



(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) 
1-0019861

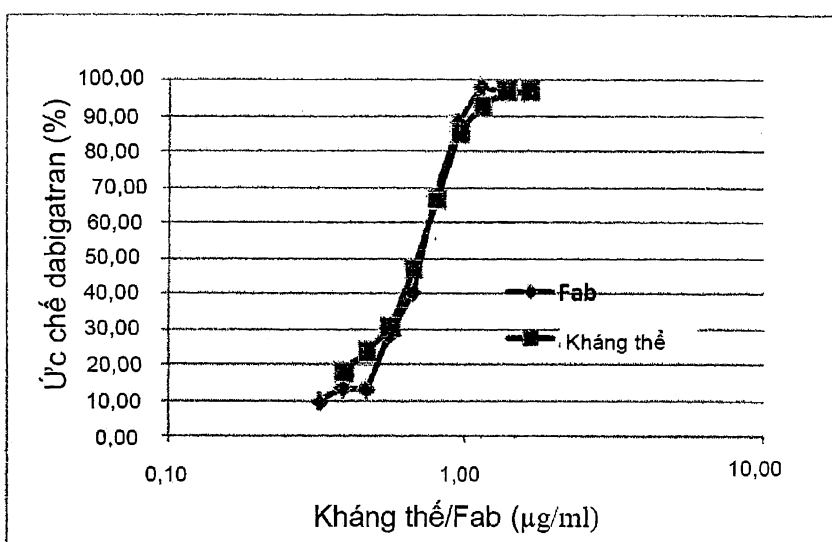
(51)⁷ **A61K 39/00, C07K 16/44**

(13) **B**

- (21) 1-2012-02464 (22) 20.01.2011
(86) PCT/EP2011/050749 20.01.2011 (87) WO2011/089183 28.07.2011
(30) 10151239.0 20.01.2010 EP
61/383,914 17.09.2010 US
(45) 25.09.2018 366 (43) 26.11.2012 296
(73) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)
Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany
(72) VAN RYN, Joanne (CA), PARK, John Edward (US), HAUEL, Norbert (DE),
KUNZ, Ulrich (DE), LITZENBURGER, Tobias (DE), CANADA, Keith (US),
SINGH, Sanjaya (US), WATERMAN, Alisa (US)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) **PHÂN TỬ KHÁNG THỂ TRUNG HÒA HOẠT TÍNH CỦA CHẤT CHỐNG ĐÔNG, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ KIT BAO GỒM PHÂN TỬ KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến các phân tử kháng thể có tác dụng trung hòa hoạt tính của chất chống đông, cụ thể là dabigatran hữu dụng làm chất giải độc cho các chất chống đông đó. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất phân tử kháng thể này và kit chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y học, cụ thể đề cập đến lĩnh vực trị liệu chống đông.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chất chống đông là chất ngăn sự đông, nghĩa là, chúng ngăn không cho máu bị vón cục. Chất chống đông được sử dụng rộng rãi trong trị liệu cho con người làm thuốc điều trị các rối loạn đông máu, ví dụ để phòng ngừa chứng tạo huyết khối sâu trong tĩnh mạch, chứng nghẽn mạch phổi, chứng nhồi máu cơ tim và đột quỵ cấp một và cấp hai cho bệnh nhân.

Loại chất chống đông chủ yếu dùng qua đường miệng hoạt động bằng cách chống lại tác động của vitamin K, ví dụ coumarin mà bao gồm warfarin. Loại hợp chất thứ hai ức chế sự đông một cách gián tiếp qua đồng nhân tố như antitrombin III hoặc đồng nhân tố heparin II. Các chất chống đông này bao gồm một số sản phẩm heparin trọng lượng phân tử thấp mà xúc tác sự ức chế phần lớn yếu tố Xa (và đến trombin mức thấp hơn) thông qua antitrombin III (bemiparin, xertoparin, dalteparin, enoxaparin, nadroparin, parnaparin, reviparin, tinzaparin), oligosacarit mạch nhỏ hơn (fondaparinux, idraparinux) chỉ ức chế yếu tố Xa thông qua antitrombin III. Heparinoit (danaparoit, sulodexit, dermatan sulfat) hoạt động thông qua cả hai đồng nhân tố và ức chế cả hai yếu tố Xa và trombin. Loại thứ ba là chất ức chế đông trực tiếp. Chất ức chế yếu tố Xa trực tiếp bao gồm apixaban, edoxaban, otamixaban, rivaroxaban, và chất ức chế trombin trực tiếp bao gồm hirudin hóa trị hai (bivalirudin, lepirudin, desirudin), và các hợp chất đơn trị argatroban và dabigatran.

Máu vón cục là cơ chế sinh học làm ngừng chảy máu, tác dụng phụ của liệu pháp chống đông có thể là hiện tượng xuất huyết không mong muốn. Do đó, có mong muốn về chất giải độc có khả năng làm ngừng các hiện tượng xuất huyết liên quan đến chất chống đông này khi xảy ra xuất huyết (Zikria and Ansell, Current Opinion in

Hematology 2009, 16(5): 347-356). Một cách để đạt được điều này là bằng cách trung hòa hoạt tính của hợp chất chống đông trong cơ thể bệnh nhân sau khi sử dụng.

Các chất giải độc cho chất chống đông có thể sử dụng hiện nay là protamin (để trung hòa heparin) và vitamin K để trung hòa chất đối kháng vitamin K như warfarin. Huyết thanh tươi đông lạnh và yếu tố tái tổ hợp VIIa cũng đã được sử dụng làm chất giải độc không đặc hiệu cho bệnh nhân được điều trị bằng heparin trọng lượng phân tử thấp, có vết thương nghiêm trọng hoặc bị xuất huyết nặng (Lauritzen, B. et al, Blood, 2005, 607A-608A.). Cũng được đề cập đến các đoạn protamin (patent Mỹ số 6,624,141) và các peptit tổng hợp nhỏ (patent Mỹ số 6,200,955) làm heparin hoặc chất giải độc heparin trọng lượng phân tử thấp; và trombin mutein (patent Mỹ số 6,060,300) làm chất giải độc cho chất ức chế trombin. Các chất trung gian và dẫn xuất protrombin đã được báo cáo làm chất giải độc cho hirudin và các chất ức chế trombin tổng hợp (patent Mỹ số 5,817,309 và 6,086,871). Các chất ức chế yếu tố trực tiếp Xa, chất tương tự yếu tố bất hoạt Xa đã được đưa ra làm chất giải độc (WO2009042962). Hơn nữa, yếu tố tái tổ hợp VIIa đã được sử dụng để đảo ngược tác động của chất ức chế yếu tố Xa phụ thuộc antitrombin III gián tiếp như fondaparinux và idraparinux (Bijsterveld, NR et al, Circulation, 2002, 106: 2550-2554; Bijsterveld, NR et al, British J. of Haematology, 2004 (124): 653-658). Việc xem xét lại các phương pháp làm đảo ngược tác động của chất chống đông đã được đề xuất trong Schulman and Bijsterveld, Transfusion Medixin Reviews 2007, 21(1): 37-48.

Zikria và các đồng tác giả, Curr. Opin. Hematol. (tháng 9/2009), tập 16, số 5, trang 347-356 mô tả các ưu điểm của chất ức chế thrombin trực tiếp dabigatran và lưu ý rằng chưa có các chất giải độc chất ức chế thrombin trực tiếp.

Có nhu cầu về chất giải độc được cải thiện cho liệu pháp chống đông, và cụ thể về chất giải độc cho chất ức chế trombin trực tiếp như dabigatran mà cho đến nay vẫn chưa có chất giải độc cụ thể nào được bộc lộ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể có tính đặc hiệu liên kết với dabigatran.

Theo khía cạnh tham khảo mà không phải là một phần của sáng chế, chất chống đông là dị vòng có hai vòng được thể hai lần có công thức chung:

R_a - A - Het - B - Ar - E, (I)

trong đó:

A là nhóm carbonyl hoặc sulphonyl liên kết với gốc benzo, pyrido hoặc thieno của nhóm Het,

B là nhóm etylen trong đó nhóm metylen liên kết với nhóm Ar có thể được thay thế bằng nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh hoặc bằng nhóm $-NR_1-$, trong đó:

R_1 là nguyên tử hydro hoặc nhóm C_{1-4} -alkyl,

E là nhóm $R_bNH-C(=NH)-$, trong đó:

R_b là nguyên tử hydro, nhóm hydroxy, C_{1-9} -alkoxycarbonyl, xyclohexyloxy-carbonyl, phenyl- C_{1-3} -alkoxycarbonyl, benzoyl, p- C_{1-3} -alkyl-benzoyl hoặc nhóm pyridinoyl, đôi khi gốc etoxy ở vị trí 2- của nhóm C_{1-9} -alkoxycarbonyl đã đề cập ở trên có thể được thế thêm bằng nhóm C_{1-3} -alkylsulphonyl hoặc 2-(C_{1-3} -alkoxy)-etyl,

Ar là nhóm 1,4-phenylen tùy ý được thế bằng nguyên tử clo hoặc bằng nhóm metyl, etyl hoặc metoxy hoặc Ar là nhóm 2,5-thienylen,

Het là nhóm 1-(C_{1-3} -alkyl)-2,5-benzimidazolylen, 1-xyclopropyl-2,5-benzimidazolylen, 2,5-benzothiazolylen, 1-(C_{1-3} -alkyl)-2,5-indolylen, 1-(C_{1-3} -alkyl)-2,5-imidazo[4,5-b]pyridinylen, 3-(C_{1-3} -alkyl)-2,7-imidazo[1,2-a]pyridinylen hoặc 1-(C_{1-3} -alkyl)-2,5-thieno[2,3-d]imidazolylen và

R_a là nhóm R_2NR_3- , trong đó:

R_2 là nhóm C_{1-4} -alkyl mà có thể được thế bằng nhóm carboxy, C_{1-6} -alkyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, C_{1-3} -alkylsulphonylaminocarbonyl hoặc 1H-tetrazol-5-yl,

là nhóm C_{2-4} -alkyl được thế bằng nhóm hydroxy, benzyloxy, carboxy- C_{1-3} -alkylamino, C_{1-3} -alkoxycarbonyl- C_{1-3} -alkylamino, N-(C_{1-3} -alkyl)-carboxy- C_{1-3} -alkylamino hoặc nhóm N-(C_{1-3} -alkyl)- C_{1-3} -alkoxycarbonyl- C_{1-3} -alkylamino, đôi khi trong các nhóm đã đề cập ở trên nguyên tử cacbon ở vị trí α so với nguyên tử nito liên kế có thể không được thế,

R₃ là nhóm C₃₋₇-xycloalkyl, nhóm propargyl, trong đó phần không được thế có thể không được liên kết trực tiếp với nguyên tử nitơ của nhóm R₂NR₃, nhóm phenyl tùy ý được thế bằng nguyên tử flo hoặc clo, hoặc bằng nhóm methyl hoặc metoxy, nhóm pyrazolyl, pyridazolyl hoặc pyridinyl tùy ý được thế bằng nhóm methyl hoặc

R₂ và R₃ cùng với nguyên tử nitơ ở giữa chúng là nhóm xycloalkylenimino có từ 5 đến 7 cạnh, tùy ý được thế thêm bằng nhóm carboxy hoặc C₁₋₄-alkoxycarbonyl, vòng phenyl có thể được dung hợp thêm vào chúng, chất đồng phân hỗn hợp, chất đồng phân lập thể và muối của chúng.

Theo một khía cạnh tham khảo khác, chất chống đông là hợp chất được chọn từ:

- (a) N-phenyl-N-(2-carboxyetyl)-amit của axit 2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzthiazol-5-carboxylic,
- (b) -N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 2-[N-(4-amidinophenyl)-N-metyl-aminometyl]-benzthiazol-5-yl-carboxylic,
- (c) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (d) -N-phenyl-N-(3-hydroxycarbonylpropyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (e) -N-(2-pyridyl)-N-(hydroxycarbonylmetyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (f) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[2-(2-amidinothiophen-5-yl)etyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (g) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (h) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[2-(4-amidinophenyl)etyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (i) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[2-(4-amidinophenyl)etyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,

- (j) N-phenyl-N-[2-(1H-tetrazol-5-yl)ethyl]-amit của axit 1-metyl-2-[2-(4-amidinophenyl)ethyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (k) N-phenyl-N-[2-(1H-tetrazol-5-yl)ethyl]-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (l) -N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-N-metyl-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (m) N-(3-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-N-metyl-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic
- (n) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-N-metyl-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (o) N-phenyl-N-[(N-hydroxycarbonyl-etyl-N-metyl)-2-aminoetyl]-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic-,
- (p) N-(3-flophenyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (q) N-(4-flophenyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (r) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-phenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (s) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-phenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (t) N-phenyl-N-(2-metoxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)aminometyl]-indol-5-yl-carboxylic,
- (u) -N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)aminometyl]-thieno[2.3-d]imidazol-5-yl-carboxylic
- (v) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (w) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic-,

(x) -N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-ethyl)-amit, của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-phenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic-,

(y) N-(2-pyridyl)-N-(2-etoxycarbonyl-ethyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-[4-(N-n-hexyloxycarbonylamidino)phenyl]-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic-, và chất đồng phân hỗn hợp, chất đồng phân lập thể và muối của chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể kháng lại dabigatran, dabigatran exetilát, và/hoặc O-axylglucuronit của dabigatran.

Theo một khía cạnh khác, phân tử kháng thể là kháng thể đơn dòng, kháng thể người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, đoạn kháng thể, cụ thể là đoạn Fab, Fab', hoặc F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn, cụ thể là đoạn biến đổi chuỗi đơn (scFv), hoặc kháng thể kép (diabody).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể như được mô tả ở trên để sử dụng trong y học.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể như được mô tả ở trên để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa các tác dụng phụ của liệu pháp chống đông.

Theo một khía cạnh khác, tác dụng phụ là hiện tượng xuất huyết.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa các tác dụng phụ của liệu pháp chống đông, bao gồm đưa lượng hiệu quả phân tử kháng thể như đã mô tả ở trên vào cơ thể chủ thể cần điều trị hoặc ngăn ngừa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit bao gồm phân tử kháng thể như đã mô tả, cùng với đồ chứa và nhãn đánh dấu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Thời gian đông máu tăng theo nồng độ dabigatran tăng trong thử nghiệm thời gian đông máu trombin. Nồng độ 200nM làm tăng thời gian đông máu lên 5 lần trên đường cơ sở và được sử dụng trong bộ thử nghiệm lần thứ nhất và lần thứ hai. Sử dụng nồng độ 500nM (liều điều trị cao) trong bộ thử nghiệm cuối cùng.

Fig.2: Tất cả bốn kháng thể khác nhau cho dabigatran (A-D) đều làm trung hòa khả năng kéo dài thời gian đông máu của dabigatran trong huyết thanh người. Sự đông

máu ở đường cơ sở trong huyết thanh người là 10,9 giây, khi ủ trước dabigatran ở nồng độ 200nM với huyết thanh, thời gian đông máu được kéo dài đến 51 giây. Mỗi kháng thể bổ sung vào huyết thanh được ủ trước với 200nM dabigatran và được ủ thêm trong thời gian 5 phút. Sau đó bắt đầu thời gian đông máu trombin bằng cách bổ sung trombin vào. Mỗi kháng thể có thể làm đảo ngược thời gian đông máu của dabigatran ở các mức độ khác nhau. Dung dịch có nồng độ lớn nhất làm đảo ngược hoạt tính chống đông lớn nhất.

Fig.3: Đo được hiệu quả của việc tăng nồng độ của kháng thể đa dòng (kháng thể D) bổ sung vào huyết thanh người mà đã được ủ trước với dabigatran 200nM. Thời gian đông máu ở đường cơ sở là 11 giây, việc bổ sung dabigatran vào kéo dài thêm thời gian đông máu đến 63,7 giây. Sau đó thử nghiệm ảnh hưởng của việc pha loãng kháng thể tăng dần đến sự đảo ngược việc kéo dài thời gian đông máu của dabigatran. Nồng độ thấp nhất làm giảm thời gian đông máu trombin đến 43,9 giây. Các nồng độ cao hơn làm giảm hoàn toàn thời gian đông máu trombin đến mức ở đường cơ sở và dẫn đến trung hòa hoàn toàn hiệu quả chống đông của dabigatran. Việc bổ sung kháng thể đa dòng ở thể không đặc hiệu (hình vuông) vào không có tác dụng làm đảo ngược hiệu quả chống đông của dabigatran.

Fig.4: Đo hiệu quả của việc tăng nồng độ kháng thể đa dòng (kháng thể D) được bổ sung vào huyết thanh người mà đã được ủ trước với dabigatran 500nM. Thời gian đông máu ở đường cơ sở là 10,9 giây, việc bổ sung dabigatran có nồng độ cao hơn này vào kéo dài thêm thời gian đông máu đến 111,7 giây (tăng thêm khoảng 10 lần). Hiệu quả của việc pha loãng kháng thể hoặc dung dịch gốc ở tỷ lệ 1:2 làm đảo ngược hiệu quả kéo dài thời gian đông máu trombin của dabigatran theo cách phụ thuộc nồng độ. Nồng độ cao nhất cũng làm đảo ngược hoàn toàn thời gian đông máu trombin đến mức ở đường cơ sở và dẫn đến trung hòa hoàn toàn hiệu quả chống đông thậm chí ở các nồng độ điều trị cao của dabigatran.

Fig.5: Trình tự các vùng biến đổi của các chuỗi nặng của phân tử kháng thể kháng-dabigatran.

Fig.6: Trình tự các vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể kháng-dabigatran.

Fig.7: Kháng thể đơn dòng ở chuột (dòng vô tính 22) làm đảo ngược hiệu quả chống đông của dabigatran trong huyết thanh người và trong máu toàn phần ở người. Bổ sung các nồng độ kháng thể chuột tăng dần vào huyết thanh hoặc máu toàn phần của người mà đã được ủ trước với dabigatran 30nM. Bắt đầu thử nghiệm bằng cách bổ sung từ 1,5 đến 2U/mL trombin vào và đo thời gian đông máu. 100% hoạt tính dabigatran được xác định là sự chênh lệch về thời gian đông máu khi có mặt và vắng mặt của hợp chất. Kháng thể này ức chế sự kéo dài thời gian đông máu qua trung gian dabigatran một cách phụ thuộc liều lượng.

Fig.8: Fab ở chuột được tạo ra từ kháng thể dòng vô tính 22 làm đảo ngược hiệu quả chống đông của dabigatran trong huyết thanh người. Bổ sung tăng dần các nồng độ Fab ở chuột vào huyết thanh người mà đã được ủ trước với dabigatran 7nM. Kháng thể nguyên vẹn cũng được thử nghiệm làm đối chứng dương. Bắt đầu thử nghiệm bằng cách bổ sung 0,4U/mL trombin vào và đo thời gian đông máu. Sự ức chế 100% được xác định là sự ngăn chặn hoàn toàn việc tăng thời gian đông máu qua trung gian dabigatran. Fab ức chế sự kéo dài thời gian đông máu trong huyết thanh người do dabigatran một cách phụ thuộc liều lượng.

Fig.9: Kháng thể đơn dòng ở chuột (dòng vô tính 22) làm đảo ngược hiệu quả chống đông của dabigatran axylglucuronit trong huyết thanh người. Bổ sung tăng dần các nồng độ kháng thể ở chuột vào huyết thanh người mà đã được ủ trước với dabigatran axylglucuronit hoặc dabigatran 7nM. Bắt đầu thử nghiệm bằng cách bổ sung 0,4U/mL trombin vào và đo thời gian đông máu. Sự ức chế 100% được xác định là sự ngăn chặn hoàn toàn việc tăng thời gian đông máu qua trung gian dabigatran. Kháng thể này ức chế sự kéo dài thời gian đông máu trong huyết thanh người qua dabigatran axylglucuronit một cách phụ thuộc liều lượng.

Fig.10: Fab đã được làm giống như của người (Fab 18/15) làm đảo ngược hiệu quả chống đông của dabigatran trong huyết thanh người. Bổ sung tăng dần các nồng độ Fab 18/15 vào huyết thanh người mà đã được ủ trước với dabigatran 7nM. Bắt đầu thử nghiệm bằng cách bổ sung 0,4U/mL trombin vào và đo thời gian đông máu. Sự ức chế 100% được xác định là sự ngăn chặn hoàn toàn việc tăng thời gian đông máu qua trung gian dabigatran. Fab ức chế sự tăng thời gian đông máu trong huyết thanh người do dabigatran một cách phụ thuộc liều lượng.

Fig.11: Thời gian đông máu trombin của máu toàn phần *ex vivo* (trombin 3,0U/mL) trong các con chuột đã được nhận dabigatran khi truyền liên tục bằng truyền tĩnh mạch nhanh Fab đẳng mol ở thời gian $t=0$. Đường có các hình tròn đặc thể hiện sự điều trị bằng chất dẫn mà không có thuốc. Đường có các hình vuông đặc thể hiện hoạt tính chống đông của dabigatran mà không có Fab. Đường có các hình tam giác đặc thể hiện hoạt tính chống đông sau khi sử dụng Fab. Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SE, $n=4$ con vật trong một nhóm điều trị.

Fig.12: aPTT của máu toàn phần *ex vivo* trong các con chuột đã được nhận dabigatran khi truyền liên tục bằng truyền tĩnh mạch nhanh Fab đẳng mol ở thời gian $t=0$. Đường có các hình tròn đặc thể hiện sự điều trị bằng chất dẫn mà không có thuốc. Đường có các hình vuông đặc thể hiện hoạt tính chống đông của dabigatran mà không có Fab. Đường có hình tam giác đặc thể hiện hoạt tính chống đông sau khi sử dụng Fab. Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SE, $n=4$ con vật trong một nhóm điều trị.

Fig.13: Thời gian đông máu trombin của máu toàn phần *ex vivo* (trombin 3,0U/mL) trong các con chuột đã được nhận dabigatran khi truyền liên tục bằng truyền tĩnh mạch nhanh các liều lượng Fab tăng dần ở thời gian $t=0$. Đường có các hình tròn đặc thể hiện sự điều trị bằng chất dẫn mà không có thuốc. Đường có các hình vuông đặc thể hiện hoạt tính chống đông của dabigatran mà không có Fab. Đường có các hình tam giác đặc thể hiện hoạt tính chống đông sau khi sử dụng đẳng mol Fab và đường nét đứt thể hiện 50% của liều đẳng mol. Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SE, $n=4$ con vật trong một nhóm điều trị.

Fig.14: aPTT của máu toàn phần *ex vivo* trong các con chuột đã được nhận dabigatran khi truyền liên tục bằng truyền tĩnh mạch nhanh các liều Fab tăng dần ở thời gian $t=0$. Đường có các hình tròn đặc thể hiện sự điều trị bằng chất dẫn mà không có thuốc. Đường có các hình vuông đặc thể hiện hoạt tính chống đông của dabigatran mà không có Fab. Đường có các hình tam giác đặc thể hiện hoạt tính chống đông sau khi sử dụng Fab đẳng mol và đường nét đứt thể hiện 50% của liều đẳng mol. Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SE, $n=4$ con vật trong một nhóm điều trị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể có khả năng làm trung hòa hoạt tính của dabigatran.

Kháng thể (cũng được biết đến là globulin miễn dịch, viết tắt là Ig) là các protein gama globulin có thể tìm thấy trong máu hoặc trong các dịch thể của động vật có xương sống khác, và được hệ miễn dịch sử dụng để nhận biết và vô hiệu hóa các đối tượng lạ, như vi khuẩn và virus. Chúng được tạo thành về cơ bản từ các đơn vị cấu trúc cơ bản - mỗi chúng có hai chuỗi nặng lớn và hai chuỗi nhẹ nhỏ - để tạo thành, ví dụ, các monome có một đơn vị, các dime có hai đơn vị hoặc các pentame có năm đơn vị. Kháng thể có thể liên kết, bằng tương tác không đồng hóa trị với các phân tử hoặc các cấu trúc đã biết khác như kháng nguyên. Liên kết này là đặc hiệu trong trường hợp kháng thể sẽ chỉ liên kết với cấu trúc đặc hiệu bằng ái lực cao. Phần duy nhất của kháng nguyên được kháng thể nhận biết được gọi là epitop, hoặc phần quyết định kháng nguyên. Phần kháng thể liên kết với epitop đôi khi được gọi là paratop và ở trong vùng được gọi là biến đổi, hoặc vùng biến đổi (Fv) của kháng thể. Vùng biến đổi bao gồm ba vùng được gọi là vùng quyết định bổ trợ (CDR's) cách nhau bằng các vùng khung (FR's).

Trong ngữ cảnh sáng chế, việc đề cập đến vùng CDR dựa trên định nghĩa của Chothia (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196: 901–917), cùng với Kabat (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller and H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda (1983)).

Lĩnh vực kỹ thuật này đã phát triển thêm được các kháng thể và làm cho chúng trở thành các công cụ đa năng trong y học và công nghệ. Do đó, trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ “phân tử kháng thể” hoặc “kháng thể” (trong bản mô tả này được sử dụng cùng nghĩa) không chỉ bao gồm các kháng thể như có thể tìm thấy trong tự nhiên, bao gồm ví dụ hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, hoặc chỉ có hai chuỗi nặng như trong các loài lạc đà, mà còn bao gồm thêm toàn bộ các phân tử có ít nhất một paratop có liên kết đặc hiệu với kháng nguyên và có cấu trúc tương tự với vùng biến đổi của globulin miễn dịch.

Do đó, phân tử kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đơn dòng, kháng thể người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, đoạn kháng thể, cụ

thể là đoạn Fv, Fab, Fab', hoặc F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn, cụ thể là đoạn biến đổi chuỗi đơn (scFv), phân tử được miễn dịch mô đun nhỏ (SMIP) hoặc kháng thể kép.

Các kháng thể đa dòng thể hiện tập hợp các phân tử kháng thể có trình tự axit amin khác nhau và có thể thu được từ máu của động vật có xương sống sau khi gây miễn dịch bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các kháng thể đơn dòng (mAb hoặc moAb) là các kháng thể đặc hiệu đơn có trình tự axit amin giống nhau. Chúng có thể được sản xuất ra bằng kỹ thuật lai từ dòng tế bào lai (gọi là tế bào lai) thể hiện dòng có sự dung hợp của tế bào B mà sản xuất kháng thể đặc hiệu với tế bào u tủy (tế bào ung thư B) (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.). Ngoài ra, kháng thể đơn dòng có thể được sản xuất bằng sự biểu hiện tái tổ hợp trong các tế bào chủ (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (May 1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells.". *J Immunol Methods* 204 (1): 77–87; cũng được xem dưới đây).

Để áp dụng cho người, thường mong muốn giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác, như chuột. Có thể thực hiện được điều này bằng cách tạo cấu trúc kháng thể khảm, hoặc bằng quy trình gọi là “làm giống như của người”. Trong ngữ cảnh này, “kháng thể khảm” được hiểu là kháng thể bao gồm một phần trình tự (ví dụ vùng biến đổi) có nguồn gốc từ một loài (ví dụ chuột) được dung hợp với một phần trình tự (ví dụ vùng ổn định) có nguồn gốc từ một loài khác (ví dụ, người). “Kháng thể được làm giống như của người” là kháng thể bao gồm vùng biến đổi có nguồn gốc từ một loài không phải là người, trong đó các axit amin cụ thể bị đột biến để làm cho toàn bộ trình tự của vùng biến đổi đó tương đồng hơn với trình tự của vùng biến đổi ở người. Các phương pháp khảm hóa và làm giống như của người ở kháng thể đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (Billetta R, Lobuglio AF. “Chimeric antibodies”. *Int Rev Immunol.* 1993;10(2-3):165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). "Reshaping human antibodies for therapy". *Nature*: 332:323.).

Hơn nữa, đã phát triển được các kỹ thuật tạo ra kháng thể dựa trên các trình tự có nguồn gốc từ hệ gen của người, ví dụ bằng kỹ thuật biểu hiện trên thực khuẩn thể

hoặc bằng cách sử dụng động vật chuyển gen (WO 90/05144; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths and G. Winter (1991) "Bypassing immunisation. Human antibodies from V-gen libraries displayed on phage." *J.Mol.Biol.*, 222, 581-597; Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296: 57-86, 2000; S. Carmen and L. Jermutus, "Concepts in antibody phage display". *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2002 1(2):189-203; Lonberg N, Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice". *Int Rev Immunol.* 1995;13(1):65-93.; Brüggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice". *Curr Opin Biotechnol.* 1997 Aug;8(4):455-8.). Các kháng thể này là “kháng thể người” trong ngữ cảnh sáng chế.

Phân tử kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm các đoạn globulin miễn dịch mà giữ lại được các đặc tính liên kết kháng nguyên, như các đoạn Fab, Fab', hoặc F(ab')₂. Có thể thu được các đoạn này bằng cách phân đoạn các globulin miễn dịch, ví dụ bằng cách phân giải protein, hoặc bằng sự biểu hiện tái tổ hợp của các đoạn đó. Ví dụ, sự phân giải globulin miễn dịch có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật thông thường, ví dụ bằng cách sử dụng papain hoặc pepsin (WO 94/29348), hoặc endoproteinaza Lys-C (Kleemann, et al, *Anal. Chem.* 80, 2001-2009, 2008). Sự phân giải kháng thể bằng papain hoặc Lys-C về cơ bản sinh ra hai đoạn liên kết kháng nguyên giống hệt nhau, gọi là đoạn Fab, mỗi đoạn có một vị trí liên kết kháng nguyên đơn, và một đoạn Fc còn lại. Việc xử lý bằng pepsin tạo ra F(ab')₂. Phương pháp tạo ra các phân tử Fab bằng sự biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào chủ được chỉ ra chi tiết hơn ở dưới đây.

Một số kỹ thuật đã được phát triển để đưa các vùng biến đổi của globulin miễn dịch, hoặc đặt các phân tử có nguồn gốc từ các vùng biến đổi đó, vào trong một phân tử khác. Các phân tử khác này cũng được xem xét là “phân tử kháng thể” theo sáng chế. Thông thường, các phân tử kháng thể này có kích cỡ nhỏ hơn các globulin miễn dịch, và có thể bao gồm một chuỗi axit amin đơn hoặc bao gồm một số chuỗi axit amin. Ví dụ, đoạn biến đổi chuỗi đơn (scFv) là sự dung hợp của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch, liên kết với nhau bằng liên kết ngắn, thường là serin (S) hoặc glyxin (G) (WO 88/01649; WO 91/17271; Huston et al; *International Reviews of Immunology*, Tập 10, 1993, 195 - 217). “Kháng thể miễn đơn” hoặc “nanobody” có một vị trí liên kết kháng nguyên trong vùng đơn dạng Ig (WO 94/04678; WO 03/050531, Ward et al., *Nature.* 1989 Oct 12;341(6242):544-6;

Revets et al., *Expert Opin Biol Ther.* 5(1):111-24, 2005). Một hoặc nhiều kháng thể miễn đơn có tính đặc hiệu liên kết với cùng một kháng nguyên hoặc với các kháng nguyên khác nhau có thể liên kết với nhau. Các kháng thể kép là các phân tử kháng thể hóa trị hai gồm có hai chuỗi axit amin mà bao gồm hai miền biến đổi (WO 94/13804, Holliger et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6444-8). Ví dụ khác về các phân tử dạng kháng thể là kháng thể siêu họ globulin miễn dịch (IgSF; Srinivasan and Roeske, *Current Protein Pept. Sci.* 2005, 6(2): 185-96). Khái niệm khác đề cập đến phân tử được miễn dịch mô đun nhỏ (SMIP) mà bao gồm vùng Fv liên kết với khớp nối chuỗi đơn và các miền tác động không có vùng ổn định CH1 (WO 02/056910).

Theo một khía cạnh khác, phân tử kháng thể theo sáng chế có thể thậm chí chỉ có mối quan hệ cấu trúc rất nhỏ với vùng biến đổi globulin miễn dịch, hoặc không có mối quan hệ nào, miễn là nó có tính đặc hiệu liên kết và ái lực cụ thể so với vùng biến đổi globulin miễn dịch. Đôi khi “giả kháng thể” không phải globulin miễn dịch này được gọi là “protein khung”, có thể dựa trên các gen của protein A, lipocalin, vùng fibronectin, và vùng lặp liên ứng ankyrin, và thioredoxin (Skerra, *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18(4): 295-304). Một phương án được ưu tiên là các protein lặp ankyrin được thiết kế (DARPin's; Steinr et al., *J Mol Biol.* 2008 Oct 24;382(5): 1211-27; Stumpp MT, Amstutz P. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007 Mar;10(2):153-9).

Phân tử kháng thể có thể được dung hợp (như protein dung hợp) hoặc mặt khác được liên kết (bằng liên kết đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị) với các phân tử khác có tác động mong muốn đến đặc tính của phân tử kháng thể đó. Ví dụ, có thể mong muốn nâng cao đặc tính dược động học của các phân tử kháng thể, ví dụ tính ổn định trong dịch thể như máu, cụ thể trong trường hợp kháng thể chuỗi đơn hoặc kháng thể vùng. Về mặt này đã có một số kỹ thuật được bộc lộ, cụ thể để kéo dài thời gian bán rã của các phân tử kháng thể đó khi lưu thông, như sự pegyl hóa (WO 98/25971; WO 98/48837; WO 2004081026), dung hợp hoặc mặt khác liên kết đồng hóa trị phân tử kháng thể đó với phân tử kháng thể khác có ái lực với protein huyết thanh như albumin (WO 2004041865; WO 2004003019), hoặc biểu hiện của phân tử kháng thể đó là protein dung hợp với toàn bộ hoặc một phần protein huyết thanh như albumin hoặc transferrin (WO 01/79258).

Theo khía cạnh khác, phân tử kháng thể có tính đặc hiệu liên kết với chất chống đông dabigatran. “Tính đặc hiệu liên kết” nghĩa là phân tử kháng thể có ái lực liên kết

với chất chống đông cao hơn đáng kể so với các phân tử không có liên quan về mặt cấu trúc.

Ái lực là sự tương tác giữa một vị trí liên kết kháng nguyên đơn trên một phân tử kháng thể và một epitop đơn. Nó được biểu hiện bằng hằng số liên kết $K_A = k_{ass}/k_{diss}$, hoặc hằng số phân tách $K_D = k_{diss}/k_{ass}$.

Theo một khía cạnh của sáng chế, kháng thể liên kết với chất chống đông bằng ái lực, như đã xác định ví dụ bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (Malmqvist M., "Surfaxey plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", *Curr Opin Immunol.* 1993 Apr; 5(2):282-6.), có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 0,1pM đến 100μM, tốt hơn là từ 1pM đến 100μM, tốt hơn là từ 1pM đến 1μM. Cũng có thể đo được ái lực của kháng thể bằng cách sử dụng kỹ thuật thử nghiệm loại trừ động lực học (KinExA) (Darling, R.J., and Brault P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2004, Dec 2(6): 647-657).

Có thể tăng ái lực liên kết của phân tử kháng thể bằng quy trình đã biết như sự thuần thực ái lực (Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783; Barbas, et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813; Shier et al., 1995, *Gen* 169:147-155). Do đó sáng chế cũng bao gồm các kháng thể đã được thuần thực ái lực.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể có khả năng làm trung hòa hoạt tính của chất chống đông dabigatran. Nghĩa là, sau khi liên kết với phân tử kháng thể, chất chống đông không còn khả năng thể hiện hoạt tính chống đông của nó nữa, hoặc có hoạt tính này ở mức độ bị giảm đáng kể. Ưu tiên, hoạt tính chống đông giảm ít nhất 2 lần, 5 lần, 10 lần, hoặc 100 lần sau khi liên kết với kháng thể, khi được xác định trong thử nghiệm hoạt tính mà phù hợp với chất chống đông ở mô, cụ thể là thử nghiệm đông máu nhạy cảm với trombin, như thời gian đông ecarin hoặc thời gian đông máu trombin (H. Bounameaux, Marbet GA, Lammle B, et al. "Monitoring of heparin treatment. Comparison of thrombin time, activated partial thromboplastin time, and plasma heparin concentration, and analysis of the behaviour of antithrombin III". *American Journal of Clinical Pathology* 1980 74(1): 68-72).

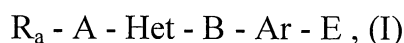
Để tạo ra các phân tử kháng thể theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể lựa chọn các phương pháp khác nhau đã biết rõ trong lĩnh

vực kỹ thuật này (Norderhaug et al., J Immunol Methods 1997, 204 (1): 77–87; Kipriyanow and Le Gall, Molecular Biotechnology 26: 39- 60, 2004; Shukla et al., 2007, J. Chromatography B, 848(1): 28-39).

Các chất chống đông đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như chỉ ra ở trên. Chất chống đông theo sáng chế là chất ức chế trombin trực tiếp. Các chất chống đông tham khảo là chất ức chế yếu tố Xa, hoặc chất đối kháng vitamin K. Ví dụ về chất đối kháng vitamin K là coumarin, bao gồm warfarin. Ví dụ về chất ức chế yếu tố Xa chủ yếu gián tiếp là nhóm heparin của các chất hoạt động thông qua sự hoạt hóa của antitrombin III bao gồm một số sản phẩm heparin trọng lượng phân tử thấp (bemiparin, certoparin, dalteparin, enoxaparin, nadroparin, parnaparin, reviparin, tinzaparin), các oligosacarit nhất định (fondaparinux, idraparinux), heparinoit (danaparoit, sulodexit, dermatan sulfat) cụ thể, và chất ức chế yếu tố Xa trực tiếp (apixaban, otamixaban, rivaroxaban). Ví dụ về chất ức chế trombin bao gồm các hirudin hóa trị hai (bivalirudin, lepirudin, desirudin), và các hợp chất argatroban và dabigatran hóa trị một.

Chất chống đông mà kháng thể theo sáng chế có tính đặc hiệu là dabigatran.

Theo một khía cạnh tham khảo mà không phải là một phần của sáng chế, chất chống đông là dị vòng có hai vòng được thể hai lần có công thức chung:



trong đó:

A là nhóm carbonyl hoặc sulphonyl liên kết với gốc benzo, pyrido hoặc thieno của nhóm Het,

B là nhóm etylen, trong đó nhóm metylen liên kết với nhóm Ar có thể được thay thế bằng nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh hoặc bằng nhóm $-\text{NR}_1-$, trong đó:

R_1 là nguyên tử hydro hoặc nhóm C_{1-4} -alkyl,

E là nhóm $\text{R}_b\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-$, trong đó:

R_b là nguyên tử hydro, nhóm hydroxy, C_{1-9} -alkoxycarbonyl, xyclohexyloxycarbonyl, phenyl- C_{1-3} -alkoxycarbonyl, benzoyl, p- C_{1-3} -alkyl-benzoyl hoặc nhóm pyridinoyl, đôi khi gốc etoxy ở vị trí 2 của nhóm C_{1-9} -alkoxycarbonyl đã

đề cập ở trên có thể được thế thêm bằng nhóm C_{1-3} -alkylsulphonyl hoặc $2-(C_{1-3}$ -alkoxy)-ethyl,

Ar là nhóm 1,4-phenylen tùy ý được thế bằng nguyên tử clo hoặc bằng nhóm methyl, ethyl hoặc metoxy hoặc Ar là nhóm 2,5-thienylen,

Het là nhóm 1-(C_{1-3} -alkyl)-2,5-benzimidazolylen, 1-xyclopropyl-2,5-benzimidazolylen, 2,5-benzothiazolylen, 1-(C_{1-3} -alkyl)-2,5-indolylen, 1-(C_{1-3} -alkyl)-2,5-imidazo[4,5-b]pyridinylen, 3-(C_{1-3} -alkyl)-2,7-imidazo[1,2-a]pyridinylen hoặc 1-(C_{1-3} -alkyl)-2,5-thieno[2,3-d]imidazolylen và

R_a là nhóm R_2NR_3 -, trong đó:

R_2 là nhóm C_{1-4} -alkyl mà có thể được thế bằng nhóm carboxy, C_{1-6} -alkyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, C_{1-3} -alkylsulphonylaminocarbonyl hoặc 1H-tetrazol-5-yl,

là nhóm C_{2-4} -alkyl được thế bằng nhóm hydroxy, benzyloxy, carboxy- C_{1-3} -alkylamino, C_{1-3} -alkoxycarbonyl- C_{1-3} -alkylamino, N-(C_{1-3} -alkyl)-carboxy- C_{1-3} -alkylamino hoặc nhóm N-(C_{1-3} -alkyl)- C_{1-3} -alkoxycarbonyl- C_{1-3} -alkylamino, đôi khi trong các nhóm đã đề cập ở trên nguyên tử cacbon ở vị trí α so với nguyên tử nitơ liền kề có thể không được thế,

R_3 là nhóm C_{3-7} -xycloalkyl, nhóm propargyl, trong đó phần không được thế có thể không được liên kết trực tiếp với nguyên tử nitơ của nhóm R_2NR_3 , nhóm phenyl tùy ý được thế bằng nguyên tử flo hoặc clo, hoặc bằng nhóm methyl hoặc metoxy, nhóm pyrazolyl, pyridazolyl hoặc pyridinyl tùy ý được thế bằng nhóm methyl hoặc

R_2 và R_3 cùng với nguyên tử nitơ ở giữa chúng là nhóm xycloalkylenimino có từ 5 đến 7 cạnh tùy ý được thế bằng nhóm carboxy hoặc C_{1-4} -alkoxycarbonyl, vòng phenyl có thể được dung hợp thêm vào chúng,

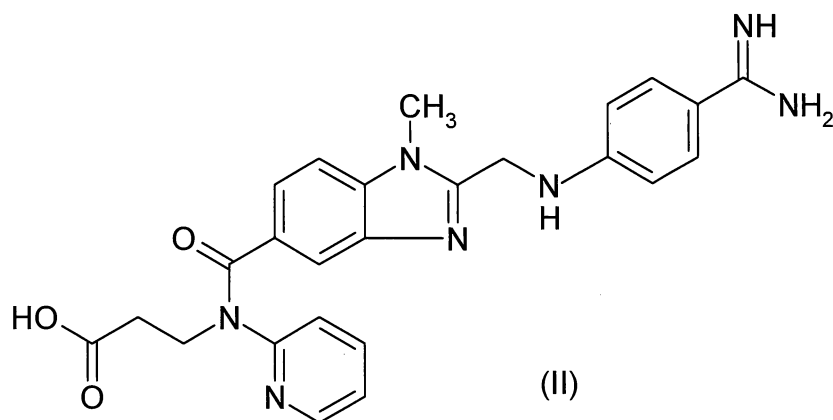
chất đồng phân hỗn hợp, chất đồng phân lập thể và muối của chúng. Hợp chất có công thức (I), quy trình điều chế các hợp chất này và việc sử dụng chúng làm chất chống đông đã được mô tả trong WO 98/37075.

Theo một phương án khác, chất chống đông là hợp chất được chọn từ

- (a) N-phenyl-N-(2-carboxyethyl)-amit của axit 2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzthiazol-5-carboxylic -,
- (b) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 2-[N-(4-amidinophenyl)-N-metyl-aminometyl]-benzthiazol-5-yl-carboxylic,
- (c) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (d) N-phenyl-N-(3-hydroxycarbonylpropyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (e) N-(2-pyridyl)-N-(hydroxycarbonylmetyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (f) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[2-(2-amidinothiophen-5-yl)etyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (g) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (h) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[2-(4-amidinophenyl)etyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (i) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[2-(4-amidinophenyl)etyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (j) N-phenyl-N-[2-(1H-tetrazol-5-yl)etyl]-amit của axit 1-metyl-2-[2-(4-amidinophenyl)etyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (k) N-phenyl-N-[2-(1H-tetrazol-5-yl)etyl]-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (l) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-N-metyl-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (m) N-(3-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-N-metyl-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (n) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-N-metyl-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,

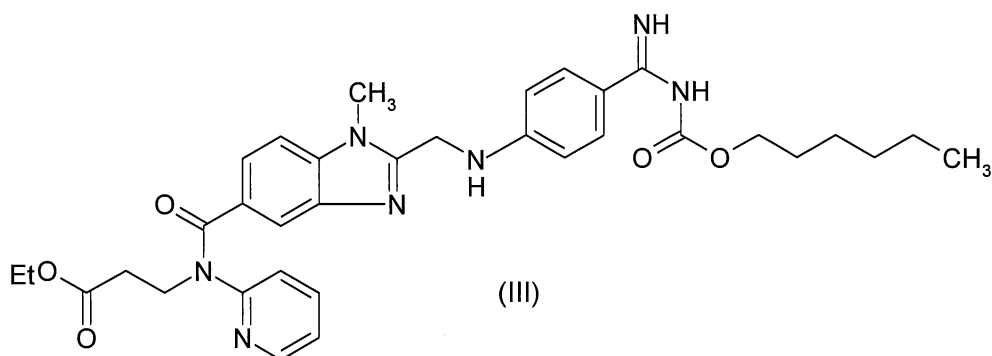
- (o) N-phenyl-N-[(N-hydroxycarbonyletyl-N-metyl)-2-aminoetyl]-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic-,
- (p) N-(3-flophenyl)-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (q) N-(4-flophenyl)-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (r) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-phenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (s) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-phenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (t) N-phenyl-N-(2-metoxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)aminometyl]-indol-5-yl-carboxylic,
- (u) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)aminometyl]-thieno[2.3-d]imidazol-5-yl-carboxylic,
- (v) N-phenyl-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (w) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic-,
- (x) N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidino-2-metoxi-phenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic,
- (y) N-(2-pyridyl)-N-(2-etoxycarbonyletyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-[4-(N-n-hexyloxycarbonylamidino)phenyl]-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic, và chất hồ biến, chất đồng phân và muối của chúng, tất cả chúng đều đã được mô tả trong WO 98/37075.

Chất chống đông được ưu tiên trong ngữ cảnh sáng chế là dabigatran (CAS 211914-51-1, N-[2-(4-Amidinophenylaminometyl)-1-metyl-1*H*-benzimidazol-5-ylcarbonyl]-N-(2-pyridyl)-beta-alanin) có công thức hóa học (II):



Dabigatran đã được biết đến trong WO 98/37075, mà bộc lộ các hợp chất có hiệu quả ức chế trombin và có hiệu quả kéo dài thời gian trombin, có tên N-(2-pyridyl)-N-(2-hydroxycarbonyl-etyl)-amit của axit 1-metyl-2-[N-(4-amidinophenyl)-aminometyl]-benzimidazol-5-yl-carboxylic. Cũng xem trong Huel et al. J Med Chem 2002, 45 (9): 1757–66.

Dabigatran được dùng làm tiền dược chất có công thức (III):



Hợp chất có công thức III (được đặt tên là dabigatran etexilat, CAS 211915-06-9; etyl 3-[(2-{[4-(hexyloxycarbonylamino-imino-metyl)-phenylamino]-metyl}-1-metyl-1*H*-benzimidazol-5-carbonyl)-pyridin-2-yl-amino]-propionat) được chuyển thành hợp chất hoạt tính (II) sau khi đưa vào cơ thể. Dạng đa hình ưu tiên của dabigatran etexilat là dabigatran etexilat mesylat.

Các chỉ định chính cho dabigatran là ngăn ngừa chứng tạo huyết khối sâu trong tĩnh mạch sau khi mổ, điều trị chứng tạo huyết khối sâu trong tĩnh mạch đã hình thành và ngăn ngừa đột quỵ ở bệnh nhân bị rung tâm nhĩ (Eriksson et al., Lancet 2007, 370 (9591): 949–56; Schulman S et al, N Engl J Med 2009, 361 (24): 2342-52; Connolly S et al., N Engl J Med 2009, 361 (12): 1139–51; Wallentin et al., Lancet 2010, 376 (9745): 975-983).

Trong cơ thể người, sự glucuronit hóa gốc carboxylat là con đường chuyển hóa dabigatran chủ yếu ở người (Ebner et al., Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75). Điều này dẫn đến tạo thành 1-O-axylglucuronit (beta anome). 1-O-axylglucuronit, ngoài sự thủy phân không đáng kể thành aglycon, có thể phải chịu sự chuyển vị axyl không do enzym trong dung dịch chứa nước, dẫn đến tạo ra 2-O-, 3-O-, và 4-O-axylglucuronit. Các thử nghiệm với 1-O-axylglucuronit đã tinh chế và các sản phẩm được sắp xếp lại theo đồng phân của chúng thể hiện sự kéo dài đáng kể về thời gian tromboplastin từng phần đã hoạt hóa so với dabigatran.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể liên kết với cả dabigatran và dabigatran etexilat.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể liên kết với cả dabigatran và O-axylglucuronit của dabigatran, cụ thể là 1-O-axylglucuronit của dabigatran.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể liên kết thêm với 2-O-, 3-O-, và 4-O-axylglucuronit của dabigatran.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể có khả năng trung hòa hoạt tính của dabigatran và O-axylglucuronit của dabigatran, cụ thể là 1-O-axylglucuronit của dabigatran.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể có tính đặc hiệu liên kết với dabigatran và bao gồm các trình tự CDR như chỉ ra trong các Fig.5 và 6.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể bao gồm các trình tự CDR chuỗi nặng như chỉ ra trong Fig.5, và các trình tự CDR chuỗi nhẹ như chỉ ra trong Fig.6.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng như chỉ ra trong Fig.5, và trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ như chỉ ra trong Fig.6.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể bao gồm các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng được chỉ ra có ký hiệu Eng VH# 15 trong Fig.5, và các trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ được chỉ ra có ký hiệu Eng VK# 18 trong Fig.6.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể có tính đặc hiệu liên kết với dabigatran và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có CDR1 có SEQ ID NO: 1, CDR2 có SEQ ID NO: 7, và CDR3 có SEQ ID NO: 10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có CDR1 có SEQ ID NO: 13, CDR2 có SEQ ID NO: 14, và CDR3 có SEQ ID NO: 15.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là phân tử scFv. Ở dạng này, miền biến đổi được bộc lộ trong bản mô tả có thể được dung hợp với nhau bằng liên kết peptit phù hợp, ví dụ các miền biến đổi được chọn từ nhóm có SEQ ID NO: 28, 29, 30, hoặc 31. Cấu trúc này có thể bao gồm các phân tử theo thứ tự, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, (miền biến đổi chuỗi nặng)-(liên kết peptit)-(miền biến đổi chuỗi nhẹ), hoặc (miền biến đổi chuỗi nhẹ)-(liên kết peptit)-(miền biến đổi chuỗi nặng).

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là phân tử scFv có SEQ ID NO: 32, hoặc SEQ ID NO: 33. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là phân tử scFv có SEQ ID NO: 32, hoặc SEQ ID NO: 33.

Các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này cho phép sự biểu hiện tái tổ hợp axit nucleic mà mã hóa cấu trúc sFv trong tế bào chủ (như *E. coli*, *Pichia pastoris*, hoặc dòng tế bào động vật có vú, ví dụ CHO hoặc NS0), thu được các phân tử scFv chức năng (ví dụ xem Rippmann et al., *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(12): 4862-4869; Yamawaki et al., *J. Biosci. Bioeng.* 2007, 104(5): 403-407; Sonoda et al., *Protein Expr. Purif.* 2010, 70(2): 248-253).

Cụ thể, phân tử kháng thể scFv theo sáng chế có thể được tạo ra như sau. Các cấu trúc này có thể được biểu hiện trong các chủng *E. coli* khác nhau như W3110, TG1, BL21, BL21(DE3), HMS174, HMS174(DE3), mM294 dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu cảm ứng. Có thể lựa chọn trình tự khởi đầu này từ lacUV5, tac, T7, trp, trc, T5, araB. Môi trường nuôi cấy tốt hơn là được xác định đầy đủ theo Wilms *et al.*, 2001 (Wilms *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 73(2): 95-103), DeLisa *et al.*, 1999 (DeLisa *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 1999, 65(1): 54-64) hoặc tài liệu tương đương. Tuy nhiên, việc bổ sung vào môi trường theo mẻ và/hoặc môi trường bổ sung dinh dưỡng với các axit amin như isoleuxin, leuxin, lysin, metionin, phenylalanin, threonin, tryptophan và valin hoặc các thành phần môi trường phức hợp như pepton đậu tương hoặc dịch chiết nấm men có thể có lợi. Quy trình lên

men được thực hiện theo dạng nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng. Điều kiện: nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 40°C, pH = từ 5,5 đến 7,5, giá trị DO được giữ lớn hơn 20%. Sau khi tiêu thụ hết nguồn cacbon ban đầu, canh trường nuôi cấy được cung cấp thêm môi trường dinh dưỡng ở trạng thái chỉ ra ở trên (hoặc tương đương). Khi trọng lượng tế bào khô đạt đến từ 40 đến 100g/L trong thùng lên men, tạo ra được canh trường bằng tác nhân gây cảm ứng phù hợp tương ứng với hệ trình tự khởi đầu sử dụng (ví dụ IPTG, lactoza, arabinoza). Việc gây cảm ứng có thể được thực hiện bằng cách gây cảm ứng xung hoàn toàn hoặc gây cảm ứng một phần bằng cách cung cấp tác nhân gây cảm ứng tương ứng vào thùng lên men trong khoảng thời gian kéo dài hoặc kết hợp cả hai cách gây cảm ứng. Pha sản xuất nên kéo dài ít nhất 4 giờ. Thu hồi các tế bào lại bằng cách ly tâm trong máy ly tâm có roto, máy ly tâm có roto hình ống hoặc máy ly tâm xếp chồng hình đĩa, loại bỏ chất nổi trên bề mặt canh trường.

Khối tế bào *E. coli* được tạo huyền phù lại với lượng gấp từ 4 đến 8 lần lượng đệm phân giải (phosphat hoặc đệm Tris, pH = từ 7 đến 8,5). Ưu tiên thực hiện phân giải tế bào bằng cách đồng hóa ở áp suất cao sau đó thu phần kết viên bằng cách ly tâm trong máy ly tâm có roto, máy ly tâm có roto hình ống hoặc máy ly tâm xếp chồng hình đĩa. Phần kết viên chứa các thể vùi scFv được rửa từ 2 đến 3 lần bằng Tris 20mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM, ure 2M, Triton X-100 0,5%, pH = 8,0 sau đó là hai bước rửa bằng cách sử dụng Tris 20mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM, pH = 8,0. Cuối cùng thu lại các thể vùi scFv bằng cách ly tâm trong máy ly tâm có roto, máy ly tâm có roto hình ống hoặc máy ly tâm xếp chồng hình đĩa. Có thể hòa tan các thể vùi scFv trong glyxin/NaOH 100mM, EDTA 5mM, dithiotreitol 20mM, pH = từ 9,5 đến 10,5 chứa tác nhân chaotrop như guanidin-HCl 6M hoặc ure từ 8 đến 10mM. Sau khi ủ trong thời gian từ 30 đến 60 phút, ly tâm dung dịch và thu lại chất nổi trên bề mặt có chứa protein đích để gấp cuộn lại về sau. Ưu tiên gấp cuộn lại ở mẻ bổ sung dinh dưỡng bằng cách pha loãng dung dịch protein ở tỷ lệ từ 1:10 đến 1:50 trong đệm gấp cuộn lại đến nồng độ protein cuối cùng từ 0,1 đến 0,5mg/ml. Đệm gấp cuộn lại có thể chứa Tris 50-100mM và/hoặc glyxin từ 50 đến 100mM, NaCl từ 50 đến 150mM, ure từ 1 đến 3M, arginin từ 0,5 đến 1M, hệ oxy hóa-khử từ 2 đến 6mM ví dụ như xytein/xystin hoặc glutathion bị oxy hóa/khử, pH = từ 9,5 đến 10,5. Sau khi ủ trong thời gian từ 24 đến 72 giờ ở nhiệt độ 4°C, dung dịch gấp cuộn lại tùy ý được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc có kích thước 0,22µm, pha loãng và điều chỉnh pH đến pH = từ 7,0 đến 8,0.

Tách protein ra bằng sắc ký trao đổi cation ở dạng liên kết (ví dụ Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose FF or S HyperCel™) ở pH = từ 7,0 đến 8,5. Thực hiện rửa giải bằng gradien NaCl gia tăng tuyến tính. Gom các phân đoạn chứa protein đích lại và sau đó tách ra trên cột trao đổi anion ở dạng không liên kết (ví dụ, Toyopearl GigaCap Q-650M, Q-Sepharose FF, Q HyperCel™) sau đó là bước khử sạch trao đổi cation (ví dụ SP Sepharose HP). Gom các phân đoạn chứa protein đích có độ tinh khiết tối thiểu là 90% lại và thu chúng bằng cách lọc màng hoặc sắc ký loại trừ kích thước trong PBS. Tính đồng nhất và chất lượng sản phẩm chứa phân tử scFv đã sản xuất được phân tích bằng SDS-PAGE khử, trong đó có thể phát hiện scFv trong vạch chủ yếu ở kích cỡ khoảng 26kDa. Các thử nghiệm khác để xác định đặc tính của scFv bao gồm đo khối phổ, RP-HPLC và SE-HPLC.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là globulin miễn dịch, tốt hơn là globulin miễn dịch loại IgG1, hoặc loại loại bỏ chức năng phản ứng lại kích thích của nó, hoặc IgG4. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là globulin miễn dịch có chuỗi nặng có SEQ ID NO: 40 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 35.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là globulin miễn dịch có chuỗi nặng có SEQ ID NO: 40, và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 35.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là globulin miễn dịch có chuỗi nặng có SEQ ID NO: 40, và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 35.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là phân tử Fab. Ở dạng này, mỗi miền biến đổi đã bộc lộ ở trên có thể được dung hợp với miền hằng định của globulin miễn dịch, tốt hơn là có nguồn gốc từ người. Do đó, miền biến đổi chuỗi nặng có thể được dung hợp với miền CH₁ (được gọi là đoạn Fd), và miền biến đổi chuỗi nhẹ có thể được dung hợp với miền CL.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là phân tử Fab có đoạn Fd có SEQ ID NO: 36, và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 37. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là phân tử Fab có đoạn Fd có SEQ ID NO: 41, và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 37. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là phân tử Fab có đoạn Fd có SEQ ID NO: 36, và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO:

37. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phân tử kháng thể là phân tử Fab có đoạn Fd có SEQ ID NO: 41, và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 37.

Các axit nucleic mã hóa cấu trúc Fab có thể được sử dụng để biểu hiện các chuỗi nặng và nhẹ này trong tế bào chủ, như E. coli, Pichia pastoris, hoặc dòng tế bào ở động vật có vú (ví dụ CHO, hoặc NS0). Các quy trình đã biết trong lĩnh vực cho phép sự gấp cuộn, kết hợp và liên kết disulfua phù hợp các chuỗi này thành phân tử Fab chức năng mà bao gồm một đoạn Fd và một chuỗi nhẹ (Burtet et al., J. Biochem. 2007, 142(6), 665-669; Ning et al., Biochem. Mol. Biol. 2005, 38: 204-299; Quintero-Hernandez et al., Mol. Immunol. 2007, 44: 1307-1315; Willems et al. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003;786:161-176.).

Cụ thể, các phân tử Fab theo sáng chế có thể được sản xuất trong các tế bào CHO như sau. Các tế bào CHO-DG44 (Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M., and Chasin, L.A. (1983). Deletion of the dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. Cell 33, 405-412.) phát triển trong huyền phù trong môi trường không có huyết thanh được chuyển nhiễm bằng cấu trúc biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của phân tử Fab bằng cách sử dụng chất phản ứng Lipofectamin™ và Plus™ (Invitrogen) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Sau thời gian 48 giờ, thu các tế bào này lại trong môi trường chứa 200 µg/mL kháng sinh G418 và không chứa hypoxanthin và tymidin để tạo ra các quần thể tế bào được chuyển nhiễm ổn định. Sau đó khuếch đại gen các tế bào đã chuyển nhiễm ổn định này bằng cách bổ sung metotrexat (MTX) ở các nồng độ tăng dần (tăng đến 100 hoặc 400 nM) vào môi trường nuôi cấy. Khi các tế bào này đã thích nghi, chúng được lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng trong thời gian từ 10 đến 11 ngày để tạo ra nguyên liệu protein Fab.

Canh trường huyền phù chứa các tế bào CHO-DG44 và các tế bào đã chuyển nhiễm ổn định của nó được ủ trong môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh, được xác định về mặt hóa học. Canh trường nuôi cấy gốc được cấy truyền tiếp trong từ 2 đến 3 ngày với mật độ gieo lần lượt từ 3×10^5 đến 2×10^5 tế bào/mL. Các tế bào được phát triển trong các bình thót cổ được lắc trong máy ủ Multitron HT (Infors) ở điều kiện CO₂ 5%, nhiệt độ 37°C và tốc độ 120 vòng/phút.

Với các thử nghiệm theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng, các tế bào được kết hạt ở 3×10^5 tế bào/mL trong các bình thót cổ được lắc trong môi trường sản xuất có BI mà

không có kháng sinh hoặc MTX. Lắc canh trường nuôi cấy ở tốc độ 120 vòng/phút trong nhiệt độ 37°C và CO₂ 5% mà sau đó được giảm xuống còn 2% khi số tế bào tăng. Các thông số của canh trường là số tế bào, khả năng sống sót của tế bào, pH, nồng độ glucoza và lactat được xác định hàng ngày và điều chỉnh pH đến pH = 7,0 bằng cách sử dụng cacbonat khi cần. Bổ sung dung dịch dinh dưỡng BI thích hợp vào cứ 24 giờ một lần. Lấy các mẫu trong chất nổi trên bề mặt ra ở các thời điểm khác nhau để xác định nồng độ sản phẩm Fab bằng kỹ thuật ELISA. Sau thời gian từ 10 đến 11 ngày, thu dịch canh trường tế bào bằng cách ly tâm và chuyển đến phòng thí nghiệm tinh chế.

Phân tử Fab được tinh chế từ chất nổi trên bề mặt của canh trường nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng bằng sắc ký và lọc. Áp dụng kỹ thuật sắc ký ái lực bước bắt giữ ban đầu, ví dụ Protein G hoặc Protein L. Ngoài ra, trong trường hợp ái lực liên kết và khả năng tiếp nhận thấp, bắt giữ được Fab bằng sắc ký trao đổi cation (CEX) tận dụng pI của phân tử này. Các protein của tế bào chủ và tạp chất, ví dụ ADN hoặc virus, được lấy ra bằng các bước tinh chế trực giao.

Tính đồng nhất và chất lượng sản phẩm của phân tử scFv đã sản xuất được phân tích bằng các phương pháp điện di, ví dụ SDS-PAGE, trong đó có thể phát hiện ra Fab ở vạch chủ yếu có kích cỡ khoảng 50kDa. Các thử nghiệm khác để xác định đặc điểm của sản phẩm Fab bao gồm sắc ký khối phổ, sắc ký hội tụ đẳng điện và sắc ký loại trừ kích cỡ. Sau hoạt tính liên kết là phân tích bằng BIAcore.

Việc xác định số lượng của các phân tử Fab hoặc IgG có độ dài đầy đủ trong chất nổi trên bề mặt của canh trường tế bào được thực hiện qua thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) chồng lớp. Có thể phát hiện ra IgG có độ dài đầy đủ bằng cách sử dụng kháng thể kháng đoạn Fc ở người (Jackson Immuno Research Laboratories) và chuỗi nhẹ kapa ở người (được tiếp hợp peroxidaza, Sigma). Đoạn Fab được cố định bằng kháng thể đa dòng ở dê kháng IgG ở người (H and L, Novus) và được phát hiện bằng kháng thể đa dòng ở cừu kháng IgG ở người (được tiếp hợp peroxidaza, vị trí liên kết).

Các phân tử Fab cũng có thể được tạo ra từ các phân tử kháng thể có độ dài đầy đủ bằng cách phân cắt enzym. Ưu điểm của cách tiếp cận này ở chỗ có thể áp dụng được quy trình cơ bản cho sự lên men và tinh chế lớn và có hiệu quả mà chịu được

hiệu suất tăng thêm và cao với chất lượng sản phẩm mong muốn. Để tinh chế, có thể sử dụng sắc ký ái lực mà sử dụng nhựa protein tái tổ hợp A làm bước bắt giữ ban đầu mà thường có độ tinh chế cao.

Đối với mục đích này, các trình tự Fab mã hóa chuỗi nặng được dung hợp với vùng Fc của phân tử kháng thể IgG ở người. Sau đó, các cấu trúc biểu hiện tạo ra được chuyển nhiễm vào các tế bào CHO-DG44 mà đang phát triển trong huyền phù trong môi trường không có huyết thanh bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên thể mỡ. Sau thời gian 48 giờ, thu các tế bào này lại trong môi trường chứa 200 μ g/mL kháng sinh G418 và không chứa hypoxanthin và thymidin để tạo ra các quần thể tế bào được chuyển nhiễm ổn định. Sau đó, khuếch đại gen của các tế bào đã chuyển nhiễm ổn định này bằng cách bổ sung methotrexat (MTX) ở các nồng độ tăng dần (tăng đến 100 hoặc 400nM) vào trong môi trường nuôi cấy. Một khi các tế bào này đã thích nghi, chúng được lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng trong thời gian từ 10 đến 11 ngày để thu được nguyên liệu protein IgG.

Protein IgG được tinh chế từ chất nổi trên bề mặt của canh trường bằng cách sử dụng sắc ký ái lực protein tái tổ hợp A. Để thu được đoạn Fab trung hòa mong muốn, sau đó IgG có độ dài đầy đủ được ủ với sự có mặt của papain mà phân cắt IgG trong vùng khớp nối, do đó giải phóng ra hai đoạn Fab và gốc Fc. Phân tử A Fab bao gồm chuỗi Fd có SEQ ID NO: 41 là ví dụ về phân tử Fab thu được bằng cách phân giải protein IgG có độ dài đầy đủ bằng papain.

Phân tử Fab được tách ra bằng sắc ký ái lực, ví dụ protein G hoặc protein L. Ngoài ra, trong trường hợp ái lực và khả năng tiếp nhận liên kết thấp, Fab được bắt giữ bằng sắc ký trao đổi cation (CEX) dựa vào pI của phân tử đó. Các protein của tế bào chủ và tạp chất, ví dụ ADN hoặc virus, được loại bỏ bằng các bước tinh chế trực giao bổ sung.

Theo một khía cạnh khác của bản mô tả, phân tử kháng thể là biến thể trình tự axit amin của phân tử kháng thể như đã mô tả trong bản mô tả.

Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách đưa những thay đổi của nucleotit phù hợp vào trong ADN kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các biến thể này bao gồm, ví dụ, loại bỏ, và/chèn vào và/hoặc thay thế, các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể trong các ví dụ trong bản mô tả. Bất kỳ sự

kết hợp nào của việc loại bỏ, chèn và thay thế để tạo ra được cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc cuối cùng có các đặc tính mong muốn. Các thay đổi axit amin có thể cũng làm thay đổi các quy trình sau dịch mã của kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể biến thể, như thay đổi số hoặc vị trí glycosyl hóa.

Phương pháp hữu hiệu để nhận biết các gốc hoặc các vùng nhất định của kháng thể mà là các vùng ưu tiên cho sự đột biến được gọi là "gây đột biến quét alanin", đã được Cunningham và Wells mô tả (Science, 244:1081-1085 (1989)). Ở đây, gốc hoặc nhóm các gốc đích được nhận biết (ví dụ, các gốc có điện tích như arg, asp, his, lys, và glu) và được thay thế bằng axit amin trung tính hoặc có điện tích âm (điển hình là alanin) để tác động đến sự tương tác của axit amin với kháng nguyên. Sau đó các vị trí của axit amin này mà thể hiện sự nhạy cảm chức năng với sự thay thế được lọc ra bằng cách đưa thêm các biến thể vào, hoặc đối với các vị trí thay thế. Do đó, trong khi vị trí để đưa biến thể của trình tự axit amin vào được xác định trước, đặc điểm của chính đột biến này không cần phải xác định trước. Ví dụ, để phân tích hiệu quả đột biến ở vị trí xác định, gây đột biến quét alanin hoặc gây đột biến ngẫu nhiên được thực hiện ở codon hoặc vùng đích và các biến thể kháng thể biểu hiện được sàng lọc để có hoạt tính mong muốn.

Việc chèn trình tự axit amin bao gồm sự dung hợp vào đầu tận cùng amino- và/hoặc carboxyl- trong phạm vi chiều dài từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như việc chèn nội trình tự của một gốc axit amin hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ về việc chèn vào đầu tận cùng bao gồm một kháng thể dung hợp vào một đuôi epitop. Các biến thể chèn khác của phân tử kháng thể bao gồm việc dung hợp vào đầu tận cùng N- hoặc C của kháng thể của enzym hoặc polypeptit mà làm tăng chu kỳ bán rã trong huyết thanh của kháng thể.

Dạng biến thể khác là biến thể thay thế axit amin. Các biến thể này có ít nhất một gốc axit amin trong phân tử kháng thể được loại bỏ và một gốc khác chèn vào vị trí của nó. Vị trí quan tâm nhất cho việc gây đột biến thay thế bao gồm các vùng siêu biến, nhưng cũng bao gồm cả các biến đổi FR. Các sự thay thế bảo toàn được thể hiện trong bảng dưới đây có tiêu đề "thay thế được ưu tiên". Nếu các sự thay thế này tạo ra sự thay đổi về hoạt tính sinh học, khi đó nhiều sự thay đổi đáng kể hơn, được gọi là "thay thế điển hình", hoặc như được mô tả thêm dưới đây về các loại axit amin, có thể được đưa vào và sản phẩm được sàng lọc.

Gốc ban đầu	Thay thế điển hình	Thay thế được ưu tiên
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Xys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	arg; asn; gln; lys;	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleuxin	leu
Leu (L)	ile; norleuxin; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	tyr; leu; val; ile; ala;	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	phe; trp; thr; ser	phe
Val (V)	leu; ile; met; phe ala; norleuxin;	leu

Trong hóa học protein, thường được chấp nhận rằng đặc tính sinh học của kháng thể có thể được hoàn thiện bằng cách lựa chọn các thay thế mà khác đáng kể về hiệu quả duy trì (a) cấu trúc mạch khung polypeptit trong vùng thể, ví dụ, là dạng tấm hoặc dạng xoắn ốc, (b) điện tích hoặc tính kỵ nước của phân tử đó ở vị trí đích, hoặc (c) kích thước của chuỗi bên. Các gốc có trong tự nhiên được chia thành các nhóm dựa vào các đặc tính chuỗi bên chung:

- (1) tính kỵ nước: norleuxin, met, ala, val, leu, ile;
- (2) tính ưa nước trung tính: xys, ser, thr;
- (3) tính axit: asp, glu;
- (4) tính bazơ: asn, gln, his, lys, arg;

(5) gốc ảnh hưởng đến sự định hướng của mạch: gly, pro; và

(6) tính thơm: trp, tyr, phe.

Sự thay thế không bảo toàn sẽ trao đổi một số gốc loại này với một số gốc loại khác.

Gốc xystein bất kỳ mà không liên quan đến sự duy trì cấu hình phù hợp của kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể biến thể cũng đều có thể được thay thế, thường bằng serin, để cải thiện độ bền oxy hóa của phân tử đó, ngăn ngừa liên kết ngang bất thường, hoặc cho ra các điểm kết hợp với hợp chất gây độc hoặc kim tế bào đã được thiết lập. Ngược lại, (các) liên kết xystein có thể được bổ sung vào kháng thể để nâng cao tính ổn định của nó (cụ thể kháng thể đó là đoạn kháng thể như đoạn Fv).

Một loại biến thể thay thế gồm có sự thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể gốc (ví dụ kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể người). Thông thường, (các) biến thể tạo thành được chọn để phát triển thêm sẽ có các đặc tính sinh học được nâng cao so với kháng thể gốc mà chúng được tạo ra từ đó. Một cách dễ dàng để tạo ra các biến thể thay thế này là sự thuần thực ái lực bằng cách sử dụng kỹ thuật hiển thị trên thực khuẩn thể. Tóm lại, một vài vị trí trong vùng siêu biến (ví dụ các vị trí 6 và 7) được gây đột biến để tạo ra toàn bộ sự thay thế amino có thể trong mỗi vị trí. Do đó, các biến thể kháng thể được tạo ra được hiển thị ở dạng đơn trị từ các phần tử thực khuẩn thể dạng sợi dưới dạng dung hợp vào sản phẩm gen III của M13 được bao bọc bên trong mỗi phần tử. Các biến thể được hiển thị trên thực khuẩn thể sau đó được sàng lọc về hoạt tính sinh học của chúng (ví dụ ái lực liên kết). Để nhận biết các vị trí ở vùng siêu biến phù hợp cho sự biến đổi, có thể thực hiện gây đột biến quét alanin để nhận biết các gốc ở vùng siêu biến mà góp phần đáng kể vào liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, hoặc hơn nữa, có thể có lợi khi phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để nhận biết các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và dabigatran ở người. Các gốc tiếp xúc và gốc lân cận này phù hợp cho việc thể theo các kỹ thuật được chỉ ra trong bản mô tả. Khi tạo ra các biến thể này, nhóm các biến thể được sàng lọc như đã mô tả trong bản mô tả và các kháng thể có đặc tính tốt hơn trong một hoặc nhiều thử nghiệm phù hợp có thể được chọn để phát triển thêm.

Dạng biến thể axit amin khác của kháng thể này làm biến đổi mẫu glycosyl hóa ban đầu của kháng thể. Thuật ngữ "biến đổi" nghĩa là loại bỏ một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được tìm thấy trong kháng thể, và/hoặc thêm vào một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa mà không có trong kháng thể.

Theo một số phương án, có thể mong muốn biến đổi kháng thể theo sáng chế để thêm các vị trí glycosyl hóa vào. Sự glycosyl hóa các kháng thể diễn hình qua liên kết N hoặc O. Liên kết N đề cập đến sự liên kết của gốc hydrat cacbon với chuỗi bên của gốc asparagin. Các trình tự tripeptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là trình tự nhận diện để liên kết enzym gốc hydrat cacbon với chuỗi bên asparagin. Do đó, sự có mặt của các trình tự tripeptit này trong polypeptit tạo ra vị trí có khả năng glycosyl hóa. Sự glycosyl hóa liên kết O đề cập đến liên kết của một trong các đường N-axeylgalactosamin, galactosa, hoặc xyloza với axit hydroxyamin, hầu hết là serin hoặc threonin, mặc dù cũng có thể sử dụng 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin. Do đó, để glycosyl hóa một protein cụ thể, ví dụ kháng thể, trình tự axit amin của protein được thiết kế để chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit đã mô tả ở trên (cho các vị trí glycosyl hóa liên kết N). Cũng có thể thực hiện sự biến đổi bằng cách bổ sung, hoặc thay thế, bằng một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự của kháng thể gốc (cho các vị trí glycosyl hóa liên kết O).

Phân tử axit nucleic mã hóa các biến thể trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, được phân lập từ nguồn tự nhiên (trong trường hợp các biến thể của trình tự axit amin có trong tự nhiên) hoặc tạo ra bằng cách gây đột biến qua trung gian oligonucleotit (hoặc đột biến định hướng điểm), gây đột biến PCR, và gây đột biến catxet một biến thể được tạo ra từ trước hoặc một phiên bản của phân tử kháng thể không phải là biến thể như đã mô tả trong bản mô tả. Như đã chỉ ra ở trên, kháng nguyên của phân tử kháng thể theo sáng chế là chất chống đông. Kháng nguyên được dùng để tạo ra phân tử kháng thể, cả bằng cách gây miễn dịch cho động vật, hoặc bằng cách lựa chọn trình tự kháng nguyên từ thư viện trình tự, như bằng phương pháp biểu hiện trên thực khuẩn thể.

Các phương thức gây miễn dịch cho động vật đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Để có được đáp ứng miễn dịch phù hợp, có thể cần kết hợp kháng nguyên với tá

được, như phosphat nhôm, hydroxit nhôm, squalen, hoặc tá dược Freund hoàn chỉnh/không hoàn chỉnh.

Kháng nguyên trong ngữ cảnh sáng chế, như dabigatran, hầu hết là các phân tử hữu cơ nhỏ có thể so sánh được, mà đôi khi không kích thích tạo ra kháng thể khi sử dụng cho động vật. Do đó có thể cần phải gắn kháng nguyên vào đại phân tử, như hapten.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể như được mô tả ở trên để sử dụng trong y học.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa phân tử kháng thể như đã đề cập ở trên, và chất mang dược lý.

Để sử dụng trong trị liệu, phân tử kháng thể có trong dược phẩm phải phù hợp để dễ dàng dùng cho động vật hoặc người. Các dạng bào chế điển hình của phân tử kháng thể có thể được bào chế ra bằng cách trộn phân tử kháng thể với các chất mang, tá dược hoặc chất ổn định chấp nhận được về mặt sinh lý, ở dạng bào chế được làm khô lạnh hoặc nếu không thì ở dạng chế phẩm được làm khô hoặc dung dịch chứa nước hoặc huyền phù chứa nước hoặc huyền phù không chứa nước. Chất mang, tá dược, chất cải biến, hoặc chất ổn định mà không độc ở các liều và nồng độ được sử dụng. Chúng bao gồm cả hệ thống đệm như phosphat, xitrat, axetat và các axit vô cơ hoặc axit hữu cơ khác và muối của chúng; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; chất bảo quản như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua, benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon hoặc polyetylen glycol (PEG); các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lyzin; monosacarit, disacarit, oligosacarit hoặc polysacarit và các cacbonhydrat khác như glucoza, mannoza, sucroza, trehaloza, dextrin hoặc dextran; tác nhân càngh hóa như EDTA; rượu ngọt như, manitol hoặc sorbitol; ion đối tạo muối như natri; phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt mang điện tích hoặc không mang điện tích như TWEEN™ (polysorbat), PLURONICS™ hoặc các este của axit béo, ete axit béo hoặc este đường. Ngoài ra các dung môi hữu cơ có thể có trong dạng bào chế của

kháng thể như etanol hoặc isopropanol. Tá dược có thể cũng có chức năng điều chỉnh sự giải phóng hoặc điều chỉnh sự hấp thụ.

Theo một khía cạnh, dược phẩm chứa phân tử kháng thể trong dung dịch chứa nước, được tạo đệm ở nồng độ từ 10 đến 20mg/ml, hoặc trong dạng đông khô được tạo ra từ dung dịch đó.

Phương pháp áp dụng được ưu tiên là ngoài đường tiêu hóa, bằng cách truyền hoặc tiêm (trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong màng bụng, trong da), nhưng các phương pháp áp dụng khác như bằng cách hít, truyền qua da, trong mũi, trong hốc miệng, qua miệng, cũng có thể áp dụng được.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể như đã mô tả ở trên để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa các tác dụng phụ của liệu pháp dabigatran, cụ thể là hiện tượng xuất huyết.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể như đã mô tả ở trên để sử dụng trong điều trị tình trạng quá liều dabigatran hoặc dabigatran exetilát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể như đã mô tả ở trên để sử dụng làm chất giải độc cho chất chống đông, tức là dabigatran hoặc dabigatran exetilát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa các tác dụng phụ của liệu pháp chống đông, bao gồm sử dụng lượng hiệu quả phân tử kháng thể như đã mô tả ở trên cho bệnh nhân cần điều trị hoặc ngăn ngừa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể này trong phương pháp điều trị hiện tượng quá liều dabigatran, bao gồm sử dụng lượng có hiệu quả phân tử kháng thể như đã mô tả ở trên cho bệnh nhân cần điều trị.

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả trị liệu" của kháng thể được sử dụng là lượng tối thiểu cần thiết để ngăn ngừa, cải thiện, hoặc điều trị các tác dụng phụ của liệu pháp chống đông, cụ thể là lượng tối thiểu có hiệu quả làm ngừng sự xuất huyết. Có thể có được hiệu quả này bằng lượng hóa học lượng pháp của phân tử kháng thể.

Ví dụ, với dabigatran có thể đạt được nồng độ huyết thanh ở mức 200nM khi đưa ra ở liều lượng được đề nghị. Khi sử dụng phân tử kháng thể đơn trị có trọng lượng phân tử khoảng 50kD, có thể trung hòa được các tác dụng phụ của liệu pháp

chống đông ở liều lượng ví dụ khoảng 1mg/kg, khi đưa vào bằng tiêm tĩnh mạch nhanh. Theo một phương án khác, liều lượng phân tử Fab sử dụng cho bệnh nhân là người có thể từ 50 đến 1000mg trong một lần sử dụng, ví dụ 100, 200, 500, 750, hoặc 1000mg cho một lần sử dụng. Phụ thuộc vào tình trạng bệnh lý, ví dụ khi sử dụng dabigatran quá liều cho bệnh nhân, có thể sử dụng liều lượng thậm chí ở mức cao hơn, ví dụ 1250, 1500, 1750 hoặc 2000mg cho một lần sử dụng. Liều lượng phù hợp có thể khác nhau, phụ thuộc vào loại và liều lượng chất chống đông sử dụng; thời gian trôi qua kể từ khi sử dụng chất chống đông, đặc điểm của phân tử kháng nguyên, tình trạng bệnh lý của bệnh nhân, và các yếu tố khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ biết được phương pháp thiết lập các nồng độ mà có cả hiệu quả trị liệu và tính an toàn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử kháng thể có ái lực với dabigatran và/hoặc dabigatran etexilat. Tốt hơn là, phân tử kháng thể liên kết với dabigatran và/hoặc dabigatran etexilat bằng ái lực, như đã xác định ví dụ bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", Curr Opin Immunol. "Curr Opin Immunol. 1993 Apr;5(2):282-6.) hoặc kỹ thuật thử nghiệm loại trừ động lực học (KinxA) (Darling, R.J., and Braut P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." ASSAY and Drug Development Technologies. 2004, Dec 2(6): 647 Apr;-657(2):282-6.), có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 0,1pM đến 100μM, tốt hơn là từ 1pM đến 100μM, tốt hơn từ 1pM đến 1μM.

Có thể sử dụng phân tử kháng thể theo sáng chế trong quy trình phân tích và chẩn đoán, ví dụ để xác định nồng độ kháng nguyên trong mẫu như huyết thanh, huyết tương, hoặc các dịch thể khác. Ví dụ, phân tử kháng nguyên có thể được sử dụng trong thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), như mô tả trong các ví dụ. Do đó, Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit phân tích và chẩn đoán bao gồm các phân tử kháng thể đã mô tả trong bản mô tả, và đề cập đến phương pháp phân tích và chẩn đoán tương ứng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm yêu cầu bảo hộ có trước, bao gồm

- (a) cung cấp tế bào chủ chứa một hoặc nhiều axit nucleic mà mã hóa phân tử kháng thể này liên kết về mặt chức năng với trình tự kiểm soát sự biểu hiện,
- (b) nuôi cấy tế bào chủ này, và
- (c) thu phân tử kháng thể từ canh trường tế bào.

Sáng chế cũng đề cập đến vật phẩm sản xuất và kit chứa nguyên liệu có thể sử dụng để làm trung hòa chất chống đông dùng qua đường miệng, cụ thể là chất ức chế trực tiếp trombin. Vật phẩm sản xuất gồm có đồ chứa và nhãn. Đồ chứa phù hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ nhỏ, và ống nghiệm. Đồ chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh, kim loại, chất dẻo hoặc sự kết hợp của chúng. Đồ chứa chứa dược phẩm mà bao gồm kháng thể như được mô tả ở đây hoặc dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó. Hoạt chất trong dược phẩm là kháng thể cụ thể hoặc dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó. Nhãn ở trên đồ chứa kháng thể thể hiện rằng dược phẩm đó được sử dụng để làm trung hòa hoặc làm trung hòa một phần dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó *in vivo*.

Kit bao gồm một hoặc nhiều đồ chứa như đã mô tả ở trên. Kit này có thể bao gồm thêm các nguyên liệu khác theo mong muốn của thị trường và quan điểm của người sử dụng, bao gồm chất đệm, chất làm loãng, giấy lọc, kim, ống tiêm, và bao gói khác kèm với hướng dẫn sử dụng.

Theo một phương án, kit bao gồm kháng thể gồm kháng thể bất kỳ theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa nó. Ví dụ, kit có thể bao gồm (1) các kháng thể bất kỳ theo sáng chế hoặc dược phẩm của nó, (2) đồ chứa và (3) nhãn.

Theo một phương án khác, kit bao gồm kháng thể gồm kháng thể trong số các kháng thể bất kỳ theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa nó, và dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc dược phẩm chứa nó. Dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó có thể ở dạng rắn, lỏng hoặc gel. Theo phương án được ưu tiên, muối dược dụng của dabigatran etexilat là muối mesylat. Theo phương án được ưu tiên khác nữa, lượng dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó trong mỗi đơn vị liều lượng nằm trong khoảng từ 50mg đến 400mg, nằm trong

khoảng từ 75mg đến 300mg, nằm trong khoảng từ 75mg đến 150mg, hoặc nằm trong khoảng từ 110mg đến 150mg, cho liều dùng một lần một ngày (QD) hoặc liều dùng hai lần một ngày (BID). Ví dụ, kit có thể bao gồm (1) kháng thể bất kỳ theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa nó, (2) dược phẩm chứa dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó, (3) đồ chứa và (4) nhãn.

Theo một phương án khác, kit bao gồm (1) dược phẩm thứ nhất chứa dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó, (2) dược phẩm thứ hai chứa kháng thể bất kỳ theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng, (3) hướng dẫn sử dụng khác nhau cho bệnh nhân đối với dược phẩm thứ nhất và thứ hai đã nói, trong đó dược phẩm thứ nhất và thứ hai đã nói được chứa trong các đồ chứa khác nhau và dược phẩm thứ hai đã nói được sử dụng cho bệnh nhân cần phải được trung hòa hoặc trung hòa một phần dabigatran hoặc 1-O-axylglucuronit của dabigatran.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp chẩn đoán để trung hòa hoặc trung hòa một phần dabigatran hoặc 1-O-axylglucuronit của dabigatran cho bệnh nhân đang được điều trị với dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó, bao gồm sử dụng một trong các kháng thể bất kỳ được mô tả ở đây, hỗn hợp của chúng hoặc dược phẩm chứa chúng. Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp trung hòa hoặc trung hòa một phần dabigatran hoặc 1-O-axylglucuronit của dabigatran cho bệnh nhân bao gồm các bước (a) khẳng định rằng bệnh nhân đang được điều trị với dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó, và lượng đã được đưa vào cơ thể bệnh nhân; (b) trung hòa dabigatran hoặc 1-O-axylglucuronit bằng kháng thể bất kỳ theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng trước khi làm thử nghiệm đông máu hoặc đông tụ, trong đó dabigatran hoặc 1-O-axylglucuronit của dabigatran sẽ làm ảnh hưởng đến kết quả đọc được của thử nghiệm đó; (c) thực hiện thử nghiệm đông máu hoặc đông tụ trên mẫu lấy từ cơ thể bệnh nhân để xác định mức độ tạo thành cục máu đông khi không có mặt dabigatran hoặc 1-O-axylglucuronit của dabigatran; và (d) điều chỉnh lượng dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của nó để đưa vào cơ thể bệnh nhân để có được sự cân bằng phù hợp giữa sự tạo thành cục máu đông và sự thoái hóa trong cơ thể bệnh nhân. Tỷ lệ mol của kháng thể so với dabigatran hoặc 1-O-axylglucuronit của dabigatran là tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100,

tốt hơn là nằm trong khoảng 0,1 và 10. Kết quả đọc được chính xác của thử nghiệm này có thể là kết quả đọc được chính xác về các nồng độ fibrinogen, khả năng kháng với protein C đã được hoạt hóa hoặc các thử nghiệm liên quan.

Ví dụ thực hiện sáng chế

I. Tạo ra kháng thể kháng dabigatran đa dòng

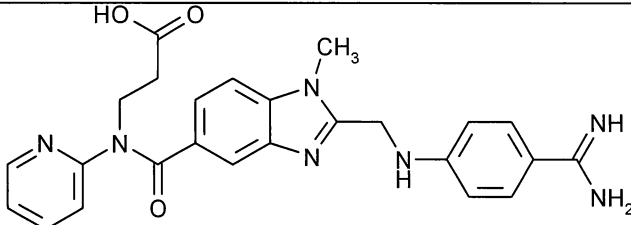
Để tạo ra kháng thể kháng dabigatran đa dòng, tạo ra 3 chất sinh miễn dịch khác nhau có hai hapten khác nhau và có các tỷ lệ mol của hapten đó và protein mang (BSA) khác nhau.

Để sàng lọc, tạo ra liên tiếp hợp enzym peroxidaza củ cải ngựa (HRP) và tiến hành thử nghiệm enzym-hấp thụ miễn dịch (ELISA).

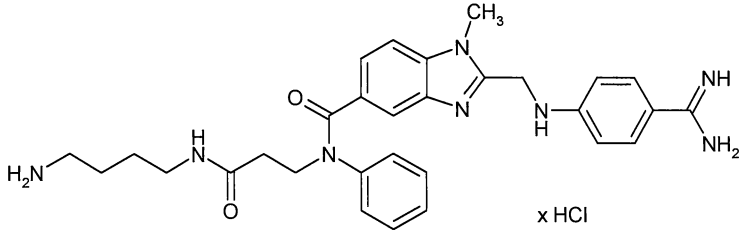
Thực hiện thêm việc tinh chế kháng thể đa dòng bằng sắc ký ái lực trên protein A sepharose FF.

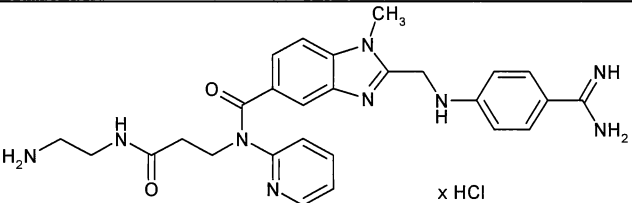
1. Nguyên liệu và phương pháp

Hợp chất thử nghiệm (dabigatran)

Mã:	dabigatran, ion lưỡng tính
Công thức cấu trúc:	 $C_{25}H_{25}N_7O_3$ trọng lượng phân tử: 471,5 g/mol

1.1. Sử dụng hapten để tổng hợp chất sinh miễn dịch và chất đánh dấu

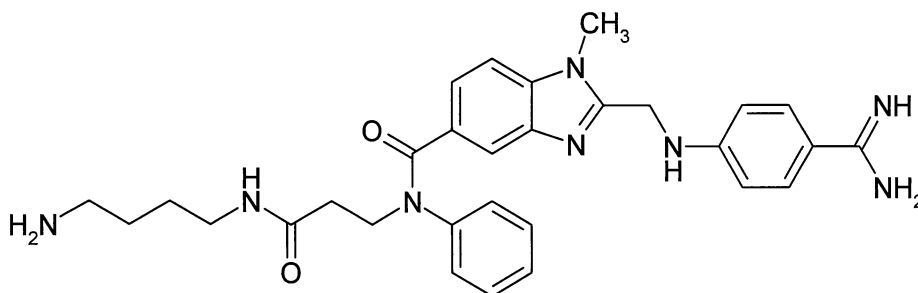
Mã:	Hapten 1
Công thức cấu trúc của phối tử:	 $C_{30}H_{36}N_8O_2 \cdot xHCl$ trọng lượng phân tử: 577,13 g/mol

Mã:	Hapten 2
Công thức cấu trúc của phối tử:	 $C_{27}H_{31}N_9O_2 \cdot xHCl$ trọng lượng phân tử: 550,07 g/mol

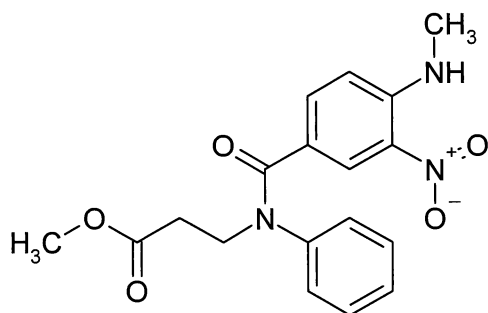
1.2 Tổng hợp các hapten

Các hapten hapten 1 và hapten 2 được tổng hợp như sau:

Hapten 1 [2-(4-amino-butylcarbamoyl)-ethyl]-phenyl-amit của axit 2-[(4-Carbamimidoyl-phenylamino)-methyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carboxylic



1a Metyl este của axit 3-[(4-metyl-amino-3-nitro-benzoyl)-phenyl-amino]-propionic



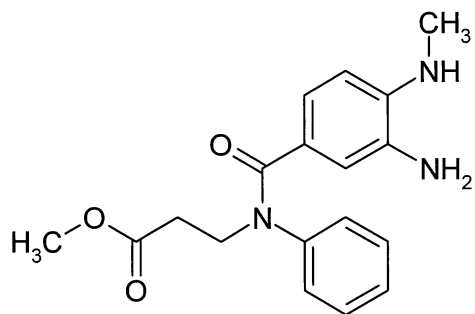
Bổ sung nhỏ giọt triethylamin (50,2mMol) vào dung dịch chứa clorua của axit 4-metylamino-3-nitro-benzoic (23,3mMol) và metyl este của axit 3-phenyl-amino-propionic (23,3mMol) trong 80mL tetrahydrofuran (THF) khan trong khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau thời gian phản ứng ba giờ, làm bay hơi hỗn hợp phản ứng cho đến khô, hòa tan chất rắn còn lại với nước và sản phẩm rắn được tách riêng bằng cách lọc.

Hiệu suất: 99%

$C_{18}H_{19}N_3O_5$ (357,36)

TLC (silicagel; Diclometan/etanol 19:1): $R_f = 0,48$

1b Metyl este của axit 3-[(3-amino-4-metylamino-benzoyl)-phenyl-amino]-propionic



Nhóm nitro trong sản phẩm 1a bị khử bằng sự hydro hóa ở nhiệt độ trong phòng trong etanol có Pd (10% trong than) làm chất xúc tác.

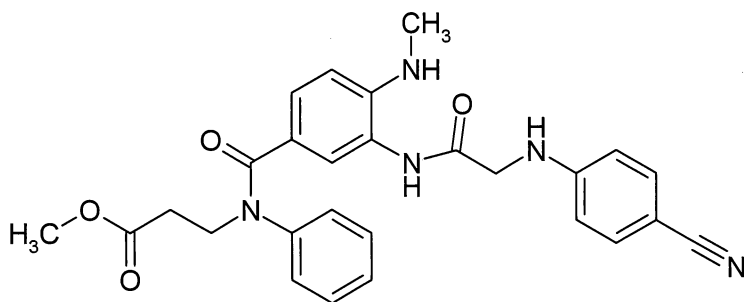
Hiệu suất: 99%

$C_{18}H_{21}N_3O_3$ (327,38)

TLC (silicagel; Diclometan/etanol 9:1): $R_f = 0,23$

Khối phổ (ESI): $[M+H]^+ = 328$

1c Metyl este của axit 3-({3-[2-(4-xyano-phenylamino)-axetylamino]-4-metylamino-benzoyl}-phenyl-amino)-propionic



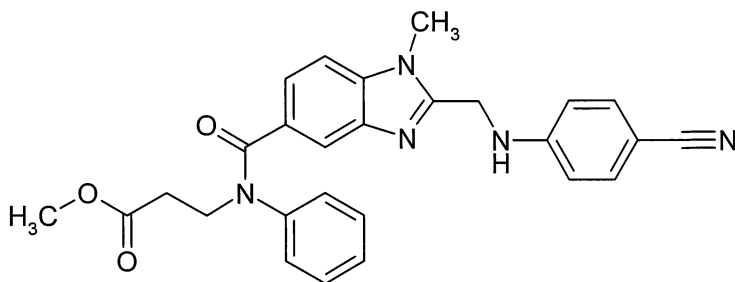
Sản phẩm chứa 1b (23,2mMol) và N-(4-xyano-phenyl)-glyxin (23,2mMol) được kết hợp với CDI (23,2mMol) trong THF khan ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi hoàn thành phản ứng, làm bay hơi hỗn hợp phản ứng cho đến khô và sản phẩm thô được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Hiệu suất: 97%

$C_{27}H_{27}N_5O_4$ (485,54)

Khối phổ (ESI): $[M+H]^+ = 486$

1d Metyl este của axit 3-({2-[(4-xyano-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carbonyl}-phenyl-amino)-propionic



Gia nhiệt dung dịch chứa sản phẩm 1c (22,6mMol) trong 100mL axit axetic đặc đến hồi lưu trong thời gian một giờ. Sau đó làm bay hơi dung dịch cho đến khô, pha loãng chất rắn còn lại bằng nước và trong khi khuấy, điều chỉnh pH đến khoảng từ 8 đến 9. Sản phẩm thô được tách ra bằng cách chiết với etyl axetat và được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (dung môi rửa giải: diclometan/etanol 1:1).

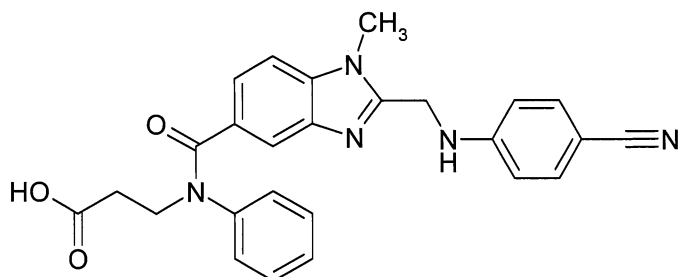
Hiệu suất: 58%

$C_{27}H_{25}N_5O_3$ (467,52)

TLC (silicagel; Diclometan/etanol 9:1): $R_f = 0,71$

Khối phổ (ESI): $[M+H]^+ = 468$

1e Axit 3-({2-[(4-cyano-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carbonyl}-phenyl-amino)-propionic



Bổ sung natri hydroxit (20,0mMol) vào dung dịch chứa sản phẩm 1d (13,0mMol) trong 100mL metanol. Khuấy hỗn hợp trong thời gian 2,5 giờ ở nhiệt độ 40°C và sau đó làm bay hơi cho đến khô. Khuấy chất rắn còn lại với 100mL nước và điều chỉnh pH đến khoảng bằng 6 bằng axit axetic đặc. Tách sản phẩm kết tủa ra bằng cách lọc, rửa với nước và làm khô ở nhiệt độ khoảng 60°C.

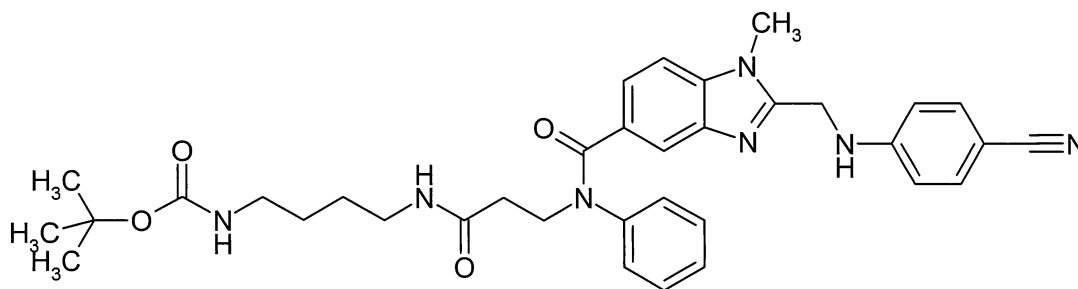
Hiệu suất: 88%

$C_{26}H_{23}N_5O_3$ (453,49)

TLC (silicagel; Diclometan/etanol 9:1): $R_f = 0,33$

Khối phổ (ESI): $[M+H]^+ = 454$

1f tert-Butyl este của axit {4-[3-({2-[(4-cyano-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carbonyl}-phenyl-amino)-propionylamino]-butyl}-carbamic



Khuấy dung dịch chứa sản phẩm 1e (5,23mMol), 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroni tetraflororat (TBTU, 5,23mMol) và N-metyl-morpholin (5,23mMol) trong 20mL DMF ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Sau đó bổ sung tert-butyl este của axit (4-amino-butyl)-carbamic (5,23mMol) vào và khuấy

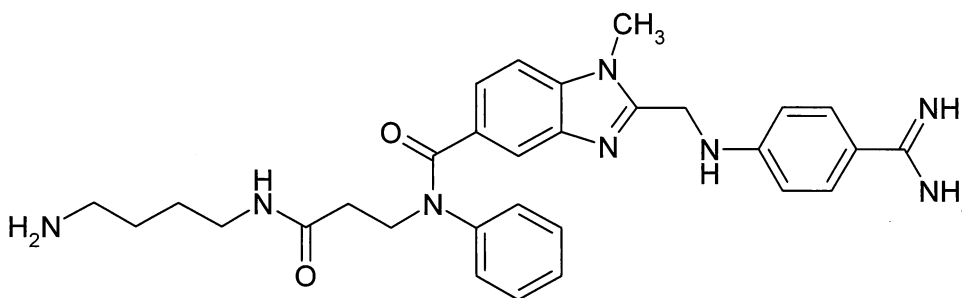
hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian thêm 24 giờ nữa. Sau đó pha loãng hỗn hợp với nước (100 mL) và tách sản phẩm ra bằng cách chiết với etyl axetat.

Hiệu suất: 92%

$C_{35}H_{41}N_7O_4$ (623,75)

TLC (silicagel; Diclometan/etanol 9:1): $R_f = 0,51$

1g [2-(4-amino-butylcarbamoyl)-etyl]-phenyl-amit của axit 2-[(4-Carbamimidoyl-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carboxylic



Hòa tan sản phẩm chứa 1f (4,81mMol) trong dung dịch HCl bão hòa trong etanol (250 mL), khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm và sau đó làm bay hơi cho đến khô ở nhiệt độ 30°C. Hòa tan nguyên liệu thô còn lại trong 200mL etanol khan, sau đó bổ sung amoni cacbonat (48,1mMol) vào và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau khi làm bay hơi dung môi, tán nhỏ nguyên liệu thô còn lại với khoảng 5mL etanol, tách nguyên liệu thô không hòa tan ra bằng cách lọc và dung môi bay hơi ở nhiệt độ 30°C. Sau đó hòa tan sản phẩm này trong 30mL nước, khuấy dung dịch với khoảng 2g than, lọc và làm bay hơi cho đến khô.

Hiệu suất: 90%

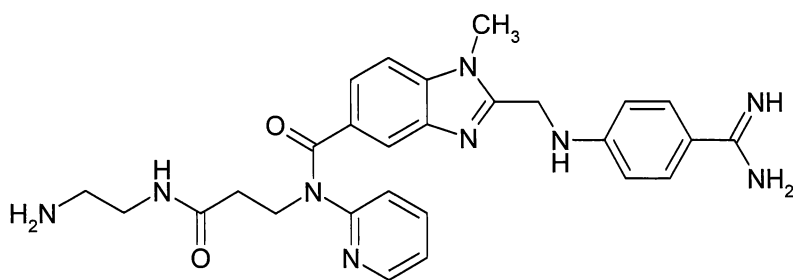
$C_{30}H_{36}N_8O_2$ (540,67)

TLC (pha đảo RP-8; metanol/5% dung dịch NaCl chứa nước 9:1): $R_f = 0,79$

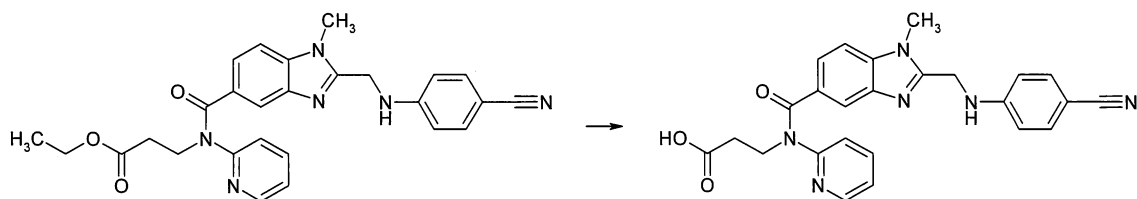
Khối phổ (ESI): $[M+H]^+ = 541$

$[M+Cl]^- = 575/7$

Hapten2 [2-(2-amino-ethylcarbamoyl)-etyl]-pyridin-2-yl-amit của axit 2-[(4-Carbamimidoyl-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carboxylic



2a axit 3-((2-[(4-Xyano-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carbonyl}-pyridin-2-yl-amino)-propionic

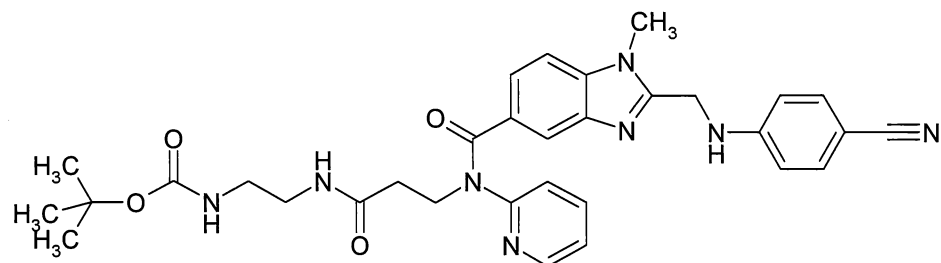


Bổ sung etyl este của axit 3-((2-[(4-Xyano-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carbonyl}-pyridin-2-yl-amino)-propionic (41,4mMol) vào dung dịch chứa natri hydroxit (50,0mMol) trong 500mL etanol và 50mL nước. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian ba giờ, sau đó bổ sung nhỏ giọt khoảng 350mL etanol, khoảng 100mL nước vào và điều chỉnh pH đến 6. Sau đó bổ sung dietylete (50 mL) vào và khuấy hỗn hợp qua đêm. Tách sản phẩm ra bằng cách lọc và sử dụng sản phẩm mà không cần tinh chế thêm.

Hiệu suất: 78%

$C_{25}H_{22}N_6O_3$ (454,48)

2b tert-butyl este của axit {2-[3-((2-[(4-Xyano-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carbonyl}-pyridin-2-yl-amino)-propionylamino]-etyl}-carbamic



Khuấy dung dịch chứa sản phẩm 2a (2,20mMol), 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluronium tetraflororat (TBTU, 2,20mMol) và N-metyl-morpholin (2.20mMol) trong tetrahydrofuran khan (100 mL) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút. Sau đó bổ sung tert-butyl este của axit (2-amino-butyl)-carbamic

(2,20mMol) vào và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian thêm 24 giờ nữa. Sau đó pha loãng hỗn hợp này với 40mL nước, tách sản phẩm ra bằng cách chiết với etyl axetat và tinh chế bằng sắc ký (silicagel; diclometan/metanol 15:1).

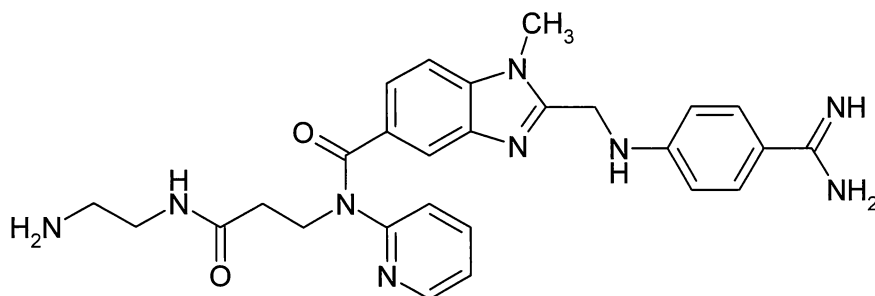
Hiệu suất: 61%

$C_{32}H_{36}N_8O_4$ (596,68)

Khối phổ (ESI): $[M+H]^+ = 597$

$[M+H]^- = 595$

2c [2-(2-amino-ethylcarbamoyl)-ethyl]-pyridin-2-yl-amit của axit 2-[(4-Carbamimidoyl-phenylamino)-metyl]-1-metyl-1H-benzoimidazol-5-carboxylic



Bổ sung sản phẩm chứa 2b (1,34mMol) vào dung dịch HCl bão hòa trong etanol khan (30 mL). Khuấy dung dịch ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 giờ, sau đó làm bay hơi cho đến khô ở nhiệt độ 30°C. Bổ sung etanol (30 mL) và amoni cacbonat (13,0mMol) vào và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau đó dung môi được làm bay hơi, nguyên liệu còn lại được nghiền 5 lần với khoảng 4mL hỗn hợp diclometan/metanol (30:1), lọc và làm bay hơi để tách sản phẩm ra từ muối vô cơ.

Hiệu suất: 27%

$C_{27}H_{31}N_9O_2$ (513,61)

Khối phổ (ESI): $[M+Cl]^- = 548/50$

$[M+HCl+Cl]^- = 584/6$

$[M+H]^+ = 514$

2. Hóa chất

2.1 Hóa chất để tổng hợp chất phản ứng

Tên	Đặc điểm kỹ thuật	Nhà cung cấp	Phân loại số
Albumin huyết thanh bò, 1,4-benzoquinon (BSA)		Fluka	12309
1,1'-Carbonyl-di- (1,2,4-triazol)	cấp phân tích	Serva	11920
Axit xitric		Fluka	21861
N,N- dimetylformamit (DMF)	để tổng hợp	Riedel-De Haën	33114
Etanol	cấp phân tích	Merck	822275
Tá dược của Freund (CFA)	Hoàn chỉnh	Baker	8006
Tá dược của Freund (IFA)	Không hoàn chỉnh	Sigma	F-5881
Glyxerin	Tinh khiết	Sigma	F-5506
peroxidaza củ cải ngựa HRP	25000 U / 100 mg	Merck	104093
CH ₂ SO ₄ ;	cấp phân tích	Boehringer Mannheim	108090
KH ₂ PO ₄	cấp phân tích	Riedel-De Haën	30743
NaHCO ₃	cấp phân tích	Merck	4873
Na ₂ CO ₃	cấp phân tích	Merck	106329
(NH ₄) ₂ SO ₄	cấp phân tích	Merck	106392
o-phenylen diamin	viên nén 30mg	Merck	101217
Natri perborat	Tinh khiết	Sigma	P8412
Thymol	Tinh khiết	Riedel-De Haën	11621
		Merck	8167

2.2 Hóa chất cho ELISA

Tên	Đặc điểm kỹ thuật	Nhà cung cấp	Phân loại số
Axit xitric	cấp phân tích	Riedel-De Haën	33114
CH ₂ SO ₄ ;	cấp phân tích	Riedel-De Haën	30743
KH ₂ PO ₄	cấp phân tích	Merck	4873
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	cấp phân tích	Merck	6580
NaCl	cấp phân tích	Merck	6404
NaOH	cấp phân tích	Merck	6498
o-phenylen diamin	viên nén 30mg	Sigma	P8412
Natri perborat	Tinh khiết	Riedel-De Haën	11621
Tween 20	Tinh khiết	Serva	37470

2.3 Đệm cho ELISA

Tên	Thành phần	Sử dụng
đệm 1 độ ổn định:	Na ₂ HPO ₄ 0,05 M/ KH ₂ PO ₄ 0,15M NaCl, pH = 7,4 4 tuần ở nhiệt độ khoảng +4°C	lớp phủ
đệm 2 độ ổn định:	như đệm 1, với BSA 5g/L 10 ngày ở nhiệt độ khoảng +4°C	đệm thử nghiệm
đệm 3 độ ổn định:	làm đệm 1, với BSA 5g/L và thimerosal 0,1g/L 4 tuần ở nhiệt độ khoảng +4°C	chặn vi đĩa; lưu giữ
đệm 4 độ ổn định:	axit xitric 0,1M, điều chỉnh đến pH = 5,0 bằng NaOH, natri perborat 6,5mMol/L axit xitric: 6 tháng ở nhiệt độ khoảng +4°C với perborat: 10 ngày ở nhiệt độ khoảng +4°C	đệm nền cho o-phenylen diamin

dung dịch rửa độ ổn định:	nước, Tween 20 0,5g/L 10 ngày ở nhiệt độ môi trường xung quanh	rửa vi đĩa
ngừng chất phản ứng độ ổn định:	H ₂ SO ₄ 2,25 M 5 năm ở nhiệt độ môi trường xung quanh	ngừng sự hiện ảnh màu o-phenylen diamin

Nước từ hệ thống xử lý nước tinh khiết Elgastat Maxima-siêu HPLC được sử dụng để điều chế dung dịch đệm.

3. Tổng hợp chất sinh miễn dịch

Để kích thích hệ miễn dịch ở thỏ sản sinh ra kháng thể đa dòng chống lại dabigatran, ba chất sinh miễn dịch (số ký hiệu **GL256**, **GL258**, và **GL262**,) được tổng hợp bằng cách cho bắt cặp các hapten HAPTEN1 và HAPTEN2 với protein mang albumin huyết thanh bò (BSA) bằng cách sử dụng 1,4-benzoquinon hoặc 1,1'-carbonyl-di-(1,2,4-triazol) làm chất phản ứng bắt cặp.

Để tổng hợp **GL256**, sử dụng 1,4-benzoquinon làm hợp chất có hai nhóm chức giống nhau với hai vị trí phản ứng. Đầu tiên hợp chất này phản ứng với nhóm amin ở pH axit chỉ ở một trong hai vị trí và ở pH kiềm ở vị trí khác với mức độ polyme hóa tối thiểu.

Tổng hợp **GL258** và **GL262** bằng cách sử dụng 1,1'-carbonyl-di-(1,2,4-triazol) làm chất phản ứng bắt cặp với các tỷ lệ đầu vào của hapten so với protein mang khác nhau.

3.1 Tổng hợp GL256

Bổ sung 1,4-benzoquinon 0,416mMol (trong 1,5mL etanol) vào dung dịch chứa BSA 0,75μMol trong 8,5mL đệm KH₂PO₄ 0,1M (pH = 4,5), và ủ trong thời gian 1,5 giờ trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó để dung dịch qua cột sephadex G25 được cân bằng trong NaCl 0,15M để loại bỏ lượng 1,4-benzoquinon thừa (thể tích cuối là 12,5 mL).

Bổ sung từ từ 2,5mL (0,15μMol) dung dịch BSA đã tinh chế vào dung dịch chứa hapten 525μMol cùng với khuấy, hòa tan HAPTEN1 trong 2mL đệm

$\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,1M (pH=8,5). Trong khi bổ sung dung dịch BSA vào, điều chỉnh pH đến khoảng 8,0. Tỷ lệ mol đầu vào của hapten và protein mang là 3500:1.

Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, chất sinh miễn dịch được thẩm tách 6 lần dựa vào 1 lit nước cất. Sắc ký lớp mỏng thể hiện rằng không có đốm nào của hapten không liên kết còn lại trong thể tiếp hợp hapten - chất mang.

Chất sinh miễn dịch được giữ đông lạnh trong các lượng nhỏ ở nhiệt độ -20°C . Mức độ thay thế BSA bằng hapten trong chất nổi trên bề mặt của chất sinh miễn dịch là khoảng 1:18 như được xác định bằng phép đo phổ hấp thụ UV ở bước sóng 302nm. Hàm lượng chất sinh miễn dịch trong dung dịch cuối là 0,75mg GL256 / mL.

3.2 Tổng hợp GL258

Điều chế dung dịch chứa 158 μMol HAPTEN2 trong 6,3mL N,N-dimetylformamit (DMF) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung 158 μMol 1,1'-carbonyl-di-(1,2,4-triazol) vào và đầu tiên ủ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 10°C và sau đó ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Kiểm tra phản ứng hóa học bằng sắc ký lớp mỏng và đạt được khoảng từ 20 đến 25%.

Sau đó hòa tan 0,75 μMol BSA trong 2mL NaHCO_3 0,13M và bổ sung nhỏ giọt 1mL N,N-dimetylformamit (DMF) vào trong khi khuấy. Điều chỉnh pH đến khoảng 8,3. Sau đó bổ sung nhỏ giọt dung dịch hapten (6,3 mL) và 4mL NaHCO_3 0,13M vào dung dịch BSA trong khi khuấy và điều chỉnh pH đến 8,4. Tỷ lệ mol đầu vào của hapten và protein mang là 210:1 đối với chất sinh miễn dịch GL258.

Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng qua đêm cùng với khuấy, chất sinh miễn dịch được thẩm tách 6 lần dựa vào 1 lit nước cất. Sắc ký lớp mỏng thể hiện rằng không có đốm nào của hapten không liên kết còn lại trong thể liên hợp hapten - chất mang.

Chất sinh miễn dịch được giữ đông lạnh trong các lượng nhỏ ở nhiệt độ -20°C . Mức độ thay thế BSA bằng hapten trong chất nổi trên bề mặt của chất sinh miễn dịch là khoảng 1:5 như được xác định bằng phép đo phổ hấp thụ UV ở bước sóng 302nm. Hàm lượng chất sinh miễn dịch trong dung dịch cuối là 0,28mg GL256 / mL

3.3 Tổng hợp GL262

Điều chế dung dịch chứa 225 μMol HAPTEN2 trong 8,75mL N,N-dimetylformamit (DMF) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung 225 μMol 1,1'-carbonyl-di-

(1,2,4-triazol) vào và ủ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 10°C. Kiểm tra phản ứng hóa học bằng sắc ký lớp mỏng và đạt được khoảng từ 20 đến 25%.

Sau đó, hòa tan 0,49 μ Mol BSA trong 2mL NaHCO₃ 0,13M và bổ sung nhỏ giọt 1mL N,N-dimetylformamit (DMF) vào trong khi khuấy. Điều chỉnh pH đến khoảng 8,2. Sau đó bổ sung nhỏ giọt dung dịch hapten (8,75 mL) và 6mL NaHCO₃ 0,13M vào dung dịch BSA trong khi khuấy và điều chỉnh pH = 8,3. Tỷ lệ mol đầu vào của hapten và protein mang là 460:1 đối với chất sinh miễn dịch GL262.

Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng qua đêm cùng với khuấy, chất sinh miễn dịch được thẩm tách 6 lần dựa vào 1 lit nước cất. Sắc ký lớp mỏng thể hiện rằng không có đốm nào của hapten không liên kết còn lại trong thể liên hợp hapten-chất mang.

Chất sinh miễn dịch được giữ đông lạnh trong các lượng nhỏ ở nhiệt độ -20°C. Mức độ thay thế BSA bằng hapten trong chất nổi trên bề mặt chứa chất sinh miễn dịch là khoảng 1:32 như được xác định bằng phép đo phổ hấp thụ UV ở bước sóng 302nm. Hàm lượng chất sinh miễn dịch trong dung dịch cuối là 0,71mg GL262 / mL

4. Tổng hợp thể liên hợp

4.1 Tổng hợp GL261

Điều chế dung dịch chứa 37,4 μ Mol HAPTEN2 trong 1,5mL N,N-dimetylformamit (DMF) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung 37,5 μ Mol 1,1'-carbonyl-di-(1,2,4-triazol) vào và đầu tiên ủ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 10°C và sau đó ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Kiểm tra phản ứng hóa học bằng sắc ký lớp mỏng và đạt được khoảng từ 20 đến 25%.

Sau đó hòa tan 1,125 μ Mol peroxidaza củ cải ngựa (HRP) trong 0,4mL NaHCO₃ 0,13M và bổ sung nhỏ giọt 0,267mL N,N-dimetylformamit (DMF) vào trong khi khuấy. Điều chỉnh pH đến khoảng 8,2. Sau đó bổ sung nhỏ giọt 0,9mL dung dịch hapten (22,5 mL) và 0,57mL NaHCO₃ 0,13M vào dung dịch HRP trong khi khuấy và điều chỉnh pH đến 8,4. Tỷ lệ mol đầu vào của hapten và HRP là 20:1 đối với thể tiếp hợp HRP GL261.

Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng qua đêm ở điều kiện khuấy, thể liên hợp HRP được tách ra khỏi dung môi hữu cơ và lượng thừa hapten bằng sắc ký gel. Dung dịch này đi qua cột sephadex G25 cân bằng với đệm phosphat 0,1M có pH = 7,0.

Nồng độ cuối cùng của thể liên hợp hapten-HRP (chất đánh dấu, 5,64mg/ml) được tăng vọt với BSA thu được nồng độ khoảng 10mg/ml, thu được thể tích cân bằng của glycerin để ngăn sự đóng băng và tinh thể thymol để ngăn sự phát triển của vi khuẩn. Dung dịch chất đánh dấu được dán nhãn số ký hiệu GL261 và được lưu giữ một phần nhỏ ở nhiệt độ -20°C.

Mức độ thay thế HRP bằng hapten là 1:0,2 như được xác định bằng quang phổ UV ở bước sóng 302nm.

Hoạt tính cụ thể của chất đánh dấu được đo trong đĩa vi chuẩn phong bế BSA bằng cách sử dụng o-phenylen-diamin (OPD) làm chất nền và HRP gốc làm nguyên liệu tham chiếu. Hỗn hợp các chuẩn HRP đã pha loãng hoặc thể liên hợp hapten-HRP và dung dịch chất nền được ủ trong thời gian 30 phút trong bóng tối, dừng lại bằng axit sulphuric và đo sự hấp thụ ở bước sóng 490nm. Hoạt tính duy trì là 94 % đối với HRP gốc và hoạt tính cụ thể của dạng tiếp hợp trong glycerin là 611U/mL.

Tóm tắt các đặc điểm của chất đánh dấu:

loại:	HAPTEN2 - peroxidaza củ cải ngựa (số ký hiệu GL 261)
hàm lượng protein:	5,64mg/ml
hoạt tính cụ thể:	108 U/mg 611U/mL (chất nền Guajacol và H ₂ O ₂ , 25°C)
lưu giữ:	ở nhiệt độ khoảng -20°C
thực hiện pha loãng:	1:40000

5. Gây miễn dịch và sản xuất kháng thể

5.1 Gây miễn dịch trên thỏ

Mười hai con thỏ cái chinchilla, 3 tháng tuổi, được gây miễn dịch với nhũ tương chứa 100µg chất sinh miễn dịch GL256, GL258 và GL262 trong 0,5mL dung dịch NaCl 0,9 % và 0,5mL tá dược Freund hoàn chỉnh (CFA). Sau đó, tạo một số lần gây miễn dịch củng cố ở tháng tiếp theo. Với lần gây miễn dịch thứ ba, sử dụng 0,5mL tá dược Freund không hoàn chỉnh (IFA). Mỗi lần gây miễn dịch được thực hiện ở bốn vị trí dưới da và bốn vị trí trong cơ khác nhau.

Nhóm A – chất sinh miễn dịch GL256

Thỏ 1 #50

Thỏ 2 #51

Thỏ 3 #52

Thỏ 4 #53

Nhóm B – chất sinh miễn dịch GL258

Thỏ 5 #54

Thỏ 6 #55

Thỏ 7 #56

Thỏ 8 #57

Nhóm C – chất sinh miễn dịch GL262

Thỏ 9 #46

Thỏ 10 #47

Thỏ 11 #48

Thỏ 12 #49

Sơ đồ gây miễn dịch

Ngày 1 Đầu tiên gây miễn dịch với 100 μ g chất sinh miễn dịch/mL cho mỗi con thỏ trong CFA

Ngày 29 Gây miễn dịch lần thứ hai với 100 μ g chất sinh miễn dịch/mL cho mỗi con thỏ trong CFA

Ngày 57 Gây miễn dịch lần thứ ba với 100 μ g chất sinh miễn dịch/mL cho mỗi con thỏ trong IFA

tình trạng sức khỏe của các con thỏ có thể thay đổi xấu hơn

bằng cách sử dụng chất sinh miễn dịch GL256 và GL258
con thỏ 7 #56 không được xử lý

- Ngày 67 Xuất huyết lần đầu tiên (2mL cho mỗi con thỏ)
- Ngày 81 Gây miễn dịch lần thứ tư với 100 μ g chất sinh miễn dịch/mL cho mỗi con thỏ trong CFA
- Ngày 91 Xuất huyết lần thứ hai (25mL cho mỗi con thỏ)
- Ngày 112 Gây miễn dịch lần thứ năm với 100 μ g chất sinh miễn dịch/mL cho mỗi con thỏ trong CFA
- Ngày 122 Bị mất sự phân bố các số của con thỏ
- Sự xuất huyết cuối cùng lần thứ ba (kiệt máu)*

*Các con thỏ số từ 1 đến 12 bị kiệt máu hoàn toàn sau khi gây miễn dịch lần thứ năm 10 ngày.

Thực hiện làm kiệt máu thông qua động mạch cảnh khi gây mê bằng xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Đức) và ketamin hydrochlorit (Ketavet®, Parke-Davis, Freiburg, Đức).

5.2 Phân tích huyết thanh thỏ

Chuẩn bị huyết thanh bằng cách ly tâm máu thỏ đã đông. Thu được phần protein bằng cách kết tủa amoni sulphat và khử muối qua cột Sephadex G25.

Sàng lọc các phần protein riêng rẽ từ huyết thanh thỏ đối với độ chuẩn kháng dabigatran bằng quy trình ELISA chuẩn.

Sàng lọc-ELISA:

Bước	Quy trình
A	các phần protein từ mỗi lần xuất huyết được hấp phụ qua đêm ở nhiệt độ môi trường xung quanh trên các đĩa vi chuẩn độ (100 μL/giếng; 1, 2 hoặc 4μg/mL) trong đệm 1. rửa các đĩa vi chuẩn độ 4 lần, mỗi lần 450 μL phong bế bằng 250μL đệm 3 trong thời gian ít nhất 1 giờ
B	rửa các đĩa vi chuẩn độ 4 lần, mỗi lần 450 μ L
C	bổ sung vào mỗi giếng trong đĩa vi chuẩn độ, ba lần: + 50μL đệm 2 + 50μL chất chuẩn hiệu chỉnh trong đệm 2 + 25μL thể tiếp hợp dabigatran- peroxidaza củ cải ngựa (HRP) GL 261 (chất đánh dấu vết) (1/40000)
D	bịt kín các đĩa vi chuẩn độ bằng lá kim loại bám dính, phân phối hoàn toàn mẫu vào tất cả các đĩa vi chuẩn độ. ủ trong 4 giờ trong máy lắc ở nhiệt độ môi trường.
E	rửa các đĩa vi chuẩn độ 4 lần, mỗi lần 450 μ L
F	bổ sung vào mỗi giếng của đĩa vi chuẩn độ 100μL o-phenylen diamin HCl, 2,7mg/ml (một viên nén 30mg trong 11mL đệm 4) ủ trong 30 phút trong bóng tối ở nhiệt độ môi trường
G	bổ sung vào mỗi giếng của đĩa vi chuẩn độ 100μL H₂SO₄ (2,25 M) lắc trong 5 phút
H	đọc hệ số hấp thụ; bước sóng thử nghiệm: 490nm, bước sóng tham chiếu: 650nm

5.3 Phát hiện kháng thể kháng dabigatran trong huyết thanh thử

Ba cột sau cùng: các giá trị của dabigatran

Xuất huyết lần hai

Thử	Chất gây miễn dịch	Nồng độ phủ (µg/ml)	Nồng độ		
			[Mol]	[Ext] [%]	[%]
1 #50	GL256	2	0	1,812	100%
			2.E-12	1,574	87%
			2.E-11	0,461	25%
			2.E-10	0,059	3%
2 #51	GL256	1	0	2,193	100%
			2.E-12	2,086	95%
			2.E-11	1,515	69%
			2.E-10	0,207	9%
3 #52	GL256	2	0	1,513	100%
			2.E-12	1,419	94%
			2.E-11	0,728	48%
			2.E-10	0,107	7%
4 #53	GL256	2	0	1,474	100%
			2.E-12	1,388	94%
			2.E-11	0,848	58%
			2.E-10	0,142	10%
5 #54	GL258	1	0	2,114	100%
			2.E-12	1,892	89%
			2.E-11	0,646	31%
			2.E-10	0,159	8%
6 #55	GL258	1	0	1,295	100%
			2.E-12	0,937	72%
			2.E-11	0,265	20%
			2.E-10	0,140	11%
7 #56	GL258	2	0	1,611	100%
			2.E-12	1,372	85%
			2.E-11	0,424	26%
			2.E-10	0,145	9%
8 #46	GL258	1	0	1,640	100%
			2.E-12	1,290	79%
			2.E-11	0,425	26%
			2.E-10	0,196	12%
9 #47	GL262	2	0	1,854	100%
			2.E-12	1,534	83%
			2.E-11	0,530	29%
			2.E-10	0,254	14%
10 #48	GL262	2	0	1,458	100%
			2.E-12	1,142	78%
			2.E-11	0,300	21%
			2.E-10	0,131	9%
11 #49	GL262	4	0	1,646	100%
			2.E-12	1,393	85%
			2.E-11	0,460	28%
			2.E-10	0,257	16%
12 #50	GL262	2	0	1,605	100%
			2.E-12	1,400	87%
			2.E-11	0,389	24%
			2.E-10	0,109	7%

Final Xuất huyết lần cuối

rabbit	Thỏ	Imu	Chất sinh miễn dịch	Nồng độ phù (µg/ml)	Nồng độ	
					[Ext]	[%]
1	?	1	0	1,589	100%	
			2.E-12	1,442	91%	
			2.E-11	0,491	31%	
			2.E-10	0,130	8%	
2	?	1	0	1,375	100%	
			2.E-12	1,041	76%	
			2.E-11	0,293	21%	
			2.E-10	0,101	7%	
3	?	1	0	1,400	100%	
			2.E-12	1,081	77%	
			2.E-11	0,288	21%	
			2.E-10	0,097	7%	
4	?	1	0	1,183	100%	
			2.E-12	0,882	75%	
			2.E-11	0,396	33%	
			2.E-10	0,183	15%	
5	?	1	0	1,335	100%	
			2.E-12	1,066	80%	
			2.E-11	0,183	14%	
			2.E-10	0,057	4%	
6	?	1	0	1,214	100%	
			2.E-12	0,976	80%	
			2.E-11	0,250	21%	
			2.E-10	0,123	10%	
7	?	2	0	1,822	100%	
			2.E-12	1,702	93%	
			2.E-11	0,661	36%	
			2.E-10	0,189	10%	
8	?	2	0	1,234	100%	
			2.E-12	1,085	88%	
			2.E-11	0,671	54%	
			2.E-10	0,147	12%	
9	?	1	0	1,911	100%	
			2.E-12	1,862	97%	
			2.E-11	0,980	51%	
			2.E-10	0,292	15%	
10	?	1	0	1,933	100%	
			2.E-12	1,891	98%	
			2.E-11	1,055	55%	
			2.E-10	0,076	4%	
11	?	1	0	1,874	100%	
			2.E-12	1,817	97%	
			2.E-11	1,539	82%	
			2.E-10	0,181	10%	
12	?	2	0	1,599	100%	
			2.E-12	1,425	89%	
			2.E-11	0,475	30%	
			2.E-10	0,050	3%	

Sau khi sàng lọc các phân protein của tất cả các con thỏ từ lần xuất huyết 2, thấy rõ rằng con thỏ số 5 (#54) có độ chuẩn của kháng thể kháng dabigatran cao nhất

với hapten HAPTEN2 được ưu tiên. Hơn nữa, có khả năng thay thế chất đánh dấu vết từ vị trí liên kết kháng thể chỉ bằng lượng nhỏ chất đang được phân tích (dabigatran).

Để sàng lọc lần xuất huyết cuối cùng 3, sử dụng thay thế chất đánh dấu vết từ vị trí liên kết kháng nguyên bằng lượng nhỏ chất đang được phân tích (dabigatran) làm tiêu chuẩn quyết định chính, do sự mất thông tin về chất sinh miễn dịch được sử dụng. Do đó sử dụng con thỏ số 2, 3 và 5 cho sự tinh chế thêm.

5.4 Tinh chế kháng thể đa dòng

Kháng huyết thanh của con thỏ số 5 (#54) lần xuất huyết 2 và của các con thỏ số 2, 3 và 5 lần xuất huyết 3 (xuất huyết cuối cùng) được kết tủa với amoni sulphat. Chất kết tủa được ly tâm trong 30 phút ở nhiệt độ 10°C ở tốc độ 4500 U/phút, được tách ra khỏi dung dịch và được hòa tan lại trong đệm Tris. Lặp lại quy trình này. Thực hiện tinh chế thêm bằng sắc ký ái lực trên protein A sepharosa FF. Đệm ở cột là Tris 0,01M có pH = 7,5 và glyxin 0,1M có pH = 3,0 được sử dụng để tách rửa. Các phần chứa IgG ở thỏ được kết hợp lại với nhau. Nồng độ protein được xác định bằng quang phổ học UV ở bước sóng 280nm.

Tóm tắt các đặc điểm của kháng thể:

chất sinh miễn dịch:	HAPTEN2-BSA (số ký hiệu GL258)
thỏ:	huyết thanh số 5 (#54) (xuất huyết số 2)
hàm lượng protein:	1,85mg/mL
lưu giữ:	ở nhiệt độ khoảng -20°C

chất sinh miễn dịch:	HAPTEN1-BSA (GL256) hoặc HAPTEN2-BSA (số ký hiệu GL258) hoặc
thỏ:	HAPTEN2-BSA (số ký hiệu GL262)
hàm lượng protein:	huyết thanh số 2 được thu lại (xuất huyết cuối cùng)
lưu giữ:	3,9mg/ml ở nhiệt độ khoảng -20°C

chất sinh miễn dịch:	HAPTEN1-BSA (GL256) hoặc
thỏ:	HAPTEN2-BSA (số ký hiệu GL258) hoặc
hàm lượng protein:	HAPTEN2-BSA (số ký hiệu GL262)
lưu giữ:	huyết thanh số 3 (xuất huyết cuối cùng)
	9,96mg/ml
	ở nhiệt độ khoảng -20°C

chất sinh miễn dịch:	HAPTEN1-BSA (GL256) hoặc
thỏ:	HAPTEN2-BSA (số ký hiệu GL258) hoặc
hàm lượng protein:	HAPTEN2-BSA (số ký hiệu GL262)
lưu giữ:	huyết thanh số 5 (xuất huyết cuối cùng)
	5,72mg/ml
	ở nhiệt độ khoảng -20°C

II. Trung hòa dabigatran

Thực hiện hai loạt thử nghiệm để thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng lại hoạt tính chống đông của dabigatran *in vitro*. Bốn kháng thể đa dòng nhận được trong phòng thí nghiệm và được thử nghiệm thêm trong huyết thanh của người. Chúng được thử nghiệm trong thử nghiệm chức năng, thời gian đông máu trombin.

Mô tả thử nghiệm:

Huyết thanh người được thu trong thời gian ngắn bằng cách đưa toàn bộ máu vào trong natri xitrat 3,13%. Sau đó ly tâm để thu được huyết thanh không có tiểu cầu và chuyển đến ống phân tách và làm đông lạnh cho đến khi cần vào ngày thử nghiệm. Làm tan huyết thanh ở nhiệt độ 37°C vào ngày thử nghiệm.

Thời gian đông máu trombin được thực hiện như sau. Đầu tiên pha loãng trombin theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (3 IU/mL trombin) trong đệm cung cấp (kit thử nghiệm Dade Behring) và làm ấm sơ bộ đến nhiệt độ 37°C. Dịch pha loãng này được sử dụng trong vòng 2 giờ điều chế. Tất cả các thử nghiệm đều được thực hiện trong máy làm đông CL4 có bán trên thị trường (Behnk Electronics, Norderstadt, Đức). 50µL huyết thanh được hút bằng ống pipet vào các cuvet được cung cấp có khuấy từ và được khuấy trong thời gian 2 phút trong giếng được gia nhiệt trước đến nhiệt độ

37°C trong máy CL4. Ở thời điểm này bổ sung 100µL dung dịch trombin vào và thời gian cần để mẫu huyết thanh đông lại được máy CL4 tự động ghi lại. Ủ dabigatran trước trong thời gian 5 phút trong huyết thanh trong chậu thủy tinh cung cấp, trước khi bổ sung trombin vào và bắt đầu đo. Nếu kháng thể cũng được thử nghiệm (trên 50µL dung dịch gốc), ủ thêm trong thời gian 5 phút nữa ở nhiệt độ 37°C trước khi bắt đầu đông lại (nghĩa là tổng thời gian ủ với dabigatran là 10 phút với dabigatran, tổng thời gian ủ với kháng thể là 5 phút và sau đó bắt đầu làm đông lại với trombin).

Ban đầu tạo ra đường cong chuẩn dabigatran bằng cách bổ sung tăng dần các nồng độ dabigatran vào huyết thanh người và đo thời gian đông sau khi bổ sung trombin vào (Fig.1). Có sự tăng thời gian đông máu trombin phụ thuộc nồng độ theo sự tăng các nồng độ dabigatran.

Với bộ thử nghiệm trung hòa thứ nhất, bổ sung nồng độ dabigatran phù hợp về lâm sàng là 200nM vào tất cả các mẫu huyết thanh để trung hòa. Tất cả 4 chế phẩm kháng thể đều có khả năng rút ngắn thời gian đông trong huyết thanh chứa dabigatran (Fig.2). Mức độ làm trung hòa có liên quan đến nồng độ protein trong mỗi chế phẩm kháng thể. Sau đó dung dịch kháng thể có nồng độ cao nhất (D) được pha loãng theo bậc và được thử nghiệm khả năng trung hòa hoạt tính chống đông dabigatran 200nM trong mỗi bộ thử nghiệm riêng. Có thể nhìn thấy trong Fig.3, có sự ức chế hoạt tính chống đông do dabigatran gây ra phụ thuộc nồng độ theo các nồng độ kháng thể tăng dần. Hơn nữa, khi bổ sung kháng thể đa dòng của thỏ không đặc hiệu (blue square) vào huyết thanh chứa dabigatran, nó có khả năng làm trung hòa hoạt tính chống đông. Sự phụ thuộc vào nồng độ và không trung hòa kháng thể không đặc hiệu thể hiện rằng việc đảo ngược sự chống đông của kháng thể là đặc hiệu cho dabigatran.

Tuy nhiên, các nồng độ dabigatran này chỉ phù hợp về lâm sàng, và sự xuất huyết hoặc quá liều hầu như sẽ xảy ra ở các nồng độ cao hơn. Do đó khả năng kháng thể ức chế được hoạt tính chống đông ở nồng độ dabigatran cao nhất (500nM) trong đường cong chuẩn trong Fig.1 cũng được thử nghiệm. Fig.4 minh họa rằng kháng thể D có thể cũng ức chế được các nồng độ dabigatran cao.

III. Sản xuất và mô tả đặc tính của các kháng thể kháng dabigatran đơn dòng

1. Sản xuất các kháng thể kháng dabigatran đơn dòng và Fabs

Gây miễn dịch cho các con chuột bằng Hapten1 (xem ví dụ 1.1) được tiếp hợp với protein mang như hemoxyanin và globulin miễn dịch và tạo ra các dòng lai theo các quy trình chuẩn. Kháng thể đơn dòng được tinh chế từ chất nổi trên bề mặt của canh trường được liên kết với các thể tiếp hợp dabigatran-protein và liên kết này có thể được hoàn thành với dabigatran trong dung dịch có sự ức chế bán tối đa ở các nồng độ trong khoảng từ 1 đến 10nM. Các Fab được tạo ra từ sự phân cắt các kháng thể đơn dòng bằng papain cùng với sự tiết ra về sau của vùng Fc thông qua protein A.

Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể chuột được tách dòng và được tạo trình tự bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn. Các trình tự này được xác nhận bằng phân tích protein bằng khối phổ và xác định trình tự các kháng thể đầu tận cùng N. Cấu trúc ADN mã hóa kháng thể khảm bao gồm các vùng biến đổi ở chuột đặc hiệu và các vùng hằng định IgG ở người được tạo ra và protein được biểu hiện trong các tế bào HEK 293T và được tinh chế.

2. Mô tả đặc điểm của các kháng thể kháng dabigatran đơn dòng và Fabs

Trình tự của các vùng biến đổi của ba dòng kháng thể đơn dòng được mô tả trong Fig.5 và 6. Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi của dòng vô tính 13 được mô tả trong Fig.5 (DBG 13 VH, chuỗi nặng, SEQ ID NO: 16) và Fig.6 (DBG 13 VK, chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 17). Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi của dòng vô tính 14 được mô tả trong Fig.5 (DBG 14 VH, chuỗi nặng, SEQ ID NO: 18) và Fig.6 (DBG 14 VK, chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 19). Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi của dòng 22 được mô tả trong Fig.5 (DBG 22 VH, chuỗi nặng, SEQ ID NO: 20) và Fig.6 (DBG 22 VK, chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 21).

Dòng vô tính kháng thể đơn dòng ở chuột 22 được thử nghiệm về khả năng trung hòa hoạt tính chống đông dabigatran trong huyết thanh người trong thử nghiệm thời gian đông máu trombin được chỉ ra trong ví dụ II. Kháng thể này đảo ngược hoàn toàn sự kéo dài thời gian đông phụ thuộc trombin qua trung gian dabigatran trong huyết thanh người theo cách phụ thuộc liều lượng (Fig.7). Kháng thể này cũng có hiệu quả ức chế chức năng dabigatran trong máu toàn phần ở người. Fab A sinh ra từ kháng thể

này ngăn chặn hoạt tính dabigatran trong huyết thanh người chứng tỏ rằng vùng liên kết kháng nguyên đơn trị có thể trung hòa hoạt tính chống đông của hợp chất. (Fig.8).

Con đường chuyển hóa chính của dabigatran trong người thông qua sự glucuronit hóa của gốc carboxyl. Dabigatran axylglucuronit đã được thể hiện có hoạt tính dược lý (Ebner et al., Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75). Để thử nghiệm xem liệu dòng vô tính kháng thể đơn dòng ở chuột 22 có thể trung hòa các cơ chế này hay không, tinh chế các dabigatran axylglucuronit từ nước tiểu của khỉ rhesus đã được xử lý bằng dabigatran và được đánh giá trong thử nghiệm thời gian đông máu trombin. Kháng thể làm đảo ngược sự kéo dài thời gian đông phụ thuộc trombin qua trung gian dabigatran axylglucuronit theo cách phụ thuộc liều lượng trong huyết thanh của người có hiệu quả tương tự như hiệu quả quan sát đối với dabigatran (Fig.9). Do đó kháng thể này có hiệu quả phong bế hoạt tính chống đông của các chất chuyển hóa dabigatran được tìm thấy trong cơ thể người.

Ái lực của Fab và kháng thể khảm chuột-người mà bao gồm các vùng biến đổi của các dòng vô tính 22, 13 và 14 và các vùng hằng định globulin miễn dịch ở người (vùng hằng định chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 44; vùng hằng định chuỗi nặng: SEQ ID NO: 45) được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật Kinxa. Ở một nồng độ cố định Fab hoặc kháng thể khảm với các nồng độ dabigatran khác nhau cho đến khi đạt đến cân bằng. Sau khi ủ, xác định nồng độ của các kháng thể tự do bằng cách bắt giữ kháng thể trên các hạt Neutravidin được liên kết với chất tương tự dabigatran được tiếp hợp Biotin. Phát hiện Fab đã bắt giữ bằng đoạn F(ab')₂ kháng IgG chuột (đặc hiệu Fab) được gắn nhãn FITC. Phát hiện ra các kháng thể khảm được bắt giữ với kháng thể kháng IgG người được tiếp hợp Cy5. Các hằng số phân ly được tính toán bằng cách sử dụng mô hình liên kết 1:1. Các kết quả từ các thử nghiệm này được tổng hợp trong bảng dưới đây.

Ái lực của kháng thể kháng dabigatran

Kháng thể	K _d biểu kiến
Fab dòng vô tính 22	48pM
Ab khảm dòng vô tính 22	34pM
Ab khảm dòng vô tính 13	60pM
Ab khảm dòng vô tính 14	46pM

Cả hai Fab và kháng thể khảm đều liên kết với abigatran với ái lực cao.

3. Tạo kháng thể kháng dabigatran đơn dòng được làm giống như của người và Fabs

Để giảm bớt khả năng gây miễn dịch sau khi sử dụng cho người, các kháng thể đơn dòng chuột được 'làm giống như của người'. Các trình tự mạch khung ở người được chọn lọc cho chuột dẫn đến dựa vào sự tương đồng mạch khung, cấu trúc CDR, gốc kiểu mẫu được bảo toàn, gốc chèn kín bề mặt chung được bảo tồn và các thông số khác. Sự thay thế đặc hiệu của các gốc axit amin trong các vị trí mạch khung này có thể làm cải thiện các khía cạnh khác nhau về hiệu quả của kháng thể bao gồm ái lực liên kết và/hoặc độ ổn định, toàn bộ đã được chứng tỏ trong các kháng thể được làm giống như của người được tạo ra bằng cách "trao đổi trực tiếp" các CDR hoặc các HVL vào các vùng mạch khung dòng mầm. Các Fab mà thể hiện liên kết tốt hơn hoặc tương đương và thể hiện sự biểu hiện được cải thiện so với Fab khảm gốc được lựa chọn để mô tả thêm đặc điểm. Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi của Fab được làm giống như của người được mô tả trong Fig.5 (Eng VH 14, SEQ ID NO: 22; ENG VH 15, SEQ ID NO: 24; và ENG VH 31, SEQ ID NO: 26) và trong Fig.6 (Eng VK 11, SEQ ID NO: 23; ENG VK 17, SEQ ID NO: 25; và ENG VK 18, SEQ ID NO: 27). Fab bao gồm Eng VH 15 và Eng VK 18 (chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 37; chuỗi nặng: SEQ ID NO: 36) được biểu hiện trực tiếp trong các tế bào CHO và được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa lựa chọn Kap và nhựa Protein G.

Fab bao gồm Eng VH15 và Eng VK 18 cũng được biến đổi thành IgG có độ dài đầy đủ trong dạng IgG1KO (chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 35; chuỗi nặng: SEQ ID NO: 40). IgG1KO (bất hoạt chức năng tác động) có hai đột biến trong vùng Fc, Leu234Ala và Leu235Ala, mà làm giảm chức năng tác động như FcγR và liên kết bổ thể. Dạng IgG được mô tả trong tài liệu (ví dụ xem Hezareh et al. (2001) Journal of Virology 75: 12161-12168). Kháng thể kháng dabigatran được làm giống như của người tùy ý bao gồm các thay thế axit amin cụ thể trong các vùng khung liên ứng hoặc dòng mầm. Kháng thể 18/15 được biểu hiện trong các tế bào HEK 293T hoặc tế bào CHO và được tinh chế. Các đoạn Fab được tạo ra từ sự phân cắt các kháng thể nguyên vẹn bằng Lys-C hoặc papain và được tinh chế để loại ra vùng Fc thông qua protein A.

4. Mô tả đặc điểm của các Fab kháng dabigatran

Đoạn Fab 18/15 được tạo ra từ sự phân cắt kháng thể nguyên vẹn bằng Lys-C được thử nghiệm khả năng làm trung hòa hoạt tính chống đông dabigatran trong huyết thanh người trong thử nghiệm thời gian đông máu trombin được chỉ ra trong ví dụ II. Fab này làm đảo ngược hoàn toàn sự kéo dài thời gian đông máu phụ thuộc trombin qua trung gian dabigatran trong huyết thanh người theo cách phụ thuộc liều lượng với IC_{50} là 2,6nM (Fig.10). Đoạn Fab biểu hiện trực tiếp và đoạn Fab được tạo ra từ sự phân cắt kháng thể nguyên vẹn bằng papain cũng làm trung hòa được hoạt tính chống đông dabigatran với IC_{50} lần lượt là 2,6 và 2,7nM.

Ái lực của Fab 18/15 được tạo ra từ sự phân cắt kháng thể nguyên vẹn bằng Lys-C và Fab được biểu hiện trực tiếp được xác định trên thiết bị BIAcore bằng cách sử dụng kỹ thuật SPR. Các Fab được ủ trước với các nồng độ dabigatran tăng dần trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được chảy qua một chip cảm ứng được phủ chất tương tự dabigatran được tiếp hợp biotin đã cố định và liên kết không có Fab được kiểm soát. Sử dụng dạng thử nghiệm cạnh tranh dung dịch này, các giá trị K_D của Fab đối với dabigatran được xác định là 0,16pM đối với Fab được tạo ra từ Lys-C và 0,45pM cho Fab được biểu hiện trực tiếp.

Thử nghiệm *in vivo* với Fab được tạo ra từ sự phân cắt bằng papain

Các con chuột (chuột Wistar đực, ~300g) được gây mê bằng pentobarbital bằng cách tiêm tĩnh mạch nhanh (60mg/kg, tiêm trong màng bụng) và truyền liên tục để duy trì gây mê (20 mg/kg/giờ, tiêm trong màng bụng) và được đặt vào các tấm sưởi ở nhiệt độ 37°C để duy trì nhiệt độ bên trong cơ thể. Động mạch cảnh được tách ra và đưa ống thông vào cơ thể để lấy mẫu máu và đưa hóa chất vào tĩnh mạch cảnh phải. Đầu tiên tiêm tĩnh mạch nhanh dabigatran vào (0,3μM/kg) và sau đó truyền (0,1μM/kg/giờ) trong thời gian 20 phút để có được các mức huyết thanh ở trạng thái ổn định. Sau thời gian 20 phút, tiêm Fab vào trong tĩnh mạch bằng cách tiêm tĩnh mạch nhanh ở các nồng độ đẳng mol hoặc bán đẳng mol thông qua tĩnh mạch cảnh trái. Các mẫu máu (pha loãng 1/10 trong natri xitrat 3,13%) được lấy ra ở đường cơ sở (-20, -2 phút) và ở các khoảng thời gian khác nhau trong 30 phút sau khi tiêm Fab.

Hiệu quả chống đông của dabigatran được đo là thời gian đông máu toàn phần, bao gồm thời gian trombin (TT) và thời gian tromboplastin được hoạt hóa một phần

(aPTT). Tóm lại, thời gian trombin được thể hiện trên máy xét nghiệm đông máu bằng cách bổ sung 50 μ L máu toàn phần vào trong giếng đã được làm ấm trước đến 37°C. Bổ sung trombin (Siemens Healthcare, Marburg, Đức) có nồng độ 3,0U/mL vào (100 μ L thể tích) và thời gian cần để làm đông mẫu được ghi lại. aPTT máu toàn phần được thực hiện bằng cách làm ấm trước 50 μ L máu toàn phần đến nhiệt độ 37°C trong máy xét nghiệm đông máu và bổ sung 50 μ L chất phản ứng aPTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Đức) vào trong thời gian 3 phút. Bắt đầu thời gian đông bằng cách bổ sung 50 μ L canxi clorua có nồng độ 0,025M (37°C) vào. Sau đó, thời gian cần để đông mẫu máu toàn phần được ghi lại.

Kết quả của Fab 18/15 (chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 37; đoạn Fd chuỗi nặng: SEQ ID NO: 41; được tạo ra từ sự phân cắt globulin miễn dịch hoàn toàn bằng papain được biểu hiện trong các tế bào CHO) khi tiêm liều đơn trong tĩnh mạch ở liều lượng đẳng mol dabigatran được thể hiện trong Fig.11 và 12. Có được sự ức chế hoạt tính chống đông dabigatran nhanh, hầu như ngay lập tức, được đo là cả TT (Fig.11) và aPTT (Fig.12) trong dạng này. Trong vòng một phút tiêm, hoạt tính chống đông dabigatran bị trung hòa hoàn toàn dưới mức vạch cơ sở. Hoạt tính này được duy trì qua 20 phút, dù cho đang truyền liên tục dabigatran trong tĩnh mạch.

Với liều lượng thấp hơn, một nửa liều lượng mol dabigatran được cung cấp, ban đầu cũng làm giảm cả TT (Fig.13) và aPTT (Fig.14). Tuy nhiên, điều này không được duy trì ngay cả khi sử dụng liều lượng cao hơn dưới các điều kiện truyền dabigatran liên tục.

Do đó, các kết quả này chứng tỏ sự trung hòa hoạt tính chống đông dabigatran có thể dự báo được phụ thuộc liều lượng và rất nhanh sau khi tiêm liều đơn Fab kháng dabigatran vào trong tĩnh mạch của mô hình động vật này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử kháng thể có tính đặc hiệu liên kết với dabigatran, trong đó phân tử này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng với CDR1 có SEQ ID NO: 1, CDR2 có SEQ ID NO: 7, CDR3 có SEQ ID NO: 10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ với CDR1 có SEQ ID NO: 13, CDR2 có SEQ ID NO: 14, và CDR3 có SEQ ID NO: 15.
2. Phân tử kháng thể theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có SEQ ID NO: 24, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 27.
3. Phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử này là kháng thể đơn dòng, kháng thể người, kháng thể được làm giống của người, kháng thể khảm, đoạn kháng thể, cụ thể là đoạn Fab, Fab', hoặc F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn, cụ thể là đoạn biến đổi chuỗi đơn (scFv), phân tử được miễn dịch mô đun nhỏ (SMIP), hoặc kháng thể kép.
4. Phân tử kháng thể theo điểm 3, trong đó phân tử này là scFv, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với nhau bằng peptit liên kết được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, và SEQ ID NO: 31.
5. Phân tử kháng thể theo điểm 3, trong đó phân tử này có chuỗi nặng chứa SEQ ID NO: 40, và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 35.
6. Phân tử kháng thể theo điểm 3, trong đó phân tử này là phân tử Fab có đoạn Fd chứa SEQ ID NO: 36, hoặc SEQ ID NO: 41, và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 37.
7. Phân tử kháng thể theo điểm 6, trong đó phân tử này có đoạn Fd chứa SEQ ID NO: 36, và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 37.
8. Phương pháp sản xuất phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) tạo ra tế bào chủ chứa một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa phân tử kháng thể đã nêu trong mối liên hệ về mặt chức năng với trình tự kiểm soát biểu hiện;
- (b) nuôi cấy tế bào chủ này; và
- (c) thu hồi phân tử kháng thể từ canh trường tế bào.

9. Kit bao gồm:

- (a) kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, hoặc dược phẩm chứa nó;
- (b) dược phẩm chứa dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của chúng;
- (c) đồ chứa; và
- (d) nhãn.

10. Kit theo điểm 9, trong đó muối dược dụng của dabigatran etexilat là muối mesylat.

11. Kit theo điểm 9 hoặc 10, trong đó nồng độ trong một đơn vị liều dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của chúng nằm trong khoảng từ 75 mg đến 300 mg, một lần một ngày (QD) hoặc hai lần một ngày (BID).

12. Kit bao gồm:

- (a) dược phẩm thứ nhất chứa dabigatran, dabigatran etexilat, tiền dược chất của dabigatran hoặc muối dược dụng của chúng;
- (b) dược phẩm thứ hai chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7;
- (c) hướng dẫn để sử dụng riêng dược phẩm thứ nhất và dược phẩm thứ hai cho bệnh nhân;

trong đó dược phẩm thứ nhất và dược phẩm thứ hai được chứa trong các đồ chứa riêng rẽ và dược phẩm thứ hai để dùng cho bệnh nhân cần trung hòa hoặc trung hòa một phần dabigatran hoặc 1-O-axylglucuronit của dabigatran.

13. Dược phẩm chứa phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, và chất mang dược dụng.

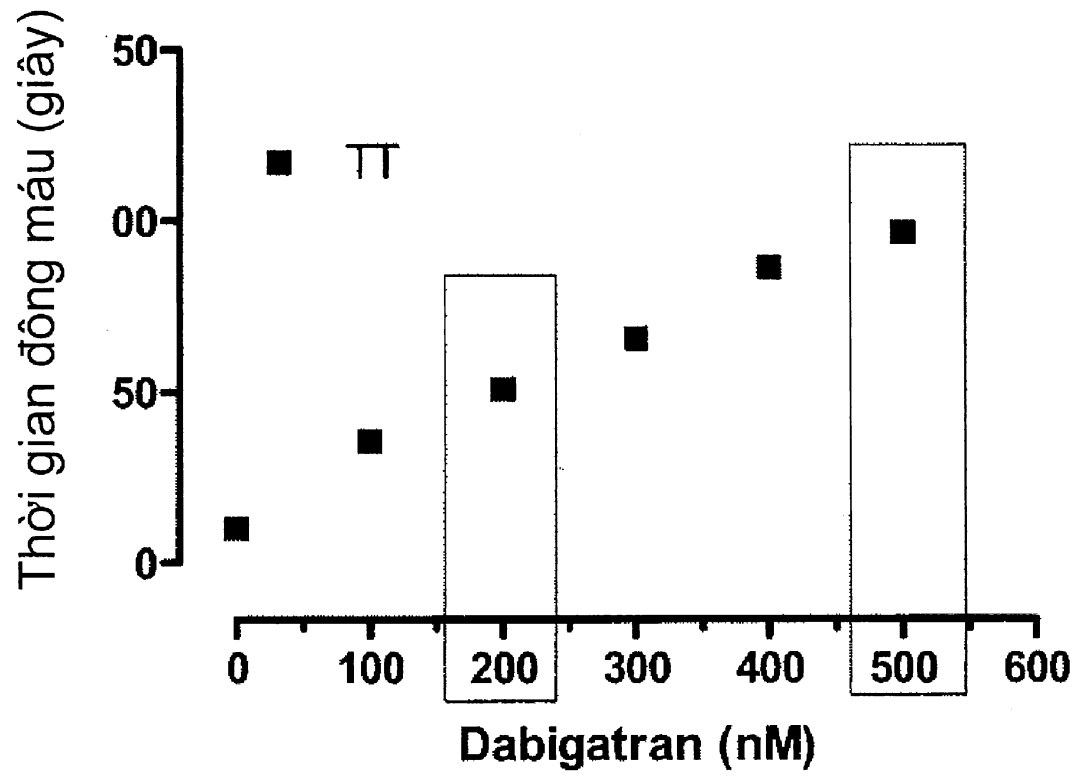


Fig.1

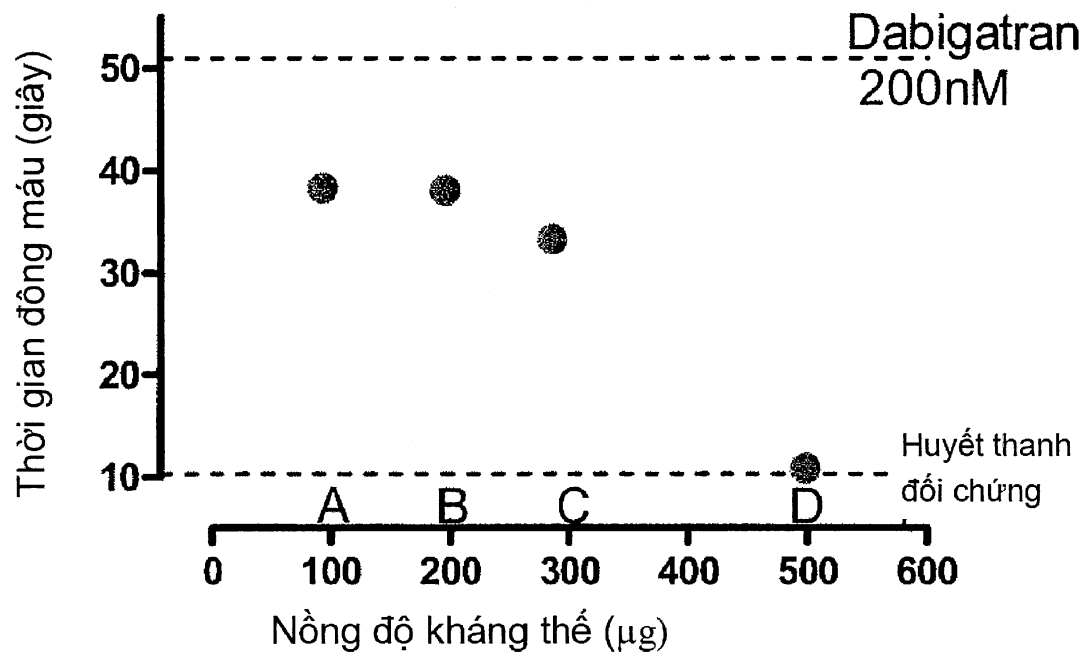
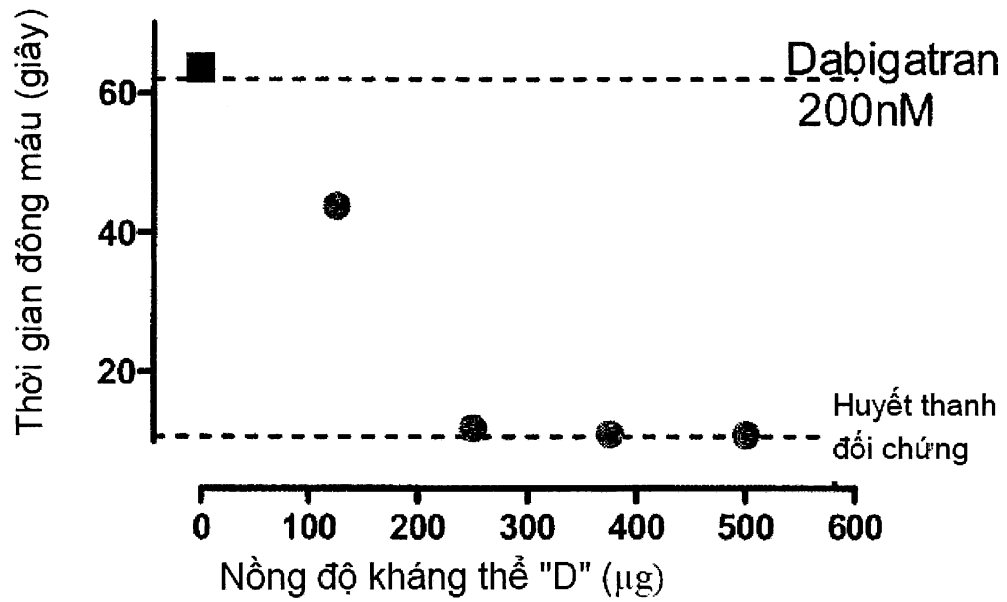


Fig.2



■ Kháng thể đa dòng không đặc hiệu ($167\mu\text{g}$) + dabigatran 200nM

Fig.3

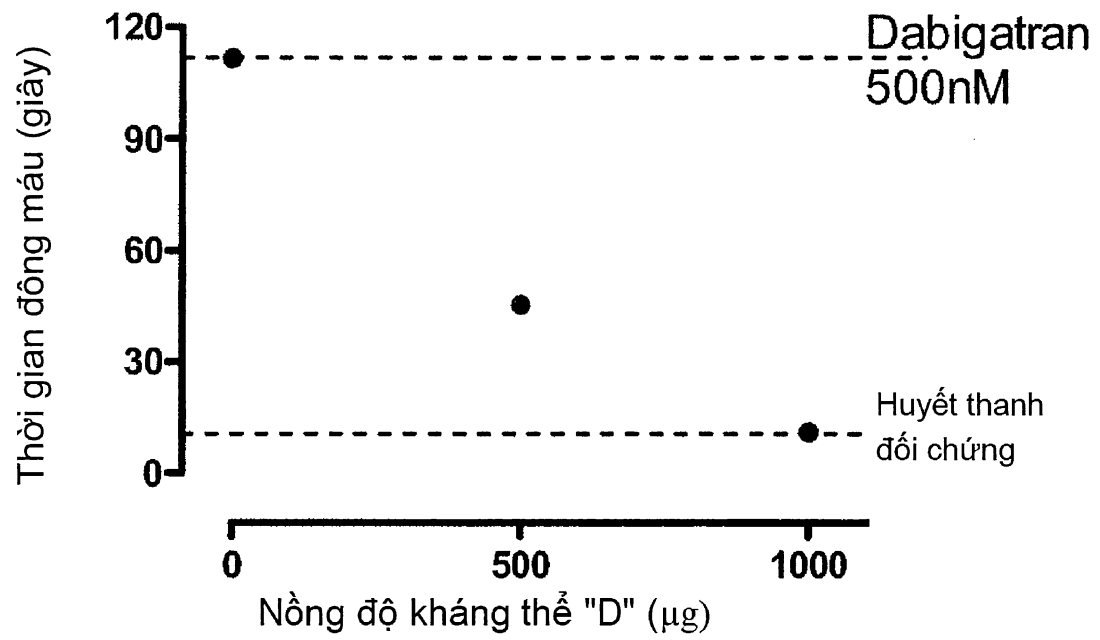


Fig.4

Fig.5

	012345678910111213141516171819202122232425262728293031323334353637383940414243444546474849505152535455565758596061626364656667686970717273747576777879808182838485868788899091929394959697989910010110210310410510610710810911011111211311411511611711811912012112212312412512612712812913013113213313413513613713813914014114214314414514614714814915015115215315415515615715815916016116216316416516616716816917017117217317417517617717817918018118218318418518618718818919019119219319419519619719819920020120220320420520620720820921021121221321421521621721821922022122222322422522622722822923023123223323423523623723823924024124224324424524624724824925025125225325425525625725825926026126226326426526626726826927027127227327427527627727827928028128228328428528628728828929029129229329429529629729829930030130230330430530630730830931031131231331431531631731831932032132232332432532632732832933033133233333433533633733833934034134234334434534634734834935035135235335435535635735835936036136236336436536636736836937037137237337437537637737837938038138238338438538638738838939039139239339439539639739839940040140240340440540640740840941041141241341441541641741841942042142242342442542642742842943043143243343443543643743843944044144244344444544644744844945045145245345445545645745845946046146246346446546646746846947047147247347447547647747847948048148248348448548648748848949049149249349449549649749849950050150250350450550650750850951051151251351451551651751851952052152252352452552652752852953053153253353453553653753853954054154254354454554654754854955055155255355455555655755855956056156256356456556656756856957057157257357457557657757857958058158258358458558658758858959059159259359459559659759859960060160260360460560660760860961061161261361461561661761861962062162262362462562662762862963063163263363463563663763863964064164264364464564664764864965065165265365465565665765865966066166266366466566666766866967067167267367467567667767867968068168268368468568668768868969069169269369469569669769869970070170270370470570670770870971071171271371471571671771871972072172272372472572672772872973073173273373473573673773873974074174274374474574674774874975075175275375475575675775875976076176276376476576676776876977077177277377477577677777877978078178278378478578678778878979079179279379479579679779879980080180280380480580680780880981081181281381481581681781881982082182282382482582682782882983083183283383483583683783883984084184284384484584684784884985085185285385485585685785885986086186286386486586686786886987087187287387487587687787887988088188288388488588688788888989089189289389489589689789889990090190290390490590690790890991091191291391491591691791891992092192292392492592692792892993093193293393493593693793893994094194294394494594694794894995095195295395495595695795895996096196296396496596696796896997097197297397497597697797897998098198298398498598698798898999099199299399499599699799899910001001100210031004100510061007100810091010101110121013101410151016101710181019102010211022102310241025102610271028102910301031103210331034103510361037103810391040104110421043104410451046104710481049105010511052105310541055105610571058105910601061106210631064106510661067106810691070107110721073107410751076107710781079108010811082108310841085108610871088108910901091109210931094109510961097109810991100110111021103110411051106110711081109111011111112111311141115111611171118111911201121112211231124112511261127112811291130113111321133113411351136113711381139114011411142114311441145114611471148114911501151115211531154115511561157115811591160116111621163116411651166116711681169117011711172117311741175117611771178117911801181118211831184118511861187118811891190119111921193119411951196119711981199120012011202120312041205120612071208120912101211121212131214121512161217121812191220122112221223122412251226122712281229123012311232123312341235123612371238123912401241124212431244124512461247124812491250125112521253125412551256125712581259126012611262126312641265126612671268126912701271127212731274127512761277127812791280128112821283128412851286128712881289129012911292129312941295129612971298129913001301130213031304130513061307130813091310131113121313131413151316131713181319132013211322132313241325132613271328132913301331133213331334133513361337133813391340134113421343134413451346134713481349135013511352135313541355135613571358135913601361136213631364136513661367136813691370137113721373137413751376137713781379138013811382138313841385138613871388138913901391139213931394139513961397139813991400140114021403140414051406140714081409141014111412141314141415141614171418141914201421142214231424142514261427142814291430143114321433143414351436143714381439144014411442144314441445144614471448144914501451145214531454145514561457145814591460146114621463146414651466146714681469147014711472147314741475147614771478147914801481148214831484148514861487148814891490149114921493149414951496149714981499150015011502150315041505150615071508150915101511151215131514151515161517151815191520152115221523152415251526152715281529153015311532153315341535153615371538153915401541154215431544154515461547154815491550155115521553155415551556155715581559156015611562156315641565156615671568156915701571157215731574157515761577157815791580158115821583158415851586158715881589159015911592159315941595159615971598159916001601160216031604160516061607160816091610161116121613161416151616161716181619162016211622162316241625162616271628162916301631163216331634163516361637163816391640164116421643164416451646164716481649165016511652165316541655165616571658165916601661166216631664166516661667166816691670167116721673167416751676167716781679168016811682168316841685168616871688168916901691169216931694169516961697169816991700170117021703170417051706170717081709171017111712171317141715171617171718171917201721172217231724172517261727172817291730173117321733173417351736173717381739174017411742174317441745174617471748174917501751175217531754175517561757175817591760176117621763176417651766176717681769177017711772177317741775177617771778177917801781178217831784178517861787178817891790179117921793179417951796179717981799180018011802180318041805180618071808180918101811181218131814181518161817181818191820182118221823182418251826182718281829183018311832183318341835183618371838183918401841184218431844184518461847184818491850185118521853185418551856185718581859186018611862186318641865186618671868186918701871187218731874187518761877187818791880188118821883188418851886188718881889189018911892189318941895189618971898189919001901190219031904190519061907190819091910191119121913191419151916191719181919192019211922192319241925192619271928192919301931193219331934193519361937193819391940194119421943194419451946194719481949195019511952195319541955195619571958195919601961196219631964196519661967196819691970197119721973197419751976197719781979198019811982198319841985198619871988198919901991199219931994199519961997199819992000200120022003200420052006200720082009201020112012201320142015201620172018201920202021202220232024202520262027202820292030203120322033203420352036203720382039204020412042204320442045204620472048204920502051205220532054205520562057205820592060206120622063206420652066206720682069207020712072207320742075207620772078207920802081208220832084208520862087208820892090209120922093209420952096209720982099210021012102210321042105210621072108210921102111211221132114211521162117211821192120212121222123212421252126212721282129213021312132213321342135213621372138213921402141214221432144214521462147214821492150215121522153215421552156215721582159216021612162216321642165216621672168216921702171217221732174217521762177217821792180218121822183218421852186218721882189219021912192219321942195219621972198219922002201220222032204220522062207220822092210221122122213221422152216221722182219222022212222222322242225222622272228222922302231223222332234223522362237223822392240224122422243224422452246224722482249225022512252225322542255225622572258225922602261226222632264226522662267226822692270227122722273227422752276227722782279228022812282228322842285228622872288228922902291229222932294229522962297229822992300230123022303230423052306230723082309231023112312231323142315231623172318231923202321232223232324232523262327232823292330233123322333233423352336233723382339234023412342234323442345234623472348234923502351235223532354235523562357235823592360236123622363236423652366236723682369237023712372237323742375237623772378237923802381238223832384238523862387238823892390239123922393239423952396239723982399240024012402240324042405240624072408240924102411241224132414241524162417241824192420242124222423242424252426242724282429243024312432243324342435243624372438243924402441244224432444244524462447244824492450245124522453245424552456245724582459246024612462246324642465246624672468246924702471247224732474247524762477247824792480248124822483248424852486248724882489249024912492249324942495249624972498249925002501250225032504250525062507250825092510251125122513251425152516251725182519252025212522252325242525252625272528252925302531253225332534253525362537253825392540254125422543254425452546254725482549255025512552255325542555255625572558255925602561256225632564256525662567256825692570257125722573257425752576257725782579258025812582258325842585258625872588258925902591259225932594259525962597259825992600260126022603260426052606260726082609261026112612261326142615261626172618261926202621262226232624262526262627262826292630263126322633263426352636263726382639264026412642264326442645264626472648264926502651265226532654265526562657265826592660266126622663266426652666266726682669267026712672267326742675267626772678267926802681268226832684268526862687268826892690269126922693269426952696269726982699270027012702270327042705270627072708270927102711271227132714271527162717271827192720272127222723272427252726272727282729273027312732273327342735273627372738273927402741274227432744274527462747274827492750275127522753275427552756275727582759276027612762276327642765276627672768276927702771277227732774277527762777277827792780278127822783278427852786278727882789279027912792279327942795279627972798279928002801280228032804280528062807280828092810281128122813281428152816281728182819282028212822282328242825282628272828282928302831283228332834283528362837283828392840284128422843284428452846284728482849285028512852285328542855285628572858285928602861286228632864286528662867286828692870287128722873287428752876287728782879288028812882288328842885288628872888288928902891289228932894289528962897289828992900290129022903290429052906290729082909291029112912291329142915291629172918291929202921292229232924292529262927292829292930293129322933293429352936293729382939294029412942294329442945294629472948294929502951295229532954295529562957295829592960296129622963296429652966296729682969297029712972297329742975297629772978297929802981298229832984298529862987298829892990299129922993299429952996299729982999300030013002300330043005300630073008300930103011301230133014301530163017301830193020302130223023302430253026302730283029303030313032303330343035303630373038303930403041304230433044304530463047304830493050305130523053305430553056305730583059306030613062306330643065306630673068306930703071307230733074307530763077307830793080308130823083308430853086308730883089309030913092309330943095309630973098309931003101310231033104310531063107310831093110311131123113311431153116311731183119312031213122312331243125312631273128312931303131313231333134313531363137313831393140314131423143314431453146314731483149315031513152315331543155315631573158315931603161316231633164316531663167316831693170317131723173317431753176317731783179318031813182318331843185318631873188318931903191319231933194319531963197319831993200320132023203320432053206320732083209321032113212321332143215321632173218321932203221322232233223432253226322732283229323032313232323332343235323632373238323932403241324232433244324532463247324832493250325132523253325432553256325732583259326032613262326332643265326632673268326932703271327232733274327532763277327832793280328132823283328432853286328732883289329032913292329332943295329632973298329933003301330233033304330533063307330833093310331133123313331433153316331733183319332033213322332333243325332633273328332933303331333233333334333533
--	---

Fig. 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Chothia
Kabat
IMGT

>DBG 13	VK	DIVMTQTPTL	SVTIGQPASIS	<u>CKSSQSLLYTNGKTYLY</u>	YWL	LQ	RP	GQ	SP	KRLI	Y				
>DBG 14	VK	DVVL	VTQTPTL	SVTIGQPASIS	<u>CKSSQSLLYTNGKSYLY</u>	YWL	LQ	RP	GQ	SP	KRLI				
>DBG 22	VK	DVVM	VTQTPTL	SVTIGQPASIS	<u>CKSSQSLLYTNGKTYLY</u>	YWL	LQ	RP	GQ	SP	KRLI				
>Eng VK#11		DVVM	TQSP	LSLP	VT	LGQPASIS	<u>CKSSQSLLYT</u>	DDGKTYLY	YWF	LQ	RP	GQ	SP	KRLI	
>Eng VK#17		DVVM	TQSP	LSLP	VT	LGQPASIS	<u>CKSSQSLLYT</u>	DDGKTYLY	YWF	Q	Q	RP	GQ	SP	KRLI
>Eng VK#18		DVVM	TQSP	LSLP	VT	LGQPASIS	<u>CKSSQSLLYT</u>	DDGKTYLY	YWF	LQ	RP	GQ	SP	PR	RLI

107
106
105
104
103
102
101
100
99
98
97
96
95
94
93
92
91
90
89
88
87
86
85
84
83
82
81
80
79
78
77
76
75
74
73
72
71
70
69
68
67
66
65
64
63
62
61
60
59
58
57
56
55
54
53
52
51
50

Chothia	Kabat	IMGT
Chothia	Kabat	IMGT

	DBG 13 VK	DBG 14 VK	DBG 22 VK	Eng VK#11	Eng VK#17	Eng VK#18																	
LVSKLD	SGV	PD	RR	FS	GS	GS	GT	DF	TL	KI	SR	VE	AE	D	LV	YY	C	<u>LQSTHFPHT</u>	FF	GG	TK	LE	IK
LVSKLD	SGV	PD	RR	FS	GS	GS	GT	DF	TL	KI	SG	VE	AE	D	VI	YY	C	<u>LQSTHFPHT</u>	FF	GG	TK	LE	IK
LVSKLD	SGV	PD	RR	FS	GS	GS	GT	DF	TL	KI	SR	VE	AE	D	VI	YY	C	<u>LQSTHFPHT</u>	FF	GG	TK	LE	IK
LVSKLD	SGV	PD	RR	FS	GS	GS	GT	DF	TL	KI	SR	VE	AE	D	VI	YY	C	<u>LQSTHFPHT</u>	FF	GG	TK	VE	IK
LVSKLD	SGV	PD	RR	FS	GS	GS	GT	DF	TL	KI	SR	VE	AE	D	VI	YY	C	<u>LQSTHFPHT</u>	FF	GG	TK	VE	IK
LVSKLD	SGV	PD	RR	FS	GS	GS	GT	DF	TL	KI	SR	VE	AE	D	VI	YY	C	<u>LQSTHFPHT</u>	FF	GG	TK	VE	IK

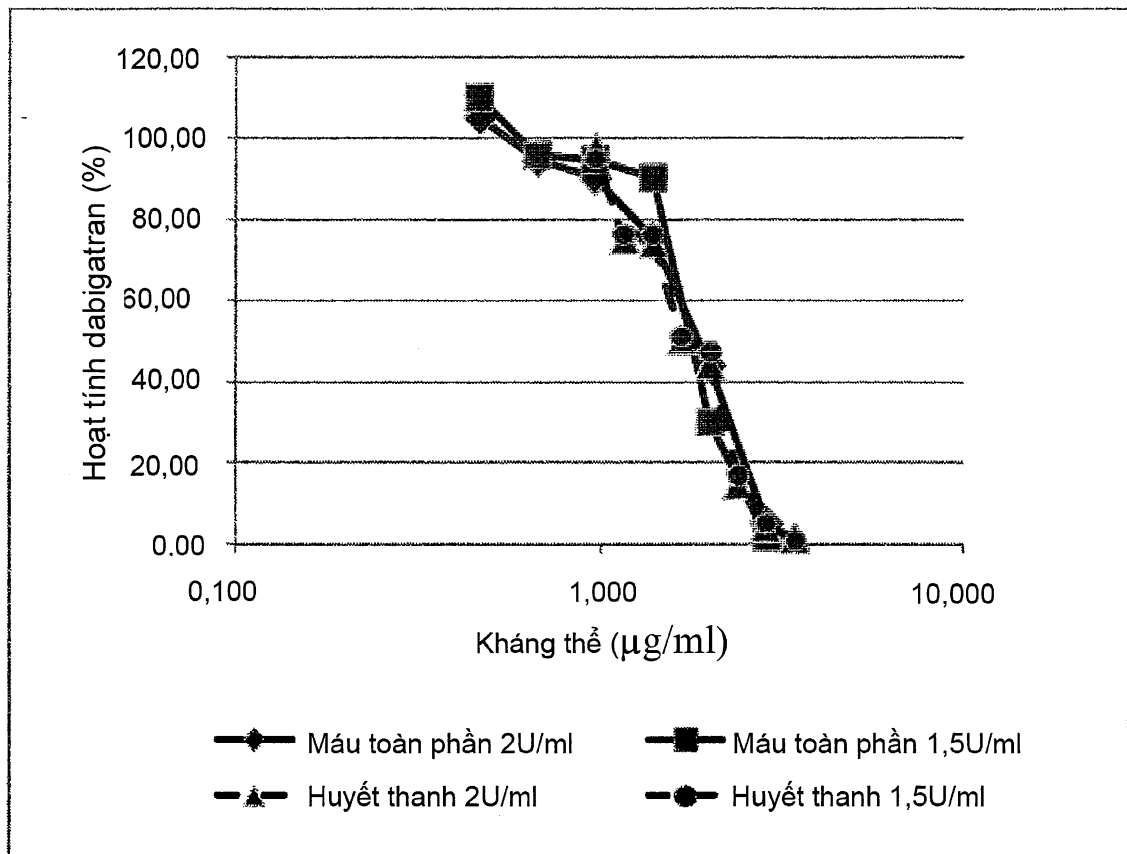


Fig.7

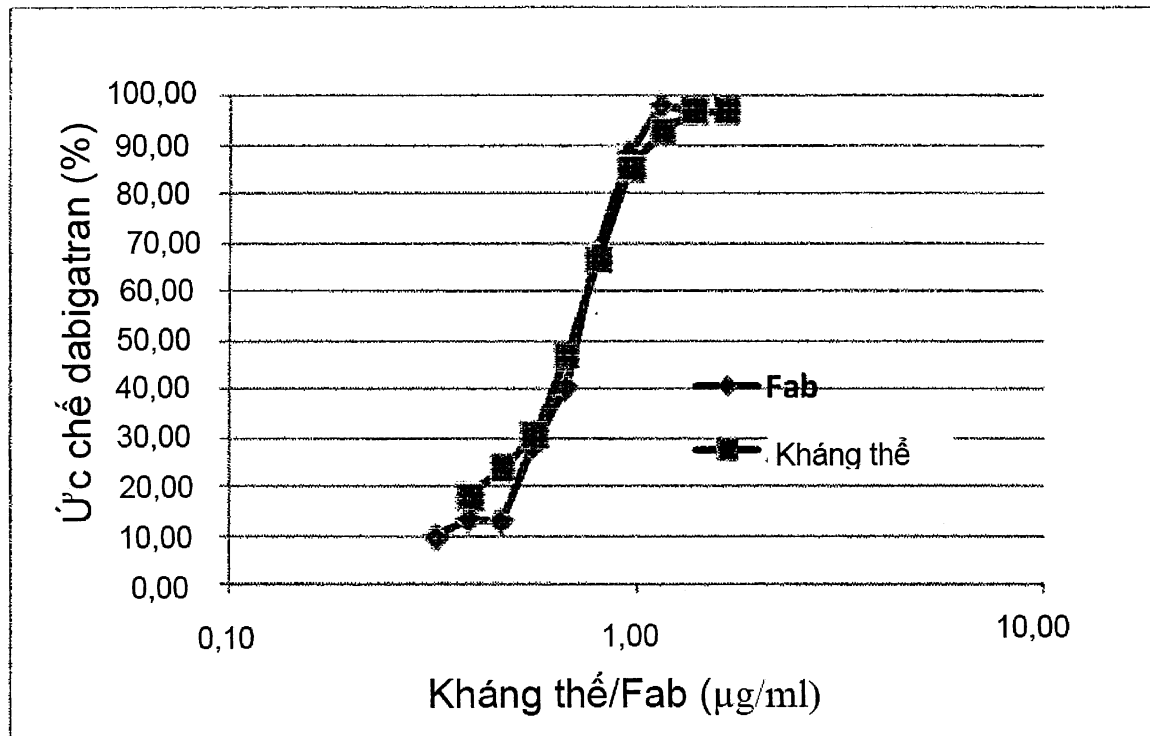


Fig.8

9/14

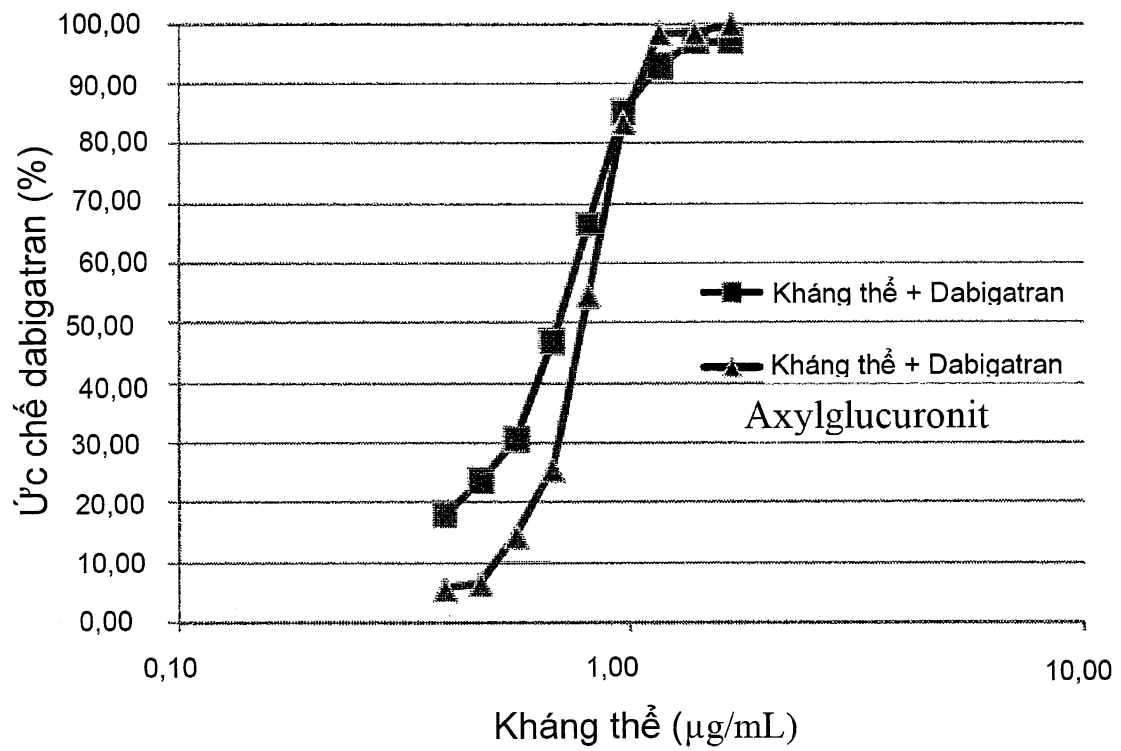


Fig.9

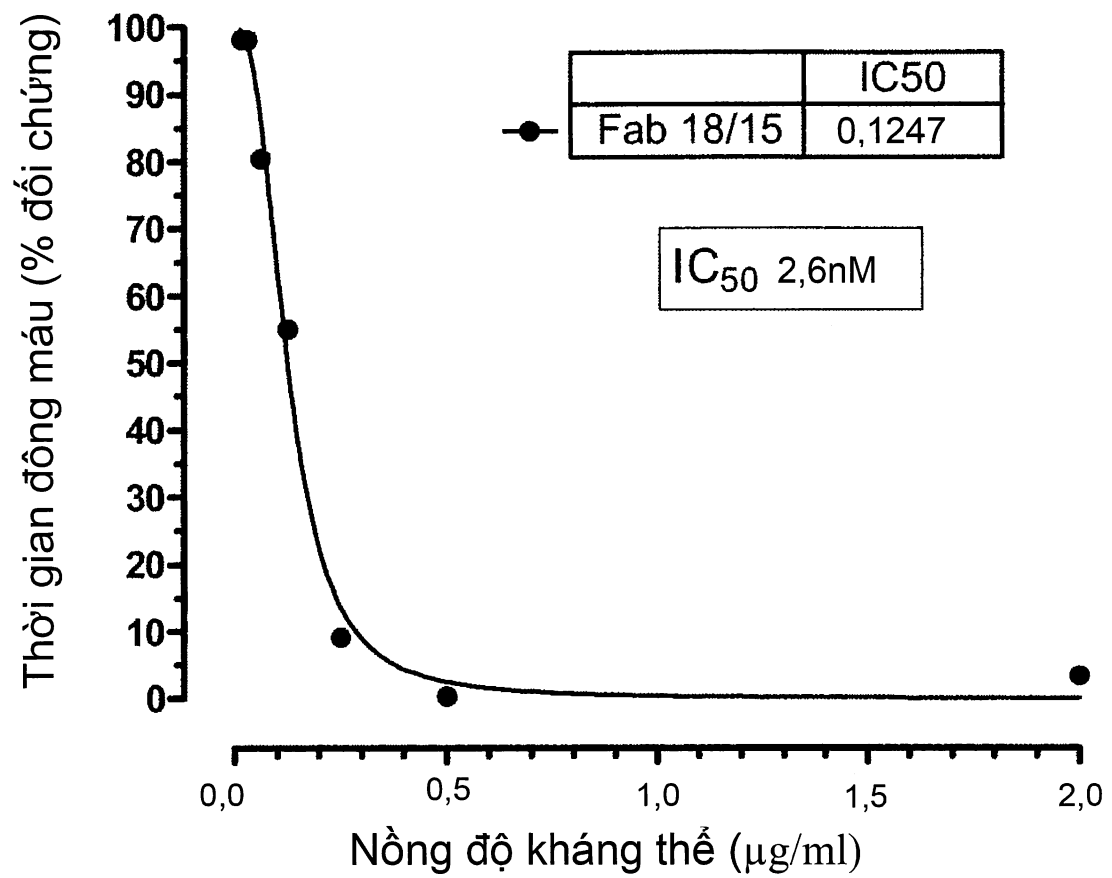
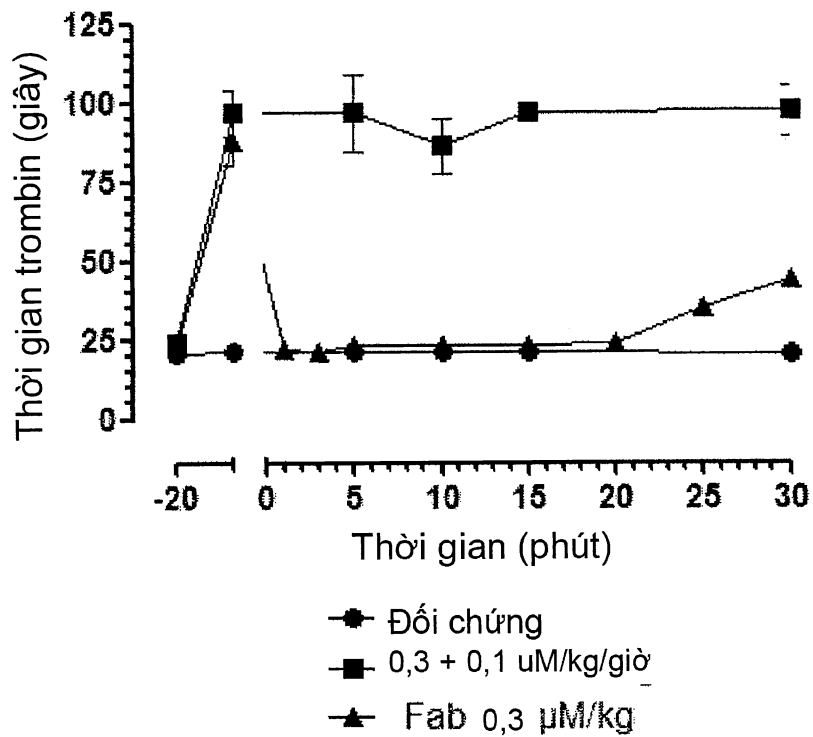


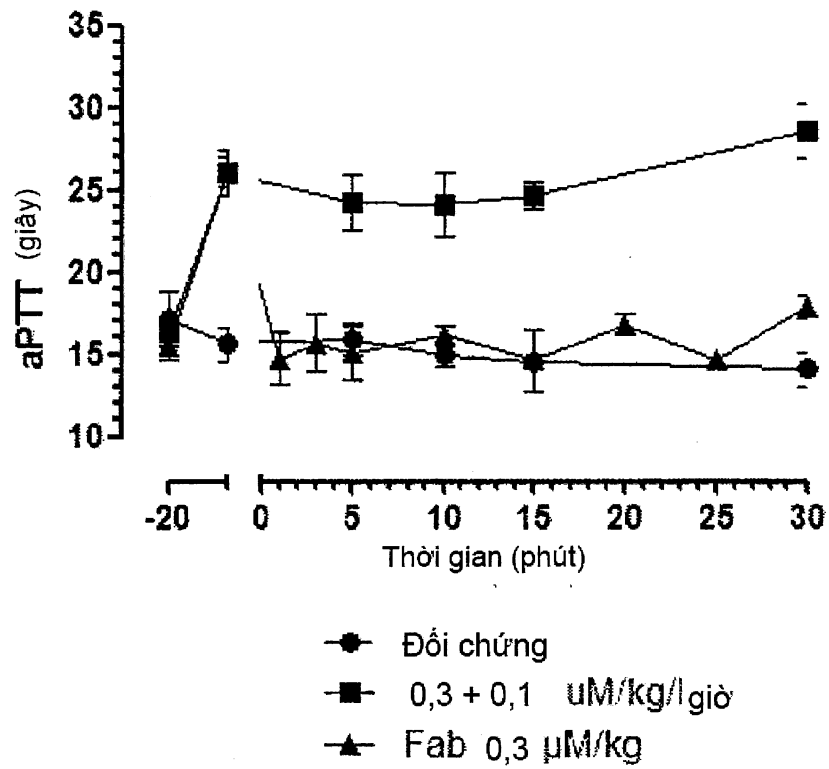
Fig.10



Dabigatran: tiêm tĩnh mạch nhanh (0,3 μ M/kg) + truyền 0,1 μ M/kg/giờ
 thời gian trombin: trombin 3,0U/ml sử dụng trong thử nghiệm
 Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SE, n=4

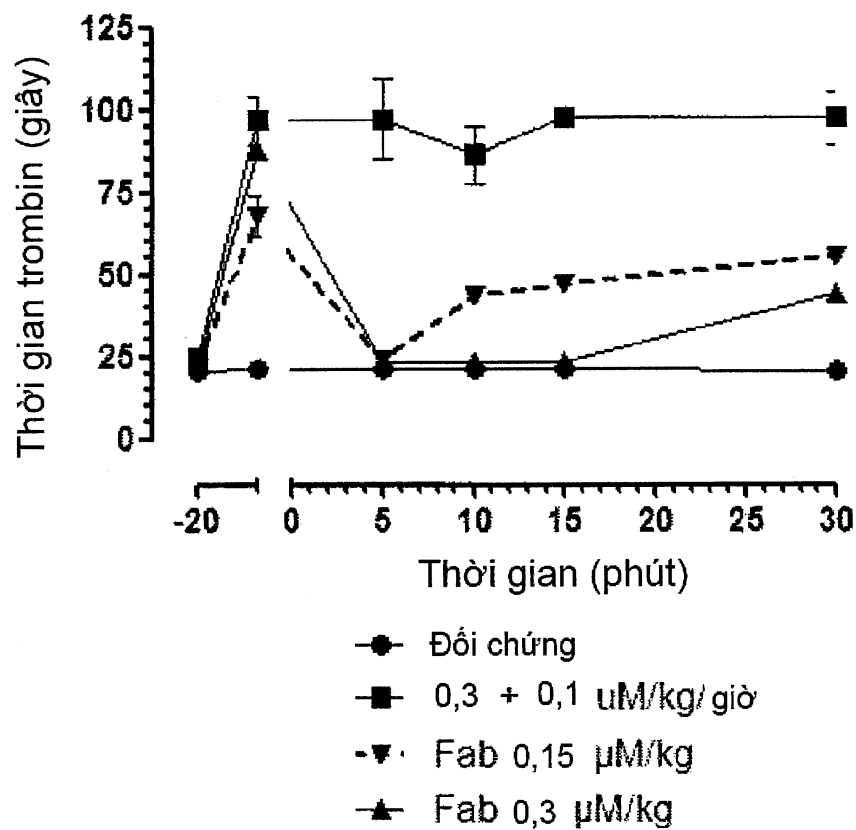
Fig.11

12/14



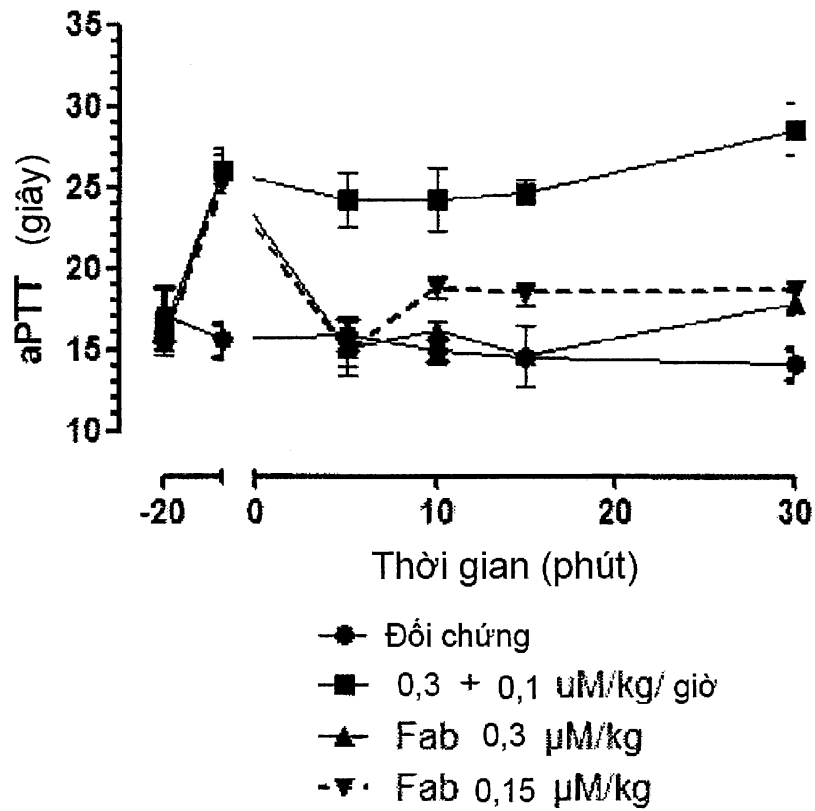
Dabigatran: tiêm tĩnh mạch nhanh (0,3 μ M/kg + truyền 0,1 μ M/kg/giờ)
 Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SE, n=4

Fig.12



Dabigatran tiêm tĩnh mạch nhanh ($0,3\mu\text{M/kg}$ + truyền $0,1\mu\text{M/kg/giờ}$)
 thời gian trombin: trombin $3,0\text{U/ml}$ sử dụng trong thử nghiệm
 Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SE, $n=4$

Fig.13



Dabigatran tiêm tĩnh mạch nhanh ($0,3\mu\text{M/kg} + \text{truyền } 0,1 \mu\text{M/kg/giờ}$)
 Dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SE, $n=4$

Fig.14

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> PHÂN TỬ KHÁNG THỂ TRUNG HÒA HOẠT TÍNH CỦA CHẤT CHỐNG ĐÔNG,
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ KIT BAO GỒM PHÂN TỬ KHÁNG THỂ NÀY

<130> P01-2585/WO/1

<160> 45

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CDR1 A

<400> 1

Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Asp
1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CDR 1B

<400> 2

Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	Ile	Val	Asp
1				5					10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CDR2 A

<400> 3

Val	Ile	Trp	Gly	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CDR2 B

<400> 4

Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser
1				5					10					15	

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CDR2 C

<400> 5

Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser
1				5					10					15	

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CDR2 D

<400> 6

Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser
1				5					10					15	

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CDR2 E

<400> 7

Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser
1				5					10					15	

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CDR2 F

<400> 8

19861

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH CDR3 A

<400> 9

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

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH CDR3 B

<400> 10

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

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VK CDR1 A

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VK CDR1 B

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 13
<211> 16

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VK CDR1 C

<400> 13

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VK CDR2

<400> 14

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VK CDR3

<400> 15

Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr
 1 5

<210> 16
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 16

Asp Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

19861

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

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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> Chuột nhà

<400> 17

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 18
<211> 122
<212> PRT
<213> Chuột nhà

<400> 18

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

Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asn Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 19

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 20

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

Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Chuột nhà

<400> 21

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, vùng biến đổi chuỗi nặng
ENG VH

14

<400> 22

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, vùng biến đổi chuỗi nhẹ
ENG VK

11

<400> 23

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, vùng biến đổi chuỗi nặng
ENG VH

15

<400> 24

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, vùng biến đổi chuỗi nhẹ,
ENG VK

17

<400> 25

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 26

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, vùng biến đổi chuỗi nặng
ENG VH

31

<400> 26

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

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

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

Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg
	50					55					60				

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

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

Ser	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp
			100					105					110		

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

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, vùng biến đổi chuỗi nhẹ,
ENG VK

18

<400> 27

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

Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Thr
			20					25					30		

Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Liên kết

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Liên kết

<400> 29

Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
 1 5 10 15

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly
 20 25

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Liên kết

<400> 30

Ser Pro Asn Gly Ala Ser His Ser Ser Ser Ala Ser Gln Thr Gly Ser
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Ser Gln
20

<210> 31
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết

<400> 31

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 32
<211> 251
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, scFv

<400> 32

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

Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly
35 40 45

Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly
50 55 60

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

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu
85 90 95

Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

19861

Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
130 135 140

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser
145 150 155 160

Tyr Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu
180 185 190

Arg Ser Arg Val Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
195 200 205

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr
225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 33
<211> 251
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, scFv2

<400> 33

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

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

Ser Tyr Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala
50 55 60

19861

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr
130 135 140

Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
145 150 155 160

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Lys Thr Tyr
165 170 175

Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
180 185 190

Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His
225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
245 250

<210> 34

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, chuỗi nặng IgG1

<400> 34

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

19861

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr	20	25	30
Ile	Val	Asp	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45
Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg	50	55	60
Ser	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	65	70	75
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95
Ser	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Gly	Phe	Ala	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
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	Lys	Ser	210	215	220
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	225	230	235
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> 35

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, chuỗi nhẹ IgG1

<400> 35

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 36

<211> 225

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, Fab Fd

19861

<400> 36

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys
225

19861

<210> 37
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, chuỗi nhẹ Fab

 <400> 37

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

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30

 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
 85 90 95

 Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

19861

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 38
<211> 226
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, Fab Fd

<400> 38

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

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser
20 25 30

Tyr Ile Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu
50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

19861

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

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

Ser Cys
225

<210> 39
<211> 220
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, chuỗi nhẹ Fab

<400> 39

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

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr
20 25 30

Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln
85 90 95

Ser Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

19861

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 40

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, chuỗi nặng IgG1

<400> 40

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala 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

19861

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	Ala	Ala	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> 41
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự của kháng thể được thiết kế, Fab Fd

<400> 41

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His
225

<210> 42
<211> 452
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng IgG thể khâm của chuột/người
<400> 42

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

Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

19861

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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 Ala Ala
 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

19861

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> 43
<211> 219
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ IgG thể khảm của chuột/người

<400> 43

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
85 90 95

19861

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

19861

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 45
<211> 330
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

19861

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

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

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

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

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

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

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

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