



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

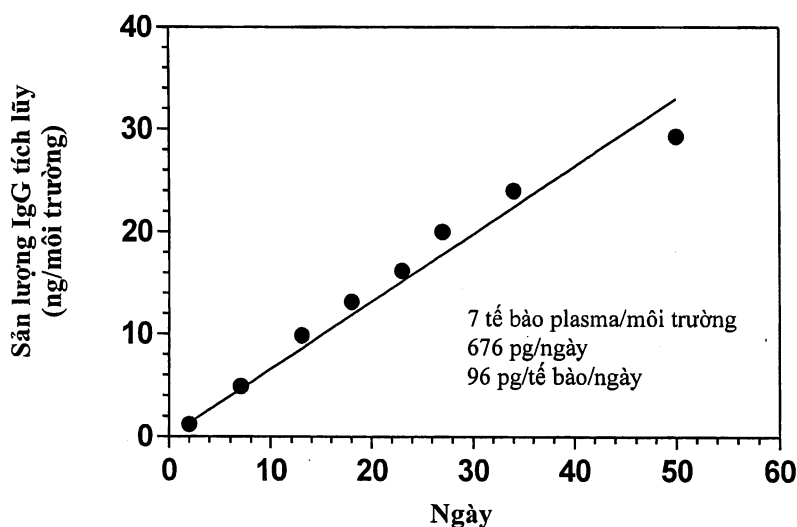
(11) 
1-0021006

(51)⁷ **C07K 16/00, 16/10, C12N 5/0781, C07K** (13) **B**
16/12

(21)	1-2011-01078	(22)	22.10.2009		
(86)	PCT/IB2009/007375	22.10.2009	(87)	WO2010/046775	29.04.2010
(30)	0819376.5	22.10.2008	GB		
	61/181,582	27.05.2009	US		
	PCT/IB2009/006616	27.07.2009	IB		
	12/509,731	27.07.2009	US		
(45)	27.05.2019	374	(43)	25.04.2012	289
(73)	INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE (CH) Via Vela 6, CH-5400 Bellinzona Switzerland.				
(72)	LANZAVECCHIA, Antonio (CH), JARROSSAY, David (CH)				
(74)	Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)				

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ TỪ TẾ BÀO PLASMA**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể, bao gồm cả kháng thể đơn dòng, từ tế bào plasma, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma. Sáng chế cũng đề cập đến việc xác định kháng thể bằng cách phân tích kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào plasma này để xác định chức năng, tính đặc hiệu liên kết, tính đặc hiệu epitop và/hoặc khả năng trung hòa độc tố hoặc mầm bệnh của chúng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể, kể cả kháng thể đơn dòng, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp nhận diện kháng thể bằng cách phân tích kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào plasma này để xác định chức năng, tính đặc hiệu liên kết, tính đặc hiệu epitop và/hoặc khả năng trung hòa độc tố hoặc mầm bệnh của chúng. Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng được sản xuất bởi phương pháp theo sáng chế cũng như các phương pháp sử dụng kháng thể và các đoạn kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào plasma là tế bào không tăng sinh, được biệt hóa cuối cùng, các tế bào này tiết ra kháng thể với tỷ lệ cao (hàng ngàn phân tử/giây, tương ứng khoảng 30-50 pg/tế bào/ngày).

Việc phân lập kháng thể, ví dụ kháng thể đơn dòng, từ tế bào plasma dựa vào việc nhân dòng và biểu hiện gen globulin miễn dịch. Việc phân lập này có thể thực hiện được bằng cách sử dụng thư viện biểu hiện thực khuẩn thể của phức hợp gen VH và VL được phân lập từ tế bào plasma, hoặc phân lập cặp gen VH và VL từ tế bào plasma bằng cách sử dụng PCR từng tế bào riêng lẻ. Tuy nhiên, với mục đích sàng lọc các kháng thể được tạo ra bởi tế bào plasma thì các gen globulin miễn dịch này cần được nhân dòng và biểu hiện ở dạng tái tổ hợp nhằm xác định tính chất về tính đặc hiệu và chức năng của kháng thể được mã hóa này. Phương pháp này rắc rối, mất thời gian và tiền bạc, không thích hợp để thu được lượng kháng thể lớn và không hiệu quả để thu được các kháng thể hiếm được tạo ra bởi phân đoạn rất nhỏ trong tổng các phân đoạn của tế bào plasma.

Do đó, cần có một phương pháp hiệu quả, thích hợp hơn để thu được lượng kháng thể lớn nhằm phân lập và sàng lọc các kháng thể này từ tế bào plasma, như kháng thể đơn dòng chẳng hạn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một phần, sáng chế dựa trên việc tìm ra phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma với sản lượng cao và hiệu quả, phương pháp này còn bao gồm bước xác định đặc tính kháng thể mà không cần dựa vào việc nhân dòng và biểu hiện gen globulin miễn dịch. Kháng thể được sản xuất từ quy trình theo sáng chế có thể được xác định đặc tính bằng cách sàng lọc nhiều lần, bao gồm phân tích liên kết, phân tích chức năng và/hoặc phân tích trung hòa. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp xác định kháng thể hiếm được tạo ra bởi tế bào plasma.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng từ tế bào plasma bao gồm bước nuôi cấy tế bào plasma trong môi trường nuôi cấy đơn bào. Phương pháp theo sáng chế này có thể còn bao gồm bước xác định đặc tính kháng thể hoặc đoạn kháng thể. Việc xác định đặc tính kháng thể hoặc đoạn kháng thể này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiến hành phân tích chức năng để xác định chức năng của kháng thể hoặc đoạn kháng thể đó, phân tích liên kết để xác định tính đặc hiệu liên kết của kháng thể hoặc đoạn kháng thể hoặc nhận biết epitop bởi kháng thể hoặc đoạn kháng thể đó, và/hoặc phân tích trung hòa để xác định khả năng trung hòa độc tố hoặc mầm bệnh của kháng thể hoặc đoạn kháng thể đó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể. Phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma, xác định môi trường nuôi cấy tạo ra kháng thể với đặc tính mong muốn, phân lập axit nucleic mã hóa kháng thể này, và biểu hiện axit nucleic đó trong tế bào chủ.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập bởi phương pháp theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chẩn đoán và/hoặc điều trị nhiều căn bệnh hoặc bệnh trạng bằng cách sử dụng kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sản lượng tích lũy IgG bởi tế bào plasma CD138 + được phân lập từ máu ngoại vi và nuôi cấy trên đơn lớp tế bào gốc trung mô trong 50 ngày.

Fig.2 thể hiện sản lượng tích lũy IgG bởi tế bào plasma CD138 + trong môi trường nuôi cấy có chứa các tế bào plasma đơn lẻ được phân lập từ (A) máu ngoại vi

và (B) tủy xương.

Fig.3 thể hiện kết quả kiểm tra dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào plasma sau 10 ngày có lượng CD138 cao được phân lập từ máu ngoại vi và được nuôi cấy trên đơn lớp trên tế bào gốc trung mô với sự có mặt của IgG, IgA, IgM và IgE.

Fig.4 thể hiện hiệu quả nuôi cấy tế bào tiết ra kháng thể (ASC: antibody-secreting cell) để tạo ra kháng thể IgG, IgA hoặc IgM khi nuôi cấy trên tế bào hMSC-TERT và được biểu hiện theo tỷ lệ phần trăm lượng tế bào plasma có thời gian sống đủ dài để tạo ra kháng thể với các lượng phát hiện được trong dịch nổi nuôi cấy.

Fig.5 thể hiện việc xác định tế bào plasma tiết ra IgG đặc hiệu độc tố uốn ván từ tế bào plasma được phân lập từ máu ngoại vi thu nhận sau 7 ngày tiêm chủng nhắc lại độc tố uốn ván (TT: tetanus toxoid).

Fig.6 thể hiện việc liên kết của kháng thể tái tổ hợp với độc tố độc tố uốn ván được tạo ra bởi việc nhân dòng và biểu hiện gen VH và VL từ tế bào plasma được nuôi cấy phân lập từ máu của người cho sau 10 năm tiêm chủng vaccin bằng độc tố uốn ván.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế dựa trên việc tìm ra phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma với sản lượng cao và hiệu quả, phương pháp này cho phép xác định đặc tính kháng thể mà không cần dựa vào việc nhân dòng và biểu hiện gen globulin miễn dịch. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma. Kháng thể được sản xuất bởi phương pháp theo sáng chế có thể được xác định đặc tính một cách thuận tiện bằng cách sàng lọc nhiều lần, bao gồm phân tích liên kết, phân tích chức năng và/hoặc trung hòa, thậm chí việc phân tích này có thể tiến hành tại chỗ, nghĩa là, trong các giếng mà tế bào plasma được nuôi cấy.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tế bào plasma” bao gồm tất cả tế bào tiết ra kháng thể sơ cấp (ASC: antibody secreting cell) được tìm thấy trong máu ngoại vi, tủy xương, mô hoặc dịch thể, hoặc hình thành *in vitro* từ tế bào B. Gần đây, các tế bào plasma được sinh ra được coi như là “nguyên bào plasma”. Nguyên bào plasma hình thành một cách tự nhiên thường được tìm thấy trong máu, cụ thể là trong máu ngoại vi. Nguyên bào plasma cũng có thể được tạo ra *in vitro* bằng cách kích thích tế bào B với nhiều tác nhân kích thích, bao gồm tác nhân hoạt hóa đa dòng như là chất chủ vận

TLR. Ở đây, thuật ngữ “tế bào plasma” hoặc “các tế bào plasma” được coi là bao hàm cả “các tế bào plasma,” “các nguyên bào plasma” và các ASC.

Về lý thuyết, có thể nuôi cấy một lượng tế bào plasma bất kỳ trong môi trường nuôi cấy để sinh ra và xác định kháng thể có đặc tính mong muốn. Về thực tiễn, lượng tế bào plasma có thể nuôi cấy được bị giới hạn bởi kỹ thuật có thể tiếp cận để nhân dòng và biểu hiện đa trình tự gen VH và VL và các thể kết hợp của chúng trong môi trường nuôi cấy tế bào đa dòng. Theo một phương án, “lượng hữu hạn tế bào plasma” chỉ số lượng tế bào plasma mà nhỏ hơn hoặc bằng 100, nghĩa là nhỏ hơn hoặc bằng 90, nhỏ hơn hoặc bằng 80, nhỏ hơn hoặc bằng 70, nhỏ hơn hoặc bằng 60, nhỏ hơn hoặc bằng 50, nhỏ hơn hoặc bằng 45, nhỏ hơn hoặc bằng 40, nhỏ hơn hoặc bằng 35, nhỏ hơn hoặc bằng 30, nhỏ hơn hoặc bằng 25, nhỏ hơn hoặc bằng 20, nhỏ hơn hoặc bằng 17, nhỏ hơn hoặc bằng 15, nhỏ hơn hoặc bằng 12, nhỏ hơn hoặc bằng 10, nhỏ hơn hoặc bằng 9, nhỏ hơn hoặc bằng 8, nhỏ hơn hoặc bằng 7, nhỏ hơn hoặc bằng 6, nhỏ hơn hoặc bằng 5, nhỏ hơn hoặc bằng 4, nhỏ hơn hoặc bằng 3, nhỏ hơn hoặc bằng 2, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào plasma với nồng độ thấp trong từng môi trường riêng lẻ. Nồng độ tế bào plasma thấp trong từng môi trường này thường chứa khoảng từ 1 đến 10, hoặc trong khoảng từ 1 đến 15, hoặc trong khoảng từ 1 đến 20, hoặc trong khoảng từ 1 đến 25, hoặc trong khoảng từ 1 đến 30, hoặc trong khoảng từ 1 đến 40, hoặc trong khoảng từ 1 đến 50, hoặc trong khoảng từ 1 đến 60, hoặc trong khoảng từ 1 đến 70, hoặc trong khoảng từ 1 đến 80, hoặc trong khoảng từ 1 đến 90, hoặc trong khoảng từ 1 đến 100 tế bào trong từng môi trường nuôi cấy.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào plasma, trong đó tế bào plasma được pha loãng với nồng độ tế bào thấp trong môi trường nuôi cấy. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy làm giảm số lượng tế bào plasma. Số tế bào plasma này được phân lập, lấy ví dụ, từ nguồn sinh học, có thể được làm giảm như được mô tả dưới đây. Như được sử dụng ở đây, “số lượng tế bào plasma giảm” được sử dụng thay thế cho “lượng hữu hạn tế bào plasma” như được mô tả ở

đây.

Các kỹ thuật để thu nhận lượng tế bào mong muốn trong môi trường nuôi cấy là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, pha loãng giới hạn, hoặc sàng lọc và lấy ra từng tế bào. Lấy ví dụ, môi trường nuôi cấy bao gồm một lượng hữu hạn hoặc giảm lượng tế bào plasma có thể tiến hành để lấy ra từng tế bào bằng cách sử dụng thiết bị sàng lọc tế bào hoặc pha loãng dịch huyền phù tế bào plasma với môi trường nuôi cấy đầy đủ như là 1, 2, 3 tế bào hoặc hơn, lấy ví dụ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 tế bào trong mỗi giếng trên đĩa nuôi cấy vi chuẩn độ.

Theo một phương án, từng tế bào plasma đơn được nuôi cấy. Do tính chất đơn dòng của kháng thể được tạo ra bởi từng tế bào plasma nên việc nuôi cấy nhiều tế bào plasma trong môi trường nuôi cấy đơn tế bào sẽ tạo ra quần thể các kháng thể đơn dòng. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng từ tế bào plasma, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào plasma trong môi trường nuôi cấy đơn tế bào.

Như được sử dụng ở đây, “môi trường nuôi cấy đơn bào” được sử dụng thay thế cho “môi trường nuôi cấy đơn tế bào plasma” và liên quan đến việc nuôi cấy gồm, tính trung bình, một tế bào plasma. Do đó, trên đĩa nuôi cấy đa giếng, ví dụ, đĩa 96 giếng, đĩa 384 giếng hoặc đĩa 1536 giếng, phần lớn các giếng này sẽ chứa một tế bào plasma, một số giếng không có tế bào plasma và một số có nhiều hơn một tế bào plasma. Theo một số phương án, tế bào plasma này có thể được nuôi cấy trong môi trường mà trong đó, tính trung bình, ít hơn 1 tế bào/giếng, nghĩa là 0,8 tế bào/giếng, 0,6 tế bào/giếng, 0,5 tế bào/giếng, 0,3 tế bào/giếng hoặc 0,1 tế bào/giếng. Các kỹ thuật nhằm thu một tế bào trong môi trường nuôi cấy tương tự như các kỹ thuật nêu trên, miễn là giá trị trung bình là bằng hoặc nhỏ hơn 1 tế bào trong mỗi giếng trên đĩa nuôi cấy vi chuẩn độ này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể. Phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma theo phương pháp bất kỳ của sáng chế, xác định môi trường nuôi cấy để tạo ra kháng thể với đặc tính mong muốn, phân lập axit nucleic mã hóa kháng thể được tạo ra, và biểu hiện axit nucleic này trong tế bào chủ.

Không giống tế bào B nhớ, có thể nhân thành dòng tế bào sản xuất kháng thể

bằng cách làm cho bất tử (Traggiai et al., 2004, Nat Med 10:871-875; Lanzavecchia et al, 2007, Curr Opin Biotechnol. 18:523-528), các tế bào plasma này không phân chia, không thể bị kích thích hoặc trở nên bất tử. Vì vậy, để khai thác các “nhà máy sản xuất kháng thể” này theo cách bất kỳ, tế bào plasma này phải còn sống trong môi trường nuôi cấy. Các tế bào plasma này sinh ra và tiết ra kháng thể một cách liên tục, và lượng kháng thể này có thể tăng theo hàm thời gian. Mặc dù các tế bào plasma tồn tại *in vivo* một thời gian dài, nhưng chúng không tồn tại quá 1 ngày trong điều kiện *in vitro* (không nêu dữ liệu thử nghiệm). Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể bằng cách nuôi cấy tế bào plasma, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một tế bào plasma đơn lẻ, trong môi trường nuôi cấy có chứa các thành phần ngoại sinh hoặc các thành phần nhằm kéo dài thời gian sống của tế bào plasma được nuôi cấy.

Nói chung, thời gian sống của tế bào plasma được kéo dài trong một thời gian đủ để kháng thể được sinh ra với lượng đủ lớn để có thể nhận dạng được, nghĩa là, môi trường nuôi cấy này có chứa một lượng kháng thể đủ để có thể sử dụng trong các phân tích sàng lọc, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phân tích liên kết, phân tích trung hòa hoặc các phương pháp phân tích khác nhằm xác định chức năng, hoặc các đặc tính khác của kháng thể này. Khi đó gen globulin miễn dịch từ môi trường nuôi cấy chứa kháng thể có tính đặc hiệu mong muốn đó được phân lập và có thể khuếch đại, xác định trình tự và biểu hiện để tạo ra kháng thể đơn dòng.

Thời gian sống của tế bào plasma này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, từng tế bào plasma trong môi trường nuôi cấy, có thể được kéo dài trong một khoảng thời gian ngắn hoặc dài. Như được sử dụng ở đây, “khoảng thời gian ngắn” chỉ một khoảng thời gian từ ít nhất là 2 ngày đến khoảng 9 ngày, nghĩa là, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc khoảng 9 ngày. Như được sử dụng ở đây, “khoảng thời gian dài” chỉ một khoảng thời gian ít nhất là mười ngày, ví dụ, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, hoặc khoảng 150 ngày.

Mặc dù việc kéo dài thời gian sống của tế bào plasma trong một khoảng thời gian ngắn có thể không tạo ra nhiều kháng thể như khi tế bào plasma được kéo dài thời gian sống trong một thời gian dài, nhưng việc kéo dài thời gian sống của tế bào plasma trong một khoảng thời gian ngắn, như được mô tả ở đây, là dễ dàng, nhanh hơn và kinh tế hơn và đặc biệt hữu dụng để sàng lọc kháng thể trong các phương pháp phân tích nhay. Việc kéo dài thời gian sống của các tế bào plasma trong một khoảng

thời gian dài là đặc biệt hữu ích trong những trường hợp mà đặc tính của kháng thể cần nhiều phân tích sàng lọc hoặc các phương pháp phân tích có độ nhạy thấp.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy có mặt các thành phần ngoại sinh để kéo dài thời gian sống của tế bào plasma được nuôi cấy trong một khoảng thời gian ngắn. Trong một phương án khác, môi trường nuôi cấy có mặt các thành phần ngoại sinh để kéo dài thời gian sống của tế bào plasma được nuôi cấy trong một khoảng thời gian dài. Thành phần ngoại sinh này có thể là một hoặc nhiều phối tử của thụ thể được biểu hiện bởi tế bào plasma hoặc không phải là tế bào plasma.

Lấy ví dụ về các phối tử của thụ thể được biểu hiện bởi tế bào plasma này mà hữu dụng để kéo dài thời gian sống của tế bào plasma này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các xytokin, chemokin và các phối tử khác. Theo một phương án, phối tử này là IL-5, IL-6, yếu tố 1 có nguồn gốc từ tế bào nền (SDF-1), TNF- α , hoặc một phối tử của CD44, ví dụ, axit ialuronic. Theo một phương án khác, thành phần ngoại sinh này bao gồm một hoặc nhiều phối tử được lựa chọn từ nhóm bao gồm IL-5, IL-6, yếu tố 1 có nguồn gốc từ tế bào nền (SDF-1), TNF- α , các phối tử đối với CD44, ví dụ, axit ialuronic, và các thể kết hợp của chúng và được sử dụng để kéo dài thời gian sống của tế bào plasma nuôi cấy trong một khoảng thời gian ngắn hoặc trong một khoảng thời gian dài.

Lấy ví dụ về tế bào không phải là tế bào plasma hữu ích để kéo dài thời gian sống của tế bào plasma nuôi cấy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào gốc trung mô, nguyên bào sợi hoặc tế bào hủy xương. Theo một phương án, tế bào không phải là tế bào plasma này là tế bào gốc trung mô, nguyên bào sợi hoặc tế bào hủy xương, và hữu ích để kéo dài thời gian sống của tế bào plasma nuôi cấy trong một khoảng thời gian ngắn hoặc trong một khoảng thời gian dài. Trong một phương án khác, tế bào không phải là tế bào plasma này là tế bào gốc trung mô và hữu ích để kéo dài thời gian sống của tế bào plasma nuôi cấy trong một khoảng thời gian ngắn hoặc trong một khoảng thời gian dài. Tế bào gốc trung mô này có thể là tế bào gốc trung mô của động vật có vú, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào gốc trung mô của người. Các tế bào gốc trung mô này có thể, một cách tùy ý, được làm bất tử trước khi sử dụng trong môi trường nuôi cấy này.

Theo một phương án của sáng chế, các tế bào plasma này được nuôi cấy, lấy ví dụ, trong môi trường nuôi cấy đơn tế bào, trong khoảng từ 3 đến 7 hoặc từ 5 đến 9

ngày với sự có mặt của một hoặc nhiều phôi tử của thụ thể được biểu hiện bởi tế bào plasma này. Theo một phương án khác, tế bào plasma được nuôi cấy, lấy ví dụ, trong môi trường nuôi cấy đơn tế bào, trong khoảng từ 5 đến 7, hoặc trong khoảng 10, hoặc khoảng 15, hoặc trong khoảng 20, hoặc trong khoảng 25, hoặc trong khoảng 30, hoặc trong khoảng 35, hoặc trong khoảng 40, hoặc trong khoảng 45, hoặc trên 50 ngày trong môi trường nuôi cấy có mặt của một hoặc nhiều typ tế bào không phải là tế bào plasma. Trong một phương án khác, tế bào plasma này được nuôi cấy, lấy ví dụ, trong môi trường nuôi cấy đơn tế bào, hoặc trong khoảng 5-7, hoặc trong khoảng 10, hoặc trong khoảng 15, hoặc trong khoảng 20, hoặc trong khoảng 25, hoặc trong khoảng 30, hoặc trong khoảng 35, hoặc trong khoảng 40, hoặc trong khoảng 45, hoặc trên 50 ngày trong môi trường nuôi cấy có mặt tế bào gốc trung mô. Theo một phương án khác, tế bào plasma này được nuôi cấy, lấy ví dụ, trong môi trường nuôi cấy đơn tế bào, hoặc trong khoảng 5-7, hoặc trong khoảng 10, hoặc trong khoảng 15, hoặc trong khoảng 20, hoặc trong khoảng 25, hoặc trong khoảng 30, hoặc trong khoảng 35 hoặc trong khoảng 40, hoặc trong khoảng 45 hoặc trong khoảng 50, hoặc trong khoảng 55 hoặc trong khoảng 60, hoặc trong khoảng 65, hoặc trên 70 ngày trong môi trường nuôi cấy có mặt một hoặc nhiều typ tế bào không phải là tế bào plasma và một hoặc nhiều phôi tử của thụ thể được biểu hiện bởi tế bào plasma này.

Theo một phương án, hiệu suất nuôi cấy tế bào trên đĩa này có thể đạt ít nhất khoảng 30%, theo một phương án khác hiệu suất nuôi cấy của đĩa này có thể đạt khoảng 40%, theo một phương án khác hiệu suất nuôi cấy trên đĩa này có thể đạt ít nhất khoảng 50%, theo một phương án khác hiệu suất nuôi cấy trên đĩa này có thể đạt ít nhất khoảng 55%, theo một phương án khác hiệu suất nuôi cấy trên đĩa này có thể đạt ít nhất 60% hoặc hơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hiệu suất nuôi cấy trên đĩa” chỉ tỷ lệ phần trăm của tế bào plasma còn sống trong một khoảng thời gian đủ dài để có thể phát hiện được lượng kháng thể có trong dịch nổi.

Tế bào plasma được nuôi cấy có thể thu được từ loài mong muốn bất kỳ. Theo một phương án, tế bào plasma này là tế bào plasma thu được từ chuột, chuột cống, thỏ, lạc đà, hoặc khỉ. Theo một phương án khác, tế bào plasma được nuôi cấy này là tế bào plasma của người và kháng thể được tạo ra là kháng thể của người. Trong một phương án khác nữa, kháng thể đơn dòng của người được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế

bào plasma của người trong môi trường nuôi cấy đơn tế bào.

Tế bào plasma, lấy ví dụ tế bào plasma của người có thể được phân lập từ máu ngoại vi của người. Tế bào plasma của người có thể được đề cập đến như “tế bào plasma máu ngoại vi” hoặc “tế bào plasma hệ tuần hoàn”. Tế bào plasma, lấy ví dụ tế bào plasma của người có thể được phân lập từ tủy xương, mô hoặc dịch thể, bao gồm, nhưng không giới hạn ở hoạt dịch, dịch não tủy và dịch tiết của người. Thuật ngữ “mô” chỉ loại mô bất kỳ có trong cơ thể người, và có thể là mô tim, mô thần kinh, mô cơ, biểu mô, mô liên kết và các cơ quan lympho như là tuyến ức, lá lách và hạch bạch huyết.

Tế bào plasma thường đặc trưng bởi sự biểu hiện của CD138, và một cách tùy ý được đặc trưng bởi sự biểu hiện tăng cường của các phân tử CD27, CD38, CD9, CD44 và MHC lớp II. Theo một phương án, tế bào này có thể được phân lập từ máu ngoại vi, mô, tủy xương hoặc dịch thể theo sự biểu hiện của CD138. Các phân tử đánh dấu bề mặt như phân tử CD27, CD38, CD9, CD44 và MHC lớp II cũng có thể được sử dụng để bổ sung cho CD138 nhằm tăng cường tiến trình phân lập và để nhận diện các tập hợp con của tế bào plasma (Arce et al., 2004, J Leukoc Biol, 75:1022-1028). Theo một phương án khác, tế bào plasma này có thể được phân lập bằng cách sử dụng các vi hạt từ tính. Trong một phương án khác nữa, tế bào plasma này có thể được phân lập bằng cách sử dụng các vi hạt từ tính được phủ một lớp kháng thể kháng CD138 cố định. Trong một phương án khác nữa, việc làm giàu tế bào plasma này được thực hiện bằng cách sử dụng các vi hạt từ tính sau khi đã phân loại tế bào.

Theo một phương án, tế bào plasma có thể được phân lập từ máu ngoại vi của người cho sau khi đã tiêm chủng vaccin. Tiêm chủng vaccin nhằm chỉ việc sử dụng kháng nguyên bất kỳ để tạo ra một đáp ứng miễn dịch. Vaccin này có thể là vaccin bất kỳ đã biết đến thời điểm hiện tại hoặc sẽ được chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cung cấp trên thị trường và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vaccin độc tố uốn ván, vaccin cúm, vaccin sốt vàng da, vaccin bạch hầu-uốn ván, vaccin viêm gan B, vaccin đậu mùa và vaccin ung thư. Theo một phương án khác, việc tiêm chủng vaccin có thể là tiêm nhắc lại vaccin (booster vaccination). Tế bào plasma này có thể được phân lập từ người cho sau 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ngày hoặc nhiều ngày hơn sau khi tiêm chủng vaccin. Theo một phương án, tế bào plasma này có thể được phân lập từ người cho mà phản ứng với mầm bệnh đã biết. Theo một phương án khác, tế bào plasma này có

thể được phân lập từ người cho mà phản ứng với mầm bệnh chưa biết. Theo một phương án khác, tế bào plasma này có thể được phân lập từ người cho bị dị ứng. Theo một phương án khác, tế bào plasma này có thể được phân lập từ người cho đã khỏi bệnh. Theo một phương án khác, tế bào plasma này có thể được phân lập từ người cho bị mắc bệnh tự miễn.

Theo một phương án khác, tế bào plasma có thể được tạo ra *in vitro* bằng cách kích thích tế bào B. Việc kích thích này có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm kích thích đa dòng hoặc kích thích đặc hiệu kháng nguyên của tế bào B nguyên thủy hoặc tế bào B nhớ (Bernasconi et al, 2002, Science, 298:2199-2202).

Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để nuôi cấy tế bào plasma tiết ra kháng thể bất kỳ của thể tương đồng bất kỳ. Theo một phương án, tế bào plasma này có thể là tế bào plasma IgG, theo một phương án khác, tế bào plasma này có thể là tế bào plasma IgA, theo một phương án khác, tế bào plasma này có thể là tế bào plasma IgM, theo một phương án khác, tế bào plasma này có thể là tế bào plasma IgD, và theo một phương án khác nữa tế bào plasma này có thể là tế bào plasma IgE. Theo một phương án khác nữa, quần thể tế bào plasma được phân lập có thể được trộn lẫn với quần thể tế bào plasma có chứa hai hay nhiều thể tương đồng.

Tế bào plasma của người đã được phân lập có thể được đếm bằng cách sử dụng phương pháp phân tích vết hấp phụ miễn dịch gắn kết enzym (ELISPOT: enzyme linked immunosorbent spot) (Bernasconi et al, 2002, Science, 298:2199-2202). Phương pháp này được thực hiện bằng cách hiển thị sản phẩm được tiết ra từ tế bào quan tâm, mà tại đó mỗi vết được tạo ra bằng phương pháp này là tương ứng với một tế bào.

Theo một phương án, tế bào plasma của người có thể được cấy ở dạng đơn tế bào bằng cách pha loãng có giới hạn hoặc lấy từng tế bào đơn. Theo một phương án, tế bào plasma của người có thể được cấy như một tế bào đơn với sự có mặt của tế bào gốc trung mô. Theo một phương án khác, tế bào plasma của người có thể được cấy như nuôi cấy đa dòng. Tế bào plasma này có thể được cấy như nuôi cấy tế bào đa dòng với sự có mặt của tế bào gốc trung mô. Tế bào plasma đa dòng được nuôi cấy trong môi trường này có thể, một cách tùy ý, được phân lập ra khỏi môi trường nuôi cấy đơn tế bào bằng cách pha loãng giới hạn. Theo một phương án khác, tế bào

plasma đa dòng của người được nuôi cấy có thể được phân lập ra khỏi môi trường nuôi cấy đơn tế bào bằng cách lấy từng tế bào đơn.

Tế bào gốc trung mô là tế bào như nguyên bào sợi, nhưng có khả năng biệt hóa lớn hơn nguyên bào sợi, chúng có khả năng biệt hóa thành nguyên bào xương, sụn và tế bào mỡ. Tế bào gốc trung mô được nhận thấy như một quần thể dị tương đồng, và tạo thành cấu trúc hỗ trợ mô, nơi mà chúng tồn tại. Trong tủy xương, cần có tế bào gốc trung mô để phát triển và biệt hóa tế bào tạo máu và duy trì tế bào bạch cầu. Tế bào gốc trung mô sơ cấp có thể được phân lập trong môi trường thích hợp và được nuôi cấy qua một số lần cấy chuyển, tuy nhiên, điều này chỉ được thực hiện trong một thời gian ngắn trước khi chúng bị lão hóa. Việc chuyển nhiễm gen mang tính trạng của enzym phiên mã ngược telomeraza (TERT: telomerase reverse transcriptase) đã được sử dụng để làm bất tử tế bào gốc trung mô để nhân lên vô hạn *in vitro* trong khi vẫn duy trì được tốc độ sinh trưởng sinh lý và các đặc tính về chức năng của chúng.

Tế bào gốc trung mô được sử dụng để nuôi cấy có thể là tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ tủy xương. Tế bào gốc trung mô này có thể là tế bào gốc trung mô của động vật có vú, ví dụ là tế bào gốc trung mô của người. Tế bào gốc trung mô để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể được phân lập từ tế bào tủy xương dính bám bằng cách nuôi cấy trong môi trường thích hợp. Môi trường này có thể chứa hydrocortizon. Tế bào gốc trung mô cũng có thể có nguồn gốc từ các loại mô khác.

Trong thực tiễn, tế bào gốc trung mô có thể được làm bất tử trước khi sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, “được làm bất tử” có nghĩa là tế bào gốc trung mô được cải thiện khả năng tăng sinh trong khi vẫn duy trì được các đặc tính khiến chúng có khả năng duy trì tế bào plasma, bao gồm khả năng tiếp xúc với chất ức chế sinh trưởng. Theo một phương án, tế bào gốc trung mô có thể sống ít nhất khoảng 1 tuần sau khi tiếp xúc hợp lưu. Theo một phương án khác, tế bào gốc trung mô đã làm bất tử này có khả năng sống ít nhất khoảng 2 tuần sau khi tiếp xúc hợp lưu, hoặc ít nhất khoảng 3 tuần sau khi tiếp xúc hợp lưu, hoặc ít nhất 4 tuần hoặc hơn sau khi tiếp xúc hợp lưu.

Tế bào gốc trung mô có thể được làm bất tử bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, tế bào gốc trung mô này được làm bất tử bằng cách chuyển nhiễm gen mã hóa enzym phiên mã ngược telomeraza. Theo một phương án khác, tế bào gốc trung mô này có thể được làm bất tử bằng cách chuyển

nhằm với gen TERT theo phương pháp được mô tả trong: Mihara et al., 2003 Br J Haematol 120: 846-849.

Như đã nêu ở trên, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể. Phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma, xác định môi trường nuôi cấy tạo ra kháng thể với các đặc tính mong muốn, phân lập axit nucleic mã hóa kháng thể được sản xuất này, và biểu hiện axit nucleic này trong tế bào chủ.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đoạn” và “đoạn kháng thể” được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ đoạn bất kỳ của kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, đoạn kháng thể này duy trì được hoạt tính liên kết với kháng nguyên của kháng thể đó. Trong một phương án khác, đoạn kháng thể này có thể bao gồm 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 hoặc 1.000 axit amin liền kề hoặc nhiều hơn. Các đoạn kháng thể điển hình chứa một hoặc nhiều mảnh Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, chuỗi nặng, chuỗi nhẹ, vùng bản lề, vị trí liên kết với kháng nguyên, kháng thể đơn chuỗi hoặc phần bất kỳ của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “axit nucleic” bao gồm tất cả các dạng axit nucleic, bao gồm nhưng không giới hạn ở, ADN, cADN, và mARN hệ gen. Việc nhân dòng và biểu hiện kháng thể hoặc các đoạn kháng thể khác loại có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử và tái tổ hợp ADN, là đã biết đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (Wrammert et al., 2008 Nature 453, 667-671 & Meijer et al., 2006 J Mol Biol 358, 764-772). Những kỹ thuật đó được mô tả chi tiết trong các sách chuyên ngành, lấy ví dụ trong Sambrook, 1989 Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition. Đối với việc thu nhận trình tự VH/VL và biểu hiện chúng thì có thể sử dụng phương pháp của Tiller và đồng tác giả., J Immunol Methods 2008 329:112-124.

Theo một phương án, kháng thể này được biểu hiện bằng cách sử dụng vector hoặc virus thích hợp trong tế bào nhân thực. Tế bào nhân thực này có thể là tế bào CHO, 293T, 293 F, hoặc tế bào nấm men. Theo một phương án khác, kháng thể này được biểu hiện bằng cách sử dụng vector hoặc thực khuẩn thể thích hợp trong tế bào nhân sơ. Tế bào nhân sơ có thể là tế bào vi khuẩn, ví dụ, tế bào E.coli. Trong một phương án khác nữa, hệ thống biểu hiện khác loại này có thể là hệ thống không có tế bào.

Kháng thể và đoạn kháng thể được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế có thể dễ dàng phân lập bằng cách sử dụng các phương pháp đã được xác lập (Coligan et al Eds Current Protocol in Immunology 1: 2.7). Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể, kể cả kháng thể hoặc đoạn kháng thể đơn dòng, theo sáng chế có thể được phân lập từ dịch nổi môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm hoặc sắc ký ái lực. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn kháng thể này có thể được phân lập theo tính đặc hiệu liên kết của chúng. Lấy ví dụ, kháng thể này có thể được phân lập bằng cách sử dụng chất mang rắn thích hợp có gắn kháng nguyên cố định thích hợp. Theo một phương án khác, kháng thể này có thể được phân lập bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG, IgE, IgA, IgD hoặc IgM, mà kháng thể này có thể, trong một số trường hợp, đã được cố định.

Tế bào plasma tiết ra Ig hoặc kháng thể đặc hiệu có thể được phân lập bằng phương pháp ái lực miễn dịch. Trước tiên, sản phẩm được tiết ra này có thể được giữ trên bề mặt của tế bào được kích thích bài tiết bằng cách sử dụng các tác nhân bất giữ liên kết đồng hóa trị thích hợp. Tiếp đó, sản phẩm được bất giữ này có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể hoặc kháng nguyên đánh dấu miễn dịch (Manz et al., 1998 Int Immunol 10, 1703-1711).

Xác định đặc tính kháng thể

Tế bào plasma không biểu hiện globulin miễn dịch trên bề mặt, và do đó không thể được chọn lọc theo tính đặc hiệu kháng nguyên hoặc tính đặc hiệu đồng dạng. Vì vậy, kháng thể được tạo ra từ tế bào plasma phải được phân lập để được xác định đặc tính. Hiện nay, có hai phương pháp chính được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo kháng thể đơn dòng của người từ tế bào plasma. Một trong hai phương pháp này là sàng lọc thư viện biểu hiện số kháng thể được tạo ra từ tổng số tủy xương của người cho đã được miễn dịch (Williamson et al., 1993 Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4141-4145). Tuy nhiên, phương pháp này bị giới hạn do thiếu mẫu tủy xương.

Phương pháp thứ hai liên quan đến việc phân lập tế bào plasma trong hệ tuần hoàn sau khi tiêm chủng nhắc lại và phát hiện gen Ig từ tế bào plasma của cá thể đó bằng cách sử dụng PCR tế bào riêng lẻ (Wrammert et al., 2008 Nature 453, 667-671 & Meijer et al., 2006 J Mol Biol 358, 764-772). Phương pháp này dựa trên thực tế là sau 6-8 ngày tiêm chủng nhắc lại, phần lớn tế bào plasma trong hệ tuần hoàn là đặc

hiệu đối với kháng nguyên gây miễn dịch. Tuy nhiên cách tiếp cận này cần thực hiện nhân dòng nhiều gen và tốn nhiều công sức biểu hiện trước khi có thể đánh giá được tính đặc hiệu của nó, và do đó không mang tính thực tiễn khi đáp ứng của tế bào plasma này trực tiếp kháng đa kháng nguyên, như là các nguồn bệnh phức hợp. Vì vậy, việc phát triển hệ thống nuôi cấy trong thời gian dài đối với tế bào plasma của người là đặc biệt hữu dụng để thu được đủ lượng kháng thể để tiến hành phân tích liên kết, phân tích chức năng và xác định đặc tính kháng thể *in vitro*, để có thể chọn được tế bào plasma sản xuất ra kháng thể quan tâm.

Các phương pháp khác để phân lập kháng thể từ tế bào plasma hoặc từ tế bào tiết ra kháng thể khác dựa trên vi thao tác bao gồm bước đầu tiên trong đó tế bào này được trải lên môi trường bán rắn (Harriman WD et al J Immunol Methods 341; 135-145 2009) hoặc lên chip vi mảng (Jin A et al Nat Medicine 15; 1088 2009) và kháng thể được tiết ra này được phân tích *in situ* bằng cách sử dụng đầu dò phát huỳnh quang. Một khi đã được xác định, thu tế bào plasma này bằng vi thao tác rồi khuếch đại và giải trình tự gen VH và VL. Các phương pháp mà dựa trên việc nuôi cấy trong một khoảng thời gian ngắn và việc phát hiện vị trí kháng thể được tiết ra cần có thiết bị chuyên dụng để vi thao tác tế bào tiết ra kháng thể đó và không thích hợp để thử nghiệm các đặc tính về chức năng của kháng thể này như là tính trung hòa độc tố hoặc virus. Các phương pháp theo sáng chế không những không dựa trên, mà cũng không cần, tiến hành vi thao tác bất kỳ mà còn cho phép tạo ra kháng thể để sàng lọc trong nhiều phương pháp phân tích, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phân tích liên kết, phân tích chức năng và/hoặc phân tích trung hòa. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma bao gồm bước nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma và xác định đặc tính kháng thể đó, trong đó phương pháp này không bao gồm bước vi thao tác để thu tế bào plasma tiết ra kháng thể đó.

Sáng chế bao gồm việc xác định đặc tính kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập bởi phương pháp theo sáng chế. Theo một phương án, việc xác định đặc tính kháng thể có thể bao gồm việc xác định tính đặc hiệu liên kết của kháng thể hoặc đoạn kháng thể. Theo phương án khác, việc xác định đặc tính kháng thể có thể bao gồm việc xác định epitop được nhận biết bởi kháng thể hoặc đoạn kháng thể. Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập và/hoặc epitop được nhận biết bởi kháng thể hoặc đoạn kháng thể này có thể được xác định bằng các phương

pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, tính đặc hiệu liên kết và/hoặc epitop được nhận biết có thể được xác định bằng việc đánh dấu kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập, đưa kháng thể hoặc đoạn kháng thể được đánh dấu tới thư viện kháng nguyên, và phát hiện kháng thể hoặc đoạn kháng thể được đánh dấu liên kết với kháng nguyên cùng bản chất. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn kháng thể được đánh dấu này có thể được dùng trong cột tinh sạch có chứa phân tử kháng nguyên được cố định, sự có hoặc không có mặt kháng thể hoặc đoạn kháng thể được đánh dấu này trên cột này dùng có thể được dùng để chỉ ra tính đặc hiệu của kháng thể và/hoặc epitop nhận dạng. Sẽ là rõ ràng với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng tế bào plasma được phân lập từ máu ngoại vi của người cho, người cho này đã được gây miễn dịch với kháng nguyên cụ thể hoặc đã tiếp xúc với nguồn bệnh cụ thể, sẽ tạo ra kháng thể hoặc đoạn kháng thể liên kết với kháng nguyên hoặc nguồn bệnh đó. Tuy nhiên, các nguồn bệnh, cụ thể là các nguồn bệnh phức hợp, có thể chứa nhiều loại kháng nguyên và các epitop đặc hiệu liên kết và/hoặc epitop nhận dạng của kháng thể hoặc đoạn kháng thể cụ thể có thể vẫn được xác định một cách chắc chắn.

Phương pháp nuôi cấy tế bào đơn theo sáng chế tạo ra tế bào plasma đơn để tạo ra kháng thể đặc hiệu, trong đó axit nucleic mã hóa kháng thể này có thể dễ dàng được phân lập bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết (Wrammert et al., 2008 Nature 453, 667-671 & Meijer et al., 2006 J Mol Biol 358, 764-772). Theo một phương án, việc xác định đặc tính kháng thể có thể liên quan đến việc giải trình tự axit nucleic mã hóa cho kháng thể hoặc đoạn kháng thể. Việc giải trình tự axit nucleic này có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, việc giải trình tự axit nucleic này có thể được thực hiện bằng cách gắn chất đánh dấu vào đầu chuỗi, trong đó chất phóng xạ, chất phát huỳnh quang hoặc các loại thuốc nhuộm khác có thể sử dụng. Theo một khía cạnh khác, việc giải trình tự axit nucleic có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp giải trình tự một cách tự động.

Theo một phương án khác, bước xác định đặc tính có thể liên quan đến việc giải trình tự protein kháng thể. Protein kháng thể có thể được giải trình tự bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, protein kháng thể có thể được giải trình tự bằng cách phân tích đầu N, phân tích đầu C hoặc biến

tính Edman. Phân tích đầu N có thể bao gồm: i) cho protein này phản ứng với thuốc thử mà đánh dấu chọn lọc tại đầu amin của axit amin đó; ii) thủy phân protein này; và iii) xác định đầu amin của axit amin đó bằng sắc ký và so sánh chuẩn. Theo khía cạnh này, có thể sử dụng thuốc thử đánh dấu bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc thử của Sanger, các dẫn xuất dansyl như là dansyl clorua, và phenylisothiocyanat. Phân tích đầu C có thể bao gồm bước ủ protein với carboxypeptidaza và lấy mẫu định kỳ để vẽ đồ thị nồng độ axit amin theo thời gian.

Sau khi giải trình tự protein kháng thể, sáng chế cũng bao gồm bước tổng hợp hóa học protein liên kết dựa trên trình tự kháng thể đã được xác định. Có thể thực hiện tổng hợp hóa học theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, tổng hợp hóa học có thể được thực hiện bằng cách gắn các nhóm carboxy của một axit amin với chất mang rắn không hòa tan, và tiếp đó cho nhóm amin của kháng thể cố định này phản ứng với nhóm carboxy của kháng thể kế tiếp trong trình tự. Phương pháp này có thể được lặp đi lặp lại cho đến khi tạo ra được trình tự axit amin yêu cầu, mà ở giai đoạn này, protein toàn vẹn này có thể được tách khỏi chất mang rắn, cho phép hoặc kích thích tạo ra cấu trúc gấp nếp protein đúng.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể hoặc đoạn kháng thể được tạo ra bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế.

Sử dụng các tính chất được học của kháng thể

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh, lấy ví dụ, để sử dụng trong điều trị bệnh dị ứng, các bệnh trạng hoặc các căn bệnh lây nhiễm, bệnh ung thư, bệnh trạng hoặc căn bệnh tự miễn.

Thuật ngữ “dị ứng” bao gồm tất cả các dạng phản ứng quá mẫn cảm gây ra bởi kháng nguyên không ký sinh, bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh viêm da do dị ứng, viêm mũi dị ứng, phù mạch, tính quá mẫn cảm, tính mẫn cảm với aspirin, bệnh hen, viêm da đặc dị, dị ứng với lông chim, dị ứng với lông chim hoàng yến, dị ứng với lông mèo, mẫn cảm với hóa chất, dị ứng với lông gà, bệnh viêm màng kết, bệnh mề đay mẫn cảm, bệnh viêm da do tiếp xúc, dị ứng với mỹ phẩm, dị ứng với sữa bò, viêm da, dị ứng với lông chó, phản vệ với thuốc, dị ứng với lông vịt, dị ứng bụi, dị ứng với ve bụi, chàm bội nhiễm, dị ứng với lông ngỗng, dị ứng với cỏ, bệnh sốt mùa hè, đau đầu, bất thường về tim, viêm ruột, tăng động ở trẻ em, giảm đường huyết, dị

ứng do tiếp xúc và hít phải dị ứng nguyên, bất dung nạp lactoza, chứng đau nửa đầu, dị ứng với sữa, dị ứng với ve bét, phát ban mào đay, dị ứng với lông vẹt, dị ứng với lông vẹt đuôi dài, viêm mũi kinh niên, dị ứng với chim bồ câu, dị ứng với phấn hoa, viêm mũi, dị ứng với cây đại hoàng, mẫn cảm với salixylat, viêm xoang, phát ban da, dị ứng với lông chim sẻ, dị ứng với gà tây, dị ứng hoa ucaria, và dị ứng với nấm men.

Thuật ngữ “các bệnh lây nhiễm” bao gồm các của bệnh có bằng chứng lâm sàng do có mặt của nguồn tác nhân vi sinh gây bệnh, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, virus, vi khuẩn, động vật nguyên sinh, ký sinh trùng và nấm. Thuật ngữ “các bệnh lây nhiễm” bao gồm, nhưng không giới hạn ở, AIDS, các bệnh liên quan đến AIDS, thủy đậu, cảm lạnh thông thường, nhiễm cytomegalovirus, sốt đóng dấu colorado, sốt xuất huyết, sốt xuất huyết ebola, bệnh tay-chân-miệng, viêm gan, bệnh rộp da, bệnh Zona, HPV, cảm cúm (cúm), sốt Lassa, sởi, sốt xuất huyết Marburg, nhiễm trùng bạch cầu đơn nhân, quai bị, nhiễm norovirus, bệnh bại liệt, bệnh não chất trắng đa ổ tiến triển, bệnh dại, bệnh sởi, bệnh SARS, bệnh đậu mùa (bệnh đậu mùa rỗ), viêm não do virus, viêm dạ dày ruột do virus, viêm màng não do virus, viêm phổi do virus, bệnh tây Nile, sốt vàng da, bệnh than, viêm màng não do vi khuẩn, ngộ độc thịt, bệnh Brucel, bệnh do campylobacterium, bệnh xước da do mèo cào, bệnh tả, bệnh bạch hầu, sốt dịch bệnh, bệnh lậu, bệnh chốc lở do vi khuẩn Legionella, bệnh phong hủi (bệnh Hansen), bệnh trùng xoắn, bệnh nhiễm Listeria, bệnh bạch huyết, bệnh gây ra bởi bọ chét, sốt thấp khớp; bệnh nhiễm trùng MRSA, bệnh Nocardia, ho lâu ngày (ho gà), dịch hạch, viêm phổi do khuẩn cầu phổi, bệnh do virus vẹt, sốt Q, sốt màng não miền núi (RMSF), bệnh do vi khuẩn xanmon, sốt ban đỏ, bệnh Shigella, bệnh giang mai, uốn ván, đau mắt hột, bệnh lao, bệnh sốt thổ, sốt thương hàn, viêm đường tiết niệu-sốt phát ban, bệnh do trùng mũi khoan châu Phi, bệnh do amip, bệnh giun sán, bệnh nhiễm ký sinh trùng Babesia, bệnh Chagas, bệnh sán lá gan nhỏ, bệnh do bào tử Cryptosporidia, bệnh sán gạo, bệnh sán Diphyllbothrium, bệnh giun Dracunculus, bệnh sán Echinococcosis, bệnh sán lá gan, bệnh sán lá, bệnh Fasciolopsis, bệnh giun chỉ, nhiễm trùng amip sống tự do, bệnh lây nhiễm, bệnh giun Gnathostoma, bệnh sán Hymenolepsis, bệnh Isosporia, bệnh sốt rét do rệp và bọ chét cắn, bệnh Leishmania, bệnh sốt rét, bệnh do nhiễm giun Metagonimus, bị nhiễm giòi, bệnh giun chỉ u, bệnh truyền nhiễm do chấy rận, bệnh nhiễm giun kim, bệnh ghẻ, bệnh sán máng, bệnh sán dây, bệnh nhiễm giun sán từ chó mèo, bệnh Toxoplasma, bệnh giun xoắn, bệnh giun

tóc, bệnh do trùng mảng uốn đuôi roi, bệnh do trùng mũi khoan, bệnh do nấm Aspergillus, bệnh do nấm chồi, bệnh do nấm Candidia, bệnh do nấm Coccidioides, bệnh Torula, bệnh do nấm Histoplasme, bệnh nấm da chân, bệnh não xốp di truyền, bệnh não xốp bò, bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh run chân tay, bệnh mất ngủ di truyền, và hội chứng Alper.

Thuật ngữ “bệnh tự miễn” bao gồm tất cả các dạng bệnh mà trong đó hệ thống miễn dịch phản ứng với chính kháng thể đó, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh đái tháo đường typ 1, viêm tuyến giáp Hashimoto, bệnh bazôđô, bệnh xơ cứng da, bệnh nội tạng, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, hội chứng Sjogren, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain-Barre, hội chứng Goodpasture, bệnh Addison, bệnh u hạt Wegener, xơ cứng mật sơ cấp, viêm xơ đường mật, viêm gan tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh tự miễn tuyến giáp, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh vẩy nến, viêm khớp vẩy nến, viêm mắt thần kinh giao cảm, bệnh thần kinh tự miễn, viêm buồng trứng tự miễn, viêm tinh hoàn tự miễn, hội chứng tăng sinh lympho tự miễn, hội chứng kháng phospholipit, bệnh lupus, hội chứng thiếu polyendocrin, hội chứng thiếu polyendocrin typ 1, hội chứng thiếu polyendocrin typ 2, ban xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch, thiếu máu ác tính, nhược cơ, bệnh mô liên kết hỗn hợp, bệnh viêm cầu thận sơ cấp, lang ben, thiếu máu tan huyết tự miễn do viêm màng bồ đào tự miễn, giảm tiểu cầu tự miễn, bệnh đau bụng, viêm da bóng nước tự miễn, bệnh emphygus, những bệnh pemphigus thể thông thường, bệnh tróc da pemphigus, bệnh bóng rộp tự miễn, viêm cơ tim tự miễn, viêm mạch tự miễn, bệnh đau mắt tự miễn, bệnh rụng tóc, bệnh xơ vữa động mạch tự miễn, bệnh Behcet, viêm tủy tự miễn, bệnh ưa chảy máu tự miễn, viêm bong đái kẽ tự miễn, đái tháo nhạt tự miễn, bệnh lạc nội mạch tử cung tự miễn, viêm đa sụn tái phát, viêm cứng khớp đốt sống, bệnh màng đáy tự miễn, hội chứng Paraneoplastic tự miễn, viêm da cơ, hội chứng Miller-Fisher, và bệnh thận do IgA.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế được sử dụng trong sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh dị ứng, các bệnh trạng hoặc bệnh lây nhiễm và bệnh trạng hoặc bệnh tự miễn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh dị ứng, bệnh trạng hoặc bệnh lây nhiễm và bệnh trạng hoặc bệnh tự miễn, phương pháp bao gồm bước sử dụng kháng thể hoặc đoạn kháng thể được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm việc phối trộn kháng thể hoặc đoạn kháng thể được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế, hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể thành chế phẩm dược phẩm khả dụng. Theo một phương án, chế phẩm dược phẩm có thể chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế. Theo một phương án khác, chế phẩm dược phẩm này có thể chứa 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập bằng phương pháp bất kỳ theo sáng chế.

Dược phẩm cũng có thể chứa chất mang dược dụng khả dụng để cho phép uống. Chất mang này không tự kích thích để sản sinh kháng thể có hại cho cá thể tiếp nhận chế phẩm và không gây độc. Chất mang thích hợp có thể bao gồm các đại phân tử lớn, chuyển hóa chậm như là protein, polypeptit, liposom, polysacharit, axit polylactic, axit polyglycolic, axit amin dạng polyme, các chất đồng polyme axit amin và các hạt virut bất hoạt.

Theo các phương án chính, muối dược dụng có thể được sử dụng, lấy ví dụ muối axit vô cơ, chẳng hạn như hydroclorit, hydrobromit, phosphat và sulphat, muối axit hữu cơ, như là axetat, propionat, malonat và benzoat.

Theo một số phương án, chế phẩm dược phẩm này cũng có thể chứa dịch lỏng chẳng hạn như nước, dung dịch muối, glyxerol và etanol. Ngoài ra, các chất phụ trợ, chẳng hạn như chất giữ ẩm hoặc chất tạo nhũ hoặc chất đệm pH có thể có mặt trong chế phẩm này, và có thể cho phép các chế phẩm dược phẩm này được phối trộn thành dạng viên nén, viên thuốc tròn, viên bao đường, viên nang, dạng lỏng, dạng gel, dạng xirô, dạng hồ và hỗn dịch, để cho bệnh nhân sử dụng.

Chế phẩm dược phẩm này có thể được sử dụng theo một số đường thông thường, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, theo đường miệng, đường tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong tủy xương, trong màng bụng, trong nội tủy mạc, trong tâm thất, trên da, qua da, cục bộ, dưới da, trong mũi, trong ruột, dưới lưỡi, trong âm đạo hoặc trong trực tràng.

Dược phẩm có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,5, trong một số phương án là trong khoảng từ 6 đến 8, và một số phương án khác là 7. Độ pH này có thể được duy trì nhờ sử dụng đệm. Dược phẩm này có thể được thanh trùng và/hoặc không chứa chất gây sốt. Dược phẩm này có thể đẳng trương đối với người.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn kháng thể phân lập được tạo ra

bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế có thể được kết hợp với tá dược chần đoán để tạo ra chất chần đoán. Theo một phương án, chất chần đoán này có thể chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế. Lấy ví dụ, chất chần đoán này có thể bao gồm 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều hơn kháng thể hoặc đoạn kháng thể được phân lập được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế.

Tá dược chần đoán này có thể chứa chất mang được dụng khả dụng để chần đoán cho bệnh nhân. Chất mang này không tự kích thích sản sinh ra kháng thể gây hại cho cá thể tiếp nhận chế phẩm này và không gây độc. Chất mang thích hợp có thể bao gồm các đại phân tử lớn chuyển hóa chậm như là protein, polypeptit, liposom, polysacharit, axit polylactic, axit polyglycolic, axit amin dạng polyme, các chất đồng polyme axit amin và các hạt virus bất hoạt.

Theo các phương án cụ thể, muối được dụng có thể được sử dụng, lấy ví dụ muối axit vô cơ, như là hydrochlorua, hydrobromit, phosphat và sulphat, các muối axit hữu cơ, như là axetat, propionat, malonat và benzoat.

Theo một số phương án, dược chất này cũng có thể chứa dung dịch như nước, nước muối, glyxerol và etanol. Ngoài ra, còn có thể có chất phụ trợ, như là chất giữ ẩm hoặc chất tạo huyền phù hoặc chất đệm pH.

Chất chần đoán này có thể được sử dụng trong chần đoán *in vivo*, *in vitro* hoặc *ex vivo*. Đối với trường hợp sử dụng *in vivo*, chất chần đoán này có thể được sử dụng theo một số đường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đường miệng, đường tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong tủy xương, trong bụng, trong nội tủy mạc, trong tâm thất, trên da, qua da, cục bộ, dưới da, trong mũi, trong ruột, dưới lưỡi, trong âm đạo hoặc trong trực tràng.

Các chất chần đoán có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,5, trong một số trường hợp, độ pH này nằm trong khoảng từ 6 đến 8, và trong một số trường hợp khác độ pH khoảng bằng 7. Độ pH này có thể được duy trì bằng cách sử dụng chất đệm. Chế phẩm này có thể vô trùng và/hoặc không có chất gây sốt. Chất chần đoán này có thể là đẳng trương với người.

Theo một phương án, chất chần đoán này có thể chứa chất đánh dấu kháng thể. Chất đánh dấu này có thể lựa chọn từ nhóm bao gồm chất đánh dấu phát huỳnh quang, chất đánh dấu phóng xạ, chất đánh dấu sinh học và bán kháng nguyên, bao gồm chất

đánh dấu enzym.

Chất chẩn đoán này có thể được sử dụng để xác định xem có hay không có kháng nguyên cụ thể. Từ thông tin này có thể ngoại suy để xác định xem có hay không có mầm bệnh cụ thể, và do đó có hoặc không có các bệnh hoặc các rối loạn cụ thể. Theo một khía cạnh của sáng chế, bệnh này có thể là bệnh dị ứng, bệnh trạng hoặc bệnh lây nhiễm hoặc bệnh trạng hoặc bệnh tự miễn. Thông tin thu được bằng cách sử dụng chất chẩn đoán này có thể được sử dụng để xác định phác đồ điều trị thích hợp cho bệnh nhân cụ thể. Cụ thể là, chất chẩn đoán này có thể được sử dụng để xác định xem có hay không có dị ứng nguyên.

Thuật ngữ “dị ứng nguyên” bao gồm những kháng nguyên không phải do sinh vật ký sinh gây ra có khả năng kích thích phản ứng quá mẫn cảm trong cá thể, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mèo, lông thú, nóng giận, gián, len, ve bụi nhà, chất bài tiết của ve bụi nhà, penixillin, sulfonamit, salixylat, thuốc mê bao gồm thuốc gây tê cục bộ, cần tây, cây cần tây, ngũ cốc, ngô, lúa mì, trứng, phôi nhũ, hoa quả, bí đỏ, cây họ đậu, các loại hạt đậu, đậu Hà Lan, quả hạch, lạc, hạt đậu tương, sữa, hải sản, vùng, nước chấm đậu tương, hạt cây, hồ đào, hạnh nhân, vết đốt của côn trùng, nọc ong do vết đốt của ong, nọc độc do vết đốt của ong bắp cày, vết muỗi đốt, bào tử nấm mốc, cao su, kim loại, phấn hoa, cỏ bao gồm rơm rạ và cỏ đuôi mèo, cỏ dại bao gồm cỏ phấn hương, cây mã đề, cây tầm ma, cây ngải thường, cây rau muống và cây chút chít chua, và các loại cây, bao gồm cây bạch dương, cây dương tía, cây phỉ, cây trăn, cây Aesculus, cây liễu, cây dương, cây chò, cây tilia, cây ô liu, cây bách xù Ashe.

Sử dụng kháng thể được phân lập trong tinh sạch protein

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp cố định kháng thể hoặc đoạn kháng thể phân lập được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ theo sáng chế lên bề mặt chất mang rắn. Thuật ngữ “chất mang rắn” bao gồm cả chất mang rắn và chất mang bán rắn, và bao hàm chất mang bất kỳ có thể sử dụng để cố định kháng thể hoặc đoạn kháng thể này. Chất mang rắn có thể bao gồm dạng gel, dạng mạng lưới, dạng hạt bao gồm hạt huyền phù hoặc hạt từ tính, dạng cột, ống, giếng của đĩa vi chuẩn độ, hoặc bản nhựa. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể cố định này được sản xuất bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế đều có thể được sử dụng trong tinh sạch protein. Theo một phương án, kháng thể được cố định này có thể được sử dụng trong sắc ký ái lực miễn dịch. Một dung dịch chứa protein quan tâm có thể được dùng cho chất mang rắn chứa kháng thể

hoặc đoạn kháng thể cố định được tạo ra bởi phương pháp bất kỳ theo sáng chế, và protein kháng thể hoặc đoạn kháng thể này đã biết là có tính đặc hiệu với protein quan tâm. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể, lấy ví dụ, được cố định trên hạt, mà hạt này, trong một số trường hợp, được giữ nằm trong cột.

Tổng quát

Thuật ngữ “chứa” bao hàm “bao gồm” cũng như “có chứa”, ví dụ một chế phẩm “chứa” X có thể bao gồm riêng thành phần X hoặc có thể chứa thành phần khác, ví dụ X + Y.

Khái niệm “về cơ bản” không ngoại trừ “hoàn toàn” ví dụ, một chế phẩm “về cơ bản” không có Y có thể hoàn toàn không có Y. Nếu cần, khái niệm “về cơ bản” có thể không dùng để xác định phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “khoảng” liên quan đến trị số x có nghĩa, lấy ví dụ, $x \pm 10\%$.

Thuật ngữ “bệnh” được sử dụng ở đây nói chung đồng nghĩa và được sử dụng thay thế với thuật ngữ “rối loạn” và “bệnh trạng” (như trong lĩnh vực y tế), trong đó các thuật ngữ này đều phản ánh tình trạng bất bình thường của cơ thể người hoặc động vật hoặc một phần của nó mà làm suy yếu hoạt động chức năng bình thường, thường được biểu hiện bởi các tín hiệu và các triệu chứng tiêu biểu, và là nguyên nhân làm giảm tuổi thọ và chất lượng cuộc sống của người và động vật.

Như được sử dụng ở đây, đề cập đến “điều trị” cho bệnh nhân được dự định bao hàm việc ngăn ngừa, dự phòng cũng như điều trị bệnh. Thuật ngữ “bệnh nhân” có nghĩa là tất cả các loài động vật có vú kể cả người. Thông thường, bệnh nhân được đề cập này là người.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương án ưu tiên theo sáng chế được đề cập trong các ví dụ dưới đây. Các ví dụ này được trình bày chỉ nhằm mục đích minh họa và hỗ trợ người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thực hiện sáng chế. Các ví dụ không nhằm hạn chế phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tế bào plasma trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô

Tác giả sáng chế quan sát được rằng môi trường nuôi cấy sơ cấp tế bào gốc trung mô của người được tạo ra từ tủy xương bình thường theo các phương pháp chuẩn (Pittenger et al, 1999, Science 284:143-147; Bieback et al, 2004 Stem cells 22:625-

634; Dominici et al, 2006, Cytotherapy 8:315-317; Sotiropoulou et al 2006, Stem Cells v24:462-471) có chứa tế bào tiết ra kháng thể. Các tế bào này được phát hiện bằng phân tích ELISPOT, và được nhận diện như tế bào plasma. Tế bào plasma trong môi trường nuôi cấy tế bào gốc trung mô vẫn có thể phát hiện được *in vitro* sau 3 tuần (không thể hiện số liệu).

Ví dụ 2: Môi trường nuôi cấy tế bào plasma tối đa 50 ngày

Với mục đích phát triển hệ thống nuôi cấy mà trong đó mỗi tế bào plasma này có thể còn sống sao cho kháng thể có thể được sản xuất và tích lũy theo thời gian nuôi cấy, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm các nguồn tế bào gốc trung mô sơ cấp khác nhau được tạo ra theo phương pháp chuẩn. Tóm lại, các bình nuôi cấy mô được ủ với FCS trong 1 giờ. Tế bào tủy xương được cho dính bám qua đêm trong môi trường IMDM toàn vẹn có bổ sung FCS 30% và Dexamethason 10^{-8} M. Những tế bào không dính bám được loại ra và những tế bào dính bám được nuôi cấy trong môi trường DMEM-FCS 10% toàn vẹn. Ba trong bảy dòng kiểm tra đã thấy có tế bào plasma của người còn sống nhưng ngừng tăng sinh sau một vài lần cấy chuyển. Trong các thử nghiệm tiếp theo, các tế bào gốc trung mô được làm bất tử bằng cách chuyển nhiễm bằng cách sử dụng gen mã hóa enzym phiên mã ngược telomeraza (MSC-TERT). Những tế bào này được phân lập bởi Mihara và cộng sự (Br J Haematol 2003, 120, 846-849).

Tế bào đơn nhân của máu ngoại vi được nhuộm màu bằng kháng thể đơn dòng kháng CD138 được đánh dấu bằng PE, được làm giàu bằng cách sử dụng vi hạt kháng PE (Miltenyi) và còn được tinh sạch bằng cách sàng lọc tế bào để phân lập tế bào dương tính CD138. Lượng của tế bào plasma tiết ra IgG được xác định bằng cách sử dụng phương pháp ELISPOT đặc hiệu đồng dạng. Lượng tế bào dương tính CD138 khác nhau được cấy trên lớp đơn tế bào gốc trung mô trên đĩa nuôi cấy 96 giếng với RPMI 1640 có bổ sung huyết thanh bào thai bò 10% (Hyclone), không có các axit amin thiết yếu, pyruvat và glutamax (GIBCO). Dựa vào phương pháp ELISPOT tại thời điểm nuôi cấy, môi trường nuôi cấy được trình bày trên Fig.1 có chứa bảy tế bào tiết ra IgG. Một nửa lượng dịch nổi nuôi cấy được lấy ra tại các thời điểm khác nhau và thay thế bằng môi trường mới. Tiếp theo, vào ngày thứ 18 và 34 môi trường nuôi cấy này được loại bỏ hoàn toàn và thay thế bằng môi trường mới. Năng suất IgG hàng

ngày trong từng môi trường nuôi cấy và năng suất IgG hàng ngày được ước tính đối với từng tế bào plasma được xác định. Như thể hiện trên Fig.1, lượng IgG được sản xuất ra bởi quần thể môi trường nuôi cấy theo sáng chế là khoảng 7 tế bào tăng tuyến tính theo hàm thời gian trong môi trường nuôi cấy lên đến trên 50 ngày, với năng suất tương ứng 676 pg/ngày và năng suất ước tính 96 pg/tế bào/ngày.

Ví dụ 3: Môi trường nuôi cấy từng tế bào plasma trong 3 tuần

Tế bào plasma được phân lập từ máu ngoại vi hoặc tủy xương bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD138 tiếp hợp PE, tiếp đó là vi hạt kháng PE và tế bào chọn lọc được cấy lên đơn lớp tế bào gốc trung mô với mật độ 0,5 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng. Những môi trường nuôi cấy có chứa IgG được theo dõi trong khoảng thời gian từ 22 đến 23 ngày bằng cách lấy mẫu định kỳ. [Môi trường được thay vào ngày thứ 16. Tỷ lệ của sản phẩm IgG trong môi trường nuôi cấy đơn dòng là không đổi, trong khoảng từ 72 đến 134 pg/tế bào/ngày trong suốt thời gian nuôi cấy (Fig.2a, thu nhận máu ngoại vi (4 môi trường nuôi cấy); Fig.2b, thu nhận tủy xương (5 môi trường nuôi cấy)).

Trong năm thí nghiệm pha loãng có giới hạn, hiệu quả phủ tế bào plasma và tủy xương trong khoảng từ 30% đến 65% (dữ liệu không được thể hiện). Ngoài ra, tế bào plasma thu được từ các môi trường nuôi cấy đa dòng có thể phủ tiếp lên môi trường nuôi cấy đơn tế bào nếu chúng còn duy trì được tỷ lệ tiết Ig (dữ liệu không được thể hiện). Đường tích lũy của IgG tương ứng với sự tồn tại của từng tế bào tiết ra IgG ở một tỷ lệ cao ổn định. Sản phẩm IgG của tế bào plasma nuôi cấy không bị ảnh hưởng bởi bức xạ với mức tăng sinh bị chấm dứt hoàn toàn và sự biệt hóa của tế bào nhớ B bị kích thích bởi chất chủ vận TLR (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 4. Môi trường nuôi cấy của tế bào plasma sản xuất IgG, IgA, IgM và IgE

Tế bào dương tính CD138 có nguồn gốc từ máu ngoại vi sản xuất IgG, IgA, IgM và IgE được phân lập từ người cho khỏe mạnh được phủ lên trên đĩa 384 giếng với 5 tế bào/giếng có chứa đơn lớp tế bào gốc trung mô trong môi trường nuôi cấy tái sinh 617. Dịch nổi sau 10 ngày nuôi cấy được kiểm tra sự có mặt của IgG, IgA, IgM và IgE bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu đồng dạng. Tổng lượng IgG, IgA, IgM và IgE này được đo trong dịch nổi nuôi cấy (xem Fig 3). Năng suất trung bình của tế bào

plasma đối với IgG, IgA, IgM và IgE là 860, 770, 1100 và 1800 pg trong 10 ngày, tức là lần lượt tương ứng với 86, 77, 110 và 180 pg/tế bào/ngày.

Ví dụ 5: Hiệu suất sống của tế bào plasma *in vitro*

Tế bào plasma của người có nguồn gốc từ máu ngoại vi được phân lập từ bảy người cho theo sự biểu hiện của CD138 và được cấy với mật độ 1 hoặc 25 tế bào/giếng. Số tế bào tiết ra kháng thể IgG, IgA và IgM tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy được tính toán bằng phương pháp ELISPOT đặc hiệu đồng dạng. Hiệu quả nuôi cấy trên đĩa được tính theo số tế bào tiết ra kháng thể IgG, IgA và IgM theo phân tích phân phối Poisson và có khoảng từ 50% đến 74% đối với IgG, từ 31% đến 78% đối với IgA và từ 0 đến 26% đối với IgM (xem Fig 4). Hơn thế nữa, tế bào plasma thu được từ môi trường nuôi cấy đa dòng có thể được tái phủ lên môi trường nuôi cấy đơn tế bào nếu chúng duy trì được tỷ lệ ổn định việc tiết ra Ig (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 6: Phân lập kháng thể đơn dòng IgE hiếm

Tế bào plasma được phân lập từ máu ngoại vi của cá thể bị dị ứng được cấy lên đĩa với 1 tế bào/giếng trên đơn lớp hMSC-TERT trong 10 vi đĩa 384 giếng. Có năm vị trí dịch nổi nuôi cấy sản sinh ra IgE. Các môi trường nuôi cấy dương tính với IgE được đưa vào chạy RT-PCR để thu được hai cặp gen VH/VL và giải trình tự (Bảng 1). Gen V được nhân dòng vào vector biểu hiện để biểu hiện chuỗi nhẹ (kappa hoặc lambda) hoặc chuỗi nặng IgG1 hoặc IgE của người theo phương pháp được mô tả bởi Wardemann và cộng sự, (Science 301, 1374-1377, 2003). Kháng thể IgG hoặc kháng thể IgE được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào 293T. Ví dụ này minh họa khả năng để thu được tế bào plasma hiếm và phân lập kháng thể đơn dòng IgE tiêu biểu.

Bảng 1: Hai kháng thể đơn dòng IgE thu được từ tế bào plasma hệ tuần hoàn

		Chuỗi nặng						Chuỗi nhẹ			
Dòng	đồng dạng	Gen V	N1 nt	Gen D	N2 nt	Gen J	SHM nt (aa)	Gen V	N nt	Gen J	SHM nt (aa)
IgE1	IgE, λ	3-9*01	4	2-15*01	5	4*02	30 (16)	2-14*01	5	2*01	18 (12)
IgE2	IgE, κ	3-15*01	0	2-2*01	9	6*03	15 (7)	3-11*01	1	5*01	8 (7)

SHM nt: nucleotit siêu đột biến soma; aa: axit amin

Ví dụ 7: Phân lập kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên từ tế bào plasma được nuôi cấy với sự có mặt của tế bào gốc trung mô

Tế bào plasma được phân lập từ máu ngoại vi của người cho sau 7 ngày tiêm chủng nhắc lại vaccin độc tố uốn ván (TT: tetanus toxoid) và được cấy trong điều kiện nhân dòng trên đơn lớp MSC-TERT trong vi đĩa 384 giếng. Dịch nổi sau 10 ngày nuôi cấy được phân tích xem sự có mặt của tổng số IgG (ng/môi trường nuôi cấy) cũng như kháng thể IgG đặc hiệu TT (OD405) và các môi trường nuôi cấy đơn dòng sản xuất kháng thể đặc hiệu TT được xác định (xem Fig 5). Ví dụ này minh họa khả năng xác định một lượng lớn tế bào plasma đặc hiệu với kháng nguyên sau khi được tiêm chủng nhắc lại.

Ví dụ 8: Phân lập kháng thể phản ứng trung hòa rộng và hiệu quả với bệnh cúm A từ tế bào plasma được nuôi cấy với sự có mặt của IL-6

Tế bào dương tính CD138 từ người cho được tiêm miễn dịch với vaccin cúm theo mùa trước 7 ngày được cấy trên mười sáu đĩa 384 giếng với mật độ 0,5 tế bào/giếng với sự có mặt IL-6 10 ng/ml. Vào ngày thứ 6 và 8, dịch nổi nuôi cấy được thử nghiệm theo ba phương pháp ELISA song song bằng cách sử dụng như là kháng nguyên baculovirus H5 hoặc H9 tái tổ hợp có nguồn gốc từ yếu tố ngưng kết tổ hồng cầu tái tổ hợp (HA: hemagglutinin) và kháng nguyên độc tố uốn ván (TT: tetanus toxoid) tương ứng. Trong số 4.928 dịch nổi môi trường nuôi cấy được sàng lọc, có 12 môi trường liên kết với H5 HA, 25 môi trường liên kết với H9 HA và 54 môi trường liên kết với cả H5 và H9. Một số còn lại có tín hiệu OD cao nhất được đưa vào chạy RT-PCR và đã thu được hai cặp gen VH/VL. Hai kháng thể đơn dòng, FI6 và FI28, chung nhau phần lớn đoạn gen V, D và J (IGHV3-30*01, IGHD3-9*01, IGHJ4*02 và

IGKV4-1*01), nhưng khác biệt trong vùng đầu N, do cách sử dụng IGKJ và mô hình đột biến thể soma nên không liên quan đến việc nhân dòng này.

Các gen V của FI6 và FI28 được nhân dòng với vector biểu hiện và kháng thể tái tổ hợp được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm vào tế bào 293T. Tính đặc hiệu của chúng được khảo sát bằng ELISA nhờ sử dụng bảng HA tái tổ hợp thuộc vào các nhóm phụ khác nhau (Bảng 2). FI6 liên kết với tất cả phân nhóm phụ HA của cúm A được thử nghiệm bao gồm nhóm 1 (H1, H5 và H9) và nhóm 2 (H3 và H7), trong khi không liên kết với HA của cúm B. Ngược lại, FI28 chỉ liên kết với các HA nhóm 1.

Bảng 2: Liên kết của tế bào plasma có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng của người với HA bệnh cúm

	Liên kết với HA bởi ELISA (% kháng thể đối chứng đặc hiệu kiểu phụ)				
	H1	H3	H5	H7	H9
	A/NC/ 20/99	A/BR/ 10/07	A/VN/ 1203/04	A/NL/ 219/03	A/HK/ 1073/99
FI6	85,9	68,5	73,7	87,9	98,7
FI28	59,4	1,3	46,3	-0,5	87,7

Tiếp đó tiến hành thử nghiệm khả năng của FI6 và FI28 đối với việc trung hòa cúm A kiểu phụ nhóm 1 và 2 bằng cách sử dụng giả virus cũng như virus lây nhiễm. Một lượng FI6 đáng kể trung hòa toàn bộ giả virus được thử nghiệm, bao gồm sáu H5 phân lập thuộc vào các nhánh phân loại kháng nguyên khác nhau 0, 1, 2,1, 2,2 và 2,3, và hai biến thể cúm chim H7 được phân lập (Bảng 3). Ngoài ra, FI6 trung hòa tất cả virus lây nhiễm được thử nghiệm, bao gồm hai virus H3N2 và bốn virus H1N1 kéo dài trong khoảng thời gian 70 năm cho đến dịch cúm hiện tại phân lập từ H1N1 có nguồn gốc ban đầu từ lợn A/Cal/04/09 (Bảng 4). Ngược lại, FI28 lại trung hòa tất cả các giả virus H5 nhưng lại không trung hòa được giả virus H7 cũng như các virus lây nhiễm được thử nghiệm (Bảng 3 và 4).

Bảng 3: Trung hòa nhóm giả H5 và H7 bằng kháng thể đơn dòng của người

	Trung hòa nhóm giả HA (IC90, µg/ml)							
	H5N1						H7N1	
	A/HK/ 491/97	A/HK/ 213/03	A/VN/ 1203/04	A/INDO/ 5/05	A/WS/ MONG/0	A/AH/ 1/05	A/ck/IT/ 13474/99	A/ck/F P
FI6	0,07	0,02	0,02	0,31	0,03	0,05	1,87	0,09
FI28	0,05	0,33	0,02	0,35	0,04	0,05	>100	>100

Bảng 4. Trung hòa virus cúm bởi kháng thể đơn dòng của người

	Trung hòa virus lây nhiễm (IC50, µg/ml)					
	H1N1				H3N2	
	A/PR/ 8/34	A/NC/ 20/99	A/SI/ 3/06	A/CA/ 4/09	A/CA/ 7/04	A/WI/ 67/05
FI6	2,2	6,3	8,8	12,5	7,9	12,5
FI28	>100	>100	>100	nd	>100	>100

nd, không thực hiện

Cần lưu ý rằng phương pháp được mô tả chi tiết ở trên đã tạo ra 50 µl kháng thể đơn dòng với năng suất khoảng 8-16 ng/ml trong 5-10 ngày. Với nồng độ kháng thể và thể tích này là đủ để thực hiện nhiều phương pháp phân tích. Các phương pháp phân tích này không chỉ là phân tích liên kết như ELISA (mà có thể được thực hiện với đĩa 384 giếng nông chuẩn với khuôn để sử dụng được 5 µl), mà còn phân tích chức năng, như là trung hòa nhóm giả, với một khoảng nhạy (xem Bảng 3). Quan trọng là, có khả năng thực hiện nhiều phân tích song song cần thiết để xác định nhanh chóng tế bào plasma hiếm mà có khả năng tiết ra kháng thể liên kết với nhiều loại kháng nguyên khác nhau.

Ví dụ 9: Phân lập kháng thể đơn dòng đặc hiệu với độc tố uốn ván từ tế bào plasma được nuôi cấy được phân lập từ tế bào máu ngoại vi sau mười năm tiêm chủng vaccin huyết thanh

Tế bào plasma CD138⁺ HLA-DR⁺ CD62L⁺ được phân lập bằng cách sàng lọc tế bào từ máu ngoại vi của người cho sau 10 năm tiêm chủng vaccin độc tố uốn ván. Một lượng 1.700 tế bào được cấy với 0,5 tế bào/giếng trên các vi đĩa 384 giếng và

dịch nổi nuôi cấy tế bào được sàng lọc vào ngày thứ 7 bằng ELISA để phát hiện sự có mặt của kháng thể IgG đặc hiệu với độc tố uốn ván. Một môi trường đặc hiệu độc tố uốn ván đã được xác định và gen VH/VL đã được tách ra vào ngày thứ 8 bằng RT-PCR và được giải trình tự (xem Bảng 5). Gen này được nhân dòng vào vector biểu hiện và kháng thể tái tổ hợp (TT14) đã được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào 293T. Kháng thể được thử nghiệm với các nồng độ khác nhau để liên kết với độc tố uốn ván hoặc liên kết với kháng nguyên không liên quan (đối chứng âm) bởi ELISA (xem Fig.6).

Bảng 5: Kháng thể đơn dòng đặc hiệu độc tố uốn ván thu được từ tế bào plasma hệ tuần hoàn sau 10 năm tiêm chủng vắc xin

Dòng	Đồng dạng	Chuỗi nặng				Chuỗi nhẹ		
		Gen V	Gen D	Gen J	SHM J nt (aa)	Gen V	Gen	SHM J nt (aa)
TT14	IgG4, I	1-2*02	6-19*01	4*02	17 (13)	7-46*01	3*02	9 (7)

SHM nt: nucleotit siêu đột biến soma; aa: axit amin

Cần lưu ý rằng có nhiều lựa chọn khác nhau để thực hiện sáng chế và có nhiều cải biến có thể thực hiện mà không nằm ngoài phạm vi và tinh thần của sáng chế. Do đó, các phương án thực hiện sáng chế cần được xem xét là nhằm minh họa sáng chế mà không hạn chế phạm vi sáng chế, và sáng chế không bị giới hạn bởi các mô tả cụ thể ở đây, mà có thể thay đổi trong phạm vi của sáng chế và tương ứng với phạm vi yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất kháng thể từ tế bào plasma bao gồm bước: nuôi tế bào plasma trong điều kiện có mặt IL-6 hoặc tế bào gốc trung mô với số lượng hữu hạn; và thu kháng thể đã nêu từ đó, trong đó số lượng tế bào plasma được nuôi cấy bằng hoặc ít hơn 10 tế bào.
2. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng từ tế bào plasma bao gồm bước: nuôi cấy tế bào plasma trong điều kiện có mặt IL-6 hoặc tế bào gốc trung mô trong môi trường nuôi cấy một tế bào; và thu kháng thể đã nêu từ đó.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó kháng thể là kháng thể của người và các tế bào plasma là các tế bào plasma của người.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó các tế bào plasma được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa IL-6 hoặc tế bào gốc trung mô có khả năng kéo dài sự sống của tế bào plasma trong khoảng thời gian đủ để sản xuất ra kháng thể với số lượng đủ để xác định đặc tính của kháng thể đã nêu.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó sự sống của các tế bào plasma được kéo dài trong khoảng thời gian ngắn, và trong đó khoảng thời gian ngắn này là khoảng từ 5 đến 7 ngày.
6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó sự sống của các tế bào plasma được kéo dài trong khoảng thời gian dài, và trong đó khoảng thời gian dài này ít nhất là 10 ngày.
7. Phương pháp theo điểm 4 hoặc điểm 6, trong đó sự sống của các tế bào plasma được kéo dài ít nhất là 20 ngày hoặc ít nhất là 30 ngày.
8. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
 - a) nuôi cấy một lượng hữu hạn tế bào plasma theo phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7;
 - b) xác định môi trường nuôi cấy tạo ra kháng thể có đặc tính mong muốn;
 - c) phân lập axit nucleic mã hóa kháng thể đã nêu; và
 - d) biểu hiện axit nucleic này trong tế bào chủ.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước xác định đặc tính kháng thể hoặc đoạn kháng thể, trong đó bước xác định đặc tính kháng thể hoặc đoạn kháng thể này bao gồm việc thực hiện phân tích chức năng để xác định chức năng của kháng thể hoặc đoạn kháng thể, phân tích liên kết để xác định tính đặc hiệu liên kết của kháng thể hoặc đoạn kháng thể hoặc epitop được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn kháng thể, và/hoặc phân tích trung hòa để xác định khả năng trung hòa độc tố hoặc mầm bệnh của kháng thể hoặc đoạn kháng thể đó.

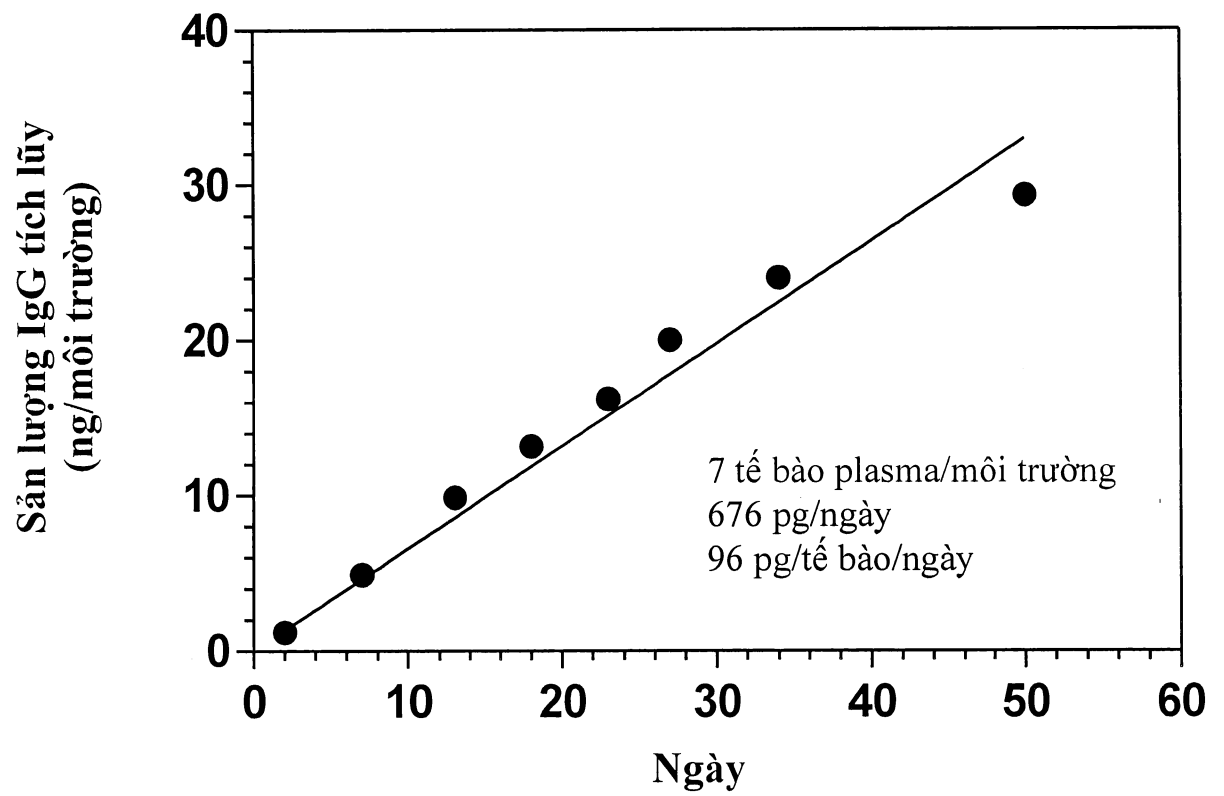


Fig.1

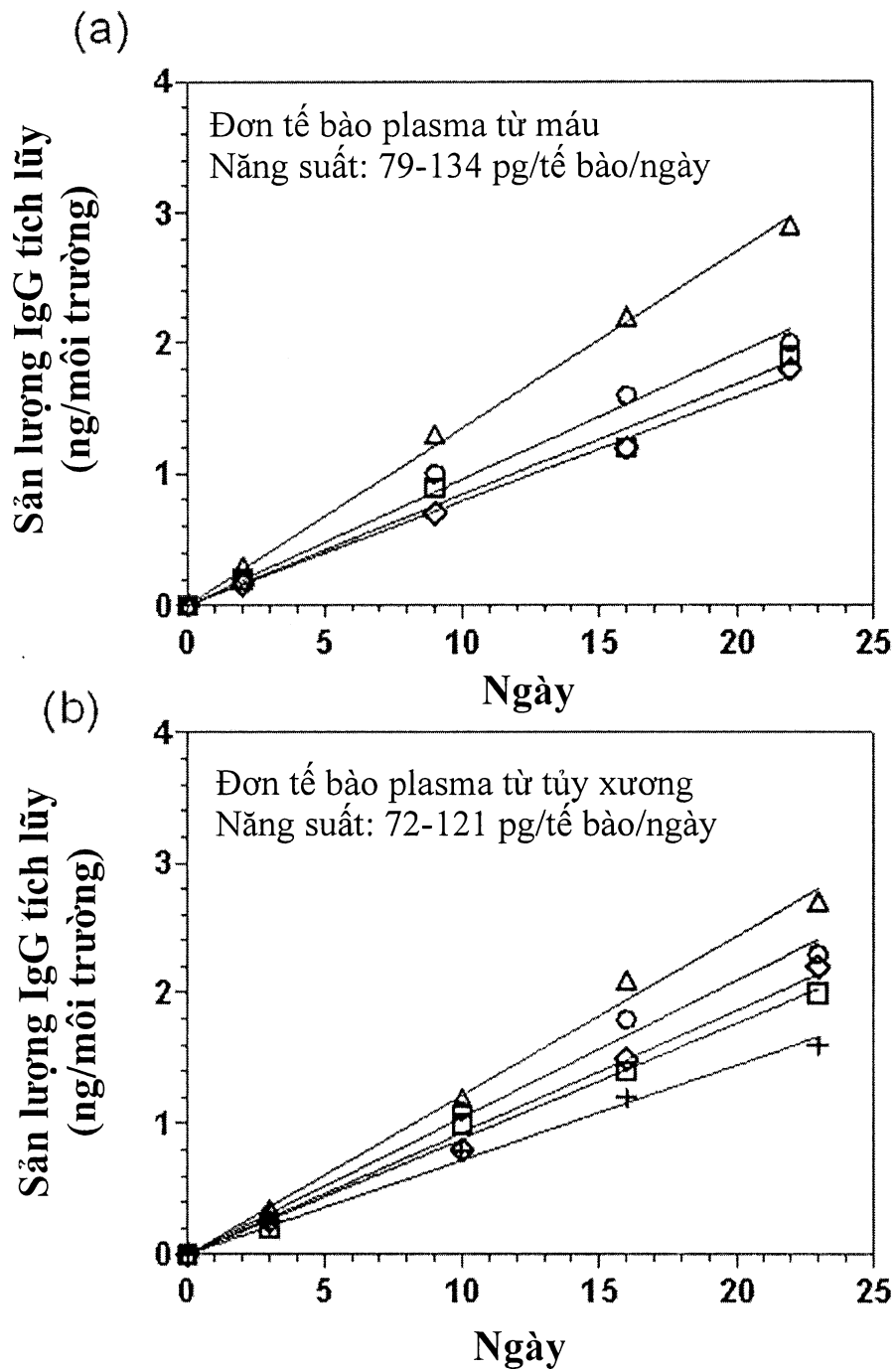


Fig.2

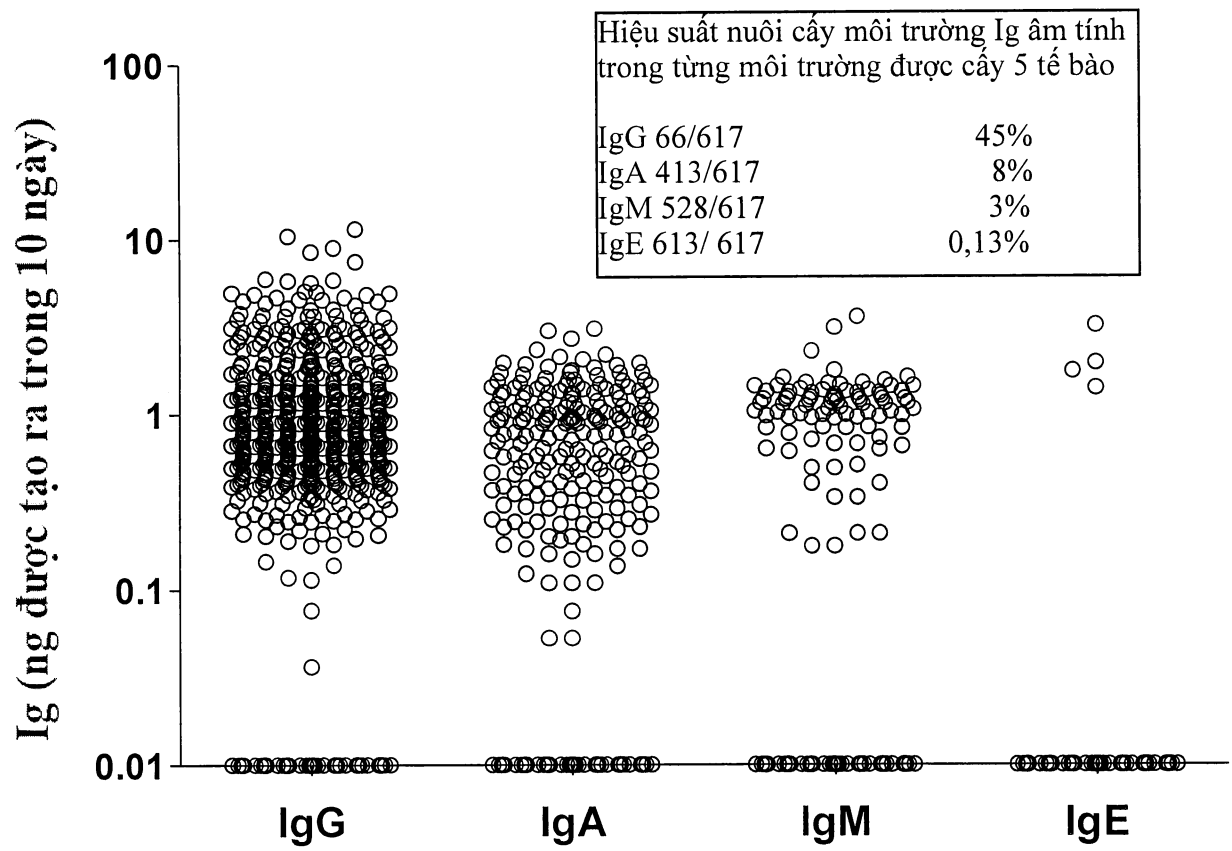


Fig.3

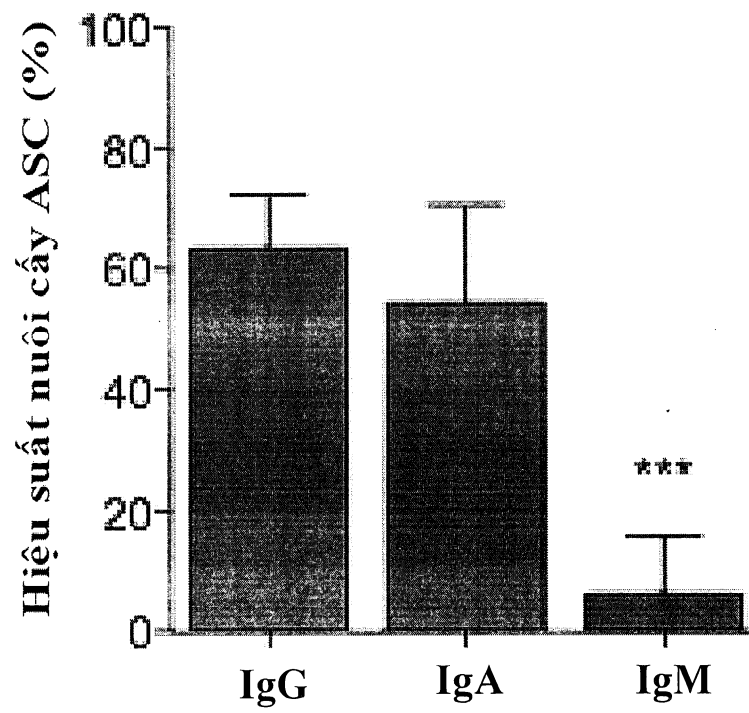


Fig.4

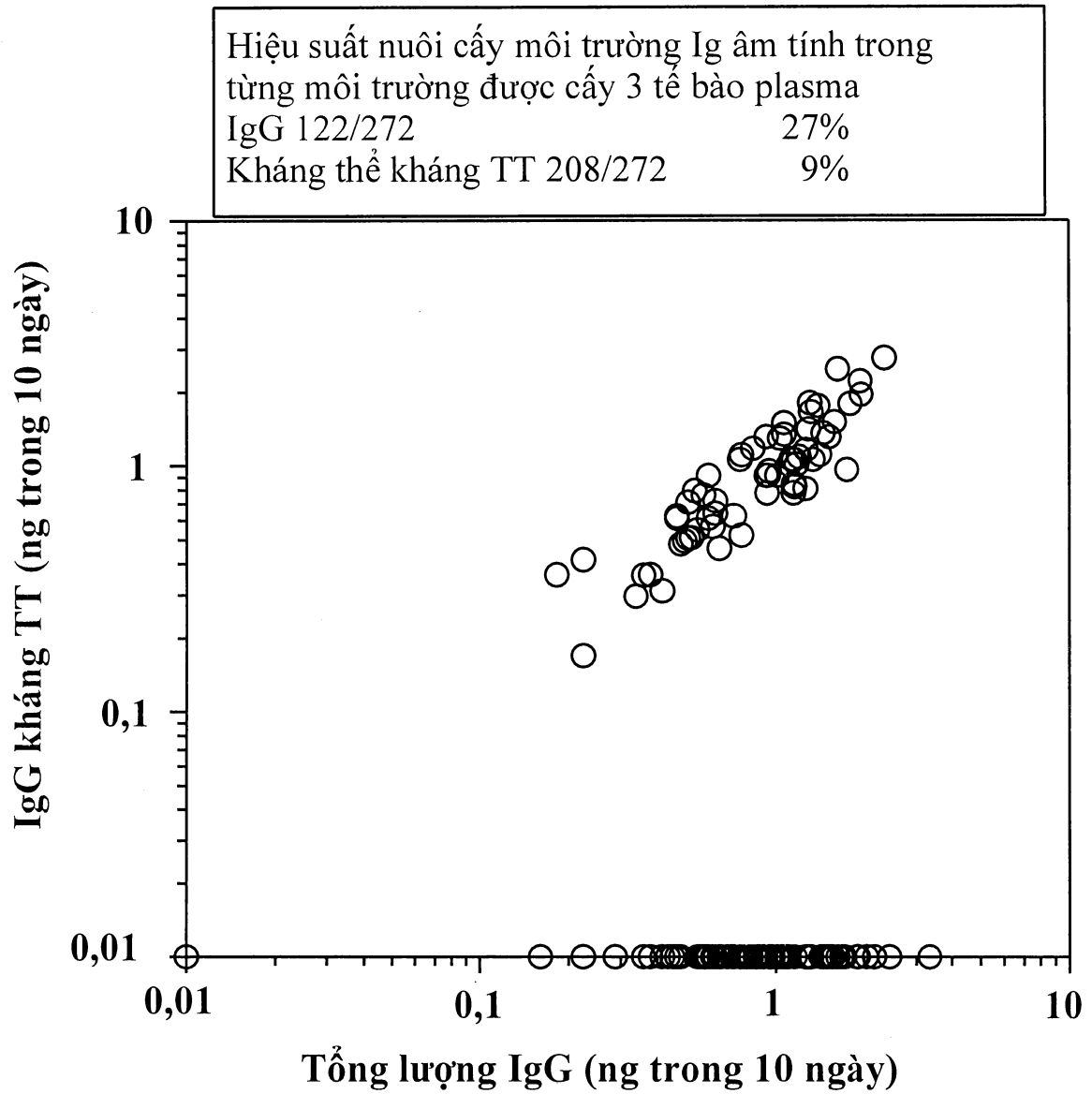
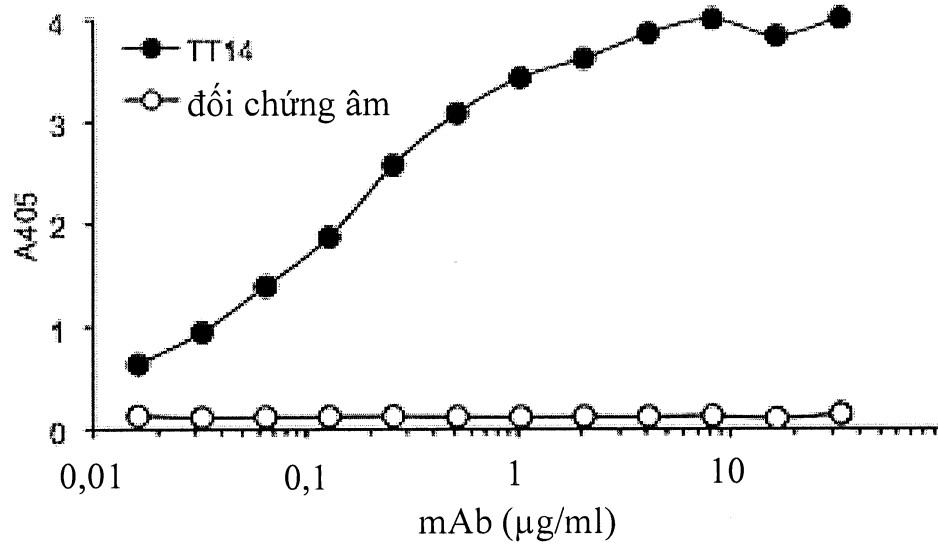


Fig.5

**Fig.6**