



(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) 
1-0022003

(51)⁷ **C07K 16/28, A61P 35/00, A61K 39/395** (13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|-----------------|------------|
| (21) | 1-2010-02723 | (22) | 23.03.2009 | | |
| (86) | PCT/EP2009/02111 | 23.03.2009 | (87) | WO2009/118142A1 | 01.10.2009 |
| (30) | 08005554.4 | 25.03.2008 | EP | | |
| | 08007172.3 | 11.04.2008 | EP | | |
| (45) | 25.10.2019 | 379 | (43) | 25.09.2011 | 282 |
| (73) | ROCHE GLYCART AG (CH)
Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Switzerland | | | | |
| (72) | DUMONTET, Charles (FR), FRIESS, Thomas (DE), HERTING, Frank (DE),
KLEIN, Christian (DE), UMANA, Pablo (CR) | | | | |
| (74) | Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH) | | | | |
-

(54) **DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG CD20 TYP II ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH
UNG THƯ BIỂU HIỆN CD20**

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20, trong đó dược phẩm này bao gồm kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp bao gồm xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm chứa kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) để điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là các bệnh ung thư biểu hiện CD20, và tác nhân hoá trị liệu bao gồm xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phân tử CD20 (còn được biết đến là kháng nguyên biệt hoá giới hạn lympho bào B người hoặc Bp35) là protein màng chuyển tiếp kỵ nước với phân tử lượng khoảng 35 kD được định vị trên tiền lympho bào B và lympho bào B trưởng thành (Valentine et al. (1989) J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287; và Einfield et al. (1988) EMBO J. 7(3):711-717). CD20 được thấy trên bề mặt của hơn 90% các tế bào B từ các cơ quan máu ngoại vi hoặc dạng bạch huyết và được biểu hiện trong quá trình phát triển tế bào sớm tiền B và duy trì cho tới khi biệt hoá bạch cầu. CD20 được biểu hiện trên cả các tế bào B bình thường cũng như các tế bào B ung thư. Cụ thể, CD20 được biểu hiện trên 90% u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL) (Anderson et al. (1984) Blood 63(6): 1424-1433)), nhưng không được thấy trên các tế bào mầm tạo máu, các tiền tế bào B, các bạch cầu bình thường hoặc các mô bình thường khác (Tedder et al. (1985) J, Immunol. 135(2):973- 979).

Vùng axit amin 85 đầu carboxyl của protein CD20 được nằm trong bào chất. Độ dài của vùng này tương phản với độ dài của các cấu trúc bề mặt đặc hiệu tế bào B khác như các chuỗi nặng IgM, IgD và IgG hoặc các kháng nguyên có tính tương hợp mô loại II hoặc các chuỗi β , chúng có các vùng trong bào chất ngắn tương đối tương ứng bao gồm 3, 3, 28, 15, và 16 axit amin (Komaromy et al. (1983) NAR 11:6775-6785). Trong số 61 axit amin đầu carboxyl thì có 21 gốc axit, trong khi chỉ 2 gốc là bazơ, chứng tỏ rằng vùng này có điện tích âm rất mạnh. Số truy cập trên Ngân hàng Gen là NP-690605. Được cho rằng CD20 có

thể liên quan đến việc điều chỉnh (các) bước sớm trong quá trình hoạt hoá và biệt hoá của các tế bào B (Tedder et al. (1986) Eur. J. Immunol. 25 16:881-887) và có thể hoạt động như kênh canxi ion (Tedder et al. (1990) J. Cell. Biochem. 14D: 195).

Có hai loại kháng thể kháng CD20 khác nhau đáng kể về kiểu gắn kết CD20 và các hoạt tính sinh học của chúng (Cragg, M.S., et al, Blood, 103 (2004) 2738-2743; and Cragg, M.S., et al, Blood, 101 (2003) 1045-1051). Các kháng thể typ I, ví dụ như Rituximab, là đặc hiệu đối với tính gây độc tế bào do bỏ thể tạo ra, trong khi các kháng thể typ II, như các kháng thể Tositumomab (B1), 11B8, AT80 hoặc B-Ly1 được làm tương thích với người và gây ra sự chết tế bào đích một cách hữu hiệu nhờ gây chết tế bào không phụ thuộc caspaza bởi sự tiếp xúc phosphatidylserin đồng thời.

Các đặc tính phân chia chung của các kháng thể kháng CD20 typ I và typ II được tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1: Các đặc tính của các kháng thể kháng CD20 typ I và Typ II

Các kháng thể kháng CD20 typ I	Các kháng thể kháng CD20 typ II
Epitop CD20 typ I	Epitop CD20 typ II
Định vị CD20 với các khối lipid	Không định vị CD20 với các khối lipid
CDC tăng (nếu là isotyp IgG1)	CDC giảm (nếu là isotyp IgG1)
Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp IgG1)	Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp IgG1)
Dung lượng gắn kết đầy đủ	Dung lượng gắn kết giảm
Kết tụ đồng kiểu	Kết tụ đồng kiểu mạnh hơn
Kích thích gây chết tế bào khi liên kết chéo	Kích thích gây chết tế bào mạnh không liên kết chéo

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là các bệnh ung thư biểu hiện CD20 kết hợp với một hoặc

nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) để bào chế thuốc điều trị cho bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu hiện CD20 kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20 kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) để điều trị cho bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu hiện CD20 kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Tốt hơn là việc điều trị bằng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) kết hợp với xyclophosphamit và vincristin.

Dược phẩm bao gồm cả kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin để sử dụng điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20, cụ thể là u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL).

Tốt hơn là kháng thể kháng CD20 typ II này là kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người, được biến đổi di truyền glyco.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "kháng thể " bao gồm các dạng khác nhau của các kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể nguyên, các kháng thể người,

các kháng thể được làm tương thích với người và các kháng thể được biến đổi di truyền như các kháng thể đơn dòng, các kháng thể dạng khảm hoặc các kháng thể tái tổ hợp cũng như các phần của các kháng thể này với điều kiện là các đặc tính đặc trưng theo sáng chế được giữ lại. Các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng" theo sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa các phân tử kháng thể của hợp chất axit amin đơn. Vì vậy, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng người" đề cập đến các kháng thể thể hiện tính gắn kết đặc hiệu đơn mà có các vùng ổn định và biến đổi thu được từ các trình tự globulin miễn dịch người dòng mầm. Theo một phương án, các kháng thể người đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai bao gồm tế bào B thu được từ động vật không phải là người chuyển gen, ví dụ chuột chuyển gen, có hệ gen bao gồm gen biến đổi chuỗi nặng người và gen biến đổi chuỗi nhẹ người kết hợp với tế bào bất tử.

Tốt hơn nếu kháng thể kháng CD20 typ II này là kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ "kháng thể dạng khảm" đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi, tức là vùng gắn kết, từ một nguồn hoặc loài và ít nhất một phần của vùng ổn định thu được từ một nguồn hoặc loài khác, thường được chuẩn bị bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Các kháng thể dạng khảm bao gồm vùng biến đổi của chuột và vùng ổn định của người được ưu tiên đặc biệt. Các kháng thể dạng khảm chuột/người này là sản phẩm của các gen globulin miễn dịch biểu hiện bao gồm các đoạn ADN mã hoá các vùng biến đổi globulin miễn dịch chuột và các đoạn ADN mã hoá các vùng ổn định globulin miễn dịch người. Các dạng khác của các kháng thể dạng khảm nằm trong sáng chế là các loại trong đó lớp hoặc lớp phụ được cải biến hoặc thay đổi từ lớp hoặc lớp phụ của kháng thể gốc. Các kháng thể "dạng khảm" đó cũng được đề cập đến như "các kháng thể chuyển đổi nhóm". Các phương pháp để tạo ra các kháng thể dạng khảm này bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và chuyển gen thông thường hiện đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ tài liệu Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 và US 5,204,244.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người" đề cập đến các kháng thể trong đó khung hoặc "các vùng xác định hỗ trợ" (CDR) được cải biến để bao gồm CDR của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác so với tính đặc hiệu của globulin miễn dịch gốc. Theo một phương án được ưu tiên, CDR chuột được cấy ghép vào vùng khung của kháng thể người để tạo ra "kháng thể được làm tương thích với người." Xem, ví dụ tài liệu Riechmann, L, et al., Nature 332 (1988) 323-327; và Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Các CDR được ưu tiên đặc biệt tương ứng với các trình tự đại diện nhận dạng các kháng nguyên thể hiện ở trên đối với các kháng thể dạng khảm và hai chức.

Thuật ngữ "kháng thể người", theo sáng chế, sẽ bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự người globulin miễn dịch dòng mầm. Các kháng thể người là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374). Dựa vào kỹ thuật này, các kháng thể người kháng lại rất nhiều loại đích khác nhau có thể được tạo ra. Các ví dụ về các kháng thể người được mô tả, chẳng hạn trong tài liệu Kellermann, S. A., et al., Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597.

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp", theo sáng chế, sẽ bao gồm tất cả các kháng thể người được thiết kế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách tái tổ hợp, các kháng thể này được phân lập từ tế bào chủ như tế bào NS0 hoặc hoặc CHO hoặc từ động vật (ví dụ, chuột) được chuyển gen cho các gen globulin miễn dịch người hoặc các kháng thể biểu hiện nhờ sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp chuyển nhiễm vào tế bào chủ. Các kháng thể người tái tổ hợp này có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch người dòng mầm dưới dạng sắp xếp lại. Các kháng thể người tái tổ hợp theo sáng chế được tạo siêu đột biến soma *in vivo*. Vì vậy, các trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà, trong khi thu được và liên quan đến các trình tự người dòng mầm VH và VL, có thể không tồn tại tự nhiên trong kho dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Theo sáng chế, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết một cách đặc hiệu với" đề cập đến gắn kết đặc hiệu của kháng thể với kháng nguyên CD20. Tốt hơn nếu ái lực gắn kết có giá trị KD là 10^{-9} mol/l hoặc thấp hơn (ví dụ 10^{-10} mol/l), tốt hơn nếu giá trị KD là 10^{-10} mol/l hoặc thấp hơn (ví dụ 10^{-12} mol/l). Ái lực gắn kết được xác định với thử nghiệm gắn kết chuẩn, như phân tích thẩm tách Scatchard nhờ các tế bào biểu hiện CD20.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic", theo sáng chế, sẽ bao gồm các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là AND sợi đơn hoặc sợi kép, nhưng tốt hơn là ADN sợi kép.

Thuật ngữ "các vùng ổn định" không tạo ra sự gắn kết trực tiếp của kháng thể với kháng nguyên, nhưng có các chức năng điều biến (ADCC, gắn kết bổ trợ và CDC).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" (vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH)) theo sáng chế đề cập đến từng cặp các chuỗi nặng và nhẹ tạo ra sự gắn kết trực tiếp của kháng thể với kháng nguyên. Các miền của các chuỗi nặng và nhẹ biến đổi của người có cấu trúc chung tương tự và mỗi miền bao gồm bốn vùng khung (FR) mà các trình tự của chúng được bảo toàn rộng rãi, liên kết bởi ba "vùng siêu biến" (hoặc các vùng xác định bổ trợ, các CDR). Các vùng khung chấp nhận cấu hình tám b- và các CDR có thể tạo ra các vòng nối với cấu trúc tám b-. Các CDR ở mỗi chuỗi được giữ trong cấu trúc ba chiều của chúng bằng các vùng khung và cùng với các CDR của chuỗi khác tạo ra điểm gắn kết kháng nguyên. Các vùng chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể CDR3 đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong việc tính đặc hiệu/ái lực gắn kết của các kháng thể theo sáng chế và vì vậy tạo ra mục đích khác nữa của sáng chế.

Các thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể" theo sáng chế đề cập đến các gốc axit amin của kháng thể mà có thể tạo ra gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến bao gồm các gốc axit amin từ "các vùng xác định bổ trợ" hoặc "các CDR". Các vùng "khung" hoặc "FR" là các

vùng miền biến đổi ngoài các gốc vùng siêu biến như được xác định theo sáng chế. Vì vậy, các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể bao gồm các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4 theo chiều từ đầu N đến đầu C. Đặc biệt, CDR3 của chuỗi nặng là vùng góp phần nhiều nhất vào gắn kết kháng nguyên. Các vùng CDR và FR được xác định theo cách xác định chuẩn trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) và/hoặc các gốc từ "vùng siêu biến".

Các thuật ngữ "CD20" và "kháng nguyên CD20" được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm các thể biến dị, các isoform, các thể tương đồng loài của CD20 người bất kỳ mà được biểu hiện một cách tự nhiên bởi các tế bào hoặc được biểu hiện trên các tế bào chuyển nhiễm với gen CD20. Gắn kết của kháng thể theo sáng chế với kháng nguyên CD20 gây chết các tế bào biểu hiện CD20 (ví dụ các tế bào khối u) bằng cách làm bất hoạt CD20. Sự chết của các tế bào biểu hiện CD20 có thể xuất hiện bằng một hoặc nhiều trong các cơ chế dưới đây: kích thích cái chết/gây chết tế bào, ADCC và CDC.

Các từ đồng nghĩa của CD20, như được chấp nhận trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm CD20 kháng nguyên lympho bào B, kháng nguyên bề mặt lympho bào B B1, Leu-16, Bp35, BM5 và LF5.

Thuật ngữ "kháng thể kháng CD20" theo sáng chế là kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên CD20. Tùy thuộc vào các đặc tính gắn kết và các hoạt tính sinh học của các kháng thể kháng CD20 với kháng nguyên CD20, hai loại của các kháng thể kháng CD20 (các kháng thể kháng CD20 typ I và typ II) có thể được phân biệt theo Cragg, M.S., et al, *Blood* 103 (2004) 2738-2743; and Cragg, M.S., et al *Blood* 101 (2003) 1045-1051, xem Bảng 2.

Bảng 2: Các đặc tính của các kháng thể kháng CD20 typ I và typ II

Các kháng thể kháng CD20 typ I	Các kháng thể kháng CD20 typ II
Epitop CD20 typ I	Epitop CD20 typ II
Định vị CD20 với các khối lipit	Không định vị CD20 với các khối

	lipit
CDC tăng (nếu là isotyp IgG1)	CDC giảm (nếu là isotyp IgG1)
Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp IgG1)	Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp IgG1)
Dung lượng gắn kết đầy đủ	Dung lượng gắn kết giảm
Kết tụ đồng kiểu	Kết tụ đồng kiểu mạnh hơn
Kích thích gây chết tế bào khi liên kết chéo	Kích thích gây chết tế bào mạnh không liên kết chéo

Một đặc tính chủ yếu của kháng thể kháng CD20 typ I và typ II là kiểu gắn kết của chúng. Vì vậy, kháng thể kháng CD20 typ I và typ II có thể được phân loại bởi tỷ lệ của các khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 này so với rituximab.

Các kháng thể kháng CD20 typ I có tỷ lệ của các dung lượng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 này so với rituximab là từ 0,3 đến 0,6, tốt hơn là từ 0,35 đến 0,55, tốt hơn nữa là 0,4 đến 0,5. Các ví dụ về các kháng thể kháng CD20 typ II này bao gồm, ví dụ tositumomab (B1 IgG2a), kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người IgG1 (kháng thể IgG1 được làm tương thích với người dạng khảm như được đề cập trong WO2005/044859), 11B8 IgG1 (như được đề cập trong WO 2004/035607), và AT80 IgG1. Tốt hơn nếu kháng thể kháng CD20 typ II là kháng thể đơn dòng có thể gắn kết với epitop tương tự như kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (như được đề cập trong WO2005/044859).

Các kháng thể kháng CD20 typ I trái lại với các kháng thể typ II có tỷ lệ của các dung lượng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 này so với rituximab là từ 0,8 đến 1,2, tốt hơn là từ 0,9 đến 1,1. Các ví dụ về các kháng thể kháng CD20 typ I này bao gồm rituximab chẳng hạn, 1F5 IgG2a (ECACC, hybridoma; Press, O.W., et al., Blood 69/2: (1987) 584-591), HI47 IgG3 (ECACC, hybridoma), 2C6 IgG1 (như được đề cập trong WO2005/103081), 2F2 IgG1 (như được đề cập và WO

2004/035607 và WO2005/103081) và 2H7 IgG1 (như được đề cập trong WO 2004/056312).

“Tỷ lệ của các dung lượng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của các kháng thể kháng CD20 so với rituximab” được xác định bằng phép đo huỳnh quang miễn dịch trực tiếp (các cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) được xác định) nhờ sử dụng kháng thể kháng CD20 kết hợp với Cy5 và rituximab kết hợp với Cy5 trong FACSArray (Becton Dickinson) với các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86), như được mô tả trong Ví dụ No. 2, và được tính như sau:

$$\begin{array}{l} \text{Tỷ lệ của các dung lượng gắn} \\ \text{kết với CD20 trên các tế bào} \\ \text{Raji (ATCC-No. CCL-86)} \end{array} = \frac{\text{MFI (Cy5-kháng} \\ \text{thể kháng CD20)}}{\text{MFI (Cy5-} \\ \text{rituximab)}} \times \frac{\text{Cy5-tỷ lệ đánh dấu} \\ \text{(Cy5-rituximab)}}{\text{Cy5-tỷ lệ đánh dấu (Cy5-} \\ \text{kháng thể kháng CD20)}}$$

MFI là cường độ huỳnh quang trung bình. “Cy5–tỷ lệ đánh dấu” theo sáng chế có nghĩa là số các phân tử đánh dấu Cy5 trên kháng thể phân tử.

Thông thường kháng thể kháng CD20 typ II này có tỷ lệ của các dung lượng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 thứ hai này so với rituximab là từ 0,3 đến 0,6, tốt hơn là từ 0,35 đến 0,55, tốt hơn nữa là từ 0,4 đến 0,5.

Kháng thể kháng CD20 typ II này theo sáng chế, có tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC).

Thuật ngữ "kháng thể có tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC)" hoặc "kháng thể với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC)" có nghĩa là kháng thể, khi thuật ngữ đó được xác định ở đây, có ADCC tăng khi được xác định bằng phương pháp bất kỳ nào thích hợp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật. Một thử nghiệm ADCC *in vitro* được chấp nhận là như sau:

1) thử nghiệm sử dụng các tế bào đích đã biết để biểu hiện kháng nguyên đích được nhận dạng bởi vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể;

2) thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (PBMCs), phân lập từ máu của người cho khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên, làm các tế bào hiệu ứng;

3) thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp sau:

i) các PBMC được phân lập nhờ sử dụng các phương pháp ly tâm mật độ chuẩn và được tạo huyền phù với 5×10^6 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào RPMI;

ii) các tế bào đích được nuôi cấy bằng các phương pháp nuôi cấy mô chuẩn, thu hoạch từ pha sinh trưởng theo số mũ với khả năng sống sót cao hơn 90%, rửa bằng môi trường nuôi cấy tế bào RPMI, đánh dấu với 100 micro-Curies của ^{51}Cr , rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy tế bào, và tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy tế bào với mật độ 10^5 tế bào/ml;

iii) 100 microlit huyền phù chứa tế bào đích cuối cùng nêu trên được chuyển vào mỗi giếng của đĩa vi chuẩn độ 96 giếng;

iv) kháng thể được pha loãng theo bậc từ 4000 ng/ml đến 0,04 ng/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào và 50 microlit gồm các dung dịch kháng thể thu được được thêm vào các tế bào đích trong đĩa vi chuẩn độ 96 giếng, thử nghiệm ba lần các nồng độ kháng thể khác nhau bao gồm giới hạn nồng độ toàn bộ nêu trên;

v) đối với các đối chứng giải phóng tối đa (MR), 3 giếng khác trong đĩa chứa các tế bào đích đánh dấu, nhận 50 microlit gồm dung dịch nước tẩy 2% (VN) không ion (Nonidet, Sigma, St. Louis), thay cho dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vi) đối với các đối chứng giải phóng tự nhiên (SR), 3 giếng khác trong đĩa chứa các tế bào đích đánh dấu, nhận 50 microlit gồm môi trường nuôi cấy tế bào RPMI thay cho dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vii) sau đó đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được làm ly tâm với 50 x g trong 1 phút và ủ trong 1 giờ ở 4°C ;

viii) 50 microlit gồm huyền phù PBMC ((điểm i nêu trên) được thêm vào mỗi giếng để tạo ra tỷ lệ tế bào hiệu ứng:tế bào đích là 25:1 và các đĩa được đặt vào lồng ấp trong môi trường khí CO₂ 5% ở 37°C trong 4 giờ;

ix) dịch nổi không chứa tế bào từ mỗi giếng được thu hoạch và độ phóng xạ giải phóng qua thử nghiệm (ER) được xác định số lượng nhờ sử dụng máy đếm gama;

x) tỷ lệ phần trăm của phân giải đặc hiệu được tính toán cho từng nồng độ kháng thể theo công thức $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, trong đó ER là độ phóng xạ trung bình được xác định (xem điểm ix nêu trên) cho nồng độ kháng thể đó, MR là độ phóng xạ trung bình được xác định (xem điểm ix nêu trên) cho các đối chứng MR (xem điểm V nêu trên), và SR là độ phóng xạ trung bình (xem điểm ix nêu trên) cho các đối chứng SR (xem điểm vi nêu trên);

4) "ADCC tăng" được xác định như hoặc tăng về tỷ lệ phần trăm tối đa của phân giải đặc hiệu được thấy trong giới hạn nồng độ kháng thể thử nghiệm nêu trên, và/hoặc giảm về nồng độ kháng thể cần thiết để đạt được một nửa tỷ lệ phần trăm tối đa của phân giải đặc hiệu được thử nghiệm nêu trên. Tăng về ADCC tương xứng với ADCC, được xác định bằng thử nghiệm nêu trên, do kháng thể tương tự gây ra, được tạo ra bởi loại các tế bào chủ tương tự, nhờ sử dụng các quy trình sản xuất, tinh chế, tạo chế phẩm và lưu giữ chuẩn tương tự mà đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng không được tạo ra bởi các tế bào chủ biến đổi di truyền để biểu hiện quá mức GnTIII.

"ADCC tăng" này có thể thu được bằng cách biến đổi di truyền glyco các kháng thể đã nêu, điều đó có nghĩa là tăng các chức năng tác động do tế bào tạo ra đã nêu của các kháng thể đơn dòng bằng cách biến đổi di truyền thành phần oligosacarit của chúng như được mô tả trong tài liệu Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) và US 6,602,684.

Thuật ngữ "tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)" đề cập đến sự phân giải của các tế bào đích khối u người bằng kháng thể theo sáng chế với sự có mặt của bổ thể. Tốt hơn là CDC được xác định bằng cách xử lý chế phẩm

chứa các tế bào biểu hiện CD20 với kháng thể kháng CD20 theo sáng chế với sự có mặt của bổ thể. CDC được thấy nếu kháng thể kích thích ở nồng độ 100 nM sự phân giải (sự chết tế bào) của 20% hoặc nhiều hơn các tế bào khối u sau 4 giờ. Tốt hơn là thử nghiệm được tiến hành với các tế bào khối u đánh dấu ^{51}Cr hoặc Eu và xác định ^{51}Cr hoặc Eu giải phóng. Các đối chứng bao gồm quá trình ủ các tế bào đích khối u với bổ thể, nhưng không có kháng thể.

Thông thường các kháng thể kháng CD20 typ II của isotyp IgG1 thể hiện các đặc tính đặc trưng của CDC. Các kháng thể kháng CD20 typ II có CDC giảm (nếu là isotyp IgG1) so với các kháng thể kháng CD20 typ I của isotyp IgG1. Tốt hơn nếu kháng thể kháng CD20 typ II là các kháng thể isotyp IgG1.

Kháng thể "rituximab" (kháng thể tham khảo; ví dụ về kháng thể kháng CD20 typ I) là miền ổn định chuột 1 gama người dạng khảm biến đổi di truyền chứa kháng thể đơn dòng trực tiếp chống lại kháng nguyên CD20 người. Kháng thể dạng khảm này chứa các miền ổn định 1 gama người và được nhận dạng bằng tên "C2B8" trong US 5,736,137 (Anderson et. al.) cấp ngày 17/4/1998, được chuyển nhượng cho IDEC Pharmaceuticals Corporation.. Rituximab được chấp thuận để điều trị cho các bệnh nhân bị tái phát hoặc khức xạ mức độ nhẹ, u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B, dương tính với CD20, có nang. Cơ chế *in vitro* của các nghiên cứu tác động chứng tỏ rằng rituximab có tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) (Reff et. al, Blood 83(2): 435-445 (1994)). Ngoài ra, nó cũng thể hiện hoạt tính đáng kể trong các thử nghiệm để xác định tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Thuật ngữ "kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người" đề cập đến kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người như được đề cập trong WO2005/044859 và WO 2007/031875, kháng thể này thu được từ kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Ly1 (vùng biến đổi của chuỗi nặng chuột (VH): SEQ ID NO: 1; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chuột (VL): SEQ ID NO: 2 – xem tài liệu Poppema, S. and Visser, L., Biotest Bulletin 3: 131-139 (1987);) bằng cách khảm hoá với miền ổn định người từ IgG1 và tiếp theo bằng cách làm

tương thích với người (xem WO2005/044859 và WO 2007/031875). Các "kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người" được đề cập đến chi tiết trong WO2005/ 044859 và WO2007/031875.

Tốt hơn nếu "kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người" có vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) được chọn từ nhóm có trình tự từ SEQ ID No.3 đến SEQ ID No.20 (B-HH2 đến B-HH9 và B-HL8 đến B-HL17 của WO2005/044859 và WO 2007/031875). Được đặc biệt ưu tiên là SEQ. ID No. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 13 và SEQ ID NO. 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 và B-HL13 nêu trong WO2005/044859 và WO 2007/031875). Tốt hơn là "kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người" có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) có trình tự nêu trong SEQ ID No. 20 (B-KV1 của WO2005/044859 và WO2007/031875). Ngoài ra, tốt hơn nếu kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người là kháng thể IgG1. Các kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người này theo sáng chế được biến đổi di truyền glyco (GE) ở vùng Fc theo các phương pháp được mô tả trong WO2005/044859, WO2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) và WO 99/154342. "Các kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người, được biến đổi di truyền glyco" này có kiểu glycosyl hoá biến đổi ở vùng Fc, tốt hơn là có mức độ các gốc fucoza giảm. Tốt hơn là ít nhất 40% hoặc nhiều hơn (theo một phương án khoảng 40% và 60%, theo một phương án khác ít nhất 50%, và theo một phương án khác nữa ít nhất 70% hoặc nhiều hơn) của các oligosacarit của vùng Fc không được fucosyl hoá. Ngoài ra, tốt hơn nếu các oligosacarit của vùng Fc được cắt đôi.

Thành phần oligosacarit có thể tác động rất lớn tới các đặc tính có liên quan đến hiệu quả của glycoprotein chữa bệnh, bao gồm tính ổn định vật lý, kháng lại sự tấn công của proteaza, tương tác với hệ miễn dịch, được động lực, và hoạt tính sinh học đặc hiệu. Các đặc tính này có thể không chỉ phụ thuộc vào sự có mặt hoặc không có mặt, mà còn phụ thuộc vào các cấu trúc đặc hiệu của các oligosacarit. Một số sự khái quát giữa cấu trúc oligosacarit và chức năng

glycoprotein có thể được tạo ra. Ví dụ, một vài cấu trúc oligosacarit có thể làm nhanh sự thanh thải của glycoprotein khỏi dòng máu nhờ các tương tác với các protein gắn kết cacbohydrat đặc hiệu, trong khi những cấu trúc khác có thể được gắn kết bởi các kháng thể và tạo ra các phản ứng miễn dịch mong muốn (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81).

Các tế bào động vật có vú là các vật chủ được ưu tiên để tạo ra các glycoprotein chữa bệnh, do khả năng glycosylat hoá các protein của chúng ở phần lớn dạng tương thích cho ứng dụng ở người (Cumming et al., *Glycobiology* 1:115-30 (1991); Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)). Vi khuẩn rất hiếm khi glycosylat hoá các protein, và giống như các loại khác của các vật chủ thông thường, như nấm men, nấm sợi, các tế bào côn trùng và thực vật, tạo ra các mẫu glycosylat hoá liên quan đến sự thanh thải nhanh khỏi dòng máu, các tương tác miễn dịch không mong muốn, và đối với một số trường hợp đặc biệt làm giảm hoạt tính sinh học. Trong các tế bào động vật có vú, các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) thường được sử dụng nhiều nhất trong suốt hai thập kỷ cuối cùng. Ngoài việc tạo ra các mẫu glycosylat hoá thích hợp, các tế bào đó cho phép tạo ra các dòng tế bào sinh sản vô tính cao, ổn định về mặt di truyền. Chúng còn có thể được nuôi cấy với các mật độ cao trong các bình phản ứng sinh học đơn giản nhờ sử dụng môi trường không chứa huyết thanh, và cho phép triển khai các quy trình sinh học an toàn và có thể sinh sản. Các tế bào động vật thường được sử dụng khác bao gồm các tế bào thận chuột đồng mới sinh (BHK), các tế bào u tuỷ NSO- và SP2/0. Mới đây hơn, quá trình tạo ra từ các động vật chuyển gen cũng được thử nghiệm (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14: (1996) 975-981).

Tất cả các kháng thể chứa các cấu trúc cacbohydrat tại các vị trí bảo toàn ở các vùng ổn định chuỗi nặng, với mỗi isotyp có dãy riêng biệt của các cấu trúc cacbohydrat liên kết N, tác động thay đổi tới tập hợp protein, hoạt tính tiết xuất hoặc chức (Wright, A., and Monison, S. L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Cấu trúc của cacbohydrat liên kết N gắn kết thay đổi đáng kể, tùy thuộc vào mức độ xử lý, và có thể bao gồm manosa cao, nhiều nhánh cũng như các oligosacarit

phức hệ hai râu (Wright, A., and Morrison, S. L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32). Thông thường, có sự xử lý không đồng nhất các cấu trúc oligosacarit nhân gắn kết tại điểm glycosylat hoá đặc biệt đến mức ngay cả các kháng thể đơn dòng cũng tồn tại như nhiều glycoform. Tương tự, nó chứng tỏ rằng các khác biệt cơ bản trong quá trình glycosyl hoá kháng thể xuất hiện giữa các dòng tế bào, và thậm chí các khác biệt nhỏ cũng được thấy đối với dòng tế bào đã cho được nuôi cấy trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau (Lifely, M. R. et al., Glycobiology 5(8) (1995) 813-22).

Một cách để đạt được các mức gia tăng lớn về hiệu lực trong khi vẫn duy trì được quy trình sản sinh đơn giản và tránh được một cách hữu hiệu các tác dụng phụ không mong muốn, đáng kể, là tăng cường các chức năng tác động do tế bào tạo ra, tự nhiên của các kháng thể đơn dòng bằng cách biến đổi di truyền thành phần oligosacarit của chúng như được mô tả trong tài liệu Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) và US 6,602,684. Các kháng thể loại IgG1, các kháng thể thường được sử dụng nhất trong liệu pháp miễn dịch ung thư, là các glycoprotein mà có điểm glycosylat hoá liên kết N bảo toàn tại Asn297 ở mỗi miền CH2. Hai oligosacarit phức hệ hai râu gắn kết với Asn297 được chôn vùi giữa các miền CH2, tạo ra các tiếp xúc mở rộng với khung chính polypeptit, và sự có mặt của chúng là cần thiết đối với kháng thể để tạo ra các chức năng tác động như tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Lifely, M. R., et al., Glycobiology 5: 813-822 (1995); Jefferis, R., et al., Immunol. Rev. 163: 59-76 (1998); Wright, A. and Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32).

Trước đó đã biết rằng việc biểu hiện quá mức ở các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) của $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza II1 ("GnTII 17y), glycosyltransferaza xúc tác quá trình hình thành các oligosacarit cắt đôi, làm tăng đáng kể hoạt tính ADCC *in vitro* của kháng thể đơn dòng dạng khảm chống u nguyên bào thần kinh (chCE7) được tạo ra bởi các tế bào CHO biến đổi di truyền (xem tài liệu Umana, P. et al., Nature Biotechnol.

17 (1999 176-180); và WO 99/154342, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Kháng thể chCE7 thuộc loại lớn của các kháng thể đơn dòng không kết hợp mà có ái lực và tính đặc hiệu với khối u cao, nhưng có hiệu lực quá ít để sử dụng lâm sàng khi được tạo ra ở các dòng tế bào công nghiệp chuẩn thiếu enzym GnTIII (Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180). Nghiên cứu này trước tiên chứng tỏ rằng các mức gia tăng lớn về hoạt tính ADCC có thể đạt được bằng cách biến đổi di truyền các tế bào tạo ra kháng thể để biểu hiện GnTIII, nó cũng dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ các oligosacarit cắt đôi liên quan đến vùng ổn định (Fc), bao gồm cả các oligosacarit không fucosyl hoá, cắt đôi, cao hơn các mức được thấy ở các kháng thể xuất hiện tự nhiên.

Thuật ngữ kháng nguyên "biểu hiện CD20" sẽ biểu thị mức biểu hiện đáng kể của kháng nguyên CD20 ở tế bào, tốt hơn là trên bề mặt tế bào của tế bào T hoặc B, tốt hơn nữa là tế bào B, từ khối u hoặc bệnh ung thư tương ứng, tốt hơn là không phải khối u rắn. Các bệnh nhân có "bệnh ung thư biểu hiện CD20" có thể được xác định bằng các thử nghiệm chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ biểu hiện kháng nguyên CD20 được xác định nhờ sử dụng phát hiện hoá học mô miễn dịch (IHC), FACS hoặc bằng phát hiện dựa vào PCR của ARN thông tin tương ứng.

Thuật ngữ "bệnh ung thư biểu hiện CD20" theo sáng chế đề cập đến tất cả các bệnh ung thư trong đó các tế bào ung thư thể hiện biểu hiện của kháng nguyên CD20. Bệnh ung thư biểu hiện CD20 này có thể là, ví dụ u bạch huyết, bệnh bạch cầu limpho bào, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCL), bệnh ung thư phổi tế bào phế nang phế quản, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, u hắc sắc tố da hoặc trong mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom các ống dẫn trứng, caxinom nội mạc tử cung, caxinom cổ tử cung, caxinom âm đạo, caxinom âm hộ, bệnh Hodgkin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột nhỏ, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến cận

giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, xacôm mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận hoặc niệu quản, caxinom tế bào trong thận, caxinom bề thận, u trung biểu mô, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư mật, mô ung thư hệ thần kinh trung ương (CNS), các khối u cột sống, u thần kinh đệm thân não, u nguyên bào xốp đa dạng, u tế bào hình sao, u bao sợi thần kinh, u tế bào màng, u nguyên thủy bào, u màng não, caxinom tế bào có vảy, u tuyến yên, bao gồm các biến thái dai dẳng của bất kỳ bệnh ung thư nào trong số các bệnh ung thư nêu trên, hoặc kết hợp của một hoặc nhiều bệnh ung thư trong số các bệnh ung thư nêu trên.

Thuật ngữ "bệnh ung thư biểu hiện CD20" theo sáng chế tốt hơn là đề cập đến u bạch huyết (tốt hơn là u bạch huyết B-Cell Non-Hodgkin's (NHL)) và bệnh bạch cầu limpho. Các u bạch huyết và bệnh bạch cầu limpho này bao gồm ví dụ a) u bạch huyết có nang, b) U bạch huyết tế bào không phân cắt nhỏ/u bạch huyết Burkitt (bao gồm u bạch huyết Burkitt địa phương, u bạch huyết Burkitt phân tán và u bạch huyết Non-Burkitt) c) u bạch huyết vùng rìa (bao gồm u bạch huyết tế bào B ngoài nút vùng rìa (u bạch huyết mô liên quan đến niêm mạc, MALT), u bạch huyết tế bào B nút vùng rìa và u bạch huyết vùng rìa lách), d) u bạch huyết tế bào lớp bọc (MCL), e) u bạch huyết tế bào lớn (bao gồm u bạch huyết tế bào lớn lan toả tế bào B (DLCL), u bạch huyết tế bào hỗn hợp lan toả, u bạch huyết nguyên bào miễn dịch, u bạch huyết tế bào B trung thất sơ cấp, u bạch huyết mạch chính-u bạch huyết tế bào B phổi), f) bệnh bạch cầu tế bào tóc, g) u bạch huyết limpho, macroglobulin huyết Waldenstrom), h) bệnh bạch cầu limpho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu limpho mãn tính (CLL)/u bạch huyết limpho nhỏ (SLL), bệnh bạch cầu tiền limpho tế bào B, i) các mô mới bạch cầu, u tuỷ bạch cầu, u tuỷ nhiều chỗ, u tương bào, j) bệnh Hodgkin.

Tốt hơn nữa nếu bệnh ung thư biểu hiện CD20 là u bạch huyết Non-Hodgkin tế bào B (NHL). Đặc biệt nếu bệnh ung thư biểu hiện CD20 là u bạch huyết tế bào lớp bọc (MCL), bệnh bạch cầu limpho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu limpho mãn tính (CLL), u bạch huyết tế bào lớn lan toả tế bào B (DLCL), u bạch huyết Burkitt, bệnh bạch cầu tế bào tóc, u bạch huyết có nang, u tuỷ nhiều

chỗ, u bạch huyết vùng rìa, rối loạn tăng sinh limpho bào sau cấy ghép (PTLD), u bạch huyết liên quan đến HIV, macroglobulin huyết Waldenstrom, hoặc u bạch huyết CNS.

Thuật ngữ "phương pháp điều trị" hoặc từ tương đương của nó, khi được sử dụng cho, ví dụ bệnh ung thư đề cập đến quy trình hoặc tiến trình tác động được đưa vào để làm giảm hoặc loại bỏ một số tế bào ung thư ở bệnh nhân, hoặc để làm giảm bớt các triệu chứng của bệnh ung thư. "Phương pháp điều trị" bệnh ung thư hoặc rối loạn tăng sinh khác không nhất thiết có nghĩa là các tế bào ung thư hoặc rối loạn khác trên thực tế sẽ bị loại bỏ, là số lượng các tế bào hoặc rối loạn trên thực tế sẽ giảm, hoặc là các triệu chứng của bệnh ung thư hoặc rối loạn trên thực tế sẽ giảm bớt. Trong nhiều trường hợp, phương pháp điều trị bệnh ung thư sẽ được tiến hành ngay cả với khả năng thành công có thể thấp, nhưng nó đưa ra lịch sử bệnh lý và ước lượng triển vọng sống sót của bệnh nhân, tuy nhiên được cho rằng để kích thích toàn bộ tiến trình tác động có lợi.

Theo một phương án, việc điều trị bằng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) là kết hợp với xyclophosphamid và vincristin.

Theo một phương án khác, việc điều trị bằng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) là kết hợp với doxorubixin.

Theo một phương án khác, việc điều trị bằng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) là kết hợp với xyclophosphamid.

Theo một phương án khác, việc điều trị bằng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) là kết hợp với xyclophosphamid, vincristin và doxorubixin.

Các thuật ngữ "đồng sử dụng", hoặc "đồng cung cấp" hoặc "kết hợp" được sử dụng theo sáng chế có nghĩa tương tự như đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng CD20 typ II này và các tác nhân hoá liệu pháp như chế phẩm đơn hoặc

như hai chế phẩm riêng biệt. Việc đồng sử dụng có thể là sử dụng cùng lúc hoặc liên tiếp, trong đó tốt hơn có khoảng thời gian khi cả hai (hoặc toàn bộ) hoạt chất sử dụng đồng thời các hoạt tính sinh học của chúng. Kháng thể kháng CD20 typ II này và các tác nhân hoá liệu pháp được cùng sử dụng đồng thời hoặc liên tiếp (ví dụ sử dụng qua tĩnh mạch (i.v.) nhờ truyền liên tục (đầu tiên là kháng thể và cuối cùng là các tác nhân hoá liệu pháp; hoặc các tác nhân hoá liệu pháp được sử dụng qua đường miệng). Khi cả hai tác nhân điều trị được sử dụng liên tiếp thì liều được cung cấp hoặc vào ngày tương tự ở hai chu trình sử dụng riêng biệt, hoặc một trong hai tác nhân đó được sử dụng vào ngày thứ 1 và tác nhân thứ hai được cùng sử dụng vào ngày từ thứ 2 đến ngày thứ 7, tốt hơn là vào ngày thứ 2 đến thứ 4. Vì vậy thuật ngữ “liên tiếp” có nghĩa là trong vòng 7 ngày sau khi sử dụng liều kháng thể thứ nhất, tốt hơn là trong vòng 4 ngày sau khi sử dụng liều kháng thể thứ nhất; và thuật ngữ “đồng thời” có nghĩa là cùng lúc. Các thuật ngữ “đồng sử dụng” đối với các liều kháng thể kháng CD20 typ II và các tác nhân hoá liệu pháp duy trì có nghĩa là các liều duy trì có thể hoặc cùng sử dụng đồng thời, nếu chu trình điều trị là thích hợp cho cả hai dược chất, ví dụ mỗi tuần. Hoặc các tác nhân hoá liệu pháp được, ví dụ sử dụng vào ngày thứ nhất tới ngày thứ ba và kháng thể kháng CD20 typ II được sử dụng mỗi tuần. Hoặc các liều duy trì được cùng sử dụng liên tiếp, hoặc trong một hoặc trong vài ngày.

Rõ ràng là bản thân các kháng thể được cho bệnh nhân sử dụng với một “lượng có tác dụng điều trị” (hoặc đơn giản là “lượng hữu hiệu”), đó là lượng hợp chất tương ứng hoặc hỗn hợp tương ứng sẽ tạo ra đáp ứng sinh học hoặc y học của mô, hệ thống, động vật hoặc người mà nhà nghiên cứu, bác sỹ thú y, bác sỹ y khoa hoặc thầy thuốc lâm sàng khác chỉ định.

Lượng cùng sử dụng của kháng thể kháng CD20 typ II và các tác nhân hoá liệu pháp này và thời điểm cùng sử dụng sẽ phụ thuộc vào loại (loài, giống, tuổi, trọng lượng.v.v..) và tình trạng của bệnh nhân cần điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng cần điều trị. Kháng thể kháng CD20 typ II và các tác nhân hoá liệu pháp này được cùng cung cấp một cách thích hợp cho bệnh

nhân một lần hoặc khắp các đợt điều trị. Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 µg/kg đến 50 mg/kg (ví dụ 0,1-20 mg/kg) của kháng thể kháng CD20 typ II và 1 µg/kg đến 50 mg/kg (ví dụ 0,1-20 mg/kg) của các tác nhân hoá liệu pháp là liều ứng cử ban đầu để cùng cung cấp cả hai dược chất cho bệnh nhân. Nếu sử dụng trong tĩnh mạch thì thời gian truyền ban đầu đối với kháng thể kháng CD20 typ II này hoặc các tác nhân hoá liệu pháp này có thể dài hơn các thời gian truyền tiếp theo, ví dụ khoảng 90 phút cho lần truyền ban đầu và khoảng 30 phút cho các lần truyền tiếp theo (nếu lần truyền ban đầu được dung nạp tốt).

Liều ưu tiên của kháng thể kháng CD20 typ II này sẽ nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 30mg/kg. Vì vậy, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg hoặc 30 mg/kg (hoặc bất kỳ kết hợp nào của chúng) có thể được cùng cung cấp cho bệnh nhân. Liều ưu tiên của các tác nhân hoá liệu pháp này sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 30 mg/kg, ví dụ 0,1 mg/kg đến 10,0 mg/kg đối với bortezomib. Tùy thuộc vào loại (loài, giống, tuổi, trọng lượng, v.v..) và tình trạng của bệnh nhân và loại kháng thể kháng CD20 và các tác nhân hoá liệu pháp, liều và phác đồ điều trị của kháng thể kháng CD20 này có thể khác liều của các tác nhân hoá liệu pháp. Ví dụ kháng thể kháng CD20 này có thể được cung cấp, ví dụ mỗi một đến ba tuần và các tác nhân hoá liệu pháp này có thể được cung cấp hàng ngày hoặc mỗi 2 đến 10 ngày. Liều điều trị ban đầu cao hơn, tiếp theo là một hoặc nhiều liều thấp hơn cũng có thể được sử dụng.

Theo một phương án ưu tiên, dược phẩm được sử dụng để phòng ngừa hoặc làm giảm sự di căn hoặc sự lây lan thêm ở bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu hiện CD20. Dược phẩm này được sử dụng để làm tăng khoảng thời gian sống của bệnh nhân này, tăng sự sống không tiến triển bệnh của bệnh nhân này, tăng thời gian đáp ứng, tạo ra sự cải thiện có ý nghĩa đáng kể về mặt lâm sàng và theo thống kê của bệnh nhân được điều trị như được xác định bởi khoảng thời gian sống, sự sống không tiến triển bệnh, tốc độ đáp ứng hoặc thời gian đáp ứng.

Theo một phương án ưu tiên, được phẩm được sử dụng để làm tăng tốc độ đáp ứng ở nhóm các bệnh nhân.

Có thể sử dụng kết hợp kháng thể kháng CD20 và các tác nhân hoá liệu pháp để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20. Các phân tử này có mặt một cách thích hợp dưới dạng kết hợp với các lượng hữu hiệu cho mục đích dự tính. Vì vậy, theo một phương án, để điều trị bằng kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin, một corticosteroid bổ sung, tốt hơn là prednison, được sử dụng.

Theo một phương án việc điều trị kết hợp kháng thể kháng CD20 và các tác nhân hoá liệu pháp được sử dụng mà không cần các corticosteroid này bổ sung.

Việc sử dụng corticosteroid được mô tả ở trên như trong các chế độ liệu pháp thường được mô tả rõ trong các lĩnh vực điều trị bệnh ung thư, và việc sử dụng chúng ở đây nằm trong các mong muốn tương tự để kiểm tra mức độ dung nạp và hiệu quả và để kiểm soát các cách sử dụng và liều, và một số điều chỉnh. Ví dụ, các liều lượng của tác nhân hoá liệu pháp và các corticosteroid thực tế có thể thay đổi tùy thuộc vào đáp ứng tế bào nuôi cấy của bệnh nhân được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp nuôi cấy mô. Nói chung, liều sẽ giảm so với lượng sử dụng không có các tác nhân khác bổ sung.

Các liều hữu hiệu thông thường của các tác nhân hoá liệu pháp và/hoặc các corticosteroid có thể nằm trong các giới hạn được đề nghị bởi nhà sản xuất, và trong đó biểu thị bởi các đáp ứng *in vitro* hoặc các đáp ứng ở các kiểu động vật, có thể giảm tới khoảng một bậc của nồng độ hoặc lượng trọng yếu. Vì vậy, lượng thực tế sẽ tùy thuộc vào quyết định của bác sỹ, tình trạng của bệnh nhân, và hiệu quả của phương pháp điều trị dựa vào đáp ứng *in vitro* của các tế bào ác tính nuôi cấy sơ cấp hoặc mẫu mô nuôi cấy mô, hoặc các đáp ứng được thấy ở các kiểu động vật thích hợp.

Trong phạm vi của sáng chế, một lượng bức xạ ion hoá hữu hiệu có thể được tiến hành và/hoặc thuốc phóng xạ có thể được sử dụng cùng với hỗn hợp

kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và các tác nhân hoá liệu pháp để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20. Nguồn bức xạ có thể hoặc ở bên ngoài hoặc bên trong với bệnh nhân cần điều trị. Nếu nguồn là bên ngoài với bệnh nhân, thì liệu pháp được biết là liệu pháp bức xạ tia bên ngoài (EBRT). Nếu nguồn là bên trong với bệnh nhân, thì việc điều trị được gọi là liệu pháp ngắn brachytherapy (BT). Nguyên tử phóng xạ để sử dụng trong phạm vi của sáng chế này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, radi, xesi-137, iridi-192, amerixi-241, vàng-198, coban-57, đồng-67, tecneti-99, iot-123, iot-131, và indi-111. Cũng có thể được là đánh dấu kháng thể bằng các đồng vị phóng xạ này. Tốt hơn là việc điều trị kết hợp kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và các tác nhân hoá liệu pháp được sử dụng mà không cần sự bức xạ ion hoá này.

Liệu pháp bức xạ là phương pháp điều trị chuẩn để không chế các khối u không thể cắt bỏ hoặc các khối u không mổ được và/hoặc các di căn khối u. Các kết quả cải thiện được thấy khi liệu pháp chiếu xạ được kết hợp với hoá liệu pháp. Liệu pháp bức xạ dựa vào nguyên tắc là bức xạ liều cao bắn ra tới khu vực đích sẽ làm chết các tế bào sinh sản ở cả các mô bình thường và khối u. Chế độ liều bức xạ thường được xác định về mặt liều lượng hấp thụ bức xạ (Gy), thời gian và sự cắt phân đoạn, và phải được xác định cẩn thận bởi bác sỹ chuyên khoa ung thư. Lượng bức xạ mà bệnh nhân nhận được sẽ tùy thuộc vào các xem xét khác nhau, nhưng hai vấn đề quan trọng nhất là vị trí khối u liên quan đến các cấu trúc hoặc các cơ quan then chốt khác của cơ thể và phạm vi mà khối u lan tới. Tiến trình điều trị thông thường cho bệnh nhân điều trị liệu pháp bức xạ sẽ là chu trình điều trị trong 1 đến 6 tuần, với liều tổng khoảng 10 và 80 Gy được cung cấp cho bệnh nhân với phân số đơn mỗi ngày là khoảng 1,8 đến 2,0 Gy, 5 ngày một tuần. Theo phương án ưu tiên của sáng chế, có tính hiệp đồng nếu các khối u ở các bệnh nhân được điều trị bằng chế phẩm theo sáng chế và bức xạ. Nói cách khác, việc ức chế sự phát triển của khối u bằng các tác nhân bao gồm hỗn hợp theo sáng chế được nâng cao nếu kết hợp với bức xạ, tùy ý với

hoá liệu pháp hoặc các chất chống ung thư bổ sung. Các thông số về các liệu pháp bức xạ bổ sung có trong WO 99/60023 chẳng hạn.

Các kháng thể kháng CD20 typ II được cung cấp cho bệnh nhân theo các phương pháp đã biết, bằng cách sử dụng trong tĩnh mạch như tiêm tĩnh mạch nhanh một lượng thuốc lớn trong một lần hoặc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian, bằng cách sử dụng trong cơ, trong bụng, trong não-tủy sống, dưới da, trong khớp, trong hoạt dịch, hoặc trong mô bao bọc. Được ưu tiên là sử dụng các kháng thể trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Các tác nhân hoá liệu pháp được cung cấp cho bệnh nhân theo các phương pháp đã biết, bằng cách sử dụng trong tĩnh mạch như tiêm tĩnh mạch nhanh một lượng thuốc lớn trong một lần hoặc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian, bằng cách sử dụng trong cơ, trong bụng, trong não-tủy sống, dưới da, trong khớp, trong hoạt dịch, hoặc trong mô bao bọc. Được ưu tiên là sử dụng các tác nhân hoá liệu pháp trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Sáng chế còn bao gồm một kit chứa kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin, để điều trị kết hợp cho bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu hiện CD20. Theo một phương án ưu tiên, các hộp dụng cụ có thể còn bao gồm một chất mang dược dụng. Bộ dụng cụ còn bao gồm chất pha loãng tiệt trùng, tốt hơn là nó được giữ trong thùng riêng biệt khác. Bộ dụng cụ còn bao gồm tài liệu đi kèm gồm các chỉ dẫn in hướng dẫn sử dụng phương pháp kết hợp làm phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20, tốt hơn là u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL).

Thuật ngữ "tài liệu đi kèm" đề cập đến các chỉ dẫn thông thường có trong các bao gói thương phẩm chứa các sản phẩm chữa bệnh, chúng có thể bao gồm thông tin về các dấu hiệu, sử dụng, liều, cách sử dụng, chỉ định cấm dùng thuốc và/hoặc các cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm chữa bệnh này.

Theo phương án ưu tiên, vật dụng trong các hộp sản xuất còn có thể bao gồm tá dược dược dụng. Vật dụng sản xuất có thể còn bao gồm chất pha loãng tiết trùng, tốt hơn là nó được giữ trong hộp riêng biệt khác.

Theo sáng chế, "chất mang dược dụng" sẽ bao gồm bất kỳ và tất cả các chất tương thích với cách sử dụng dược phẩm bao gồm các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, các chất kháng vi khuẩn và kháng nấm, các chất làm chậm đẳng trương và hấp thu, và các chất khác và các hợp chất tương thích với cách sử dụng dược phẩm. Ngoài trừ tới mức khi môi trường thông thường hoặc chất bất kỳ nào tương thích với hoạt chất, thì việc sử dụng chúng trong các chế phẩm theo sáng chế cũng được xem xét. Các hoạt chất bổ sung này cũng có thể được đưa vào các chế phẩm.

Dược phẩm

Dược phẩm có thể thu được bằng cách xử lý kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và/hoặc các tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin theo sáng chế với các chất mang hữu cơ hoặc vô cơ, dược dụng. Lactoza, tinh bột ngô hoặc các dẫn xuất của chúng, bột talc, các axit stearic hoặc các muối của chúng và các loại tương tự có thể được sử dụng, ví dụ như các chất mang cho các viên nén, các viên nén bọc, kẹo trứng chim và các viên nang gelatin cứng. Các chất mang thích hợp cho các viên nang gelatin mềm, ví dụ dầu thực vật, sáp, chất béo, các polyol bán rắn và lỏng và các loại tương tự. Tuy thuộc vào tính chất của hoạt chất mà có thể không cần các chất mang, tuy nhiên, thường cần đối với trường hợp các viên nang gelatin mềm. Các chất mang thích hợp để bào chế các dung dịch và xiro, ví dụ là nước, các polyol, glyxerol, dầu thực vật và các loại tương tự. Các chất mang thích hợp cho viên thuốc đạn, ví dụ là dầu tự nhiên hoặc hoá rắn, sáp, các chất béo, các polyol bán lỏng hoặc lỏng và các loại tương tự.

Ngoài ra, các dược phẩm có thể còn chứa các chất bảo quản, các chất hoà tan, các chất làm ổn định, các chất thấm ướt, các chất nhũ hoá, các chất làm

ngọt, các chất tạo màu, các chất tạo hương vị, các muối để làm thay đổi áp suất thẩm thấu, các chất đệm, các chất che mùi vị hoặc các chất chống oxy hoá. Chúng cũng có thể còn chứa các chất có tác dụng điều trị khác nữa.

Một phương án của sáng chế là dược phẩm bao gồm cả kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin, cụ thể là sử dụng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20.

Dược phẩm này có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm cụ thể để sử dụng điều trị bệnh ung thư, bao gồm (i) một lượng hữu hiệu thứ nhất của kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC), và (ii) một lượng hữu hiệu thứ hai của một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin. Dược phẩm này tùy ý còn bao gồm các chất mang dược dụng và/hoặc các tá dược.

Các dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) riêng rẽ sử dụng theo sáng chế được bào chế để cất giữ bằng cách trộn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với các chất mang, các tá dược hoặc các chất làm ổn định dược dụng tùy ý, (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), dưới dạng các chế phẩm đông khô nhanh hoặc các dung dịch nước. Các chất mang, các tá dược hoặc các chất làm ổn định chấp nhận được không độc cho người nhận với các liều và nồng độ sử dụng, và bao gồm các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua, benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzyl; các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các

globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidone; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc các lysin; các monosacarit, các disacarit, và các carbohydrat khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc các dextrin; các tác nhân tạo chelat như EDTA; các đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion ngược tạo muối như natri; các phức chất kim loại (ví dụ các phức chất Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như TWEEN™, PLURONIC™ hoặc polyetylen glycol (PEG).

Dược phẩm chứa các tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin, tùy thuộc vào các đặc tính dược của chúng; ví dụ đối với các hợp chất hoá học nhỏ, ví dụ như bortezomib, công thức bào chế có thể, ví dụ như sau:

a) Chế phẩm dạng viên nén (quá trình tạo hạt ướt)

Mục	Các thành phần	mg/viên nén			
1	Hợp chất có công thức (I)	5	25	100	500
2	Lactoza khan DTG	125	105	30	150
3	Sta-Rx 1500	6	6	6	30
4	Xenluloza vi tinh thể	30	30	30	150
5	Magie stearat	1	1	1	1
	Tổng	167	167	167	831

Phương pháp bào chế:

1. Trộn các mục 1, 2, 3 và 4 và tạo hạt với nước tinh khiết.
2. Làm khô các hạt ở 50°C.
3. Cho các hạt qua thiết bị nghiền thích hợp.
4. Thêm mục 5 và trộn trong ba phút; nén bằng máy nén thích hợp.

b) Chế phẩm dạng viên nang:

Mục	Các thành phần	mg/viên nang			
1	Hợp chất có công thức (I)	5	25	100	500
2	Lactoza khan	159	123	148	---
3	Tinh bột ngô	25	35	40	70

4	Bột talc	10	15	10	25
5	Magie stearat	1	2	2	5
	Tổng	200	200	300	600

Phương pháp bào chế:

1. Trộn các mục 1, 2 và 3 trong thiết bị trộn thích hợp trong 30 phút.
2. Thêm các mục 4 và 5 và trộn trong ba phút.
3. Làm đầy viên nang thích hợp.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, tốt hơn là được phẩm theo sáng chế là hai chế phẩm riêng biệt của kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và của các tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin. Các hoạt chất có thể cũng được giữ dưới dạng các vi nang điều chế, ví dụ bằng các kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng quá trình polyme hoá giữa các loại, ví dụ các vi nang hydroxymetylxenluloza hoặc gelatin và các vi nang poly-(methylmetaxylat) tương ứng, trong các hệ phân phối được chất dạng keo (ví dụ các liposom, các vi cầu albumin, các vi nhũ tương, các hạt nano và các vi nang nano) hoặc trong nhũ tương lớn. Các kỹ thuật này được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Các chế phẩm giải phóng duy trì có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về các chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm các chất nền bán thấm thấu của các polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, các chất nền đó có dạng các vật phẩm có hình dạng, ví dụ màng, hoặc vi nang. Các ví dụ về các chất nền giải phóng duy trì bao gồm các polyeste, các hydrogel (ví dụ, poly(2- hydroxyetyl-metacrylat), hoặc rượu poly(vinyl)), các polylactit (US 3,773,919), các copolyme của axit L-glutamic và gama-etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không thể thoái biến, các copolyme của axit lactic-axit glycolic có thể thoái biến LUPRON DEPOT™ (các vi cầu có thể tiêm được bao gồm các copolyme của axit lactic-axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric.

Các chế phẩm để sử dụng *in vivo* phải tiệt trùng. Điều này được thực hiện dễ dàng bằng cách lọc qua các màng lọc tiệt trùng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để điều trị bệnh ung thư, bao gồm cung cấp cho bệnh nhân cần sự điều trị này (i) một lượng hữu hiệu thứ nhất của kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC); và (ii) một lượng hữu hiệu thứ hai của một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để điều trị bệnh ung thư, bao gồm cung cấp cho bệnh nhân cần sự điều trị này (i) một lượng hữu hiệu thứ nhất của kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC); và (ii) một lượng hữu hiệu thứ hai của một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Theo sáng chế, thuật ngữ “bệnh nhân” tốt hơn là đề cập đến người cần điều trị bằng kháng thể kháng CD20 typ II (ví dụ bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu hiện CD20) vì mục đích bất kỳ nào, và tốt hơn nữa là người cần sự điều trị này để điều trị bệnh ung thư, hoặc tình trạng hoặc tổn thương tiền ung thư. Tuy nhiên, thuật ngữ “bệnh nhân” còn có thể đề cập đến động vật không phải là người, tốt hơn là động vật có vú như cho, mèo, ngựa, bò, lợn, cừu, và động vật linh trưởng không phải người, bao gồm các loại khác.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20 kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) để điều trị cho bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu hiện CD20 kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin để sử dụng điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) và một hoặc nhiều tác nhân hoá liệu pháp được chọn từ nhóm gồm có xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin để sử dụng điều trị cho bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu hiện CD20.

Tốt hơn nếu kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) là kháng thể B-Ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người.

Tốt hơn nếu bệnh ung thư biểu hiện CD20 là u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL).

Các ví dụ, danh sách trình tự và các hình vẽ dưới đây được đưa vào nhằm giúp hiểu rõ hơn sáng chế, phạm vi thực của sáng chế được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Cần hiểu rằng các cải biến có thể được thực hiện theo các phương pháp đã nêu mà không nằm ngoài ý tưởng của sáng chế.

Mô tả danh mục trình tự:

SEQ ID NO:1 trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Ly1.

SEQ ID NO:2 trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Ly1.

SEQ ID NO:3-19 các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của các kháng thể được làm tương thích với người B-Ly1 (B-HH2 đến B-HH9, B-HL8, và B-HL10 đến B-HL17).

SEQ ID NO:20 các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể được làm tương thích với người B-Ly1 B-KV1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1

a) Hoạt tính chống u hiệp đồng của phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) với xyclophosphamit và vincristin; và

b) So sánh với phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ I (rituximab) với xyclophosphamit và vincristin đối với u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B WSU-DLCL2 người (NHL).

Các giá trị trung bình của thể tích khối u [mm^3] $\pm$ IQR được lập biểu đồ trên trục y; số ngày sau khi tiêm các tế bào u được lập biểu đồ trên trục x. Ghi chú: A) tá dược (hình tròn), B) xyclophosphoamit (25 mg/kg) và vincristin (0,25 mg/kg) mỗi tuần một lần (hình chữ thập), C) rituximab (30 mg/kg) mỗi tuần một lần (hình tam giác), D) B-ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) mỗi tuần một lần (hình vuông), E) rituximab (30 mg/kg) với xyclophosphoamit (25 mg/kg) và vincristin (0,25 mg/kg), mỗi tuần một lần (các hình thoi) và F) B-ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) với xyclophosphoamit (25 mg/kg) và vincristin (0,25 mg/kg), mỗi tuần một lần (dấu cộng).

Fig.2

Cường độ phát huỳnh quang trung bình (MFI, trục y phía trái) của kháng thể kháng CD20 typ I (rituximab) (Cy5-rituximab = thanh trắng) và kháng thể kháng CD20 typ II (Cy5 - B-Ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người B-HH6-B-KV1 GE = thanh đen) đối với các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86); Tỷ lệ của các khả năng gắn kết với CD20 của kháng thể kháng CD20 typ I (rituximab) và kháng thể kháng CD20 typ II (B-HH6-B- KV1 GE) so với rituximab (được lập theo tỷ lệ trên trục y phía phải).

Fig.3

a) Hoạt tính chống u hiệp đồng của phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) với doxorubixin; và

b) So sánh với phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ I (rituximab) với doxorubixin đối với u bạch huyết Non Hodgkin người có nang RL (NHL).

Các giá trị trung bình của thể tích khối u [mm^3] $\pm$ IQR được lập biểu đồ trên trục y; số ngày sau khi tiêm các tế bào u được lập biểu đồ trên trục x. Ghi chú: A) tá dược (các dấu cộng), B) doxorubixin (3 mg/kg) mỗi tuần một lần (các hình chữ thập), C) rituximab (30 mg/kg) mỗi tuần một lần (các hình tam giác), D) B-ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) mỗi tuần một lần (hình vuông), E) rituximab (30 mg/kg) với doxorubixin (3 mg/kg), mỗi tuần một lần (hình thoi) và F) B-ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) với doxorubixin (3 mg/kg), mỗi tuần một lần (hình tròn).

Fig.4

a) Hoạt tính chống u hiệp đồng của phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) với xyclophosphamit; và

b) So sánh với phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ I (rituximab) với xyclophosphamit đối với u bạch huyết Non Hodgkin người có nang RL (NHL).

Các giá trị trung bình của thể tích khối u [mm^3] $\pm$ IQR được lập biểu đồ trên trục y; số ngày sau khi tiêm các tế bào u được lập biểu đồ trên trục x. Ghi chú: A) tá dược (các hình tròn), B) xyclophosphamit (50 mg/kg) mỗi tuần một lần (các hình chữ thập), C) rituximab (30 mg/kg) mỗi tuần một lần (hình tam giác), D) B-ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) mỗi tuần một lần (hình vuông), E) rituximab (30 mg/kg) với xyclophosphamit (50 mg/kg), mỗi tuần một lần (hình thoi) và F) B-

ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người (B-HH6-B-KV1 GE) (30 mg/kg) với xyclophosphamit (50 mg/kg), mỗi tuần một lần (dầu cộng).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Hoạt tính chống u của phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) với xyclophosphamit và vincristin

Chất thử nghiệm:

Kháng thể kháng CD20 typ II B-HH6-B-KV1 GE (= B-Ly1 được làm tương thích với người, B-HH6-B-KV1 được biến đổi di truyền glyco, xem WO 2005/044859 và WO 2007/031875) được GlycArt, Schlieren, Switzerland cung cấp làm dung dịch gốc (c=9,4 mg/ml). Chất đệm kháng thể bao gồm histidin, trehaloza và polysorbat 20. Dung dịch kháng thể được pha loãng một cách thích hợp trong PBS từ nguyên liệu để tiêm truyền trước.

Rituximab được Hoffmann La Roche, Basel cung cấp.

Xyclophosphamit và vincristin tương ứng được mua như chế phẩm đơn giản của Baxter Oncology GmbH, Halle, Germany hoặc medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg, Germany. Mức độ pha loãng được điều chỉnh theo dung dịch gốc hoàn nguyên.

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy:

Các tế bào Non-Hodgkin-Lymphoma người WSU-DLCL2 (NHL) có nguồn gốc từ Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ, USA. Dòng tế bào u được nuôi cấy thông thường trong môi trường RPMI (PAA, Laboratories, Austria) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (PAA Laboratories, Austria) và 2 mM L-glutamin, ở 37°C trong không khí bão hoà nước với 5% CO₂. Công đoạn 4 được sử dụng để cấy ghép. Các tế bào được cùng tiêm với Matrigel.

Động vật thử nghiệm:

Chuột cái màu be SCID; 7-8 tuần tuổi khi mới đến (được mua của Charles River, Sulzfeld, Germany) được duy trì ở tình trạng không có mầm bệnh đặc trưng với các chu trình mỗi ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo hướng dẫn điều trị (GV- Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp thử nghiệm được xem xét và chuẩn y bởi chính quyền địa phương. Sau khi động vật thử nghiệm mới đến được giữ ở phân cách ly của thiết bị giữ động vật trong một tuần để làm quen với môi trường mới và để quan sát. Việc kiểm tra sức khoẻ liên tục được tiến hành đều đặn. Thức ăn (Provimi Kliba 3337) và nước (axit hoá độ pH=2,5-3) được cung cấp tuỳ ý.

Kiểm tra:

Động vật thử nghiệm được kiểm soát hàng ngày về các triệu chứng lâm sàng và phát hiện các tác dụng phụ. Để kiểm tra từ đầu đến cuối, trọng lượng cơ thể của động vật thử nghiệm được dẫn chứng hai lần mỗi tuần và thể tích khối u được xác định bằng thước cặp sau giai đoạn xử lý.

Điều trị cho động vật thử nghiệm:

Việc điều trị cho động vật thử nghiệm được bắt đầu vào ngày của 9 ngày ngẫu nhiên sau khi cấy ghép tế bào. Kháng thể kháng CD20 typ II biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người B-HH6-B-KV1 GE hoặc Rituximab được cung cấp dưới dạng các chất đơn q7d được tiêm vào trong tĩnh mạch vào ngày thử nghiệm 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51 và 58 với liều chỉ định là 30 mg/kg. Tá dược tương ứng được cung cấp vào các ngày tương tự. Xyclophosphamit và vincristin được tiêm vào trong tĩnh mạch mỗi tuần một lần vào ngày 9, 15, 23, 30, 37, 44, 51 và 58 với 25 mg/kg hoặc 0,25 mg/kg tương ứng. Ở các nhóm điều trị kết hợp, cả hai kháng thể được sử dụng 24 giờ sau các tác nhân hoá liệu pháp vào ngày 10, 16, 24, 31, 38, 45, 52 và 59.

Thử nghiệm ức chế sự phát triển của khối u *in vivo*:

Vào ngày 35 sau khi cấy ghép tế bào, có mức ức chế sự phát triển của khối u đáng kể là 73%, 85%, 66%, 94% hoặc 90% tương ứng ở động vật thử nghiệm sử dụng rituximab, kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE, hoá liệu pháp,

kết hợp giữa hoá liệu pháp và kháng thể kháng CD20 hoặc kết hợp giữa hoá liệu pháp và rituximab, so với nhóm đối chứng. Kết thúc thử nghiệm, mức ức chế sự phát triển của khối u tốt hơn đáng kể được thấy ở nhóm điều trị kết hợp giữa hoá liệu pháp/kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE như so với nhóm điều trị kết hợp giữa hoá liệu pháp/rituximab.

Hiệu quả của các phương pháp điều trị khác nhau cho tới khi kết thúc thử nghiệm vào ngày 64 sau khi cấy ghép tế bào được chứng minh bởi giá trị làm chậm sự phát triển khối u (T-C, trong đó T là thời gian trung bình trong các ngày cần để các khối u của nhóm điều trị đạt tới kích cỡ xác định trước là 1500 mm³, và C là thời gian trung bình trong các ngày để các khối u của nhóm đối chứng đạt tới kích cỡ tương tự). Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây:

Bảng 3. Khả năng làm chậm sự phát triển khối u của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng trong các ngày thử nghiệm

Nhóm	Hợp chất (liều)	Giá trị T-C (số ngày)
2	Rituximab (30 mg/kg)	13
3	Kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg)	19
4	Xyclophosphamit (25 mg/kg) Vincristin (0,25 mg/kg)	14
5	Xyclophosphamit (25 mg/kg) Vincristin (0,25 mg/kg) Kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE (30 mg/kg)	38
6	Xyclophosphamit (25 mg/kg) Vincristin (0,25 mg/kg) Rituximab (30 mg/kg)	28

Ví dụ 2

Xác định tỷ lệ các khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) của kháng thể kháng CD20 so với rituximab

Các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) được giữ trong môi trường RPMI-1640 (PanBiotech GmbH, Cat.-No. PO4-18500) chứa 10% FCS (Gibco, Cat-

No.10500-064). Kháng thể kháng CD20 typ II B-HH6-B-KV1 GE (kháng thể B-Ly1 biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người) và rituximab được đánh dấu nhờ sử dụng este Cy5 Mono NHS (Amersham GE Healthcare, Catalogue No. PA15101) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Rituximab liên kết Cy5 có tỷ lệ đánh dấu là 2,0 phân tử Cy5 trên một kháng thể. B-HH6-B-KV1 liên kết Cy5 có tỷ lệ đánh dấu là 2,2 phân tử Cy5 trên một kháng thể. Để xác định và so sánh các khả năng và kiểu gắn kết của cả hai kháng thể, các đường cong gắn kết (bằng cách chuẩn độ rituximab liên kết Cy5 và B-HH6-B-KV1 liên kết Cy5) được tạo ra bằng huỳnh quang miễn dịch trực tiếp nhờ sử dụng dòng tế bào u bạch huyết của Burkitt Raji (ATCC-No. CCL-86). Các cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) để phân tích là EC50 (50% của cường độ tối đa) đối với rituximab liên kết Cy5 và B-HH6-B-KV1 liên kết Cy5 tương ứng. 5×10^5 tế bào trên một mẫu được nhuộm trong 30 phút ở 4°C . Sau đó, các tế bào được rửa trong môi trường nuôi cấy. Nhuộm propidi iodua (PI) được sử dụng để loại trừ các tế bào chết. Các phép đo được tiến hành nhờ sử dụng FACSArray (Becton Dickinson), propidi iodua (PI) được xác định tại Far Red A và Cy5 tại Red-A. Fig.2 thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình đối với gắn kết tại EC50 (50% của cường độ tối đa) của B-HH6-B-KV1 GE đánh dấu Cy5 (thanh đen) và rituximab đánh dấu Cy5 (thanh trắng).

Sau đó tỷ lệ của các khả năng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86) được tính toán theo công thức dưới đây:

$$\begin{aligned} \text{Tỷ lệ của các dung lượng gắn kết với CD20 trên các tế bào Raji (ATCC-No. CCL-86)} &= \frac{\text{MFI (Cy5-kháng thể kháng CD20)}}{\text{MFI (Cy5-rituximab)}} \times \frac{\text{Cy5-tỷ lệ đánh dấu (Cy5-rituximab)}}{\text{Cy5-tỷ lệ đánh dấu (Cy5-kháng thể kháng CD20)}} \\ &= \frac{\text{MFI (B-HH6-B-KVI)}}{\text{MFI (Cy5-rituximab)}} \times \frac{\text{Cy5-tỷ lệ đánh dấu (Cy5-rituximab)}}{\text{Cy5-tỷ lệ đánh dấu (Cy5-B-HH6-B-KVI)}} = \frac{207}{433} \times \frac{2,2}{2,0} = 0,44 \end{aligned}$$

Vì vậy B-HH6-B-KV1 GE là kháng thể kháng CD20 thông thường có khả năng gắn kết giảm so với rituximab.

Ví dụ 3

Hoạt tính chống u của phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) (B-HH6-B-KV1 GE) với doxorubicin

Các chất thử nghiệm

Kháng thể kháng CD20 typ II B-HH6-B-KV1 GE (= B-Ly1 được làm tương thích với người, B-HH6-B-KV1 biến đổi di truyền glyco, xem WO 2005/044859 và WO 2007/031875) được GlycArt, Schlieren, Switzerland cung cấp làm dung dịch gốc (c=9,4 mg/ml). Chất đệm kháng thể bao gồm histidin, trehaloza và polysorbat 20. Dung dịch kháng thể được pha loãng một cách thích hợp trong PBS từ nguyên liệu để tiêm truyền trước.

Rituximab được Hoffmann La Roche, Basel cung cấp.

Doxorubixin được mua như chế phẩm đơn giản của Hexal, Holzkirchen, Germany. Mức độ pha loãng được điều chỉnh theo dung dịch gốc hoàn nguyên.

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy

Các tế bào u bạch huyết có nang Non Hodgkin người RL có nguồn gốc từ Dr. Charles Dumontet, INSERM 590, Lyon, France. Dòng tế bào u được nuôi cấy thông thường trong môi trường RPMI (PAA, Laboratories, Austria) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (PAA Laboratories, Austria) và 2 mM L-glutamin, ở 37°C trong không khí bão hoà nước với 5% CO₂. Công đoạn 2 được sử dụng để cấy ghép.

Động vật thử nghiệm

Chuột cái màu be SCID; 7-8 tuần tuổi khi mới đến (được mua của Charles River, Sulzfeld, Germany) được duy trì ở tình trạng không có mầm bệnh đặc trưng với các chu trình mỗi ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo hướng dẫn điều trị (GV- Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp thử nghiệm được xem xét và chuẩn y bởi chính quyền địa phương. Sau khi động vật thử nghiệm mới đến được giữ ở phần cách ly của thiết bị giữ động vật trong một tuần để làm quen với môi

trường mới và để quan sát. Việc kiểm tra sức khoẻ liên tục được tiến hành đều đặn. Thức ăn (Provimi Kliba 3337) và nước (axit hoá độ pH=2,5-3) được cung cấp tuỳ ý.

Kiểm tra

Động vật thử nghiệm được kiểm soát hàng ngày về các triệu chứng lâm sàng và phát hiện các tác dụng phụ. Để kiểm tra trong suốt quá trình thử nghiệm, trọng lượng cơ thể của động vật thử nghiệm được dẫn chứng hai lần mỗi tuần và thể tích khối u được xác định bằng thước cặp sau giai đoạn xử lý.

Điều trị cho động vật thử nghiệm

Việc điều trị cho động vật thử nghiệm được bắt đầu vào ngày ngẫu nhiên trong vòng 14 ngày sau khi cấy ghép tế bào. Kháng thể kháng CD20 typ II biến đổi di truyền glyco, được làm tương thích với người B-HH6-B-KV1 GE hoặc Rituximab được tiêm vào trong tĩnh mạch dưới dạng các chất đơn q7d vào ngày thử nghiệm 14, 21, 28, 36 và 42 với liều chỉ định là 30 mg/kg hoặc 60 mg/kg. Tá được tương ứng được cung cấp vào các ngày tương tự cũng như Doxorubicin được tiêm vào trong tĩnh mạch mỗi tuần một lần với 3 mg/kg. Ở các nhóm điều trị kết hợp, doxorubicin được tiêm vào trong tĩnh mạch mỗi tuần một lần vào ngày 15, 22, 29, 37 và 43 với 3 mg/kg và Rituximab được tiêm vào trong tĩnh mạch mỗi tuần một lần vào các ngày tương tự với 30 mg/kg ở nhóm liệu pháp kết hợp.

Ví dụ 4

Hoạt tính chống u của phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ II (B-HH6-B- KV1 GE) và Xyclophosphamit ở dòng tế bào RL

Các chất thử nghiệm

Kháng thể kháng CD20 typ II B-HH6-B-KV1 GE (= B-Ly1 được làm tương thích với người, B-HH6-B-KV1 biến đổi di truyền glyco, xem WO 2005/044859 và WO 2007/031875) được GlycArt, Schlieren, Switzerland cung cấp làm dung dịch gốc (c=9,4 mg/ml). Chất đệm kháng thể bao gồm histidin,

trehaloza và polysorbat 20. Dung dịch kháng thể được pha loãng một cách thích hợp trong PBS từ nguyên liệu để tiêm truyền trước.

Rituximab kháng thể kháng CD20 typ II được Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland cung cấp làm dung dịch gốc ($c=10$ mg/ml). Chất đệm chứa polysorbat 80, natri clorua và natrixitrat.

Xyclophosphamit được mua như chế phẩm đơn giản của Baxter Oncology GmbH, Halle, Germany hoặc medac, Gesellschaft fur klinische Spezialpraparate mbH, Hamburg, Germany tương ứng. Mức độ pha loãng được điều chỉnh theo dung dịch gốc hoàn nguyên.

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy

Dòng tế bào u bạch huyết có nang Non Hodgkin người RL được nuôi cấy thông thường trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% huyết thanh thai bò và các chất kháng sinh. Các tế bào RL được sinh trưởng trong huyền phù và tạo thành các cụm. Các tế bào sinh trưởng theo luật số mũ được tiêm dưới da ở chuột SCID.

Động vật thử nghiệm

Động vật thử nghiệm là chuột cái 6 tuần tuổi, chuột SCID, được cung cấp bởi Charles River (L'Arbresle, France) với tình trạng IPSOS. Các con chuột này được nuôi nhốt ít nhất một tuần trước khi tiêm các tế bào RL. Mỗi chuồng nhốt 5 con chuột.

Kiểm tra

Động vật thử nghiệm được kiểm soát hàng ngày về các triệu chứng lâm sàng và phát hiện các tác dụng phụ. Để kiểm tra từ đầu đến cuối, trọng lượng cơ thể của động vật thử nghiệm được kiểm tra hai lần mỗi tuần và thể tích khối u được xác định bằng thước cặp sau giai đoạn xử lý. Tiêu chuẩn loại trừ thử nghiệm đối với động vật thử nghiệm được mô tả và chấp thuận bởi Experimental Animal Committee địa phương.

Điều trị cho động vật

Việc điều trị bắt đầu 31 ngày sau khi cấy ghép tế bào. Kháng thể kháng CD20 typ II được làm tương thích với người B-HH6-B-KV1 GE, tá dược hoặc rituximab được tiêm vào trong tĩnh mạch cho động vật thử nghiệm mỗi tuần một lần với liều 30 mg/kg, (ngày 31, 38, 45 và 52). Xyclophosphamit được tiêm vào các ngày tương tự với liều 50 mg/kg. Các dung dịch kháng thể pha loãng được điều chế mới từ nguyên liệu trước khi sử dụng.

Thử nghiệm ức chế sự phát triển của khối u *in vivo*

Vào ngày 66 sau khi cấy ghép tế bào, có mức ức chế sự phát triển của khối u đáng kể là 54%, 85% hoặc 91% ở động vật thử nghiệm sử dụng các hỗn hợp của Rituximab và Xyclophosphamit, kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE và Rituximab hoặc kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE và xyclophosphamit. Vì vậy, phương pháp điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE và xyclophosphamit tạo ra hoạt tính chống u tốt nhất so với phương pháp điều trị chỉ bằng xyclophosphamit.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20, trong đó dược phẩm này bao gồm:

- kháng thể kháng CD20 typ II với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC), trong đó kháng thể kháng CD20 typ II này là kháng thể B-Ly 1 được làm tương thích với người, được biến đổi di truyền glyco và có vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) nêu trong SEQ ID No.7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) nêu trong SEQ ID No. 20; và

- xyclophosphamit và vincristin, hoặc

- xyclophosphamit, vincristin và doxorubixin.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này còn chứa thêm corticosteroid.

FIG.2

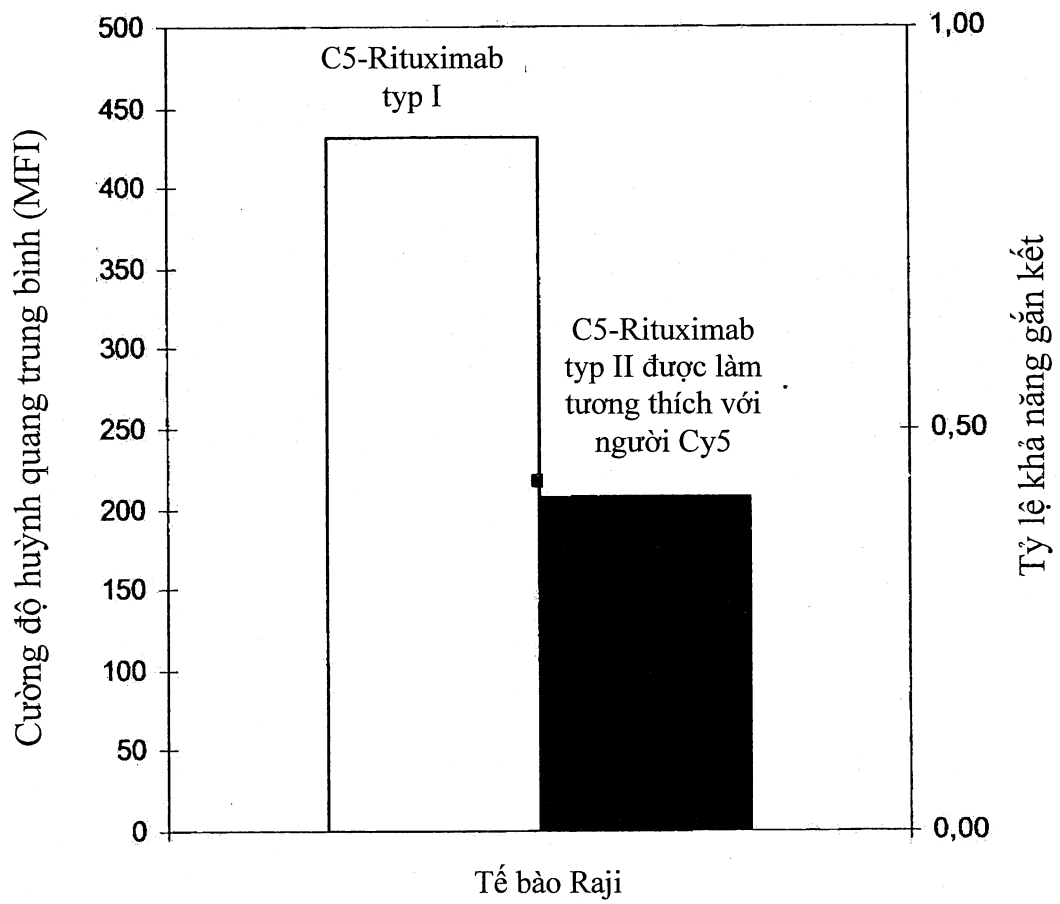


FIG.3

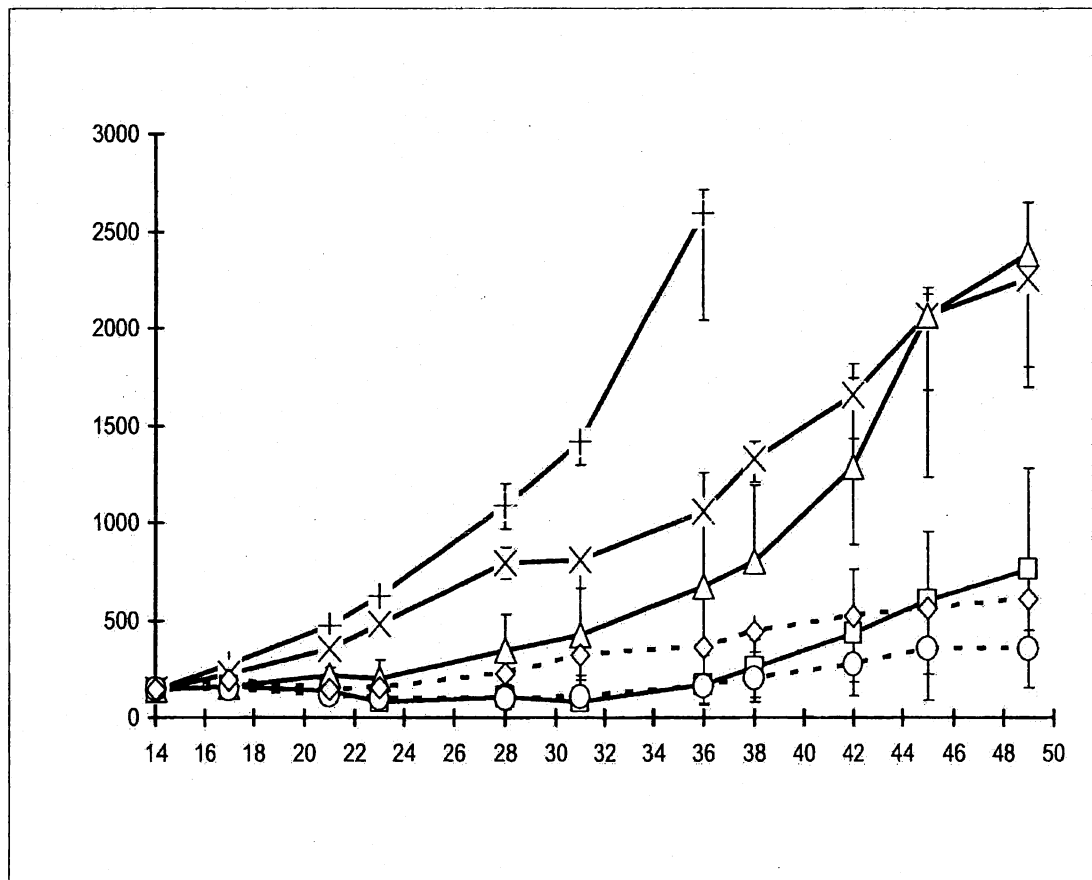
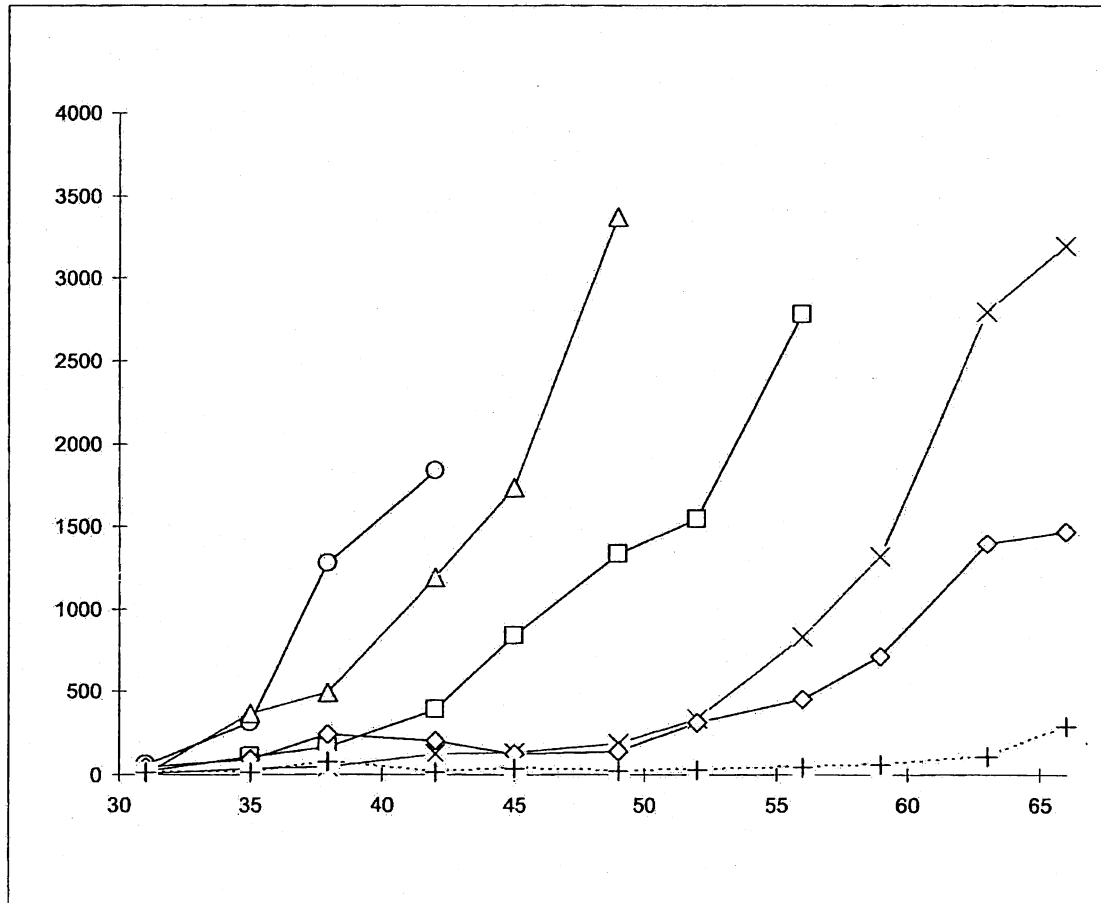


FIG.4



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG CD20 TYP II ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH
UNG THƯ BIỂU HIỆN CD20
- <130> 24858
- <150> 08005554.4
- <151> 2008-03-25
- <150> 08007172.3
- <151> 2008-04-11
- <160> 20
- <170> Patent In phiên bản 3.2
- <210> 1
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> Mus sp.
- <220>
- <221> Đặc điểm MISC
- <223> Trình tự axit amino của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của
kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Lyl
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Pro | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ala | Ser | Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Tyr | Ser | Trp | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Leu |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Arg | Ile | Phe | Pro | Gly | Asp |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Asp | Thr | Asp | Tyr | Asn | Gly | Lys | Phe | Lys | Gly | Lys | Ala | Thr | Leu | Thr |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Asn | Thr | Ala | Tyr | Met | Gln | Leu | Thr | Ser | Leu | Thr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Ser | Val | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Leu | Cys | Ala | Arg | Asn | Val | Phe | Asp | Gly |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Tyr | Trp | Leu | Val | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ala |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |

<210> 2
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<223> Trình tự axit amino của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Lyl

<400> 2

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
 20 25 30

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100

<210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLyl (B-HH2)

<400> 3

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

22003

50

55

60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 119

<212> PRT <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH của
kháng thể BLy1 (B-HH3))

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HH4)

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HH5)

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HH6)

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HH7)

<400> 8

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

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

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

22003

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

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HH8)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

$\langle 210 \rangle$ 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HH9)

 $\langle 400 \rangle$ 10

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

$\langle 210 \rangle$ 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HL8)

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

22003

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HL10)

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 119

<212> PRT <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HL11)

<400> 13

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

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

<210> 14
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HL12)

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HL13)

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HL14)

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30

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

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

22003

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLY1 (B-HL15)

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HL16)

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể BLy1 (B-HL17)

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

22003

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 115

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể BLY1 B-KV1

<400> 20

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val
 115

FIG.1

