoạt tính của TCR bao gồm chuỗi beta thuộc về họ TRBV9.

Các đặc tính sinh học có thể nhận biết khác của kháng thể bao gồm, ví dụ, khả năng phản ứng chéo (nghĩa là với các thể đồng đẳng không phải của người của peptit đích, hoặc với các protein hoặc mô khác nói chung), và khả năng bảo toàn sự biểu hiện ở mức cao của protein trong các tế bào của động vật có vú. Các đặc tính hoặc đặc điểm nêu trên có thể được quan sát, xác định, và/hoặc đánh giá bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được thừa nhận trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm ELISA, thử nghiệm ELISA cạnh tranh, phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE hoặc KINEXA, trong các thử nghiệm ức chế *in vitro* hoặc *in vivo* mà không có giới hạn, các thử nghiệm gắn kết thụ thể, các thử nghiệm tiết ra và/hoặc tạo ra xytokin hoặc yếu tố sinh trưởng, và sự tải nạp tín hiệu và hóa mô miễn dịch của các lát cắt mô thu được từ nhiều nguồn khác nhau, bao gồm người, động vật linh trưởng hoặc nguồn khác bất kỳ.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "ức chế" hoặc "làm trung hòa" liên quan đến hoạt tính của kháng thể theo sáng chế để chỉ khả năng đối kháng, ngăn chặn,

phòng ngừa, hạn chế, làm chậm, phá vỡ, loại bỏ, làm ngừng, làm giảm đáng kể, ví dụ, sự tiến triển hoặc mức độ nặng của quá trình cần được ức chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các quá trình nêu trên, hoạt tính sinh học của kháng thể, hoặc đặc tính, bệnh hoặc tình trạng bệnh.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể đột biến" hoặc "biến thể" để chỉ kháng thể được bộc lộ trong đơn sáng chế này, trong đó một hoặc nhiều axit amin được bổ sung và/hoặc thay thế và/hoặc làm khuyết và/hoặc chèn vào ở đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C và/hoặc trong các trình tự axit amin nguyên thể của kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh của nó. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể đột biến" còn để chỉ phân tử axit nucleic mã hóa protein đột biến. Ngoài ra, thuật ngữ "thể đột biến" để chỉ biến thể bất kỳ ngắn hơn hoặc dài hơn protein hoặc axit nucleic.

Thuật ngữ "tính tương đồng" được sử dụng để mô tả mối liên quan của các trình tự nucleotit hoặc axit amin với các trình tự nucleotit hoặc axit amin khác, được xác định theo mức độ tính đồng nhất và/hoặc tương tự giữa các trình tự cần được so sánh nêu trên.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự axit amin hoặc nucleotit "gần như tương tự" hoặc "gần như giống nhau" làm trình tự tham chiếu nếu trình tự axit amin hoặc nucleotit này có tính đồng nhất ít nhất 85% với trình tự cụ thể trong vùng được chọn để so sánh. Do đó, các trình tự gần như tương tự bao gồm các trình tự có, ví dụ, tính đồng nhất ít nhất 90%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 91%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 92%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 93%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 94%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 95%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 96%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 97%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 98%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 99%. Hai trình tự có tính đồng nhất với nhau về cơ bản cũng giống nhau.

Tính đồng nhất trình tự được xác định dựa trên trình tự tham chiếu. Các thuật toán để phân tích trình tự là đã biết trong lĩnh vực này, như IgBLAST được mô tả trong tài liệu: Ye et al. *Nucleic Acids Res.* 2013, W34-40. Nhằm mục đích của sáng chế, để xác định mức độ tính đồng nhất và tính tương tự giữa các trình tự nucleotit và các trình tự axit amin, các trình tự nucleotit và axit amin có thể được so sánh với sự trợ giúp của gói phần mềm IgBLAST được cung cấp bởi Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) bằng cách sử dụng sự dóng thẳng hàng có chèn khoảng trống với các thông số tiêu chuẩn. Để tính toán tỷ lệ % tính đồng nhất, chiều dài đầy đủ của trình tự tham chiếu, ví dụ, vùng biến đổi, được sử dụng.

Sự đề cập đến trình tự nucleotit "mã hóa" polypeptit có nghĩa là polypeptit này được tạo ra từ trình tự nucleotit trong khi dịch mã và phiên mã mARN. Nhờ đó, cả chuỗi mã hóa giống với mARN và thường được sử dụng trong danh mục trình tự và chuỗi bổ trợ dùng làm khuôn để phiên mã có thể được chỉ ra. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, thuật ngữ này cũng bao gồm các trình tự nucleotit thoái hóa bất kỳ mã hóa chính trình tự axit amin này. Các trình tự nucleotit mã hóa polypeptit bao gồm các trình tự chứa intron.

Các kháng thể

Như đã nêu trên đây, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng được làm cho giống với của người được phân lập và các mảnh chức năng của nó có khả năng gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể T của người.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và có thể được sử dụng làm thuốc để điều trị bệnh AS và các bệnh khác mà sinh bệnh học của chúng có liên quan đến thụ thể TCR thuộc về họ TRBV9, ví dụ, bệnh Celiac hoặc u lymphô tế bào T.

Kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng. Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng, ví dụ, các kỹ thuật tế bào lai đã được biết rõ trong lĩnh vực này, cũng như các kỹ thuật tái tổ hợp, kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn, các kỹ thuật tổng hợp hoặc tổ hợp của các kỹ thuật này hoặc các kỹ thuật khác đã biết rõ trong lĩnh vực này. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" để chỉ kháng thể thu được từ một bản sao hoặc dòng vô tính bao gồm, ví dụ, dòng sinh vật có nhân chuẩn, dòng sinh vật có nhân nguyên thủy hoặc dòng thể thực khuẩn bất kỳ, chứ không phải phương pháp tạo ra của nó.

Kháng thể được làm cho giống với của người và kháng thể thể khảm có thể được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp peptit hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp như được mô tả trong phần "axit nucleic" dưới đây.

Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế là kháng thể thể khảm và khác biệt ở chỗ, chúng có các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng không có nguồn gốc từ người (ví dụ, có nguồn gốc từ chuột hoặc chuột nhắt), và các miền ổn định có nguồn gốc từ người.

Kháng thể của sáng chế bao gồm

miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có ba vùng siêu biến

1) HCDR1 (theo sơ đồ đánh số của Kabat) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1,

2) HCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2

3) HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 3;

miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có ba vùng siêu biến, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó:

LCDR 1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4,

LCDR 2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5,

LCDR 3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

Nếu không được chỉ rõ cụ thể theo cách khác, sơ đồ đánh số của Kabat đã biết rõ được sử dụng sau đây để xác định các vùng CDR của kháng thể.

Theo tất cả các phương án, các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế được làm cho giống với của người và khác với các miền này của kháng thể bố-mẹ về sự thay thế axit amin giống với của người, trong đó các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể chứa sự thay thế axit amin trong mảnh FR của các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, làm gia tăng mức độ giống với của người của kháng thể này so với kháng thể bố-mẹ.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất 10 sự thay thế axit amin giống với của người so với miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bố-mẹ, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 8.

Theo các phương án được ưu tiên, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế chứa sự thay thế axit amin khác mà không làm thay đổi độ đặc hiệu của kháng thể.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất 10 sự thay thế axit amin giống với của người so với miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bố-mẹ, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Theo các phương án được ưu tiên, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế chứa sự thay thế axit amin và có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO 18.

Theo một số phương án, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế chứa

sự thay thế axit amin khác mà không làm thay đổi độ đặc hiệu của kháng thể.

Theo một số phương án, các kháng thể đơn dòng theo sáng chế là kháng thể IgG của người có chiều dài đầy đủ, ví dụ, IgG1 hoặc IgG2 hoặc IgG3 hoặc IgG4.

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế bao gồm chuỗi nặng, trình tự axit amin của nó có tính đồng nhất ít nhất 85%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 90%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 91%, hoặc ít nhất 92%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 93%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 94%, hoặc ít nhất 95%, hoặc ít nhất 96%, hoặc ít nhất 97%, hoặc ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20.

Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế bao gồm chuỗi nhẹ, trình tự axit amin của nó có tính đồng nhất ít nhất 85%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 90%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 91%, hoặc ít nhất 92%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 93%, hoặc ít nhất 94%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 95%, hoặc ít nhất 96%, hoặc ít nhất 97%, hoặc ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22.

Theo một số phương án, kháng thể có chuỗi nhẹ, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 22, và chuỗi nặng, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 20.

Như đã biết từ các tài liệu trong lĩnh vực này, sự đột biến có thể được đưa vào các trình tự của kháng thể, bao gồm các miền biến đổi mà không làm thay đổi đáng kể khả năng gắn kết với kháng nguyên của kháng thể này. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể chứa sự đột biến khác mà không dẫn đến làm mất khả năng gắn kết với chuỗi beta họ TRBV9 của TCR của kháng thể nhưng có thể dẫn đến làm giảm tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc làm tăng ái lực hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể. Cụ thể, đã biết rõ từ các tài liệu trong lĩnh vực này, có thể tạo ra sự thay thế axit amin bảo toàn trong trình tự của kháng thể. "Sự thay thế bảo toàn" trong ngữ cảnh của đơn sáng chế này để chỉ sự thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có mạch bên tương tự. Các họ gốc axit amin có mạch bên tương tự là đã được biết rõ trong lĩnh vực này, bao gồm các mạch bên có tính bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), các mạch bên có tính axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), các mạch bên phân cực không mang điện tích (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), các mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), các mạch bên có nhánh β (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin), và các mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Tốt hơn nếu các vùng CDR3 trong

miền VL và/hoặc VH bao gồm không nhiều hơn năm sự thay thế axit amin bảo toàn, thường là không nhiều hơn ba sự thay thế bảo toàn. Thông thường, không tạo ra sự thay thế bảo toàn ở các vị trí axit amin quan trọng cho sự gắn kết epitop của chuỗi beta họ TRBV9.

Các biến thể (thể đột biến) trên đây của kháng thể theo sáng chế có thể thu được bằng cách tổng hợp peptit hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp như được mô tả trong phần "axit nucleic" dưới đây.

Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể chứa vùng ổn định chuỗi nặng, như vùng ổn định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD của người. Tốt hơn nếu vùng ổn định chuỗi nặng là vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người. Ngoài ra, kháng thể có thể chứa vùng ổn định chuỗi nhẹ hoặc vùng ổn định kappa của chuỗi nhẹ hoặc vùng ổn định lambda của chuỗi nhẹ. Tốt hơn nếu kháng thể chứa vùng ổn định kappa của chuỗi nhẹ.

Theo các phương án được ưu tiên, mảnh biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được đặc trưng bởi mức độ giống với của người 87%. Theo các phương án được ưu tiên, mảnh biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được đặc trưng bởi mức độ giống với của người 85%.

Sáng chế cũng đề xuất mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc "mảnh chức năng của kháng thể" hoặc "mảnh có hoạt tính của kháng thể") để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Đã chứng minh được rằng chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bằng các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết được bao gồm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (a) mảnh Fab, mảnh hóa trị một bao gồm các miền VL, VH, CL và CH1; (b) mảnh F(ab)2, mảnh hóa trị hai chứa hai mảnh Fab được liên kết bằng liên kết cầu disulfua ở vùng bản lề; (c) mảnh Fd gồm các miền VH và CH1; (d) mảnh Fv gồm các miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể; (e) mảnh dAb (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546) gồm miền VH, và (f) vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) được phân lập. Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh Fv là VL và VH được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được liên kết bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng nhóm liên kết tổng hợp để cho phép chúng được tạo ra dưới dạng chuỗi protein đơn mà trong đó các vùng VL và VH ghép đôi để tạo thành các phân tử hóa trị một (được gọi là Fv chuỗi đơn (single chain Fv: scFv); ví dụ, xem tài liệu: Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được dự định bao gồm trong thuật ngữ

"mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Chúng cũng bao gồm các dạng khác của các kháng thể chuỗi đơn, như kháng thể hai mảnh. Các kháng thể hai mảnh là kháng thể đặc hiệu kép, hóa trị hai trong đó các miền VH và VL được biểu hiện trên chuỗi polypeptit đơn nhưng sử dụng nhóm liên kết quá ngắn để cho phép ghép đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, do đó ép buộc các miền này ghép đôi với các miền bổ trợ của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kết kháng nguyên (ví dụ, xem tài liệu: Holliger P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ* 90:6444-6448; Poljak R.J. et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Các mảnh kháng thể, như Fab và F(ab')₂, có thể thu được từ các kháng thể toàn phần bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, như phân giải các kháng thể toàn phần bằng papain hoặc pepsin tương ứng. Ngoài ra, có thể thu được các kháng thể, các mảnh kháng thể và các phân tử adhesin miễn dịch bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn.

Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có thể là một phần của các phân tử adhesin miễn dịch lớn hơn được tạo ra bằng cách liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị của kháng thể hoặc mảnh kháng thể với một hoặc nhiều protein hoặc peptit. Ví dụ về các phân tử adhesin miễn dịch này bao gồm việc sử dụng vùng nhân streptavidin để tạo ra phân tử scFv tetrame (Kipriyanov S.M. et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) và sử dụng gốc cystein, peptit đánh dấu và đuôi polyhistidin ở đầu tận cùng C để tạo ra các phân tử scFv có kích thước giảm và hóa trị hai (Kipriyanov S.M. et al. (1994) *Mol. Immunol.*, 31:1047-1058). Các liên kết hóa học khác giữa các mảnh kháng thể cũng đã được biết rõ từ tài liệu trong lĩnh vực này.

Các kháng thể và mảnh chức năng của nó theo sáng chế có mặt ở dạng được phân lập, điều này có nghĩa là protein này gần như tự do đối với sự có mặt của các protein khác hoặc các phân tử sinh học có trong tự nhiên khác, như các oligosacarit, axit nucleic và các mảnh của nó, v.v., trong đó thuật ngữ "gần như tự do" trong trường hợp này có nghĩa là có ít hơn 70%, thường là ít hơn 60%, và thông thường hơn là ít hơn 50% chế phẩm nêu trên chứa protein được phân lập là phân tử sinh học có trong tự nhiên khác. Theo một số phương án, các protein nêu trên có mặt ở dạng gần như tinh khiết, trong đó thuật ngữ "dạng gần như tinh khiết" có nghĩa là độ tinh khiết bằng ít nhất 95%, thường là bằng ít nhất 97%, và thông thường hơn là bằng ít nhất 99%.

Phương pháp tinh chế kháng thể thu được bằng kỹ thuật tái tổ hợp hoặc kỹ thuật tế bào lai đã được biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, quá trình tinh chế có thể được thực hiện bằng cách sắc ký (ví dụ, phương pháp sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, đặc biệt là ái lực đối

với protein A hoặc protein G của các kháng nguyên đặc hiệu, và sắc ký cột theo kích thước), phương pháp ly tâm, phương pháp sử dụng độ tan khác nhau, hoặc kỹ thuật tiêu chuẩn khác bất kỳ để tinh chế các protein. Ngoài ra, các kháng thể thu được bằng kỹ thuật theo sáng chế hoặc các mảnh của nó có thể được dung hợp với các trình tự polypeptit khác loài (ví dụ, đuôi histidin) để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tinh chế.

Ái lực của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phân tích tiêu chuẩn bằng cách xác định hằng số phân ly (KD). KD được tính toán bằng cách sử dụng công thức $KD = k_{dis}/k_{on}$, trong đó k_{dis} là hằng số tốc độ lệ phân ly được tính toán theo thử nghiệm và k_{on} là hằng số tốc độ kết hợp được tính toán theo thử nghiệm của phức hợp kháng thể-kháng nguyên.

Các kháng thể được ưu tiên là kháng thể gắn kết kháng nguyên của người với giá trị KD không lớn hơn khoảng 1×10^{-7} M; tốt hơn là không lớn hơn khoảng 1×10^{-8} M; thông thường hơn là không lớn hơn khoảng 1×10^{-9} M; tốt hơn nữa là không lớn hơn khoảng 1×10^{-10} M, và tốt nhất là không lớn hơn khoảng 1×10^{-11} M, ví dụ, không lớn hơn khoảng 1×10^{-12} M.

Các kháng thể được ưu tiên bao gồm kháng thể MA-042 được mô tả chi tiết trong phần thử nghiệm dưới đây.

Các kháng thể và mảnh của nó có thể được sử dụng trong các chế phẩm và phương pháp của sáng chế là các kháng thể và mảnh có hoạt tính sinh học, nghĩa là chúng có khả năng gắn kết các epitop của kháng nguyên mong muốn và có hiệu quả sinh học theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp.

Các kháng thể và mảnh chức năng của nó theo sáng chế có thể gắn kết đặc hiệu với (vùng) epitop của chuỗi beta họ TRBV9. Theo các phương án được ưu tiên, nhờ sự gắn kết đặc hiệu của chúng với chuỗi beta họ TRBV9, sự ức chế hoạt tính của TCR bao gồm cả chuỗi beta nêu trên. Thông thường, tốt hơn nếu mức độ ức chế ít nhất khoảng 20, hoặc 30, hoặc 40, hoặc 50, hoặc 60, hoặc 70, hoặc 80, hoặc 90, hoặc 95% hoặc cao hơn.

Theo một số phương án, kháng thể kháng chuỗi beta họ TRBV9 theo sáng chế hoặc mảnh của nó có thể loại bỏ các tế bào T mang TCR chứa chuỗi beta họ TRBV9. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế có thể tạo ra sự loại bỏ các tế bào lymphô T ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, hoặc khoảng 100%.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể là kháng thể MA-042.

Kháng thể MA-042 bao gồm các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, có các trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16 và 18.

Kháng thể MA-042 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, có các trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 20 và 22 tương ứng.

Axit nucleic

Sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế, các mảnh chức năng và miền biến đổi của chúng để có thể được sử dụng để thu được các kháng thể thể khả chứa các miền biến đổi của sáng chế được dung hợp khi hoạt động với các miền ổn định đã biết của kháng thể của người.

Theo các phương án được ưu tiên, axit nucleic của sáng chế mã hóa chuỗi nặng của kháng thể, miền biến đổi của nó chứa 3 vùng siêu biến, HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó

HCDR1 (theo sơ đồ đánh số của Kabat) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 1;

HCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 2;

HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 3.

Theo các phương án được ưu tiên, axit nucleic của sáng chế mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, miền biến đổi của nó chứa 3 vùng siêu biến, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó:

LCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 4;

LCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 5;

LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No 6.

Theo các phương án được ưu tiên, axit nucleic của sáng chế mã hóa các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, chứa sự thay thế axit amin trong các mảnh FR của các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, để làm gia tăng mức độ giống với của người của kháng thể này so với kháng thể bố-mẹ.

Các phân tử axit nucleic mã hóa thể đồng dạng và thể đột biến của các chuỗi của kháng thể nêu trên, các mảnh chức năng và miền của nó cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể

theo sáng chế, chứa ít nhất 10 sự thay thế axit amin giống với của người so với miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bố-mẹ, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No 8.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của kháng thể, miền biến đổi của nó có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 16.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, miền biến đổi của nó chứa ít nhất 10 sự thay thế axit amin giống với của người so với miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bố-mẹ, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 10.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, miền biến đổi của nó có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 18.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của kháng thể, trình tự axit amin của nó có tính đồng nhất ít nhất 85%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 90%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 91%, hoặc ít nhất 92%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 93%, hoặc ít nhất 94%, hoặc ít nhất 95%, hoặc ít nhất 96%, hoặc ít nhất 97%, hoặc ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự axit amin của nó có tính đồng nhất ít nhất 85%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 90%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 91%, hoặc ít nhất 92%, hoặc tính đồng nhất ít nhất 93%, hoặc ít nhất 94%, hoặc ít nhất 95%, hoặc ít nhất 96%, hoặc ít nhất 97%, hoặc ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22.

Ví dụ về các axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của sáng chế được thể hiện trong các trình tự SEQ ID No: 19 và 21.

Các axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể cũng được quan tâm. Các axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể có thể được sử dụng để dung hợp khi hoạt động với các axit nucleic mã hóa miền ổn định tương ứng của các kháng thể.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 16.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID No: 18.

Ví dụ về các axit nucleic mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được thể hiện trong các trình tự SEQ ID No: 15 và 17.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, "phân tử axit nucleic" hoặc "axit nucleic" là phân tử ADN, như phân tử ADN hệ gen hoặc phân tử cADN, hoặc phân tử ARN, như phân tử mARN. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic của sáng chế là phân tử ADN (hoặc cADN) chứa khung đọc mở mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể của sáng chế và có khả năng, trong các điều kiện thích hợp (ví dụ, các điều kiện nội bào sinh lý), được sử dụng để biểu hiện trong các hệ biểu hiện khác loài.

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic của sáng chế được tạo ra bằng phương pháp kỹ thuật di truyền. Các phương pháp tạo ra axit nucleic là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, tính khả dụng của thông tin về trình tự axit amin hoặc thông tin về trình tự nucleotit cho phép tạo ra các phân tử axit nucleic được phân lập của sáng chế bằng phương pháp tổng hợp oligonucleotit. Trong trường hợp thông tin về trình tự axit amin, nhiều axit nucleic khác nhau do mã thoái hóa có thể được tổng hợp. Các phương pháp chọn lọc biến thể codon đối với vật chủ mong muốn là đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các oligonucleotit tổng hợp có thể được tạo ra bằng phương pháp phosphoramidit, và các cấu trúc tạo thành có thể được tinh chế theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này, như phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography: HPLC) hoặc các phương pháp khác được mô tả trong các tài liệu, ví dụ, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, và theo hướng dẫn được mô tả, ví dụ, trong Hướng dẫn của Bộ y tế và dịch vụ nhân sinh Mỹ (HHS), Viện y tế quốc gia (National Institute of Health: NIH) về nghiên cứu ADN tái tổ hợp. Các phân tử ADN sợi kép, mạch dài của sáng chế có thể được tổng hợp theo cách sau: bằng cách tổng hợp một vài mảnh nhỏ hơn có tính bổ trợ thích hợp chứa các đầu tận cùng thích hợp có khả năng kết dính với mảnh liền kề. Các mảnh liền kề có thể được liên kết bằng cách sử dụng phương pháp trên cơ sở ADN ligaza hoặc PCR.

Các phân tử axit nucleic của sáng chế cũng có thể được tách dòng từ các nguồn sinh học.

Sáng chế cũng bao gồm các axit nucleic có tính tương đồng, gần như giống với, đồng nhất với, hoặc có nguồn gốc từ các axit nucleic mã hóa polypeptit của sáng chế.

Các axit nucleic của sáng chế có mặt trong môi trường khác với môi trường mà trong đó chúng có mặt trong tự nhiên, ví dụ, chúng được phân lập, có mặt với lượng tăng lên, có mặt hoặc được biểu hiện trong các hệ *in vitro* hoặc trong các tế bào hoặc sinh vật không

phải tế bào và sinh vật mà chúng có mặt trong tự nhiên.

Các thay đổi hoặc khác biệt về trình tự nucleotit giữa các trình tự axit nucleic có liên quan chặt chẽ có thể là sự thay đổi nucleotit trong trình tự xuất hiện trong quá trình sao chép hoặc nhân đôi bình thường. Các thay đổi khác có thể được thiết kế đặc hiệu và được đưa vào trình tự nhằm mục đích cụ thể, như để làm thay đổi codon của các axit amin cụ thể hoặc trình tự nucleotit trong vùng điều hòa. Các thay đổi cụ thể này có thể được tạo ra *in vitro* bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật gây đột biến khác nhau hoặc được tạo ra trong sinh vật chủ được đưa vào điều kiện chọn lọc đặc hiệu để cảm ứng hoặc chọn lọc các thay đổi này. Các biến thể của trình tự thu được theo cách đặc hiệu này có thể được gọi là "thể đột biến" hoặc "dẫn xuất" của trình tự ban đầu.

Các axit nucleic thể đột biến hoặc dẫn xuất có thể thu được trên axit nucleic khuôn được chọn từ các axit nucleic trên đây bằng cách cải biến, làm khuyết đoạn hoặc bổ sung một hoặc nhiều nucleotit trong trình tự khuôn, hoặc tổ hợp của chúng, để thu được biến thể của axit nucleic khuôn. Các cải biến, bổ sung hoặc làm khuyết đoạn này cũng có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem tài liệu: Gustin et al., *Biotechniques* (1993) 14: 22; Barany, *Gene* (1985) 37: 111-123; và Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* (1985) 199:537-539, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989), CSH Press, pp. 15.3-15.108) bao gồm phản ứng PCR dễ mắc lỗi, sắp xếp lại, gây đột biến có định hướng oligonucleotit, phản ứng PCR ghép, gây đột biến bằng PCR theo giới tính, gây đột biến *in vivo*, gây đột biến cat xet, gây đột biến tập hợp đệ quy, gây đột biến tập hợp theo hàm mũ, gây đột biến đặc hiệu vị trí, gây đột biến ngẫu nhiên, tái ghép gen, gây đột biến bão hòa vị trí gen (gene site saturated mutagenesis: GSSM), tái ghép bằng cách gắn tổng hợp (synthetic ligation reassembly: SLR), hoặc tổ hợp của chúng. Các cải biến, bổ sung hoặc làm khuyết đoạn này cũng có thể được thực hiện bằng phương pháp bao gồm tái tổ hợp, tái tổ hợp trình tự đệ quy, gây đột biến ADN được cải biến bằng phosphothioat, gây đột biến khuôn chứa uraxil, gây đột biến đoạn lặp kép có chèn khoảng trống, gây đột biến sửa chữa sự ghép cặp sai theo điểm, gây đột biến chủng vật chủ không có khả năng sửa chữa, gây đột biến bằng hóa chất, gây đột biến bằng di truyền học phóng xạ, gây đột biến làm khuyết đoạn, gây đột biến chọn lọc giới hạn, gây đột biến tinh chế giới hạn, tổng hợp gen nhân tạo, gây đột biến tập hợp, tạo ra multime axit nucleic thể khảm, và tổ hợp của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất các biến thể thoái hóa của axit nucleic mã hóa protein của

sáng chế. Biến thể thoái hóa của axit nucleic bao gồm sự thay thế các codon của axit nucleic bằng các codon khác mã hóa chính các axit amin này. Cụ thể, biến thể thoái hóa của axit nucleic được tạo ra để làm gia tăng mức độ biểu hiện trong tế bào chủ. Trong phương án này, các codon của axit nucleic không được ưu tiên hoặc ít được ưu tiên trong các gen của tế bào chủ được thay thế bằng codon được biểu hiện quá mức trong các trình tự mã hóa trong các gen của tế bào chủ này, trong đó các codon đã thay thế nêu trên mã hóa chính axit amin này.

Các cải biến nêu trên không làm thay đổi đáng kể các đặc tính của kháng thể hoặc các mảnh chức năng của nó, nhưng có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự cuộn gập protein trong tế bào chủ, làm giảm khả năng kết tụ hoặc điều biến các hoạt tính sinh học khác của protein, ví dụ, khoảng thời gian bán hủy. Theo một số phương án, các cải biến này không làm thay đổi các đặc tính sinh hóa của protein. Theo một số phương án, các cải biến này dẫn đến tính sinh miễn dịch của kháng thể giảm đi. Tất cả các loại cải biến và sự đột biến đã chỉ rõ trên đây được thực hiện ở cấp độ axit nucleic.

Các axit nucleic đã bộc lộ có thể được phân lập và điều chế ở dạng gần như tinh khiết. Dạng gần như tinh khiết có nghĩa là các axit nucleic có độ tinh khiết ít nhất khoảng 50%, thông thường độ tinh khiết ít nhất khoảng 90% và thường là ở dạng "tái tổ hợp", nghĩa là nằm ở cạnh một hoặc nhiều nucleotit mà nó thường không được liên kết trên nhiễm sắc thể có trong tự nhiên ở cơ thể vật chủ tự nhiên của nó.

Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa protein dung hợp chứa protein của sáng chế, hoặc các mảnh của nó, được bàn luận chi tiết hơn dưới đây. Các axit nucleic mã hóa các miền biến đổi theo sáng chế có thể được liên kết khi hoạt động với các axit nucleic mã hóa miền ổn định tương ứng của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể. Các axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể này có thể được liên kết khi hoạt động với các axit nucleic mã hóa peptit dẫn đầu để tạo điều kiện thuận lợi cho sự vận chuyển các sản phẩm biểu hiện từ tế bào chủ. Peptit dẫn đầu này được loại bỏ sau đó trong quá trình trưởng thành của polypeptit.

Vector

Sáng chế cũng đề xuất vector và các cấu trúc axit nucleic khác chứa axit nucleic được bộc lộ. Thuật ngữ "vector" để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó đã được liên kết với khi hoạt động. Một số vector có thể tự sao chép trong tế bào

chủ mà chúng được đưa vào, trong khi các vector khác có thể đính gắn vào hệ gen của tế bào chủ và sao chép cùng với hệ gen của vật chủ. Ngoài ra, một số vector có khả năng định hướng sự biểu hiện của các gen mà chúng được liên kết với khi hoạt động. Các vector này được gọi ở đây là "vector biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "vector biểu hiện") và các vector minh họa là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các vector thích hợp bao gồm các vector của virus và vector không phải của virus, các plasmid, cosmit, thể thực khuẩn, v.v., tốt hơn nếu là các plasmid, và được sử dụng để tách dòng, khuếch đại, biểu hiện, vận chuyển, v.v. trình tự axit nucleic của sáng chế đến vật chủ thích hợp. Việc lựa chọn vector thích hợp là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Axit nucleic có chiều dài đầy đủ hoặc phần của nó được chèn vào vector thường là bằng cách gắn ADN ligaza với vị trí enzym giới hạn được phân cắt trong vector này. Theo cách khác, trình tự nucleotit mong muốn có thể được chèn bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng *in vivo*, thường là bằng cách gắn các vùng có tính tương đồng với vector trên các vùng rìa của trình tự nucleotit mong muốn. Các vùng có tính tương đồng được bổ sung bằng cách gắn các oligonucleotit, hoặc bằng phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng các đoạn môi chứa, ví dụ, cả vùng có tính tương đồng và phần trình tự nucleotit mong muốn. Thông thường, vector có nguồn gốc sao chép đảm bảo sự nhân giống của chúng trong các tế bào chủ nhờ việc đưa vào tế bào dưới dạng yếu tố ngoài nhiễm sắc thể. Vector cũng có thể chứa các yếu tố điều hòa đảm bảo sự biểu hiện của axit nucleic vào tế bào chủ và sự tạo ra polypeptit đích. Trong vector biểu hiện, axit nucleic nêu trên được liên kết khi hoạt động với trình tự điều hòa có thể bao gồm các gen khởi đầu, gen tăng cường, gen kết thúc, gen điều khiển, gen ức chế và gen cảm ứng, cũng như codon khởi đầu của polypeptit. Theo một số phương án, axit nucleic của sáng chế còn được liên kết khi hoạt động với peptit dẫn đầu để đảm bảo sự phân lập sản phẩm biểu hiện ra khỏi vật chủ vào vùng ngoại bào.

Sáng chế cũng đề xuất cat xet biểu hiện hoặc hệ biểu hiện được sử dụng, ngoài các yếu tố khác, để thu được polypeptit được bộc lộ (ví dụ, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế hoặc các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế) trên cơ sở đó hoặc để sao chép các phân tử axit nucleic được bộc lộ. Cat xet biểu hiện này có thể tồn tại dưới dạng yếu tố ngoài nhiễm sắc thể hoặc có thể được tích hợp vào hệ gen của tế bào bằng cách đưa cat xet biểu hiện nêu trên vào tế bào. Để biểu hiện, sản phẩm protein được mã hóa bằng axit nucleic của sáng chế được biểu hiện trong hệ biểu hiện thuận tiện bất kỳ bao gồm, ví dụ, các hệ của vi khuẩn, nấm, côn trùng, động vật lưỡng cư,

hoặc các tế bào của động vật có vú. Trong cat xet biểu hiện, axit nucleic đích được liên kết khi hoạt động với các trình tự điều hòa có thể bao gồm các gen khởi đầu, gen tăng cường, trình tự kết thúc, gen điều khiển, gen ức chế và gen cảm ứng, cũng như codon khởi đầu của polypeptit. Theo một số phương án, axit nucleic của sáng chế còn được liên kết khi hoạt động với peptit dẫn đầu để đảm bảo sự phân lập sản phẩm biểu hiện ra khỏi tế bào chủ vào vùng ngoại bào. Các phương pháp thu được cat xet biểu hiện hoặc hệ có khả năng biểu hiện sản phẩm mong muốn là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Tế bào chủ

Các hệ biểu hiện trên đây có thể được sử dụng trong vật chủ có nhân nguyên thủy hoặc có nhân điển hình. Các tế bào chủ, như tế bào *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, còn trùng kết hợp với các vectơ của tế bào của baculovirut, hoặc các tế bào của sinh vật bậc cao, không là tế bào phôi của người, như nấm men, thực vật, động vật có xương sống, ví dụ, tế bào CHO (ví dụ, ATCC CRL-9096), tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào HEK293, tế bào COS (ví dụ, ATCC CRL-1650, CRL-1651) và HeLa (ví dụ, ATCC CCL-2), có thể được sử dụng để thu được protein.

Để tạo ra kháng thể theo sáng chế, tế bào chủ được đồng chuyển nhiễm với vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể và vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của kháng thể. Theo một số phương án, vectơ biểu hiện đơn được sử dụng, các axit nucleic mã hóa cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được đưa vào đó.

Đối với sự biểu hiện của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, (các) vectơ biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chuyển nhiễm (đồng chuyển nhiễm) vào tế bào chủ sao cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được biểu hiện trong tế bào chủ và tốt hơn là được tiết vào môi trường mà trong đó tế bào chủ được nuôi cấy, và môi trường mà các kháng thể có thể được phân lập từ đó. Sự giải thích khác nhau của thuật ngữ "sự biến nạp" được dự định bao gồm khoảng rộng các phương pháp thường được sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào tế bào chủ có nhân nguyên thủy hoặc có nhân điển hình, ví dụ, gây xung điện, kết tủa bằng canxi phosphat, chuyển nhiễm bằng DEAE-dextran, v.v., như được mô tả trong tài liệu: Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989; Ausubel F.M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates (1989).

Khi các vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic của kháng thể được đưa vào tế bào chủ, các kháng thể thu được bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ này, hoặc (tốt hơn nữa là) tiết ra kháng thể vào môi trường nuôi cấy mà trong đó tế bào chủ được cho sinh trưởng. Các kháng thể có thể được phân lập ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein tiêu chuẩn. Các điều kiện nuôi cấy tế bào là đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được mô tả trong tài liệu: *Current Protocols in Cell Biology*, Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. and Yamada K.M. (eds.) được công bố bởi John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Nếu tế bào chủ bất kỳ trong số tế bào chủ trên đây hoặc các tế bào chủ hoặc sinh vật khác thích hợp cho sự sao chép và/hoặc biểu hiện của axit nucleic theo sáng chế được sử dụng, axit nucleic đã sao chép tạo thành, protein hoặc polypeptit đã biểu hiện đều nằm trong phạm vi của sáng chế dưới dạng sản phẩm của tế bào chủ hoặc sinh vật. Sản phẩm này có thể được phân lập bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Các dòng tế bào biểu hiện ổn định các protein của sáng chế, có thể được chọn lọc bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, đồng chuyển nhiễm với gen đánh dấu có thể chọn lọc, như dhfr, gpt, neomycin, hygromycin, để cho phép nhận biết và phân lập các tế bào đã chuyển nhiễm chứa gen được đính gắn vào hệ gen).

Các phân tử axit nucleic của sáng chế cũng có thể được sử dụng để xác định sự biểu hiện của gen trong mẫu sinh học. Phương pháp trong đó các tế bào được thử nghiệm về sự có mặt của các trình tự nucleotit cụ thể, như ADN hoặc ARN hệ gen, đã được thiết lập trong lĩnh vực này. Tóm lại, ADN hoặc mARN được phân lập từ mẫu tế bào. mARN có thể được khuếch đại bằng phản ứng RT-PCR, bằng cách sử dụng enzym transcriptaza ngược để tạo ra sợi ADN bổ trợ, sau đó sử dụng sự khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu với các trình tự ADN của sáng chế. Theo cách khác, mẫu mARN được tách bằng phương pháp điện di trên gel, được chuyển vào chất mang thích hợp, ví dụ, nitroxenluloza, nylon, v.v., và sau đó được dò bằng mảnh ADN của sáng chế làm đoạn dò. Các kỹ thuật khác như thử nghiệm gắn oligonucleotit, lai tại chỗ, và lai với đoạn dò ADN được cố định trên chip dạng rắn cũng có thể sử dụng. Việc phát hiện sự lai của mARN với trình tự của sáng chế là dấu hiệu chỉ báo của sự biểu hiện gen trong mẫu.

Ứng dụng điều trị của kháng thể theo sáng chế

Theo một khía cạnh, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính của nó theo sáng chế được sử dụng trong việc điều trị các rối loạn có liên quan đến hoạt tính của các tế bào lymphô T mang TCR họ TRBV9 trên bề mặt về mặt bệnh học, ví dụ, có hoạt tính của các tế bào lymphô T tự miễn trong bệnh AS, bệnh Celiac, u lymphô tế bào T.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh nhân" để chỉ động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuột, khỉ, người, động vật có vú là gia súc, động vật có vú nuôi để thi đấu và động vật có vú là thú cưng; tốt hơn là thuật ngữ này áp dụng cho người. Theo phương án cụ thể, bệnh nhân còn có đặc điểm về bệnh hoặc rối loạn, hoặc tình trạng bệnh do sự có mặt trong cơ thể của TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9 gây ra. Như đã biết trong lĩnh vực này, TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, có liên quan đến bệnh AS và bệnh Celiac. Ngoài ra, TCR, chuỗi beta của nó thuộc về họ TRBV9, có thể có liên quan đến sự phát triển nhiều bệnh về máu như u lymphô tế bào T do virus Epstein-Barr gây ra.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "sử dụng đồng thời", "được sử dụng đồng thời" và "kết hợp với" để chỉ kháng thể với một hoặc nhiều chất điều trị khác, được cho là có nghĩa là dùng để chỉ hoặc bao gồm các định nghĩa sau:

1) việc sử dụng đồng thời tổ hợp của kháng thể theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế cùng nhau thành dạng liều dùng đơn lẻ, dạng này sẽ giải phóng các thành phần nêu trên ở thời điểm gần như đồng thời vào bệnh nhân nêu trên,

2) việc sử dụng gần như đồng thời tổ hợp của kháng thể theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế riêng biệt với nhau thành các dạng liều dùng riêng rẽ, các dạng liều này được sử dụng gần như đồng thời bởi bệnh nhân nêu trên, sau đó các thành phần nêu trên được giải phóng gần như đồng thời vào bệnh nhân này,

3) việc sử dụng lần lượt tổ hợp của kháng thể theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế riêng biệt với nhau thành các dạng liều dùng riêng rẽ, các dạng liều này được sử dụng ở các thời điểm liên nhau bởi bệnh nhân nêu trên với khoảng thời gian cách nhau đáng kể giữa mỗi lần sử dụng, sau đó các thành phần nêu trên được giải phóng ở các thời điểm khác nhau đáng kể vào bệnh nhân nêu trên; và ngoài ra

4) việc sử dụng lần lượt tổ hợp kháng thể theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế cùng nhau thành dạng liều dùng đơn

lẻ, dạng liều dùng này giải phóng các thành phần nêu trên theo cách có kiểm soát, sau đó chúng được giải phóng đồng thời, liên tiếp, hoặc cùng nhau ở các thời điểm giống nhau và/hoặc khác nhau vào bệnh nhân nêu trên, trong đó mỗi phần có thể được sử dụng qua đường sử dụng giống nhau hoặc khác nhau.

Kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng mà không sử dụng phương pháp điều trị khác, nghĩa là dưới dạng liệu pháp độc lập. Ngoài ra, việc điều trị bằng kháng thể của sáng chế có thể bao gồm ít nhất chất điều trị bổ sung (liệu pháp kết hợp). Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể có thể được sử dụng đồng thời hoặc được bào chế với thuốc/được chất khác để điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh về khối u mà sinh bệnh học của chúng có liên quan đến TCR chứa chuỗi beta của TRBV9, ví dụ, bệnh AS, bệnh Celiac, u lymphô tế bào T, bệnh bạch cầu tế bào T.

Liều dùng và đường sử dụng

Kháng thể của sáng chế sẽ được sử dụng với lượng có hiệu quả trong việc điều trị tình trạng bệnh cần điều trị, nghĩa là với liều và trong khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh cụ thể cần được điều trị, độ tuổi, giới tính, và trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, và việc kháng thể này được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều kỹ thuật điều trị ức chế miễn dịch hoặc kháng viêm bổ sung hay không.

Chế độ dùng liều có thể được điều chỉnh để tạo ra mức độ đáp ứng tối ưu. Ví dụ, một liều lớn có thể được sử dụng, vài liều chia nhỏ có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều dùng này có thể được giảm đi hoặc tăng lên tương ứng như được chỉ định theo các tình huống điều trị. Đặc biệt có lợi nếu bào chế được phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều dùng đơn vị để dễ sử dụng và tính đồng đều của liều lượng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, dạng liều dùng tiêu chuẩn được dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp làm liều dùng đơn vị cho các bệnh nhân/đối tượng cần được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hợp chất có hoạt tính được tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dùng mong muốn. Tiêu chuẩn kỹ thuật của các dạng liều dùng tiêu chuẩn theo sáng chế thường được quyết định theo và phụ thuộc trực tiếp vào (a) các đặc tính đặc biệt của chất hóa trị liệu và tác dụng phòng bệnh hoặc điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) các giới hạn hạn chế vốn có trong lĩnh vực này việc bào chế hợp chất có hoạt tính dùng để điều trị có tính miễn cảm ở các đối tượng.

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, dựa vào phần mô tả được đưa ra ở đây, các liều dùng và chế độ dùng liều được điều chỉnh theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực điều trị. Điều này có nghĩa là liều được dung nạp tối đa có thể được thiết lập dễ dàng, và lượng hữu hiệu để tạo ra lợi ích điều trị mong muốn cho bệnh nhân cũng có thể được xác định, do các yêu cầu tạm thời đối với việc sử dụng mỗi chất có thể tạo ra lợi ích điều trị có thể phát hiện cho bệnh nhân. Do đó, mặc dù một số liều dùng và chế độ sử dụng nhất định được đưa ra làm ví dụ trong tài liệu này, các ví dụ này không làm giới hạn các liều dùng và chế độ dùng liều có thể là cần thiết cho bệnh nhân trong khi thực hành sáng chế.

Cần lưu ý rằng các giá trị liều dùng có thể thay đổi theo loại và mức độ nặng của tình trạng cần được làm thuyên giảm, và có thể bao gồm một hoặc nhiều liều. Ngoài ra, cần hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ dùng liều cụ thể cần được điều chỉnh theo thời gian tùy theo nhu cầu của đối tượng và sự đánh giá của chuyên gia y tế về việc sử dụng hoặc theo dõi việc sử dụng dược phẩm, và các khoảng liều dùng được đưa ra trong bản mô tả này chỉ là ví dụ và không dự định làm giới hạn phạm vi hoặc sự thực hành dược phẩm theo sáng chế. Ngoài ra, chế độ dùng liều với các dược phẩm theo sáng chế này có thể dựa trên nhiều yếu tố khác nhau bao gồm loại bệnh, độ tuổi, trọng lượng, giới tính, tình trạng sức khỏe của bệnh nhân, mức độ nặng của bệnh, đường sử dụng và kháng thể cụ thể được sử dụng. Do đó, chế độ dùng liều có thể thay đổi trong khoảng rộng, nhưng có thể được xác định theo cách thông thường bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, các liều dùng có thể được điều chỉnh dựa trên các thông số dược động học hoặc dược lực học, các thông số này có thể bao gồm các hiệu quả lâm sàng như tác dụng gây độc và/hoặc giá trị trong phòng thí nghiệm. Do đó, sáng chế bao gồm cả sự tăng liều dùng ở bệnh nhân như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp xác định liều dùng và chế độ dùng liều thích hợp là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ dựa vào các ý tưởng được bộc lộ ở đây.

Ví dụ về các phương pháp sử dụng thích hợp đã được đề xuất trên đây.

Dự định rằng liều dùng thích hợp của kháng thể theo sáng chế sẽ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 200 mg/kg, tốt hơn là từ 0,1 đến 100 mg/kg, bao gồm cả khoảng từ 0,5 đến 50 mg/kg, ví dụ, khoảng từ 1 đến 20 mg/kg. Kháng thể có thể được sử dụng, ví dụ, với liều ít nhất bằng 0,25 mg/kg, như ít nhất 0,5 mg/kg, bao gồm cả ít nhất 1 mg/kg, ví dụ, ít nhất 1,5 mg/kg, như ít nhất 2 mg/kg, ví dụ, ít nhất 3 mg/kg, bao gồm cả ít nhất 4 mg/kg, ví dụ, ít nhất

5 mg/kg; và ví dụ, đến mức tối đa 50 mg/kg, bao gồm cả đến mức tối đa 30 mg/kg, ví dụ, đến mức tối đa 20 mg/kg, bao gồm cả đến mức tối đa 15 mg/kg. Việc sử dụng này sẽ thường được lặp lại trong các khoảng thời gian thích hợp, như mỗi tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần hoặc bốn tuần một lần, và miễn là trong khoảng thời gian được cho là thích hợp bởi bác sĩ điều trị mà trong một số trường hợp, có thể tăng hoặc giảm liều dùng, nếu cần.

Dược phẩm

Kháng thể của sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân. Các kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với chất mang, chất pha loãng, và/hoặc tá dược được dùng, theo một hoặc nhiều liều. Dược phẩm để sử dụng được thiết kế để phù hợp với chế độ sử dụng đã chọn, và các chất pha loãng, chất mang, và/hoặc tá dược được dùng, như chất phân tán, chất đệm, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất hòa tan, chất đẳng trương, chất ổn định và chất tương tự được sử dụng, khi thích hợp. Các dược phẩm nêu trên được thiết kế theo kỹ thuật thông thường, ví dụ, như trong tài liệu: Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, tài liệu này cung cấp các kỹ thuật khác nhau để thu được dược phẩm như thường đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ "thuốc (dược chất)" – là hợp chất hoặc hỗn hợp của các hợp chất dưới dạng dược phẩm ở dạng viên nén, viên nang, bột, sản phẩm đông khô nhanh, thuốc tiêm, tiêm truyền, thuốc mỡ và các dạng sử dụng được ngay khác dùng để phục hồi, cải thiện hoặc cải biến các chức năng sinh lý ở người và động vật, và còn để điều trị và phòng ngừa bệnh, để chẩn đoán, gây mê, tránh thai, mỹ phẩm và các mục đích khác. Phương pháp bất kỳ để sử dụng các peptit, protein hoặc kháng thể đã được chấp nhận trong lĩnh vực này có thể được sử dụng theo cách thích hợp đối với kháng thể của sáng chế.

Thuật ngữ "dược dụng" để chỉ một hoặc nhiều thành phần dạng rắn hoặc lỏng tương hợp được, các thành phần này thích hợp để sử dụng ở động vật có vú, tốt hơn là ở người.

Thuật ngữ "tá dược" được sử dụng trong bản mô tả này để mô tả thành phần bất kỳ không phải các thành phần nêu trên của sáng chế. Các thành phần này là chất hữu cơ hoặc vô cơ được sử dụng trong khi sản xuất dược phẩm để tạo ra các sản phẩm thuốc có các đặc tính lý hóa cần thiết.

Thuật ngữ "chất đệm", "hỗn hợp chất đệm", "tác nhân đệm" để chỉ dung dịch có khả năng chống lại sự thay đổi độ pH nhờ tác dụng của các thành phần liên hợp axit-bazơ của nó, và cho phép được chất là kháng thể chống lại sự thay đổi độ pH. Nói chung, tốt hơn là được phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0. Ví dụ về các chất đệm được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dung dịch đệm axetat, phosphat, xitrat, histidin, succinat, v.v..

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "chất đẳng trương", "chất điều hòa áp lực thẩm thấu" hoặc "chất thẩm thấu" để chỉ tá dược có thể làm tăng áp suất thẩm thấu của dạng bào chế kháng thể dạng lỏng. Dược chất "đẳng trương" là dược chất có áp suất thẩm thấu tương đương với áp suất thẩm thấu trong máu của người. Các dược chất đẳng trương thường có áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng từ khoảng 250 đến 350 mOsm/kg. Các chất đẳng trương được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyol, sacarit và sucroza, axit amin, các muối kim loại, ví dụ, natri clorua, v.v..

Thuật ngữ "chất ổn định" để chỉ tá dược hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều hơn hai tá dược để tạo ra tính ổn định lý học và/hoặc hóa học của chất có hoạt tính. Các chất ổn định có thể được sử dụng là các axit amin, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, arginin, histidin, glyxin, lysin, glutamin, prolin; các chất hoạt động bề mặt, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, polysorbat 20 (tên thương mại: Tween 20), polysorbat 80 (tên thương mại: Tween 80), polyetylen-polypropylen glycol và các copolyme của chúng (tên thương mại: Poloxamer, Pluronic, natri dodecyl sulfat (SDS); các chất chống oxy hóa, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, methionin, axetylxystein, axit ascorbic, monothioglycerol, các muối của axit sulfuro, v.v.; các chất chelat hóa, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), axit dietylenđiaminpentaaxetic (DTPA), natri xitrat, v.v..

Dược phẩm có tính "ổn định" nếu chất có hoạt tính vẫn giữ được tính ổn định lý học và/hoặc tính ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó trong khoảng thời hạn sử dụng cụ thể ở nhiệt độ bảo quản, ví dụ, nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C. Tốt hơn là chất có hoạt tính vẫn giữ được tính ổn định lý học và hóa học, cũng như hoạt tính sinh học. Khoảng thời gian bảo quản được điều chỉnh dựa trên kết quả thử nghiệm tính ổn định trong điều kiện gia tốc hoặc lão hóa tự nhiên.

Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân có biểu hiện bệnh lý như được mô tả trong đơn sáng chế này bằng cách sử dụng các kỹ thuật sử dụng tiêu chuẩn, bao gồm sử dụng qua đường miệng, trong tĩnh mạch, trong màng

bụng, dưới da, đường phổi, qua chân bì, trong cơ, trong mũi, trong má, dưới lưỡi, hoặc thuốc đạn.

Tốt hơn là được phẩm của sáng chế chứa hoặc có "lượng có hiệu quả điều trị" của kháng thể theo sáng chế. Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" được dự định để chỉ lượng có hiệu quả với liều dùng và trong khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và trọng lượng của đối tượng, và khả năng của kháng thể hoặc phần của nó tạo ra đáp ứng mong muốn ở đối tượng. Lượng có hiệu quả điều trị cũng là lượng mà trong đó tác dụng gây độc hoặc có hại bất kỳ đều nhỏ hơn nhiều so với hiệu quả có lợi về mặt điều trị của kháng thể. Thuật ngữ "lượng có hiệu quả phòng bệnh" được dự định để chỉ lượng có hiệu quả với liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả phòng bệnh mong muốn. Do liều để phòng bệnh được kê đơn cho các đối tượng trước khi mắc bệnh hoặc ở giai đoạn đầu của bệnh, lượng có hiệu quả phòng bệnh có thể thường là nhỏ hơn lượng có hiệu quả điều trị.

Lượng có hiệu quả điều trị hoặc lượng có hiệu quả phòng bệnh ít nhất là liều có hiệu quả điều trị nhỏ nhất, lượng này nhỏ hơn liều có độc tính của chất có hoạt tính. Mặt khác, lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể theo sáng chế là lượng làm giảm, hoạt tính sinh học của các dòng tự miễn ở động vật có vú, tốt hơn là người, ví dụ, bằng cách gắn kết TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, trong khi sự có mặt của các dòng này gây ra hoặc góp phần vào hiệu quả gây bệnh không mong muốn, hoặc làm giảm TCR, chuỗi beta thuộc về họ TRBV9, tạo ra hiệu quả điều trị có lợi ở động vật có vú, tốt hơn là ở người.

Đường sử dụng của kháng thể theo sáng chế có thể là đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, bằng cách hít hoặc đường khu trú. Tốt hơn nếu các kháng thể theo sáng chế có thể được đưa vào được phẩm chấp nhận được để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ngoài đường tiêu hóa" bao gồm sử dụng qua đường trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trực tràng, âm đạo hoặc trong màng bụng. Tiêm trong tĩnh mạch, trong màng bụng hoặc dưới da là các đường sử dụng được ưu tiên. Các chất mang được dùng dùng cho các dạng tiêm này là đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Như được mô tả trong hướng dẫn thích hợp, các dược phẩm cần được vô khuẩn và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản trong đồ chứa, được tạo ra bằng, ví dụ, lọ nhỏ (ampun) được bịt kín hoặc bơm tiêm. Do đó, các dược phẩm có thể được khử khuẩn bằng cách lọc sau khi bào chế dược phẩm này, hoặc có thể được tạo ra ở dạng thích hợp về mặt vi

sinh bằng kỹ thuật khác bất kỳ. Chế phẩm điển hình dùng để tiêm truyền qua đường trong tĩnh mạch bao gồm 250-1000 ml chất lỏng như dung dịch Ringer vô khuẩn, nước muối sinh lý, dung dịch dextroza hoặc dung dịch nước muối Hank, và liều có hiệu quả điều trị (ví dụ, 1-100 mg/ml hoặc nhiều hơn) của kháng thể dạng cô đặc. Các liều dùng có thể thay đổi tùy theo loại bệnh và mức độ nặng của bệnh. Đã biết rõ trong lĩnh vực này rằng liều dùng cho bệnh nhân bất kỳ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm thể trạng của bệnh nhân, diện tích bề mặt cơ thể, độ tuổi, hợp chất cụ thể cần được sử dụng, giới tính, khoảng thời gian và đường sử dụng, tình trạng sức khỏe chung và các thuốc được sử dụng đồng thời khác. Liều dùng điển hình có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ 0,001 đến 1000 μ g; tuy nhiên, liều dùng thấp hơn và cao hơn khoảng minh họa này được dự định, đặc biệt là dựa vào các thông số đã nêu trên đây. Chế độ dùng liều ngoài đường tiêu hóa hàng ngày có thể nằm trong khoảng từ 0,1 μ g/kg đến 100 μ g/kg của tổng trọng lượng cơ thể, tốt hơn là từ 0,3 μ g/kg đến 10 μ g/kg, và tốt hơn nữa là từ 1 μ g/kg đến 1 μ g/kg, đặc biệt tốt hơn là từ 0,5 đến 10 μ g/kg trọng lượng cơ thể/ngày. Quá trình điều trị có thể được theo dõi bằng cách đánh giá theo định kỳ tình trạng sức khỏe của bệnh nhân. Đối với việc sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh của bệnh nhân, việc điều trị được lặp lại cho đến khi đạt được sự đáp ứng hoặc sự ức chế mong muốn các triệu chứng của bệnh. Tuy nhiên, các chế độ dùng liều khác không được mô tả ở đây cũng có thể được áp dụng. Liều dùng mong muốn có thể được sử dụng bằng cách dùng một hoặc nhiều liều lớn, hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục kháng thể, tùy thuộc vào sự phân hủy động học mong muốn bởi bác sĩ thực hành.

Các lượng được ước tính này của kháng thể phụ thuộc đáng kể vào quyết định của bác sĩ. Hiệu quả được dự kiến là yếu tố then chốt để chọn liều dùng và chế độ dùng liều thích hợp. Các yếu tố được tính đến ở đây bao gồm bệnh nhất định cần được điều trị, động vật có vú nhất định sẽ được điều trị, tình trạng lâm sàng của bệnh nhân nhất định, nguyên nhân rối loạn, vị trí sử dụng kháng thể, loại kháng thể cụ thể, đường sử dụng, chế độ sử dụng và các yếu tố khác đã được biết rõ trong lĩnh vực y học.

Các chất điều trị theo sáng chế có thể được bảo quản lạnh hoặc đông khô nhanh và được hoàn nguyên trong chất mang vô khuẩn thích hợp trước khi sử dụng. Quá trình đông khô và hoàn nguyên có thể làm mất hoạt tính của kháng thể ở mức độ nhất định. Các liều dùng có thể được điều chỉnh để bù lại sự mất hoạt tính này. Nói chung, giá trị độ pH của được phẩm nằm trong khoảng từ 6 đến 8 là được ưu tiên.

Vật phẩm (sản phẩm) và kit

Phương án khác của sáng chế là vật phẩm chứa các sản phẩm được dùng để điều trị các bệnh tự miễn và tình trạng bệnh liên quan và các bệnh về máu ác tính mà sinh bệnh học của chúng có liên quan đến TCR mang chuỗi beta họ TRBV9. Các bệnh này bao gồm, ví dụ, bệnh AS, bệnh Celiac, bệnh bạch cầu tế bào T, u lymphô tế bào T và các bệnh khác.

Vật phẩm là đồ chứa có gắn nhãn và tờ hướng dẫn sử dụng, sản phẩm này có thể ở trong vỉ bấm và/hoặc bao gói. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, lọ nhỏ, ampun, bơm tiêm, v.v.. Các đồ chứa có thể được làm bằng nhiều vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc vật liệu polyme. Đồ chứa này chứa được phẩm có hiệu quả điều trị bệnh nhất định, và có thể có đường tiếp cận vô khuẩn. Ít nhất một thành phần hoạt tính trong được phẩm là kháng thể theo sáng chế. Nhãn dán và tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng được chất được sử dụng để điều trị bệnh nhất định. Nhãn dán và/hoặc tờ hướng dẫn sử dụng còn chứa các hướng dẫn sử dụng hỗn hợp kháng thể ở bệnh nhân, bao gồm cả chỉ định, tần suất, liều dùng, đường sử dụng, chống chỉ định và/hoặc lưu ý đối với các sản phẩm điều trị này. Theo một phương án, tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng được phẩm được dự định để sử dụng cho việc điều trị.

Ngoài ra, vật phẩm có thể chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sản phẩm khác cần thiết cho mục đích thương mại hoặc cần thiết cho người tiêu dùng, như các dung môi, chất pha loãng, dụng cụ lọc, kim tiêm và bơm tiêm.

Sáng chế cũng đề cập đến kit có thể được sử dụng cho các mục đích khác nhau, ví dụ, để đánh giá khả năng tiêu diệt các tế bào T mang thụ thể TCR họ TRBV9, để tinh chế hoặc kết tủa miễn dịch thụ thể TRBV9 ra khỏi tế bào. Để phân lập và tinh chế, kit này có thể chứa kháng thể được liên kết với hạt (ví dụ, các hạt sepharosa). Kit này bao gồm đồ chứa, nhãn dán và tờ hướng dẫn sử dụng.

Mục đích chẩn đoán

Các kháng thể của sáng chế cũng được sử dụng trong mục đích chẩn đoán (ví dụ, *in vitro*, *ex vivo*). Ví dụ, kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định nồng độ của các tế bào lymphô T mang TCR của họ TRBV9 trong các mẫu thu được từ bệnh nhân (ví dụ, mẫu mô hoặc mẫu dịch cơ thể, như dịch tiết do viêm, máu, dịch ruột, nước bọt hoặc nước tiểu). Các phương pháp thích hợp để phát hiện và xác định bao gồm các thử nghiệm miễn dịch, như phương pháp đếm tế bào theo dòng, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), thử nghiệm phát quang hóa học, thử

nghiệm miễn dịch phóng xạ, và thử nghiệm mô miễn dịch. Sáng chế còn bao gồm các kit, ví dụ, kit để chẩn đoán chứa các kháng thể được mô tả ở đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Để sáng chế này có thể được hiểu rõ hơn, các ví dụ sau đây được đưa ra. Các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Tất cả các tài liệu công bố, bằng độc quyền sáng chế, và đơn đăng ký sáng chế đã viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp vào đây để tham khảo. Mặc dù sáng chế nêu trên đã được mô tả trong một số chi tiết để minh họa và ví dụ nhằm mục đích hiểu rõ ràng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng hiểu rõ sáng chế dựa vào phần bộc lộ của nó, và có thể tiến hành một số thay đổi và cải biến mà vẫn nằm trong phạm vi và ý tưởng của các phương án kèm theo.

Ví dụ 1. Làm cho các trình tự miền biến đổi của kháng thể giống với của người in silico

Đối với các trình tự của kháng thể bố-mẹ (tham chiếu) được sử dụng, các trình tự của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng TRBV9-2 có các trình tự axit amin của chúng được thể hiện trong SEQ ID No: 8 và 10.

Các trình tự axit amin của miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được so sánh với tổ hợp của các trình tự dòng mầm của miền biến đổi của globulin miễn dịch của người, các trình tự dòng mầm của miền biến đổi của globulin miễn dịch của chuột, các trình tự của kháng thể của chuột và người trưởng thành thu được từ cả nguồn mở và thư viện người cho được cung cấp bởi công ty Biocad (Nga). Gói phần mềm Ylab được sử dụng để phân tích (Biocad, Nga).

Quá trình phân tích đã xác định các vị trí và tổ hợp của chúng trong các trình tự miền biến đổi của các kháng thể thử nghiệm là gần giống với động vật và không giống với của người. Đồng thời, các tổ hợp axit amin thường được thể hiện phổ biến nhất trong các kháng thể của người ở các vị trí này được xác định. Các trình tự nhân tạo của các miền biến đổi chứa sự thay thế làm gia tăng mức độ giống với kháng thể của người được thiết kế dựa trên số liệu thu được.

Ngoài ra, các trình tự nucleotit mã hóa các biến thể axit amin của sáng chế được tối ưu hóa codon để biểu hiện kháng thể được làm cho giống với của người trong dòng tế bào

CHO. Các trình tự nucleotit được làm cho giống với của người của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (SEQ ID No: 15 và 17) được tổng hợp *de novo* và được tách dòng vào vector pEE-HC, pEE-CK, định dạng IgG1 (Xu et al. Front. Chem. Sci. Eng. 2015, 9(3): 376–380) ở các vị trí giới hạn Sall/NheI và Sall/BsiWI tương ứng.

Các trình tự axit nucleic của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tạo thành được khẳng định bằng thiết bị giải trình tự Sanger. Kháng thể MA-042 được chọn lọc để đánh giá thêm, các trình tự axit amin và nucleotit của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của chúng được thể hiện trong các trình tự SEQ ID No: 19-22.

Kháng thể MA-042 bao gồm các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16 và 18.

Mức độ giống với của người của miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể MA-042 là 87%, trong khi mức độ này của miền biến đổi chuỗi nhẹ là 85% (Bảng 1). Miền ổn định của chuỗi nặng được thể hiện bằng định dạng IgG1, alotyp Gm3.

Bảng 1. So sánh mức độ giống với của người giữa các miền biến đổi của kháng thể bố-mẹ và kháng thể MA-042

Kháng thể	Mức độ giống với của người của miền biến đổi chuỗi nặng, %	Mức độ giống với của người của miền biến đổi chuỗi nhẹ, %
TRBV9-2	72	69
MA-042	87	85

Ví dụ 2. Tạo ra kháng thể tái tổ hợp và xác định ái lực của nó

Các vector chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể MA-042, thu được như được mô tả trong Ví dụ 1, được nhân giống trong các tế bào *E. coli* và được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế ADN plasmit của công ty Qiagen (Đức) và được sử dụng để chuyển nhiễm dòng tế bào CHO-Fut8 bằng cách sử dụng polyetylenimin mạch thẳng (PEI "MAX", "Polysciences", Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các hỗn hợp phản ứng tạo thành được ủ ở nhiệt độ 37°C trên thiết bị lắc. 9 ngày sau khi chuyển nhiễm, dịch lỏng nuôi cấy được tách ra khỏi tế bào bằng cách lọc qua bộ lọc cỡ 0,5/0,22 µm. Sau khi lọc, dịch lỏng nuôi cấy được sử dụng để phân lập các kháng thể bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ái lực trên cột PreDictor RoboColumn MabSelect SuRe 0,2ml (GE Healthcare, Mỹ) được làm cân bằng bằng nước muối đệm phosphat (PBS, độ pH = 7,4). Sau

đó, cột này được rửa bằng 5 lần thể tích của PBS. Protein đã gắn kết chất mang được rửa giải bằng cách sử dụng chất đệm glyxin 0,1M, độ pH = 3. Các tác giả sáng chế đã thu thập đỉnh chính chứa protein và điều chỉnh độ pH đến mức trung tính bằng chất đệm Tris 1M (độ pH = 7,5). Tất cả các công đoạn được tiến hành với tốc độ dòng 110 cm/giờ. Sau đó, protein được chuyển vào PBS (độ pH = 7,4) bằng cách sử dụng phương pháp thẩm tách, lọc qua bộ lọc cỡ 0,22 μ m, chuyển vào các ống vô khuẩn mới.

Chất lượng phân lập được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp PAGE 12% trong điều kiện làm biến tính. Việc đánh giá định lượng được tiến hành bằng cách xác định bằng thiết bị vi phổ quang kế NanoDrop2000 ở 280A. Protein phân lập được được bảo quản ở nhiệt độ -70°C.

Ái lực của kháng thể được xác định trên hệ thống OctetRed 96 (ForteBio, Mỹ. Kháng nguyên với nồng độ 20 μ g/ml được cố định trên bề mặt của các bộ cảm biến AR2G (ForteBio) theo quy trình tiêu chuẩn và các hướng dẫn của nhà sản xuất. Việc phân tích được tiến hành ở nhiệt độ 30°C bằng cách sử dụng PBS chứa Tween 20 0,1% và BSA 0,1% làm dung dịch đệm làm việc. Sau khi ghi lại kết quả ban đầu, các bộ cảm biến được ngâm vào các lỗ chứa dung dịch kháng thể trong 300 giây mà ở đó phức chất được kết hợp. Sau đó sự phân ly phức chất trong dung dịch đệm được phát hiện trong 600 giây.

Đường cong mức độ gắn kết, sau khi trừ đi tín hiệu của chất tham chiếu, được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích số liệu Octet (phiên bản 9.0) theo quy trình tiêu chuẩn và sử dụng mô hình tương tác Global theo tỷ lệ 1:1. Số liệu thu được (Bảng 2) cho thấy rằng kháng thể gắn kết đặc hiệu và với ái lực cao với kháng nguyên của người.

Bảng 2. Xác định ái lực của kháng thể MA-042

Kháng thể	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	R ² toàn phần
MA-042	<1.0E-12	3.19E+05	<1.0E-07	0,9758

Ví dụ 3. Tạo ra dòng tế bào sản sinh kháng thể ổn định ở định dạng IgG1, và sản xuất kháng thể

Các trình tự của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể MA-042 được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 1 và được tách dòng vào các vectơ pSX ở vị trí giới hạn HindIII, XbaI. Các plasmit tạo thành được nuôi cấy trong tế bào *E. coli*, và 600-700 μ g được phân lập bằng cách sử dụng thiết bị BenchPro (Life Technology, CIIA) theo các hướng dẫn của

nhà sản xuất. Các plasmit được tuyến tính hóa qua đêm bằng cách sử dụng PvuI endonucleaza, sau đó etanol được làm kết tủa, chất kết tủa được hòa tan trong nước, nồng độ trong thể tích cuối nằm trong khoảng từ 900 đến 1100 ng/ μ l.

Dòng tế bào CHO-K1-S được nuôi cấy trong môi trường F12 Gibco của Ham (Thermo, Mỹ). Việc chuyển nhiễm với các cấu trúc gen chứa trình tự mã hóa của chuỗi MA-042 được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp gây xung điện trên thiết bị Nucleofector™ (Lonza, Thụy Sĩ) theo quy trình của nhà sản xuất.

Vào ngày sau khi chuyển nhiễm, các tế bào đã chuyển nhiễm được chọn lọc bằng kháng sinh trong 24 ngày bằng cách bổ sung puromyxin (nồng độ cuối bằng 7,2 μ g/ml) và hygromyxin B (nồng độ cuối bằng 640 μ g/ml) vào môi trường. Sau đó, các dòng tế bào kháng thuốc kháng sinh đồng nhất trong cấu trúc biểu hiện MA-042 ở mức độ cao được chọn lọc.

Để nuôi cấy CHO-K1-S biểu hiện MA-042, môi trường không chứa huyết thanh F12 Gibco của Ham (Thermo, Mỹ) được bổ sung 25-100 μ M 2-deoxy-2-fluoro-L-fucoza (CarboSynth, Vương Quốc Anh) được sử dụng. Kháng thể đơn dòng MA-042 dùng cho các nghiên cứu tiền lâm sàng được tạo ra trong thùng lên men của bình phản ứng sinh học dùng một lần HyClone (Thermo Fisher Scientific) dung tích 50 lít. Các tế bào tạo ra được loại bỏ ra khỏi dịch lỏng nuôi cấy bằng cách sử dụng thiết bị lọc sâu Millistak C0HC (Merck-Millipore, Mỹ). Tiến hành tinh chế sơ bộ kháng thể ra khỏi môi trường nuôi cấy đã làm trong trên chất hấp thụ ái lực với protein A. Protein đích được rửa giải đặc hiệu bằng chất đệm glyxin, độ pH = 3,3-3,8 trong điều kiện axit. Dịch rửa giải thu được được cho tiếp xúc với độ pH axit trong khoảng thời gian từ 30 đến 60 phút để làm bất hoạt virus, và sau đó được làm trung hòa bằng dung dịch Tris-HCl 1M đến độ pH = 6,5-7,0. Tiến hành tinh chế sắc ký cuối để loại bỏ các tạp chất có thể có (ADN, các protein của tế bào tạo ra, phối tử của chất hấp thụ ái lực được giải phóng, các khối kết tụ và mảnh kháng thể) bằng cách sử dụng chất hấp thụ CaptoAdhere (GE HealthCare LifeSciences) theo chế độ dòng chảy qua. Do đó, dung dịch protein được cho chảy qua chất hấp thụ đã được làm cân bằng bằng chất đệm Tris ở độ pH = 6,5-7,0, trong điều kiện độ dẫn điện thấp ($< 3 \text{ msec/cm}^2$). Sau đó, protein đã tinh chế được lọc để loại bỏ virus bằng cách sử dụng kit lọc Viresolve PRO (Millipore, Mỹ), cô đặc và lọc qua màng bán thấm đối với dung dịch đệm cuối chứa chất đệm axetat (độ pH = 5,0-5,5) và trehaloza.

Ví dụ 4. Sử dụng kháng thể để gắn kết đặc hiệu với TCR của họ TRBV9

Các kháng thể đơn dòng MA-042 thu được như được mô tả trong Ví dụ 3 được sử dụng để phân loại tiểu quần thể tế bào lymphô. Các kháng thể được đánh dấu bằng florescein bằng cách sử dụng chất phản ứng florescein isothiocyanat (Sigma, Mỹ) theo quy trình của nhà sản xuất. Số lượng phân tử mang huỳnh quang được cho phản ứng với các phân tử kháng thể được kiểm soát theo tỷ lệ phổ hấp thụ ở bước sóng 495/280 nm.

Các tế bào lymphô T thu được từ máu ngoại vi của người cho khỏe mạnh. Máu được thu gom vào ống EDTA Vacuette (mỗi ống 2x9 ml), phân đoạn đơn nhân được phân lập theo quy trình tiêu chuẩn được mô tả trong tài liệu (Kovalchuk L. V. et al. Immunology: Workshop - 2010. - 176 p.). Sau khi phân lập, các tế bào được chuyển vào nước muối đệm phosphat (PBS) chứa 0,5% huyết thanh bào thai bò (bovine serum albumin: BSA) và EDTA 2mM. Tổng số lượng tế bào và khả năng sống của chúng được xác định bằng phương pháp nhuộm bằng thuốc nhuộm xanh trypan như được mô tả bởi Lang N.R. (Stimulation of lymphocytes M.: Medicine, 1976.-288 p.). Thể tích tương đương của dung dịch xanh trypan 0,1% được bổ sung vào hỗn dịch tế bào, sau đó các tế bào được nhuộm (đã chết) và các tế bào màu xanh lam không được nhuộm được đếm trong buồng Goryaev. Dựa trên các số liệu này, tỷ lệ % tế bào đã chết trong mẫu thử nghiệm được xác định.

Để khẳng định tính chọn lọc gắn kết của MA-042 với quần thể đích của tế bào lymphô T mang TCR trên màng thuộc về họ TRBV9, 500000 phần phân ước tế bào của phân đoạn đơn nhân được bổ sung vào chất đệm PBS chứa 0,5% huyết thanh bào thai bò (BSA), EDTA 2mM có độ pH = 8, các kháng thể MA-042 được đánh dấu bằng FITC, CD3-eFluor405 (chất đánh dấu tế bào lymphô T) (eBioscience, Mỹ) và CD45-PC5 (eBioscience, Mỹ) (chất đánh dấu bạch cầu toàn phần) ở nồng độ 100 ng/ml. 50µl hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó, các tế bào được rửa bằng chất đệm PBS được bổ sung BSA 0,5%, EDTA 2mM. Sau quá trình nhuộm, các tế bào được sử dụng để phân loại bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng (FACSARIA III, Mỹ, Fig.1). Việc sử dụng các chất đánh dấu trong khi nhuộm làm cho có thể phân lập các tế bào của quần thể đích, ngấm qua bề mặt TRBV9+, CD3+, CD45+, cũng như thu được các tế bào của quần thể âm tính, nghĩa là các tế bào tương ứng với kiểu hình miễn dịch "TRBV9-, CD3+, CD45+". Các tế bào của quần thể TRBV9+ và TRBV9- từ hai lần sao chép được sử dụng để phân lập ARN toàn phần và giải trình tự của chuỗi beta của TCR. Các phân đoạn tế bào tạo thành được cho vào chất đệm RLT (Quagen, Đức), ARN được phân lập ra khỏi đó

bằng cách sử dụng kit chất phản ứng của kit mini Quiagen RNAeasy #217004 (Quiagen) theo quy trình của nhà sản xuất. cADN được tổng hợp trên khuôn ARN được phân lập, các mảnh của chuỗi beta của thụ thể T được khuếch đại theo quy trình được mô tả trong tài liệu của Britanova và các đồng tác giả (J Immunol, 2016, 196(12) 5005-5013) bằng cách sử dụng kit tổng hợp cADN Mint (Eurogen, Nga). Thiết bị làm thích ứng Illumina (Mỹ) được gắn với amplicon được tạo ra, việc giải trình tự được thực hiện trên thiết bị MiSeq Illumina theo quy trình của nhà sản xuất thiết bị giải trình tự. Số liệu giải trình tự được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm MiGEC, MiXCR và VDJtools có sẵn trên Internet ở trang web: <https://milaboratory.com>. Việc phân tích kho chứa các chuỗi beta của TCR tạo thành cho thấy rằng thư viện thu được bằng cách phân loại sử dụng kháng thể MA-042 được làm giàu 93% bằng các trình tự được mã hóa bằng đoạn gen TRBV9, trong khi không có trình tự nào chứa TRBV9 được phát hiện trong kho chứa các chuỗi beta của phân đoạn âm tính "TRBV9-".

Ví dụ 5. Hoạt tính chức năng in vitro của kháng thể MA-042

Kháng thể đơn dòng MA-042 thu được như được mô tả trong Ví dụ 3. Phân đoạn đơn nhân của máu của người thu được như được mô tả trong Ví dụ 4. Hoạt tính gây độc tế bào của MA-042 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp huỳnh quang tế bào. Phần phân ước tế bào từ phân đoạn đơn nhân được sử dụng để tính toán tổng số tế bào, khả năng sống được xác định theo khả năng nhuộm bằng thuốc nhuộm xanh trypan. Để đánh giá hiệu quả gây độc tế bào, $3-4 \times 10^6$ tế bào được ủ trong chất đệm PBS trong một giờ với kháng thể MA-042 ở nồng độ: 20 ng/ml, 40 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml và 1 μ g/ml, đối với "đối chứng không", các tế bào được ủ mà không bổ sung kháng thể. Sau khi ủ, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS, chuyển vào môi trường RPMI chứa 10% huyết thanh của người, và được ủ trong 72 giờ trong tủ áp chứa CO₂. Sau đó, các tế bào được ly tâm và nhuộm bằng các kháng thể CD4-PE, CD3-eFluor405 (eBioscience, Mỹ) và MA-042-FITC. Các mẫu tế bào đã nhuộm được sử dụng trong phân tích đếm tế bào trên thiết bị phân loại tế bào FACS Aria III (BD, Mỹ). Hiệu quả gây độc tế bào được đánh giá theo tỷ lệ tế bào dương tính với TRBV9 giảm dần trong quần thể tế bào lymphô CD3+, sự giảm số lượng tế bào đích có tương quan với sự tăng nồng độ kháng thể MA-042 cho đến khi loại bỏ hoàn toàn quần thể đích. Việc loại bỏ hoàn toàn quần thể đích sau khi nhuộm bằng MA-042 được phát hiện với nồng độ kháng thể bằng 500 ng/ml. Trong nhóm "đối chứng không", tỷ lệ % các tế

bào lymphô T của TRBV9 vẫn không thay đổi. Fig.2 thể hiện kết quả điển hình của phương pháp đếm tế bào theo dòng. Giá trị EC50 thu được (nồng độ có hiệu quả tối đa một nửa để chỉ nồng độ kháng thể tạo ra một nửa hiệu quả tối đa của kháng thể cho trước sau một khoảng thời gian cụ thể), lên đến 100 ng/ml đối với kháng thể MA-042 (Fig.3).

Ví dụ 6. Hoạt tính chức năng in vivo của kháng thể MA-042

Kháng thể đơn dòng MA-042 thu được như được mô tả trong Ví dụ 3. Việc sử dụng MA-042 một lần qua đường trong tĩnh mạch cho khỉ redut (*Macaca mulatta*) được thực hiện để đánh giá hoạt tính đặc hiệu và các thông số dược động học cơ bản. Thử nghiệm được thực hiện trên khỉ đực redut trưởng thành về giới tính, cân nặng 4-10 kg, được cung cấp bởi Viện khoa học ngân sách nhà nước Liên bang "Scientific Research Institute of Medical Primatology". Sau khi cung cấp, các con vật được cách ly 30 ngày.

Hàm lượng phân đoạn của tế bào lymphô TRBV9+ trong máu ngoại vi được ước tính sơ bộ để tạo ra nhóm động vật thử nghiệm và nhóm động vật đối chứng. Lấy máu từ tĩnh mạch của các động vật vào ống chân không EDTA (Vacuette, Greiner Bio-One, Áo) với lượng 4 ml/ống. Sau đó, phân đoạn tế bào đơn nhân (1,077 g/cm³ PanEco, Nga) được phân lập theo gradien Ficoll. Để xác định kiểu hình miễn dịch, các tác giả sáng chế sử dụng 100000 tế bào, được bổ sung 1µl kháng thể kháng CD8 PE/Cy5 (dòng RPA-T8) có bán trên thị trường (BioLegend, Mỹ), kháng thể kháng CD4-Alexa Fluor 488 (dòng S3.5) (Thermo Fisher, Mỹ) và kháng thể kháng CD2-PerCP Cy 5.5 (dòng RPA-2.10) (BioLegend, Mỹ), kháng thể kháng TcRVβ1 (TRBV9)-PE (Beckman Coulter, Mỹ), được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút và rửa 2 lần bằng thể tích tương đương của dung dịch Hanks. Các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị phân loại tế bào FACS Aria III (Mỹ).

Đối với thời gian thử nghiệm, các con khỉ đã chọn được nuôi trong lồng kim loại riêng biệt có trang bị thùng đựng thức ăn, giá kẹp nhãn, mỗi lồng 1 con. Chế độ ăn được thiết lập từ thức ăn chứa tất cả các thành phần trộn sẵn, trái cây, rau theo tiêu chuẩn chế độ ăn trung bình. Các con khỉ được cung cấp nước từ nguồn nước trung tâm.

Dựa trên các kết quả phân tích đếm tế bào với các kháng thể đối với các yếu tố xác định bề mặt tế bào lymphô chính (CD4, CD8, CD2), các con khỉ được chia thành ba nhóm với 4 con/nhóm, bao gồm cả nhóm đối chứng. Nhóm đối chứng của các con khỉ được cho sử dụng globulin miễn dịch của người qua đường trong tĩnh mạch ("Immunovenin", Microgen, Nga).

Hai nhóm thử nghiệm được cho sử dụng MA-042 với liều 1 và 10 mg/con tương ứng

để nghiên cứu so sánh về tỷ lệ phần trăm (%) của các tế bào T TRBV9+ trong máu ngoại vi của khỉ redut (*Macaca mulatta*) theo hàm số của liều dùng sản phẩm. "Immunovenin" được pha loãng bằng nước vô khuẩn theo hướng dẫn và được sử dụng với nồng độ 10mg/con. Sản phẩm MA-042 được pha loãng bằng nước muối đệm phosphat của Dulbecco (DPBS) mà không chứa canxi và magie. Các sản phẩm được sử dụng vào tĩnh mạch trụ của chân trước bên phải với thể tích không quá 5ml cho mỗi lần tiêm.

Khoảng thời gian quan sát kéo dài 42 ngày. Các mẫu máu được lấy ở thời điểm như được thể hiện trong Bảng 3. Việc xác định kiểu hình miễn dịch và phân tích mẫu được thực hiện như đã mô tả trên đây.

Bảng 3. Sơ đồ lấy mẫu máu toàn phần để xác định tỷ lệ phần trăm (%) của TRBV9+ trong các tế bào T.

Tuần	Ngày	Giờ	Lưu ý
1	1	0	Ban đầu (trước khi sử dụng lần đầu tiên)
1	4	72	72 giờ sau khi sử dụng
1	7	144	144 giờ sau khi sử dụng
3	15	336	336 giờ sau khi sử dụng
4	25	576	576 giờ sau khi sử dụng
6	42	984	984 giờ sau khi sử dụng

Kết quả là 72 giờ sau khi sử dụng MA-042, các con khỉ có sự loại bỏ gần như hoàn toàn TRBV9+ trong máu ngoại vi ở cả hai nồng độ. Phát hiện được một phần tế bào lymphô TRBV9+ ở thời điểm 336 giờ sau khi sử dụng sản phẩm với nồng độ 1 mg/con. Không phát hiện được các tế bào lymphô TRBV9+ ở các con khỉ được cho sử dụng sản phẩm với liều 10mg. 42 ngày sau khi sử dụng, không phát hiện được trường hợp nào có tế bào lymphô TRBV9+ ở các nhóm thử nghiệm; nhóm đối chứng có cùng nồng độ tế bào lymphô TRBV9+ như trước khi thử nghiệm.

Ví dụ 8. Bào chế dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế

Dược phẩm được bào chế bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn là đã biết trong lĩnh vực này.

Các thành phần của dược phẩm được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Nồng độ của các thành phần của dược phẩm

Thành phần	Nồng độ
Kháng thể MA-042	10-50 mg/ml
Chất đệm xitrat 10mM để điều chỉnh độ pH	6,0-7,0
Natri clorua	50-150 mM
Sucroza, trehaloza	0,3-0,5%
Nước dùng để tiêm	lượng cho đủ 1ml

Ví dụ 9. Kit chứa dược phẩm có kháng thể

Để tạo ra các kit với dạng liều dùng chứa thành phần kháng thể MA-042, dược phẩm được bào chế theo Ví dụ 5 được bịt kín trong ampun hoặc bơm tiêm 1ml trong các điều kiện vô khuẩn, được gắn nhãn và đóng gói vào đồ chứa bằng nhựa hoặc bìa các tông.

Ngoài ra, hướng dẫn sử dụng được đưa vào đồ chứa dạng ampun.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta họ TRBV-9 của thụ thể tế bào T của người, bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được thể hiện trong trình tự SEQ ID No: 16 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được thể hiện trong trình tự SEQ ID No: 18.

2. Kháng thể đơn dòng theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 20 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 22.

3. Kháng thể đơn dòng theo điểm 2, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG có chiều dài đầy đủ.

4. Axit nucleic mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với vùng chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể T của người.

5. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 4.

6. Phương pháp tạo ra tế bào chủ để tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, phương pháp này bao gồm bước đồng biến nạp tế bào với vector theo điểm 5.

7. Tế bào chủ để tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó tế bào này chứa axit nucleic theo điểm 4.

8. Phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 7 trong môi trường sinh trưởng trong điều kiện đảm bảo tạo ra kháng thể nêu trên, sau đó phân lập và tinh chế kháng thể thu được.

9. Dược phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn do vùng chuỗi beta họ TRBV9 của thụ thể T của người làm trung gian gây ra, trong đó dược phẩm này chứa lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng.

10. Dược phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn do thụ thể tế bào T của người mang chuỗi beta họ TRBV9 làm trung gian gây ra, trong đó dược phẩm này chứa lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 và ít nhất một hợp chất có hoạt tính điều trị khác với lượng có hiệu quả điều trị.

11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó hợp chất có hoạt tính điều trị khác được chọn từ phân tử nhỏ, kháng thể hoặc các hormon steroid.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JSC "BIOCAD"

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI TRBV9 CỦA NGƯỜI

<130> MA042.docx

<150> RU 2018146029

<151> 2019-12-24

<160> 22

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự vùng HCDR1 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 1

Asp Tyr Leu Val His

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự vùng HCDR2 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự vùng HCDR3 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 3

Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự vùng LCDR1 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 4

Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự vùng LCDR2 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 5

Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự vùng LCDR3 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 6

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của miền biến đổi
 của chuỗi nặng của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 7
 caaatacaac tgggtgcagag cgggccagaa ttgagagaac ccggagaatc tgtgaagctg 60
 agttgtaagg ccagcggata cactttcact gactatctcg tgactgggt gaaacaggct 120
 cccggttaagg gattgaaatg gatgggatgg atcaatactt ataccggcac acctacatat 180
 gcagacgatt tcgaggggcg atttgtgttc agtttgagg cctctgccag cacggcgaac 240
 ctgcagatat cgaatctcaa gaatgaggac accgccacgt atttctgcgc tagatcttgg 300

agacgcggat tgaaggtat cggattcgac tactggggac aaggcgtctt cgtgactgta 360
tcatcc 366

<210> 8
<211> 122
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi
của chuỗi nặng của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 8

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

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

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 321
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit của miền biến đổi chuỗi nhẹ
của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 9
gatgtacaga tgacacaatc accctacaac cttgctgctt cccctgggga aagtgtcagt 60

atcaattgca aggcacgcgaa gtcgatcaac aagtatcttg cgtgggtatca gcagaagcca 120
 ggaaagccca acaagctcct gatctatgac ggctctacac tgcaatctgg cataccttcg 180
 cggttttctg gctcggggtc cgggactgac ttactctta caatacgagg acttgaaccc 240
 gaagacttcg gcctgtatta ctgccagcag cacaatgagt atccacctac cttcggggct 300
 ggcaccaagt tggagcttaa g 321

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ
 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 10

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

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 11
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ
 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 11
 gacgtgcaga tgaccagtc ccctacaac ctggccgcct ccccggcga gtccgtgtcc 60

```

atcaactgca aggcctccaa gtccatcaac aagtaacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaagccca acaagctgct gatctacgac ggctccaccc tgcagtcggg catcccctcc 180
aggttctccg gctccggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagggg cctggagccc 240
gaggacttcg gcctgtacta ctgccagcag cacaacgagt accccccac cttcggcgcc 300
ggcaccaagc tggagctgaa gcgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtcgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgtcctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagag 639

```

<210> 12
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ
 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 12

```

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

```

```

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
          20           25           30

```

```

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

```

```

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

```

```

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

```

```

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro
          85           90           95

```

```

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

```

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu
 210

<210> 13
 <211> 1365
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của chuỗi nặng
 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 13
 cagatccagc tgggtgcagtc cggccccgag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
 cccggcaagg gcctgaagt gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
 gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac 240
 ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
 aggaggggcc tgaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg 360
 tcctccgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 420
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgcctacag 540
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660
 gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc 720

```

ctggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc      780
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag      840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag      900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccc tcctgcacca ggactggctg      960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa     1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc      1080
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc     1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg      1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag      1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac     1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gataa                      1365

```

<210> 14
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng
 của kháng thể bố-mẹ TRBV9-2

<400> 14

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

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

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

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

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

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 15
<211> 366
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit của chuỗi nặng biến đổi
của kháng thể MA-042

<400> 15
caggtgcaac ttgttcagtc ggggagcgaa cttaagaagc caggggaaag tgtaaaagtg 60
agctgcaaag cctcaggcta cacgtttacc gattatcttg tgcatgggt tagacaggct 120
ccaggccaag gactggaatg gatgggatgg atcaatacct atacaggac acccacatat 180
gccgatgact ttgagggacg gtttgtcttc tcacttgata ccagtgtttc cactgctaac 240
ctccagataa gcagcctgaa ggagaggac accgccgttt atttctgcgc ccgatcatgg 300
aggagaggct tgcgaggaat tggattcgat tactggggtc agggcacttt agtcactgtc 360
tctagc 366

<210> 16
<211> 122
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của miền biến đổi

của chuỗi nặng của kháng thể bố-mẹ MA-042

<400> 16

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ biến đổi
của kháng thể MA-042

<400> 17

gacatacaga tgactcaaag cccttattcg ctcagtgcgt cggtcgggga cagagtaacc 60

atcacctgca aggcgtcaaa gtcaatcaat aagtatctgg cgtgggtcca gcagaagcca 120

ggaaagccta acaagctatt aatatacgat gggcttacc tccaatccgg ggtcccttca 180

cgattttctg gaagcggctc aggaaccgat ttcacgctga ccatcagtag cttggagcct 240

gaggactttg ccacttatta ttgccagcag cacaacgagt atcctcccac cttcggacag 300

ggtacaaaac tggagatcaa g 321

<210> 18

<211> 107

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi
 của kháng thể MA-042

<400> 18

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 19
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể MA-042

<400> 19

caggtgcaac ttgttcagtc ggggagcgaa cttagaagc caggggaaag tgtaaaagtg 60
 agctgcaaag cctcaggcta cacgtttacc gattatcttg tgcattgggt tagacaggct 120
 ccaggtcaag gactggaatg gatgggatgg atcaatacct atacaggac acccacatat 180
 gccgatgact ttgagggacg gtttgccttc tcacttgata ccagtgttc cactgctaac 240
 ctccagataa gcagcctgaa ggcagaggac accgccgtt atttctgcgc ccgatcatgg 300
 aggagaggcc tacgaggaat cggattcgat tactggggtc agggcacttt agtcactgtc 360
 tctagcgcta gcaccaaggc cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 420
 tctgggggca cagcgccctt gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt 660
 gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 720
 gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgag ggaggagcag 900
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1020
 atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
 tacacgcaga aaagcctctc cctgtccccg ggtaaa 1356

<210> 20

<211> 452

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể MA-042

<400> 20

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

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

Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Trp	Arg	Arg	Gly	Leu	Arg	Gly	Ile	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
			165						170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
		275					280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 21
<211> 642
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể MA-042

<400> 21
gacatacaga tgactcaaag cccttattcg ctcagtgcgt cggtcgggga cagagtaacc 60
atcacctgca aggcgtcaaa gtcaatcaat aagtatctgg cgtgggtcca gcagaagcca 120
ggaaagccta acaagctatt aatatacgat gggctctacc tccaatccgg ggtcccttca 180
cgattttctg gaagcggctc aggaaccgat ttcacgctga ccatcagtag cttggagcct 240
gaggactttg ccacttatta ttgccagcag cacaacgagt atcctcccac cttcggacag 300
ggtacaaaac tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 22
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể MA-042

<400> 22

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

1/3

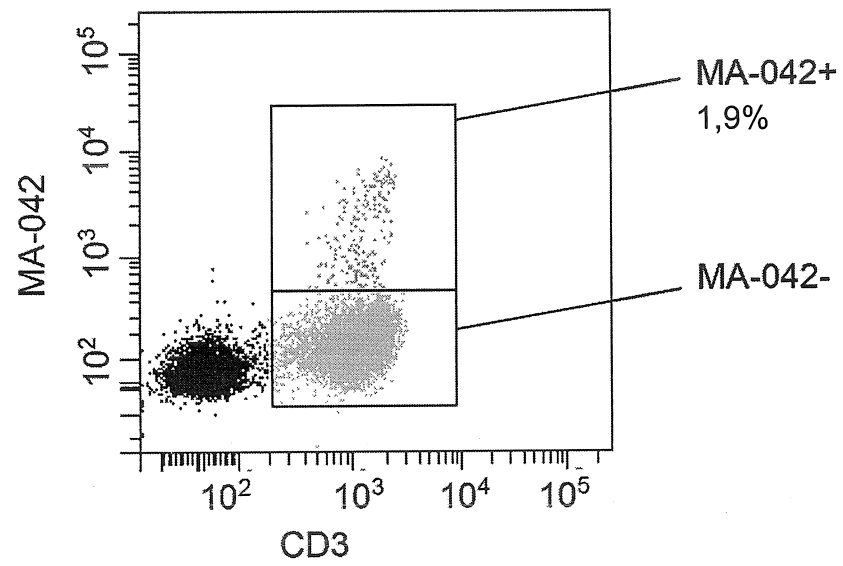


Fig.1

2/3

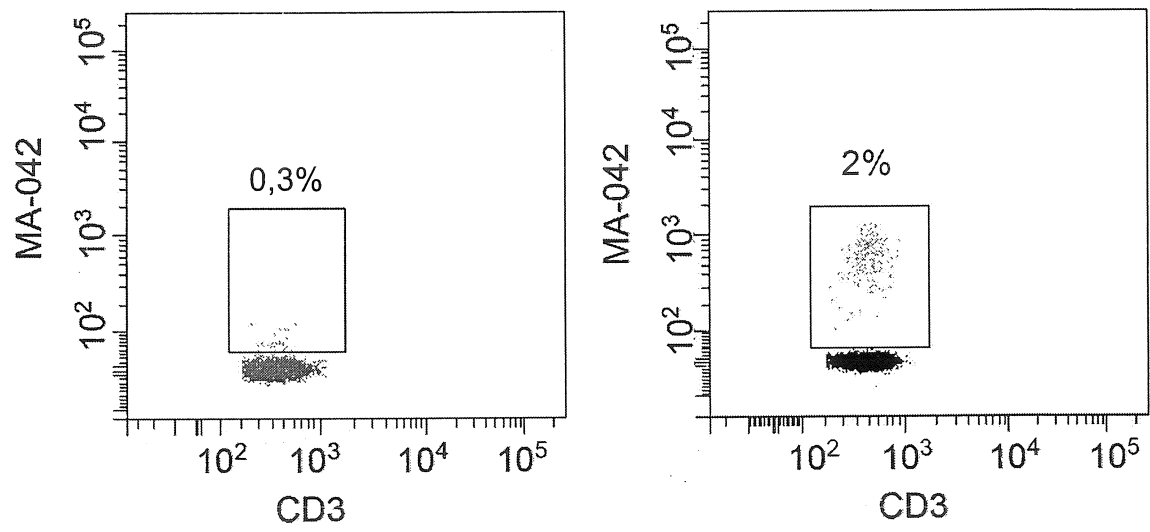


Fig.2

3/3

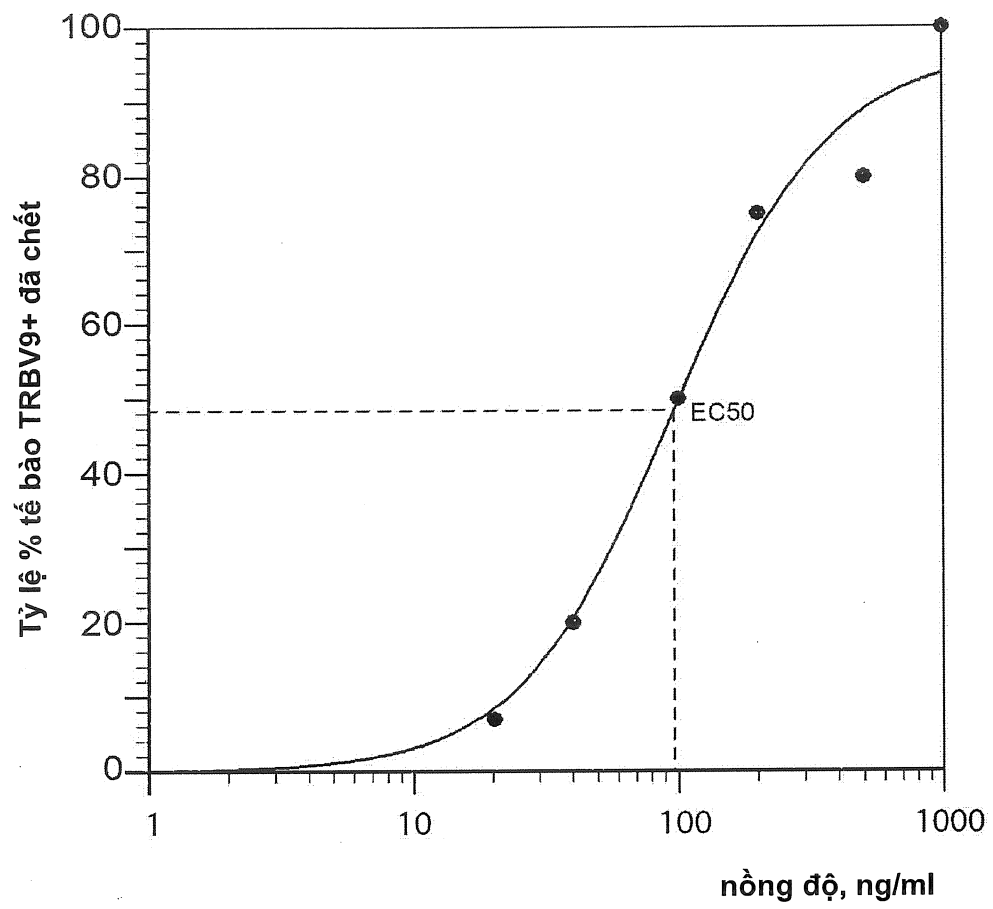


Fig.3