



(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) 
1-0022561

(51)⁷ **C07K 16/28, A61K 39/395, 29/00, A61P** (13) **B**
37/06, 17/06

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|-----------------|------------|
| (21) | 1-2014-00114 | (22) | 12.06.2012 | | |
| (86) | PCT/US2012/042068 | 12.06.2012 | (87) | WO2012/174001A1 | 20.12.2012 |
| (30) | 61/496,249 | 13.06.2011 | US | | |
| (45) | 25.12.2019 | 381 | (43) | 25.04.2014 | 313 |
| (73) | ABGENOMICS COOPERATIEF U.A. (NL)
Kingsfordweg 103, 1043 GP Amsterdam, the Netherlands | | | | |
| (72) | BASSARAB, Stefan (DE), ENENKEL, Barbara (DE), GARIDEL, Patrick (DE),
SCHOTT, Heidrun (DE), SINGH, Sanjaya (US), LITZENBURGER, Tobias (DE) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.) | | | | |
-

(54) **KHÁNG THỂ KHÁNG PHỐI TỬ P-SELECTIN GLYCOPROTEIN 1, KIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu miễn dịch với phối tử P-selectin glycoprotein 1 (PSGL-1), polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa các kháng thể này, và vectơ biểu hiện và tế bào chủ để sản sinh ra kháng thể theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến kit và dược phẩm chứa kháng thể gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 để điều trị rối loạn hoặc bệnh gây ra bởi hoặc liên quan đến sự tăng sinh cao hơn bình thường và/hoặc sự gia tăng số lượng tế bào T được hoạt hoá bằng cách sử dụng các kháng thể theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với phối tử P-selectin glycoprotein 1 (P-selectin glycoprotein ligand-1: PSGL-1), polynucleotit mã hóa kháng thể này, vectơ biểu hiện chứa polynucleotit, tế bào chủ chứa vectơ biểu hiện này, và các chế phẩm liên quan. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị rối loạn hoặc bệnh gây ra bởi hoặc liên quan đến sự tăng sinh cao hơn bình thường và/hoặc sự gia tăng số lượng tế bào T được hoạt hoá, như bệnh vẩy nến, bằng cách sử dụng các kháng thể kháng PSGL-1.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các đáp ứng viêm đối với sự nhiễm khuẩn hoặc tổn thương nhiễm khởi phát do sự dính bám của tế bào bạch cầu lên thành mạch máu (McEver *et al.*, 1997, J. Clin. Invest., 100 (3): 485-492). Các selectin là họ các glycoprotein làm trung gian cho sự tương tác giữa tế bào nội mô-bạch cầu tiên phát và bạch cầu-tiểu cầu trong quá trình viêm. Họ selectin, bao gồm L-selectin, E-selectin và P-selectin, chứa vùng lectin đầu NH₂, tiếp đó là vùng tương tự EGF, loạt vùng lặp liên ứng, vùng xuyên màng, và đuôi ngắn nằm trong tế bào. Vùng lectin của các selectin tương tác với phối tử tiếp hợp glyco đặc hiệu để tạo điều kiện thuận lợi cho sự dính bám vào tế bào. L-selectin, được biểu hiện trên phần lớn bạch cầu, gắn kết với phối tử trên một số tế bào nội mô và các bạch cầu khác. E-selectin, được biểu hiện trên tế bào nội mô được hoạt hóa bằng xytokin, gắn kết với phối tử trên phần lớn bạch cầu. P-selectin, được biểu hiện trên tiểu cầu và tế bào nội mô hoạt hóa, cũng gắn kết với các phối tử trên phần lớn bạch cầu.

Phối tử P-selectin glycoprotein 1 (PSGL-1), còn được gọi là SELPLG hoặc CD162 (cụm biệt hóa 162) là một phối tử glycoprotein typ muxin của người của cả ba loại selectin (Constantin, Gabriela, 2004, Drugs News Perspect, 17(9): 579-585; McEver *et al.*, 1997, J. Clin. Invest., 100 (3): 485-492). PSGL-1 là homodime có hai cấu trúc dưới phân tử kích thước 120 kDa được liên kết với nhau bằng liên kết

disulfua và được biểu hiện trên bề mặt của tế bào đơn nhân to, tế bào lympho, bạch cầu hạt, và trong một số tế bào gốc CD34⁺. PSGL-1 có khả năng góp phần vào sự huy động bạch cầu bệnh lý trong một số rối loạn do viêm, do nó tạo điều kiện thuận lợi cho sự tương tác dính bám của các selectin, điều này gợi ý rằng các chất ức chế PSGL-1, như kháng thể với PSGL-1 có tiềm năng được sử dụng làm dược chất kháng viêm.

Một số kháng thể kháng PSGL-1 đã được phát triển (ví dụ, xem Công bố đơn quốc tế số WO 2005/110475, công bố ngày 24/11/2005; Công bố đơn quốc tế số WO 2003/013603, công bố ngày 20/02/2003; Constantin, Gabriela, 2004, *Drugs News Perspect*, 17(9): 579-585).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với PSGL-1. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người chứa: (i) vùng chuỗi nhẹ biến đổi (variable light: VL) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (ii) chuỗi nặng chứa vùng chuỗi nặng biến đổi (variable heavy: VH) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và (iii) vùng ổn định IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU (globulin miễn dịch gama-G1) (xem tài liệu: Edelman *et al.*, 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ*, 63(1): 78-85). Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người chứa: (i) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; và (ii) chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người chứa: (i) chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; và (ii) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người có chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ bổ trợ. Theo một phương án cụ thể, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đơn dòng nêu trên được tinh chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đơn dòng nêu trên và chất mang dược dụng. Theo một phương án cụ thể, dược phẩm này chứa kháng thể đơn dòng được tinh chế.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm dược chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đơn dòng nêu trên trong dung dịch nước chứa natri xitrat, natri clorua, và axit xitric monohydrat. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm dược này là dung dịch nước chứa 9,1mM natri xitrat dihydrat, 150mM natri clorua, và 0,9mM axit xitric. Theo phương án cụ thể khác, kháng thể đơn dòng có mặt trong chế phẩm dược này với nồng độ 0,267mM. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm dược là dung dịch nước chứa 2,676 g/l natri, 8,766 g/l natri clorua, 0,2 g/l polysorbat 80, và 0,189 g/l axit xitric. Theo phương án cụ thể khác, kháng thể đơn dòng có mặt trong chế phẩm dược với nồng độ 40 g/l. Theo một phương án cụ thể, tất cả các dung dịch nước nêu trên có độ pH = 6,0.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập được mã hóa chuỗi nặng của kháng thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa polynucleotit phân lập được nêu trên. Theo một số phương án, vector biểu hiện còn chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo một phương án cụ thể, vector biểu hiện là vector biểu hiện của động vật có vú. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa vector biểu hiện nêu trên. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ chứa (a) axit nucleic thứ nhất mã hóa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, được liên kết hoạt động với gen khởi đầu có chức năng trong tế bào chủ nêu trên; và (b) axit nucleic thứ hai mã hóa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 được liên kết hoạt động với gen khởi đầu có chức năng trong tế bào chủ nêu trên. Theo phương án cụ thể khác, các axit nucleic thứ nhất và thứ hai của tế bào chủ này có mặt trong cùng vector biểu hiện hoặc các vector biểu hiện khác nhau.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đơn dòng nêu trên, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ bất kỳ trong số các tế bào chủ nêu trên sao cho các axit nucleic thứ

nhất và thứ hai được biểu hiện bởi tế bào này, và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên được lắp ghép với nhau để tạo thành kháng thể theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chuỗi nặng của kháng thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc mảnh chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin từ vị trí số 1 đến 228 của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến chuỗi nặng của kháng thể chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến mảnh chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin từ vị trí số 1 đến 228 của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất chuỗi nặng nêu trên, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ bất kỳ trong số các tế bào chủ nêu trên sao cho chuỗi nặng nêu trên được biểu hiện bởi tế bào này, và phân lập chuỗi nặng này. Theo một phương án cụ thể, phương pháp tạo ra kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên bao gồm bước sản xuất chuỗi nặng theo phương pháp nêu trên để tạo ra chuỗi nặng của kháng thể, phân lập chuỗi nặng này, và liên hợp chuỗi nặng này với chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit bao gồm đồ chứa thứ nhất chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đơn dòng nêu trên. Theo một phương án cụ thể, đồ chứa thứ nhất này là lọ chứa kháng thể đơn dòng theo sáng chế ở dạng bột vô khuẩn được đông khô nhanh trong chân không, và kit này còn có đồ chứa thứ hai chứa chất lỏng được dụng. Sáng chế cũng đề cập đến dụng cụ tiêm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đơn dòng nêu trên. Theo một phương án cụ thể, dụng cụ tiêm này là bơm tiêm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan hoặc do (toàn bộ hoặc một phần) bởi sự tăng lên và/hoặc số lượng tế bào T hoạt hóa so với các đối tượng khỏe mạnh hoặc các đối tượng không bị mắc bệnh hoặc rối loạn cụ thể đó. Theo một phương án cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn do viêm, bao gồm bước đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đơn dòng được đề cập trên đây. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn do viêm, phương pháp này bao gồm bước cho đối

tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm được đề cập trên đây. Theo một phương án cụ thể, rối loạn do viêm là bệnh tự miễn. Theo phương án cụ thể khác, rối loạn do viêm là bệnh vẩy nến. Theo phương án cụ thể khác, rối loạn do viêm là bệnh vẩy nến thể mảng. Theo phương án cụ thể khác, bệnh vẩy nến thể mảng này ở mức độ từ trung bình đến nặng. Theo phương án cụ thể khác, rối loạn do viêm là bệnh vẩy nến phát ban. Theo phương án cụ thể khác, rối loạn do viêm là bệnh viêm khớp vẩy nến. Theo phương án cụ thể khác, rối loạn do viêm là bệnh viêm đa khớp dạng thấp. Theo phương án cụ thể khác, rối loạn do viêm là bệnh Crohn. Theo phương án cụ thể khác, rối loạn do viêm là bệnh viêm loét ruột dạng thấp. Theo phương án cụ thể khác, rối loạn do viêm là bệnh đái tháo đường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả điện di trên gel mao quản (capillary gel electrophoresis: CGE) không kích thích đối với kháng thể h15A7 và 15A7H. Hình mũi tên chỉ giá trị đỉnh của một nửa lượng phân tử kháng thể.

Fig.2 thể hiện mức độ gắn kết của kháng thể 15A7H và kháng thể đối chứng đối với tế bào T CD4⁺ của người được hoạt hóa. Giá trị EC₅₀ (nM) thu được bằng cách sử dụng mô hình làm khớp bốn tham số của một vị trí bằng cách vẽ đồ thị cường độ huỳnh quang trung bình (mean fluorescence intensity: MFI) theo nồng độ kháng thể.

Fig.3 thể hiện mức độ đáp ứng liều hỗn hợp của kháng thể 15A7H trong thử nghiệm DTH *trans-vivo* ở các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của 4 người cho. Giá trị trung bình chung $\pm$ SEM của 4 người cho sau khi điều trị bằng kháng thể với liều 0,03, 0,1, 0,3, 1 và 10 mg/kg, hoặc chất dẫn thuốc. pbmc: chỉ sử dụng PBMC, V: chất dẫn thuốc, kháng thể 15A7H với liều 0,03, 0,1, 0,3, 1 và 10 mg/kg. Mức độ ức chế tỷ lệ % đối với sự phù chân tương ứng với việc điều trị bằng kháng thể 15A7H với liều 0,03, 0,1, 0,3, 1, và 10 mg/kg.

Fig.4 thể hiện nồng độ kháng thể 15A7H trong vòng 24 giờ trong huyết thanh của chuột C57BL/6 sau khi tiêm một lần qua đường trong màng bụng. Nồng độ của hai kháng thể trong huyết thanh hỗn hợp (giá trị trung bình $\pm$ SEM, n=4) của các

động vật thử nghiệm được vẽ đồ thị mức độ ức chế theo tỷ lệ % đối với sự phù chân trong thử nghiệm DTH *trans-vivo*.

Fig.5 thể hiện nồng độ 15A7H trong huyết thanh theo thời gian của chuột C57BL/6. Bốn con chuột kèm theo được tiêm kháng thể 15A7H qua đường trong màng bụng với liều 0,03, 0,1, 0,3, 1, và 10 mg/kg. Mẫu máu được lấy ở thời điểm 1, 3, 5 và 24 giờ.

Fig.6 thể hiện hoạt tính CDC của kháng thể 15A7H và kháng thể đối chứng, được thử nghiệm với các nồng độ khác nhau (5, 0,5, 0,05, 0,005 và 0,0005 µg/ml).

Fig.7A thể hiện trình tự axit amin chuỗi nặng của kháng thể 15A7H (SEQ ID NO: 2). Vùng chuỗi nặng biến đổi (SEQ ID NO: 4) được in đậm. Các vùng CDR (CDR1 (SEQ ID NO: 8), CDR2 (SEQ ID NO: 9), và CDR3 (SEQ ID NO: 10)) được đóng khung. Các vùng khung (FR1 (SEQ ID NO: 17), FR2 (SEQ ID NO: 18), FR3 (SEQ ID NO: 19), và FR4 (SEQ ID NO: 20)) cũng được chỉ ra trong hình. Vùng ổn định cũng được chỉ rõ. Trình tự axit amin vùng bản lề (SEQ ID NO: 12) được đóng khung. Prolin được thế ở vị trí axit amin 228 trong vùng bản lề được in nghiêng.

Fig.7B thể hiện trình tự axit amin chuỗi nhẹ của kháng thể 15A7H (SEQ ID NO: 1). Vùng chuỗi nhẹ biến đổi (SEQ ID NO: 3) được in đậm. Các vùng CDR (CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6), và CDR3 (SEQ ID NO: 7)) được đóng khung. Các vùng khung (FR1 (SEQ ID NO: 13), FR2 (SEQ ID NO: 14), FR3 (SEQ ID NO: 15), và FR4 (SEQ ID NO: 16)) cũng được chỉ ra trong hình. Vùng ổn định cũng được chỉ rõ.

Bảng 1: Danh mục số SEQ ID và các trình tự tương ứng của chúng

SEQ ID NO:	Trình tự tương ứng
SEQ ID NO: 1	Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 15A7H
SEQ ID NO: 2	Trình tự axit amin của chuỗi nặng 15A7H
SEQ ID NO: 3	Trình tự axit amin vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) 15A7H
SEQ ID NO: 4	Trình tự axit amin vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) 15A7H
SEQ ID NO: 5	Trình tự axit amin vùng CDR1 VL 15A7H

SEQ ID NO: 6	Trình tự axit amin vùng CDR2 VL 15A7H
SEQ ID NO: 7	Trình tự axit amin vùng CDR3 VL 15A7H
SEQ ID NO: 8	Trình tự axit amin vùng CDR1 VH 15A7H
SEQ ID NO: 9	Trình tự axit amin vùng CDR2 VH 15A7H
SEQ ID NO: 10	Trình tự axit amin vùng CDR3 VH 15A7H
SEQ ID NO: 11	Trình tự axit amin PSGL-1 của người có chiều dài đầy đủ
SEQ ID NO: 12	Trình tự axit amin vùng bản lề IgG4
SEQ ID NO: 13	FR1 VL 15A7H
SEQ ID NO: 14	FR2 VL 15A7H
SEQ ID NO: 15	FR3 VL 15A7H
SEQ ID NO: 16	FR4 VL 15A7H
SEQ ID NO: 17	FR1 VH 15A7H
SEQ ID NO: 18	FR2 VH 15A7H
SEQ ID NO: 19	FR3 VH 15A7H
SEQ ID NO: 20	FR4 VH 15A7H
SEQ ID NO: 21	Trình tự axit amin vùng bản lề kiểu đại của IgG4

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với PSGL-1. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic phân lập được mã hóa kháng thể này. Sáng chế còn đề cập đến vector và tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể, tế bào, ví dụ, tế bào CHO, kháng thể được tạo ra bởi tế bào này và phương pháp tinh chế kháng thể thu được. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh và/hoặc phòng ngừa rối loạn hoặc bệnh như được mô tả ở đây (ví dụ, tình trạng viêm) bao gồm bước sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây mà chúng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1. Theo một phương án cụ thể, kháng thể này là kháng thể đơn dòng 15A7H của IgG4

được mô tả trong các ví dụ từ 1 đến 4 dưới đây.

Kháng thể

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với phối tử P-selectin glycoprotein 1 (“PSGL-1”) của người. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người chứa: (i) vùng chuỗi nhẹ biến đổi (variable light: VL) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (ii) chuỗi nặng chứa vùng chuỗi nặng biến đổi (variable heavy: VH) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và (iii) vùng ổn định IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU. Các ví dụ không làm giới hạn về vùng ổn định của người đã được mô tả trong lĩnh vực này, ví dụ, xem tài liệu: Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242. Tốt hơn, nếu kháng thể này gắn kết với PSGL-1 và kích thích theo cách chọn lọc sự chết theo chương trình của tế bào T hoạt hóa (so với các tế bào khác biểu hiện PSGL-1). Theo một phương án cụ thể, sự gắn kết của kháng thể với PSGL-1 không cản trở sự tương tác của P-selectin với PSGL-1, một chức năng có liên quan đến PSGL-1 và cần thiết để định vị có hiệu quả tế bào T được hoạt hóa và bạch cầu trung tính với các mô đích.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 là một globulin miễn dịch G có chiều dài đầy đủ của nhóm 4 (immunoglobulin G of class 4: IgG4), và tốt hơn là chứa trình tự của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 2, và thậm chí tốt hơn nữa là chứa trình tự của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 2 và trình tự của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 1 (trường hợp sau là kháng thể đơn dòng 15A7H).

Sáng chế cũng đề cập đến các mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, mảnh này chứa các trình tự vùng biến đổi nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và ít nhất một phần của vùng ổn định chuỗi nặng của người chứa vùng bản lề IgG4 của người và có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở axit amin số 228 của chuỗi nặng của người được đánh số theo chỉ số UE. Theo một

phương án cụ thể, mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể là mảnh $F(ab')_2$.

Tốt hơn, nếu kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây được phân lập, tốt nhất là được tinh chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này và trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, các thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu miễn dịch”, “nhận biết đặc hiệu miễn dịch”, “gắn kết đặc hiệu” và “nhận biết đặc hiệu” là các thuật ngữ tương đương trong ngữ cảnh của kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể và được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, và để chỉ sự gắn kết của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể thông qua vị trí gắn kết kháng nguyên với epitop của nó, như đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo một phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên cũng có thể gắn kết với các peptit hoặc polypeptit khác, mặc dù thường là với ái lực thấp hơn như được xác định bởi, ví dụ, thử nghiệm miễn dịch, Biacore™, thiết bị KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), hoặc các thử nghiệm khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên sẽ gắn kết với kháng nguyên đó với giá trị K_a thấp nhất là 2 log, 2,5 log, 3 log, 4 log hoặc lớn hơn giá trị K_a khi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này gắn kết với kháng nguyên khác. Theo phương án cụ thể khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch với một kháng nguyên sẽ không phản ứng chéo bằng cách gắn kết với các protein khác. Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với thể đồng dạng tự nhiên hoặc biến thể tự nhiên của PSGL-1 (là thể đồng dạng hoặc biến thể có trong tự nhiên của PSGL-1 ở động vật mà có thể được phân lập từ động vật, tốt hơn là người). Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người hoặc mảnh của nó. Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng

chế gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 của người và/hoặc PSGL-1 của chó hoặc mảnh của nó.

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11 thể hiện PSGL-1 có chiều dài đầy đủ, mã số truy cập GenBank™ AAA74577.1, GI:902797. Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 như được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) hoặc thử nghiệm gắn kết kháng nguyên đã biết trong lĩnh vực này, hoặc như được mô tả theo sáng chế.

Theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với PSGL của người và/hoặc của chó và là globulin miễn dịch G (có vùng chuỗi nặng gama) của nhóm 4 (IgG4) là tetrame của hai dime có liên kết disulfua giống hệt nhau, mỗi dime này chứa một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ. Tốt hơn, nếu kháng thể chứa chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 2. Tốt hơn nữa nếu kháng thể này chứa chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 1. Đối với chuỗi nhẹ, theo một phương án cụ thể, chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế là chuỗi nhẹ kapa.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm một chuỗi nặng chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm chuỗi nhẹ chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và chuỗi nặng chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm chuỗi nhẹ chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể được đề cập trong sáng chế là kháng thể đơn dòng IgG4 gắn kết đặc hiệu với PSGL-1. Các kháng thể IgG4 đã biết là sẽ được xử lý bằng quy trình được gọi là trao đổi nhánh Fab, còn được gọi là xáo trộn IgG4, trong đó tính miễn cảm gia tăng của các liên kết disulfua vùng bản lề của IgG4 tự nhiên để khử cho phép chuỗi nặng tách ra và tái kết hợp theo cách ngẫu nhiên để tạo ra quần thể phức hợp của các phân tử IgG4 với các cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ngẫu nhiên (Aalberse *et al.*, 1999. *Int Arch Allergy Immunol* 118:187-

189; Labrijn, *et al.*, 2009, Nat Biotechnol 27:767-771; Schuurman *et al.*, 2001. Mol Immunol 38:1-8; van der Neut Kolfshoten *et al.*, 2007. Science 317:1554-1557).

Đã chứng minh được rằng sự đột biến Serin thành Prolin ở vị trí 241 theo các đánh số Kabat (Kabat *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) hoặc ở vị trí 228 theo chỉ số EU (Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63(1): 78-85) trong vùng bản lề của IgG4 của người tạo ra kết quả mong muốn trong việc làm giảm sự hình thành liên kết disulfua trong chuỗi, kết quả là làm giảm phân tử “nửa kháng thể” IgG4 và làm giảm sự xáo trộn/không đồng nhất của phân tử IgG4 (Bloom *et al.* 1997, Protein Sci, 6:407-415; Angal *et al.*, 1993, Molecular Immunology, 30(1): 105-108)). Cũng đã có thông báo rằng sự đột biến ở vùng bản lề này có thể làm giảm sự xáo trộn của IgG4 và làm tăng thời gian bán hủy của các phân tử IgG4 *in vivo* (Labrijn, *et al.*, 2009, Nat Biotechnol 27:767-771; Stubenrauch, *et al.*, 2010, Drug Metab Dispos 38:84-91). Van der Neut Kolfshoten và các đồng tác giả đã thông báo rằng vùng C_H3 của IgG4 và không phải là lõi bản lề có liên quan chủ yếu đến phản ứng trao đổi nhánh Fab (xem tài liệu: Van der Neut Kolfshoten *et al.*, 2007, Science, 317:1554-1557 (“Van der Neut Kolfshoten”) at page 1555, col. 2). Van der Neut Kolfshoten đã thông báo rằng sự trao đổi vùng C_H3 của IgG1 đối với vùng C_H3 của IgG4 sẽ hoạt hóa sự trao đổi nhánh Fab đối với IgG1, trong khi sự trao đổi vùng C_H3 của IgG4 lại ngăn chặn sự trao đổi nhánh Fab đối với IgG4 (xem trang 1555 và Fig.2D).

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể IgG4 hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với PSGL-1, và có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong vùng bản lề IgG4, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó vẫn gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 và trong đó mức độ xáo trộn IgG4 được giảm đi so với kháng thể chứa vùng bản lề IgG4 không có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin. Theo một phương án cụ thể, vùng bản lề của IgG4 chỉ có một sự thay thế axit amin. Một ví dụ về “vùng bản lề IgG4 của người” là vùng nằm trên chuỗi nặng của kháng thể IgG4 giữa vùng C_H1 và vùng C_H2 gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12, như được nêu trong tài liệu: Angal *et al.*, 1993, Molecular Immunology, 30(1): 105-108.

Theo một phương án cụ thể, sự giảm mức độ xáo trộn IgG4 được xác định bằng cách phát hiện lượng các phân tử nửa kháng thể ít hơn hoặc mức độ trao đổi nhánh ít hơn được tạo ra từ kháng thể theo sáng chế có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong vùng bản lề, so với lượng các phân tử nửa kháng thể hoặc mức độ trao đổi nhánh được tạo ra từ phân tử IgG4 chứa vùng bản lề IgG4 mà không có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin. Thử nghiệm bất kỳ đã được biết rõ trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để phát hiện sự tạo ra nửa kháng thể và các phân tử kháng thể đặc hiệu kép. Ví dụ, xem tài liệu: Van der Neut Kolfschoten *et al*, 2007, *Science*, 317:1554-1557, về các ví dụ của thử nghiệm để phát hiện sự tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng IgG4 gắn kết đặc hiệu với PSGL-1, có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở vị trí axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và chuỗi nặng có Prolin ở vị trí 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể đơn dòng, gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người bao gồm: (i) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; và (ii) chuỗi nặng chứa vùng ổn định IgG4 của người có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong vùng bản lề của IgG4, trong đó kháng thể này vẫn có sự gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 nêu trên và trong đó mức độ xáo trộn IgG4 được giảm đi so với kháng thể chứa vùng bản lề IgG4 không có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin này.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người bao gồm (i) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; và (ii) chuỗi nặng chứa vùng ổn định IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở vị trí axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU hoặc vị trí 241 theo hệ thống đánh số Kabat (Kabat *et al*. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; và Edelman *et al.*, 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63(1): 78-85).

Theo một phương án cụ thể, kháng thể đơn dòng, gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người bao gồm: (i) vùng chuỗi VL chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (ii) vùng chuỗi VH chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và (iii) vùng ổn định IgG4 của người chứa vùng bản lề IgG4 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong vùng bản lề này, trong đó kháng thể vẫn gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 và trong đó mức độ xáo trộn IgG4 được giảm đi so với kháng thể chứa vùng bản lề IgG4 không có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin này.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người bao gồm: (i) chuỗi nặng chứa vùng chuỗi VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, và (ii) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở vị trí axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể đơn dòng, gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người bao gồm: (i) vùng chuỗi VL có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (ii) chuỗi nặng chứa vùng chuỗi VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và (iii) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở vị trí axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng IgG4 theo sáng chế chứa các vùng CDR VH có trình tự axit amin được mô tả ở đây (ví dụ, xem Bảng 3) và các vùng CDR VL có trình tự axit amin được mô tả ở đây (ví dụ, xem Bảng 2), trong đó kháng thể này gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 và đột biến vùng bản lề mà đột biến này làm giảm mức độ xáo trộn IgG4 (ví dụ, sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở vị trí axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU). Theo một phương án cụ thể, kháng thể đơn dòng IgG4 gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 và chứa chuỗi nặng bao gồm (a) vùng chuỗi VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, 9 và 10; và (b) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở vị trí axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU. Tốt hơn nữa nếu kháng thể còn chứa chuỗi nhẹ có vùng chuỗi VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, 6, và 7.

Bảng 2 dưới đây thể hiện các vùng CDR VL (cụ thể là CDR1 VL, CDR2

VL, và CDR VL) của trình tự axit amin của kháng thể 15A7H. Bảng 3 dưới đây thể hiện các vùng CDR VH (cụ thể là CDR1 VH, CDR2 VH và CDR3 VH) của trình tự axit amin của kháng thể 15A7H. Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người (SEQ ID NO: 11) chứa trình tự CDR VL nêu trong Bảng 2. Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người (SEQ ID NO: 11), chứa trình tự CDR VH được lựa chọn từ các trình tự nêu trong Bảng 3.

Bảng 2: Trình tự axit amin vùng CDR VL

Ab	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
15A7H	RSSQSIVHNDGNTYFE (SEQ ID NO: 5)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 6)	FQGSYVPLT (SEQ ID NO: 7)

Bảng 3: Trình tự axit amin vùng CDR VH

Ab	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
15A7H	SFGMH (SEQ ID NO: 8)	YINGGSSTIFYANAVKG (SEQ ID NO: 9)	YASYGGGAMDY (SEQ ID NO: 10)

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người và chứa: (i) vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) chứa các vùng CDR1 VL, CDR2 VL, và CDR3 VL có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, và SEQ ID NO: 7, tương ứng; (ii) vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) có các vùng CDR1 VH, CDR2 VH, và CDR3 VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, và SEQ ID NO: 10, tương ứng; và (iii) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người chứa vùng bản lề IgG có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong vùng bản lề, trong đó kháng thể này vẫn gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 nêu trên và trong đó mức độ xáo trộn IgG4 được giảm đi so với kháng thể chứa vùng bản lề IgG4 không có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin này.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người và chứa: (i) vùng chuỗi VL có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (ii) vùng chuỗi VH chứa các vùng CDR1 VH, CDR2 VH, và

CDR3 VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, và SEQ ID NO: 10, tương ứng; và (iii) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người chứa vùng bản lề IgG4 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong vùng bản lề này, trong đó, kháng thể này vẫn gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 nêu trên và mức độ xáo trộn IgG4 được giảm đi so với kháng thể chứa vùng bản lề IgG4 không có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin này.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người và chứa: (i) vùng chuỗi VL có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3; (ii) chuỗi nặng chứa vùng chuỗi VH chứa các vùng CDR1 VH, CDR2 VH, và CDR3 VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, và SEQ ID NO: 10, tương ứng; và (iii) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở vị trí axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người và bao gồm: (i) vùng chuỗi VL chứa các vùng CDR1 VL, CDR2 VL, và CDR3 VL có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, và SEQ ID NO: 7, tương ứng; (ii) vùng chuỗi VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và (iii) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người chứa vùng bản lề IgG4 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong vùng bản lề, trong đó kháng thể này vẫn gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 và trong đó mức độ xáo trộn IgG4 được giảm đi so với kháng thể chứa vùng bản lề IgG4 không có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin này.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người và bao gồm: (i) vùng chuỗi VL chứa các vùng CDR1 VL, CDR2 VL, và CDR3 VL có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, và SEQ ID NO: 7, tương ứng; (ii) chuỗi nặng chứa vùng chuỗi VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và (iii) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở vị trí axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1, ví dụ, polypeptit PSGL-1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID

NO: 11, chứa các vùng khung (ví dụ, các vùng khung của vùng VL và vùng VH). Các ví dụ không làm giới hạn về vùng khung của người đã được mô tả trong lĩnh vực này, ví dụ, xem tài liệu: Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Bảng 4 dưới đây thể hiện trình tự axit amin vùng khung (FR) của VL (cụ thể là các trình tự của vùng khung FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL, và FR4 VL) của kháng thể 15A7H. Bảng 5 dưới đây thể hiện trình tự axit amin của vùng khung FR VH (cụ thể là các trình tự vùng khung FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, và FR4 VH) của kháng thể 15A7H.

Bảng 4: Trình tự axit amin FR VL

Ab	FR1 VL	FR2 VL	FR3 VL	FR4 VL
15A7H	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITIC (SEQ ID NO: 13)	WYQQKPGKA PKLLIY (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTHF TLTISSLQPEDFATY YC (SEQ ID NO: 15)	FGQGTKVE IKR (SEQ ID NO: 16)

Bảng 5: Trình tự axit amin FR VH

Ab	FR1 VH	FR2 VH	FR3 VH	FR4 VH
15A7H	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFTFS (SEQ ID NO: 17)	WVRQAPGKGL EWVA (SEQ ID NO: 18)	RFTISRDNAKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCAR (SEQ ID NO: 19)	WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 20)

Theo một số phương án, kháng thể IgG4 đã mô tả trên đây có sự đột biến trong vùng bản lề làm giảm mức độ xáo trộn IgG4 chứa các vùng khung FR VL có trình tự axit amin được mô tả ở đây (xem Bảng 4). Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng chuỗi VL có các vùng FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4 nêu trong Bảng 1 và Bảng 3.

Theo một số phương án, kháng thể IgG4 đã mô tả trên đây có sự đột biến trong vùng bản lề làm giảm mức độ xáo trộn IgG4 chứa vùng FR VH có trình tự axit amin được mô tả ở đây (xem Bảng 5). Theo các phương án cụ thể, kháng thể

chứa vùng chuỗi VH có các vùng FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4 nêu trong Bảng 2 và Bảng 4.

Theo phương án cụ thể khác, kháng thể đơn dòng IgG4 được mô tả ở đây bao gồm (i) vùng chuỗi VL chứa các vùng FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL, và FR4 VL có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, 14, 15, và 16, tương ứng; và (ii) vùng chuỗi VH chứa các vùng FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, và FR4 VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17, 18, 19, và 20, tương ứng, và có sự đột biến trong vùng bản lề làm giảm mức độ xáo trộn IgG4. Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng chuỗi VL chứa các vùng FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL, và FR4 VL có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, 14, 15, và 16, tương ứng. Theo phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng chuỗi VH chứa các vùng FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, và FR4 VH có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOs: 17, 18, 19, và 20, tương ứng.

Theo các phương án cụ thể, sự glycosyl hóa vùng ổn định của kháng thể theo sáng chế có thể được cải biến. Ví dụ, có thể tạo ra vùng ổn định không được glycosyl hóa của kháng thể (nghĩa là vùng ổn định của kháng thể này không có sự glycosyl hóa) hoặc vùng ổn định của kháng thể có sự đột biến hoặc sự thay thế ở một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa để loại bỏ sự glycosyl hóa ở một hay nhiều vị trí glycosyl hóa.

Sự glycosyl hóa có thể xuất hiện thông qua sự glycosyl hóa liên kết với N (hoặc liên kết với asparagin) hoặc sự glycosyl hóa liên kết với O. Sự glycosyl hóa liên kết với N liên quan đến sự cải biến hydrat cacbon ở nhóm NH_2 mạch bên của axit amin asparagin trong polypeptit. Sự glycosyl hóa liên kết với O liên quan đến sự cải biến hydrat cacbon ở nhóm hydroxyl trên mạch bên của axit amin serin, threonin, hoặc hydroxylysin.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể không được glycosyl hóa có thể được tạo ra trong tế bào vi khuẩn thiếu thành phần glycosyl hóa cần thiết. Các tế bào có thành phần glycosyl hóa biến đổi đã được mô tả trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng làm tế bào chủ mà trong đó nó biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế để nhờ đó tạo ra kháng thể có sự glycosyl hóa được biến đổi. Ví dụ, xem tài liệu: Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999)

Nat. Biotech. 17:176-1, cũng như Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP 1.176.195; các công bố đơn quốc tế số WO 03/035835; WO 99/54342.

Theo một số phương án, nói chung, một hoặc nhiều cải biến này có thể được tạo ra trong vùng Fc của kháng thể theo sáng chế, để làm thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể đó, như thời gian bán hủy trong huyết thanh, sự cố định bổ trợ, sự gắn kết thụ thể Fc, và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Các cải biến này là đã biết trong lĩnh vực này, và được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn quốc tế số WO 2008/153926 A2. Ví dụ về các cải biến như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: 1) làm thay đổi số lượng gốc xystein trong vùng bản lề để tạo điều kiện thuận lợi cho sự lắp ghép chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc để tăng hoặc làm giảm tính ổn định của kháng thể; 2) gây đột biến một hoặc nhiều axit amin trong vùng bề mặt phân cách của vùng CH2-CH3 của mảnh Fc bản lề của kháng thể để làm giảm thời gian bán hủy sinh học của kháng thể này; 3) thay thế một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 và 322 theo chỉ số EU của Kabat bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể này có ái lực thay đổi đối với phối tử tác động nhưng vẫn duy trì được khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể gốc; và/hoặc 4) cải biến một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí sau: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439 theo chỉ số EU của Kabat để làm tăng khả năng của kháng thể làm trung gian cho tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC) và/hoặc làm tăng ái lực của kháng thể này với thụ thể Fcγ. Sáng chế đề cập đến kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 và có thể điều biến hoạt tính của PSGL-1. Theo các phương án cụ thể, kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 mà không ức chế sự gắn kết của PSGL-1 với P-selectin, và kích thích sự gây chết theo chương trình của tế bào T hoạt hóa. Hoạt tính của PSGL-1 có thể liên quan đến hoạt tính bất kỳ của PSGL-1 đã biết hoặc

được mô tả trong lĩnh vực này, ví dụ, sự hoạt hóa tế bào T trong đáp ứng viêm. Hoạt tính của PSGL-1 hoặc chức năng của PSGL-1 được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Theo một số khía cạnh, hoạt tính của PSGL-1 được tạo bởi sự gắn kết của phối tử PSGL-1 (ví dụ, P-selectin) với PSGL-1.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PSGL hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng chế không phong bế hoặc ức chế sự gắn kết của P-selectin với PSGL-1.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng chế làm giảm sự huy động bạch cầu trong đáp ứng viêm.

Theo một số khía cạnh, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng chế làm giảm hoặc ức chế sự sống của tế bào biểu hiện PSGL-1 và đáp ứng với sự truyền phát tín hiệu hoạt tính của PSGL-1 (ví dụ, các tế bào tăng sinh đáp ứng với sự kích thích của phối tử PSGL-1, sự truyền tín hiệu PSGL-1 hoặc sự gắn kết với selectin), ví dụ, gây ra sự chết theo chương trình của tế bào T hoạt hóa. Các thử nghiệm về sự sống của tế bào đã được mô tả trong lĩnh vực này và có thể được tiến hành dễ dàng bởi một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, khả năng sống của tế bào có thể được đánh giá bằng cách sử dụng kỹ thuật nhuộm màu xanh trypan hoặc các chất đánh dấu khả năng sống hoặc chết của tế bào khác đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ: Annexin-1, propidium iodide (propidium iodine: PI) hoặc 7-AAD, xem tài liệu: Gerber A, Bohne M, Rasch J, Struy H, Ansorge S, Gollnick H., 2000. Việc đánh giá sự gắn kết của annexin V với bạch cầu sau khi xử lý bằng liệu pháp miễn dịch quang học ngoài cơ thể làm các dấu ấn sớm của quá trình chết tế bào theo chương trình. *Dermatology*. 2000;201(2):111-7, Coder, D. M. 2001. Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry*. 9.2.1–9.2.14, và Muppidi, J., Porter, M. and Siegel, R. M. 2004. Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. *Current Protocols in Immunology*. 59:3.17.1–3.17.36.).

Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với PSGL-1 và ức chế (ví dụ, ức chế một phần hoặc hoàn toàn) sự sống của tế bào T hoạt hóa như được đánh giá bằng các phương pháp được mô tả ở đây hoặc đã biết

với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, thử nghiệm loại trừ xanh trypan, xem tài liệu: Coder, D. M. 2001. Assessment of Cell Viability. Current Protocols in Cytometry. 9.2.1–9.2.14). Theo một số phương án, thuật ngữ "ức chế" hoặc "sự ức chế" có nghĩa là sự làm giảm hoặc ngăn chặn sự sống của tế bào T hoạt hóa. Sự sống của tế bào T hoạt hóa có thể bị giảm đi khoảng 10%, khoảng 20%, khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 100%, khoảng 125%, khoảng 150% hoặc nhiều hơn so với đối chứng (ví dụ, sự sống của tế bào T khi không có mặt kháng thể theo sáng chế hoặc có mặt kháng thể không đặc hiệu).

Theo một số khía cạnh, kháng thể kháng PSGL theo sáng chế có khả năng gây ra sự chết theo chương trình của tế bào T hoạt hóa (nghĩa là tế bào chết theo chương trình được định trước) biểu hiện PSGL-1. Các thử nghiệm về sự chết tế bào theo chương trình đã được mô tả trong lĩnh vực này và có thể được tiến hành dễ dàng bởi một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, xem tài liệu: Muppidi, J., Porter, M. and Siegel, R. M. 2004. Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. Current Protocols in Immunology. 59:3.17.1–3.17.36). Thuật ngữ "kích thích" hoặc "gây kích thích" có nghĩa là sự khơi mào hoặc sự gia tăng mức độ tế bào chết theo chương trình so với mức đối chứng. Sự chết theo chương trình của tế bào T hoạt hóa có thể kích thích khoảng 10%, khoảng 20%, khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 100%, khoảng 125%, khoảng 150% hoặc nhiều hơn so với đối chứng (nghĩa là sự chết theo chương trình của tế bào T hoạt hóa khi không có mặt các kháng thể theo sáng chế hoặc có mặt kháng thể không đặc hiệu).

Các tế bào T và dòng tế bào T thích hợp để sử dụng trong các thử nghiệm được mô tả ở đây liên quan đến hoạt tính của PSGL-1 có bán trên thị trường (ví dụ, ARR, DU.528, Jurkat, H-SB2, RPMI 8402, CML-T1, Karpas 45, KE-37/SKW-3, SUP-T1, SUP-T3, MOLT 3/4, P12-Ichikawa, PF-382, CCRF-CEM, HPB-ALL, K-T1, TALL-1, MOLT 16/17, TALL-104, DND-41, Loucy, MOLT 13, Peer/Be13, HUT 78/H9, HUT 102, MT-1, DEL, JB6, Karpas 299, SU-DHL1, 12H5, 3DO54.8, 3DO11.10, 8DO51.15, hoặc 3DO18.3) hoặc có thể dễ dàng nhận biết được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem tài liệu: Thornton, A. M.

2003. Fractionation of T and B Cells Using Magnetic Beads. *Current Protocols in Immunology*. 55:3.5A.1–3.5A.11., Hathcock, K. 2001. T Cell Enrichment by Cytotoxic Elimination of B Cells and Accessory Cells. *Current Protocols in Immunology*. 00:3.3.1–3.3.5., Horgan, K., Shaw, S. and Boirivant, M. 2009. Immunomagnetic Purification of T Cell Subpopulations. *Current Protocols in Immunology*. 85:7.4.1–7.4.9., và Kanof, M. E. 2001. Purification of T Cell Subpopulations. *Current Protocols in Immunology*. 00:7.3.1–7.3.5). Theo các phương án cụ thể, các tế bào hoặc dòng tế bào để sử dụng trong thử nghiệm tăng sinh tế bào có thể biểu hiện PSGL-1, theo cách nội sinh hoặc tái tổ hợp. Các tế bào hoặc dòng tế bào để sử dụng trong thử nghiệm về khả năng sống của tế bào có thể biểu hiện PSGL-1, theo cách nội sinh hoặc tái tổ hợp, và tạo ra các thay đổi về khả năng sống của tế bào đáp ứng với phối tử PSGL-1 hoặc gắn kết kháng thể kháng PSGL-1. Các tế bào hoặc dòng tế bào để sử dụng trong thử nghiệm về sự chết tế bào theo chương trình có thể biểu hiện PSGL-1, theo cách nội sinh hoặc tái tổ hợp, và tạo ra các thay đổi trong sự chết tế bào theo chương trình đáp ứng với phối tử PSGL-1 hoặc gắn kết kháng thể kháng PSGL-1. Tốt hơn, nếu các tế bào hoặc dòng tế bào là của người (ví dụ, ARR, DU.528, Jurkat, H-SB2, RPMI 8402, CML-T1, Karpas 45, KE-37/SKW-3, SUP-T1, SUP-T3, MOLT 3/4, P12-Ichikawa, PF-382, CCRF-CEM, HPB-ALL, K-T1, TALL-1, MOLT 16/17, TALL-104, DND-41, Loucy, MOLT 13, Peer/Be13, HUT 78/H9, HUT 102, MT-1, DEL, JB6, Karpas 299, hoặc SU-DHL1).

Các phương pháp để xác định sự gắn kết đặc hiệu miễn dịch của kháng thể với kháng nguyên đích của nó có thể sử dụng dễ dàng và được mô tả trong lĩnh vực này. Ví dụ, ái lực và đặc tính gắn kết của kháng thể với kháng nguyên đích của nó, có thể được xác định bằng nhiều phương pháp thử nghiệm *in vitro* (thử nghiệm trên cơ sở sinh hóa hoặc miễn dịch) đã biết trong lĩnh vực này như các phương pháp cân bằng (ví dụ, thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunoabsorbent assay: ELISA), hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay: RIA)), hoặc động lực (ví dụ, phân tích Biacore™), và các phương pháp khác như thử nghiệm gắn kết gián tiếp, thử nghiệm ức chế cạnh tranh, kỹ thuật truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (fluorescence resonance

energy transfer: FRET), phương pháp kết tủa miễn dịch, phương pháp điện di trên gel và sắc ký (ví dụ, lọc gel). Các phương pháp này và các phương pháp khác có thể sử dụng chất đánh dấu trên một hoặc nhiều thành phần được thử nghiệm và/hoặc sử dụng nhiều phương pháp phát hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đánh dấu sự tạo màu, phát huỳnh quang, phát quang hoặc đồng vị phóng xạ. Theo một số phương án, không cần sử dụng chất đánh dấu, ví dụ, các hệ Biacore™ sử dụng hiện tượng tự nhiên của sự cộng hưởng từ bề mặt (surface plasmon resonance: SPR) để cung cấp dữ liệu trong thời gian thực mà không cần sử dụng các chất đánh dấu.

Theo một phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế được phân lập. Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế được tinh chế. Theo phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng tái tổ hợp.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được cải biến theo cách thích hợp để sản xuất ở quy mô công nghiệp. Điều này có thể liên quan đến sự tách dòng các trình tự nucleotit mã hóa các vùng cần thiết của kháng thể kháng PSGL, như một hoặc nhiều vùng CDR hoặc FR, thành vector biểu hiện thích hợp, vector này cũng chứa các trình tự nucleotit mã hóa vùng ổn định thích hợp sao cho kháng thể toàn vẹn được tạo ra. Các trình tự polynucleotit được tạo ra bởi vector biểu hiện này là các trình tự nucleotit có thể được tối ưu hóa để làm tăng đến mức tối đa sản lượng và tính ổn định của kháng thể đối với các điều kiện sản xuất và quy trình tinh chế môi trường nuôi cấy tế bào.

Polynucleotit

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây gắn kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên PSGL-1, và vector chứa các polynucleotit này để biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào chủ (ví dụ, trong cơ thể vi sinh vật, như *E. coli* và tế bào của động vật có vú, như tế bào lai của chuột, tế bào CHO, và nguyên bào sợi 3T3). Sáng chế đề cập đến polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ

trong số các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể của nó được đề cập ở đây, cũng như vectơ chứa các trình tự polynucleotit như vậy ví dụ, vectơ biểu hiện để biểu hiện hiệu quả của chúng trong tế bào chủ, ví dụ, tế bào của động vật có vú. Theo một phương án cụ thể, polynucleotit này chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng chế được phân lập hoặc tinh chế.

Theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 và chứa trình tự axit amin được mô tả ở đây.

Theo các phương án cụ thể, polynucleotit được mô tả ở đây mã hóa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Các polynucleotit có thể chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng chứa các vùng FR VH và các vùng CDR của kháng thể được mô tả ở đây (ví dụ, xem Bảng 2 và Bảng 4) và còn chứa đột biến trong vùng bản lề này để làm giảm mức độ xáo trộn IgG4.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, được tối ưu hóa, ví dụ, bằng cách tối ưu hóa codon/ARN, thay thế bằng trình tự tín hiệu khác loại, và loại bỏ các thành phần gây mất ổn định ARN thông tin. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, được tối ưu hóa, ví dụ, bằng cách tối ưu hóa codon/ARN, thay thế các trình tự tín hiệu khác loại, và loại bỏ thành phần gây mất ổn định ARN thông tin. Các phương pháp tạo ra axit nucleic tối ưu mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể để biểu hiện tái tổ hợp bằng cách đưa vào sự thay đổi codon và/hoặc loại bỏ vùng ức chế trong ARN thông tin có thể được tiến hành bằng cách lựa chọn các phương pháp tối ưu hóa được mô tả, ví dụ, trong các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.965.726; US 6.174.666; US 6.291.664; US 6.414.132; và US 6.794.498. Ví dụ, các vị trí phân cắt tiềm năng và các thành phần không ổn định (ví dụ, thành phần giàu A/T hoặc A/U) trong ARN có thể được gây đột biến bằng cách thay đổi các

axit amin được mã hóa bằng các trình tự axit nucleic để làm tăng tính ổn định của ARN để biểu hiện tái tổ hợp. Các thay đổi sử dụng sự thoái biến của mã di truyền, ví dụ, bằng cách sử dụng các codon thay thế cho trình tự axit amin giống hệt. Theo một số phương án, phương pháp này có thể được sử dụng để làm thay đổi một hoặc nhiều codon để mã hóa sự đột biến bảo toàn, ví dụ, axit amin tương tự có cấu trúc và đặc tính và/hoặc chức năng tương tự như axit amin ban đầu. Các phương pháp này có thể làm tăng mức độ biểu hiện của kháng thể kháng PSGL hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó so với mức độ biểu hiện của kháng thể kháng PSGL được mã hóa bằng polynucleotit chưa được tối ưu hóa. Hơn nữa, trình tự polynucleotit này có thể được thiết kế để bắt cặp các codon ưu tiên được sử dụng trong tế bào chủ, nghĩa là codon sử dụng của E.coli hoặc codon sử dụng của CHO.

Trình tự polynucleotit được tối ưu hóa mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây có thể được lai với trình tự polynucleotit không được tối ưu hóa mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây. Theo các phương án cụ thể, trình tự nucleotit được tối ưu hóa mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây lai trong điều kiện nghiêm ngặt ở mức cao với trình tự polynucleotit không được tối ưu hóa mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây. Theo một phương án cụ thể, trình tự nucleotit được tối ưu hóa mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây lai trong điều kiện nghiêm ngặt ở mức cao, trung bình hoặc thấp với trình tự nucleotit không được tối ưu hóa mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây. Thông tin liên quan đến các điều kiện lai đã được mô tả, ví dụ, xem công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2005/0048549 (ví dụ, đoạn 72-73), tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó.

Các polynucleotit này có thể thu được và trình tự nucleotit của polynucleotit này được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây, và các phiên bản được cải biến của các kháng thể hoặc

mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này, nghĩa là các codon nucleotit đã biết là mã hóa các axit amin cụ thể được lắp ghép theo cách sao cho tạo ra axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này. Polynucleotit mã hóa kháng thể này có thể được lắp ghép từ các oligonucleotit được tổng hợp hóa học (ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: Kutmeier *et al.*, 1994, BioTechniques 17:242), ví dụ, liên quan đến sự tổng hợp của các oligonucleotit trùng lặp chứa các phần của trình tự mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này, cắt và gắn các oligonucleotit này, và tiếp đó khuếch đại các oligonucleotit đã gắn này bằng phương pháp PCR. Các phương pháp khác nhau để tạo ra các gen tổng hợp từ các oligonucleotit là đã biết trong lĩnh vực này.

Theo cách khác, polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây có thể được tạo ra từ axit nucleic từ nguồn thích hợp (ví dụ, tế bào lai) bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, phương pháp PCR và các phương pháp tách dòng phân tử khác). Ví dụ, sự khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi tổng hợp có thể lai với các đầu 3' và 5' của trình tự đã biết có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hệ gen thu được từ tế bào sản sinh ra kháng thể quan tâm, ví dụ, tế bào lai. Các phương pháp khuếch đại bằng PCR như vậy có thể được sử dụng để thu được axit nucleic chứa trình tự mã hóa chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể. Các phương pháp khuếch đại PCR như vậy có thể được sử dụng để thu được axit nucleic chứa trình tự mã hóa vùng chuỗi nhẹ biến đổi và/hoặc vùng chuỗi nặng biến đổi của kháng thể. Axit nucleic đã khuếch đại có thể được tách dòng vào vector để biểu hiện trong tế bào chủ và được tách dòng thêm, ví dụ, để tạo ra kháng thể thể khảm và kháng thể được làm giống như của người. Chuỗi ổn định, đối với chuỗi nhẹ của kháng thể thường là kappa hoặc lambda, đối với chuỗi nặng của kháng thể, chuỗi ổn định này có thể là, không chỉ giới hạn ở, isotyp IgG bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) hoặc các globulin miễn dịch khác, kể cả các biến thể allen.

Nếu không có dòng chứa axit nucleic mã hóa kháng thể cụ thể, nhưng trình

tự của phân tử kháng thể đó là đã biết thì axit nucleic mã hóa globulin miễn dịch có thể được tổng hợp hóa học và tách dòng thành vector tách dòng có thể sao chép bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này.

ADN mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây có thể phân lập và giải trình tự dễ dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông dụng (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể). Khi được phân lập, ADN này có thể được đặt vào vector biểu hiện, sau đó vector này được chuyển nhiễm vào tế bào chủ có nhân điển hình hoặc tiền nhân như tế bào *E. coli*, tế bào nấm men (*Pichia*, *Saccharomyces*), tế bào COS của khỉ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO), tế bào u tủy (NS0), tế bào thực vật hoặc tế bào côn trùng mà không tạo ra protein của globulin miễn dịch theo cách khác, để thu được sự tổng hợp kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể trong tế bào chủ tái tổ hợp.

Tế bào chủ và sự biểu hiện tái tổ hợp của kháng thể

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ biểu hiện theo cách tái tổ hợp kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây và vector biểu hiện liên quan. Sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa polynucleotit có trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây để biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào chủ có nhân điển hình hoặc tiền nhân, tốt hơn là trong tế bào của động vật có vú. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ chứa vector biểu hiện này để biểu hiện theo cách tái tổ hợp kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây, bao gồm bước biểu hiện kháng thể mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này từ tế bào chủ.

Sự biểu hiện tái tổ hợp của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể được mô tả ở đây gắn kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên PSGL-1 liên quan đến cấu trúc của vector biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa kháng thể

hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này. Khi thu được polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây, vector để tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực này. Do đó, phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể bằng cách biểu hiện polynucleotit chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể mã hóa (các) trình tự nucleotit được mô tả ở đây. Các phương pháp đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để tạo cấu trúc các vector biểu hiện chứa trình tự mã hóa kháng thể hoặc trình tự mã hóa mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể và các tín hiệu kiểm soát sự phiên mã và dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, kỹ thuật tái tổ hợp ADN *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp, và tái tổ hợp di truyền *in vivo*. Sáng chế cũng đề cập đến các vector có khả năng sao chép chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể được mô tả ở đây, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, liên kết hoạt động với gen khởi đầu, cụ thể, gen khởi đầu để biểu hiện trong tế bào của động vật có vú. Các vector như vậy có thể chứa trình tự nucleotit mã hóa vùng ổn định của phân tử kháng thể (ví dụ, xem các Công bố đơn quốc tế số WO 86/05807 và WO 89/01036; và Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.122.464) và các vùng biến đổi của kháng thể có thể tách dòng được vào vector như vậy để biểu hiện chuỗi nặng hoàn toàn, chuỗi nhẹ hoàn toàn hoặc cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn toàn. Các vector biểu hiện bao gồm các lasmit, retrovirus, cosmit, episome có nguồn gốc từ EBV, nhiễm sắc thể nhân tạo và các dạng tương tự. Vector biểu hiện và trình tự kiểm soát sự biểu hiện được lựa chọn tương hợp được với tế bào chủ. Vector biểu hiện tái tổ hợp này cũng có thể mã hóa peptit tín hiệu để tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiết ra của các chuỗi kháng thể từ tế bào chủ. Peptit tín hiệu này có thể là peptit tín hiệu globulin miễn dịch, peptit khác loại từ protein không phải globulin miễn dịch hoặc peptit nhân tạo.

Vector biểu hiện này được chuyển nhiễm vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật

thông thường đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, sự chuyển nhiễm qua trung gian liposom, sự chuyển nhiễm qua trung gian polycation, sự dung hợp thể nguyên sinh, vi tiêm, làm kết tủa canxi phosphat, đánh thủng bằng điện, chuyển bằng vector virus) và sau đó tế bào đã chuyển nhiễm được nuôi cấy bằng các kỹ thuật thông thường để tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây. Do đó, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây, được liên kết hoạt động với gen khởi đầu khác loại. Theo một số phương án để biểu hiện các kháng thể chuỗi kép, các vector mã hóa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được đồng biểu hiện trong tế bào chủ để biểu hiện toàn bộ phân tử globulin miễn dịch, như được mô tả dưới đây. Theo một số phương án, tế bào chủ chứa vector có polynucleotit mã hóa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được mô tả ở đây, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Theo các phương án cụ thể, tế bào chủ chứa hai vector khác nhau, vector thứ nhất chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể được mô tả ở đây, hoặc mảnh của nó (ví dụ, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó), và vector thứ hai chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể được mô tả ở đây, hoặc mảnh của nó (ví dụ, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó). Theo các phương án khác, tế bào chủ thứ nhất chứa vector thứ nhất có polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể được mô tả ở đây, hoặc mảnh của nó, và tế bào chủ thứ hai chứa vector thứ hai có polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể được mô tả ở đây.

Có nhiều hệ vector biểu hiện chủ có thể được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây (ví dụ, xem các Bằng độc quyền sáng chế số US 5.807.715 và US 7.604.800). Các hệ biểu hiện chủ có chức năng như vật dẫn mà qua đó trình tự mã hóa quan tâm có thể được đưa vào và sau đó được tinh chế, nhưng cũng là tế bào mà khi được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng các nucleotit mã hóa trình tự thích hợp, có thể biểu hiện phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây *in situ*. Các hệ vector này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vi sinh vật như vi khuẩn (ví dụ, *E. coli* và *B. subtilis*) được biến nạp bằng vector biểu hiện ADN thể thực khuẩn, ADN plasmid hoặc ADN cosmit tái tổ

hợp chứa trình tự mã hóa kháng thể hoặc trình tự mã hóa mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể; nấm men (ví dụ, *Saccharomyces*, *Pichia*) được biến nạp bằng vector biểu hiện của nấm men tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa kháng thể hoặc trình tự mã hóa mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể; hệ tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng vector biểu hiện của virus tái tổ hợp (ví dụ, baculovirus) chứa trình tự mã hóa kháng thể hoặc trình tự mã hóa mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể; hệ tế bào thực vật (ví dụ, tảo xanh như *Chlamydomonas reinhardtii*) được gây nhiễm bằng vector biểu hiện của virus tái tổ hợp (ví dụ, virus gây khảm súp lơ, CaMV; virus gây khảm khoai tây, TMV) hoặc được biến nạp bằng vector biểu hiện là plasmid tái tổ hợp (ví dụ, Ti plasmid) chứa trình tự mã hóa kháng thể hoặc trình tự mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể; hoặc hệ tế bào của động vật có vú (ví dụ, tế bào COS, CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa, và NIH 3T3) có cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp chứa gen khởi đầu và/hoặc gen tăng cường có nguồn gốc từ hệ gen tế bào của động vật có vú (ví dụ, gen khởi đầu metallothionein, gen khởi đầu globulin miễn dịch, gen khởi đầu actin) hoặc từ virus của động vật có vú (ví dụ, gen khởi đầu muện của adenovirus; gen khởi đầu 7.5K của virus vaccinia, CMV, virus 40 gây nhiễm trên khỉ). Các thành phần điều hòa khác đối với sự biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình là tín hiệu polyadenyl hóa như BGH polyA, SV40 muện hoặc polyA sớm. Theo cách khác, tín hiệu polyadenyl hóa của globulin miễn dịch hoặc các gen khác có thể được sử dụng. Theo phương án cụ thể khác, các tế bào có nhân điển hình, cụ thể là đối với sự biểu hiện của kháng thể đơn dòng IgG4 được mô tả ở đây, được sử dụng để biểu hiện kháng thể được mô tả ở đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Ví dụ, tế bào của động vật có vú như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), kết hợp với vector như yếu tố khởi đầu gen sớm là yếu tố trung gian chính có nguồn gốc từ virus cự bào của người là hệ biểu hiện hiệu quả đối với các kháng thể (Foecking *et al.*, 1986, Gene 45:101; và Cockett *et al.*, 1990, Bio/Technology 8:2). Theo một số phương án, các kháng thể được mô tả ở đây được tạo ra bởi tế bào CHO hoặc tế bào NS0. Theo một phương án cụ thể, sự biểu hiện của các trình tự nucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được

mô tả ở đây gắn kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên PSGL-1 được điều hòa bởi gen khởi đầu cơ định, gen khởi đầu kích thích hoặc gen khởi đầu đặc hiệu mô.

Trong hệ vi khuẩn, số lượng vector biểu hiện có thể được lựa chọn theo cách có lợi phụ thuộc vào mục đích dự định của phân tử kháng thể được biểu hiện. Ví dụ, khi lượng lớn kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể cần được tạo ra, để tạo ra dược phẩm chứa phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, có thể cần các vector định hướng sự biểu hiện mức độ cao của các sản phẩm protein dung hợp được tinh chế dễ dàng.

Ngoài ra, chủng tế bào chủ có thể được lựa chọn để điều biến sự biểu hiện của trình tự quan tâm, hoặc cải biến và xử lý sản phẩm gen ở dạng mong muốn cụ thể. Những cải biến như vậy (ví dụ, glycosyl hóa) và xử lý các sản phẩm protein có thể là quan trọng đối với chức năng của protein. Các tế bào chủ khác nhau có đặc tính và cơ chế đặc hiệu đối với xử lý sau dịch mã và cải biến protein cũng như sản phẩm gen. Các dòng tế bào chủ hoặc tế bào chủ thích hợp có thể được lựa chọn để đảm bảo sự cải biến và xử lý chính xác protein ngoại lai được biểu hiện. Nhằm mục đích này, tế bào chủ có nhân điển hình có cơ cấu tế bào để xử lý thích hợp sản phẩm phiên mã sơ cấp, sự glycosyl hóa, và phosphoryl hóa sản phẩm gen có thể được sử dụng. Các tế bào chủ của động vật có vú như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào CHO, VERO, BHK, Hela, COS, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O và T47D, NS0 (dòng tế bào u tủy của chuột không sản sinh nội bào chuỗi globulin miễn dịch bất kỳ), CRL703O và HsS78Bst. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây được sản sinh ở tế bào động vật có vú, như tế bào CHO.

Để sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể với năng suất cao trong thời gian dài, sự biểu hiện ổn định được ưu tiên. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú biểu hiện ổn định phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể có thể được thiết kế. Khác với việc sử dụng vector biểu hiện chứa điểm khởi đầu sự sao chép của virus, các tế bào chủ có thể được biến nạp bằng ADN được kiểm soát bởi các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện thích hợp (ví dụ, gen khởi đầu, gen tăng cường, các trình tự, các đoạn

kết thúc phiên mã, các vị trí polyadenyl hóa, v.v.), và các gen đánh dấu có thể chọn lọc. Sau khi đưa ADN ngoại lai vào, các tế bào đã thao tác di truyền có thể được để sinh trưởng trong thời gian từ 1 đến 2 ngày trong môi trường không chọn lọc, và sau đó được chuyển vào môi trường chọn lọc. Các chất đánh dấu có thể chọn lọc trong plasmit tái tổ hợp tạo ra sự kháng lại những chất chọn lọc và cho phép tế bào kết hợp một cách ổn định plasmit này vào nhiễm sắc thể của chúng. Sau khi tách dòng một tế bào, các tế bào được mở rộng thành các dòng tế bào sản xuất. Phương pháp này có thể được sử dụng theo cách có lợi để thiết kế các dòng tế bào biểu hiện phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể đó. Các dòng tế bào được thiết kế này có thể đặc biệt hữu ích trong việc sàng lọc và đánh giá chế phẩm tương tác trực tiếp hoặc gián tiếp với phân tử kháng thể.

Có nhiều hệ chọn lọc có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thymidin kinaza của virus ecpet (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11:223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), và adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22:8-17) có thể được sử dụng trong các tế bào tk-, hgp^rt- hoặc apr^t, tương ứng. Tương tự, sự kháng chất chống chuyển hóa có thể được sử dụng làm cơ sở chọn lọc cho các gen sau: *dhfr*, tạo ra sự kháng methotrexat (Wigler *et al.*, 1980, Natl. Acad. Sci. Mỹ 77:357; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ 78:1527); *gpt*, tạo ra sự kháng axit mycophenolic (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ 78:2072); neo, tạo ra sự kháng aminoglycosit G-418 (Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; và Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-2 15); và *hygro*, tạo ra sự kháng hygromycin (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30:147). Các phương pháp thường là đã biết trong lĩnh vực này về kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể được sử dụng theo cách thông thường để chọn lọc các dòng tái tổ hợp mong muốn, và các phương pháp như vậy đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); và trong Chương 12 và 13, Dracopoli *et al.* (eds.), Current Protocols in

Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1, các tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Mức độ biểu hiện của phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể có thể được tăng lên bằng cách khuếch đại vector (để tham khảo, xem tài liệu: Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Khi một chất đánh dấu trong hệ vector biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể có thể được khuếch đại, sự tăng nồng độ chất ức chế có mặt trong môi trường nuôi cấy của tế bào chủ sẽ làm tăng số lượng bản sao của gen đánh dấu. Do vùng được khuếch đại có liên quan đến gen của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, sự tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể cũng sẽ tăng lên (Crouse *et al.*, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

Tế bào chủ có thể được đồng chuyển nhiễm bằng một hoặc nhiều vector biểu hiện được mô tả ở đây, vector thứ nhất mã hóa polypeptit có nguồn gốc từ chuỗi nặng và vector thứ hai mã hóa polypeptit có nguồn gốc chuỗi nhẹ. Hai vector này có thể chứa các gen đánh dấu có thể chọn lọc được giống nhau hoặc khác nhau mà cho phép biểu hiện đủ polypeptit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Tế bào chủ này có thể được đồng chuyển nhiễm bằng các lượng khác nhau của một hoặc nhiều vector biểu hiện.

Theo cách khác, vector đơn lẻ có thể được sử dụng để mã hóa, và có khả năng biểu hiện, cả polypeptit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các trình tự mã hóa của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể chứa ADN bổ trợ hoặc ADN hệ gen. Vector biểu hiện này có thể là đơn cistron hoặc đa cistron. Ví dụ, cấu trúc của axit nucleic bicistron có thể chứa trong gen khởi đầu theo thứ tự sau, chuỗi nặng của kháng thể được mô tả ở đây), và chuỗi nhẹ của kháng thể được mô tả ở đây. Trong vector biểu hiện này, sự phiên mã cả hai chuỗi có thể được điều khiển bởi gen khởi đầu, trong khi sự dịch mã của ARN thông tin từ chuỗi nặng có thể theo cơ chế sàng lọc phụ thuộc mũ và sự dịch mã của ARN thông tin từ chuỗi nhẹ có thể theo cơ chế không

phụ thuộc mũ, ví dụ, bằng IRES.

Theo một số phương án, các phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện các phân tử ở mức cao trong tế bào chủ. Theo một số phương án, các phân tử được biểu hiện trong tế bào của động vật có vú, ví dụ, trong tế bào CHO trong môi trường không chứa huyết thanh hoặc trong môi trường được xác định về mặt hóa học. Theo một số phương án, các phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy dưới dạng polypeptit được tiết ra hoặc có thể được thu hồi từ các dịch tan tế bào chủ, ví dụ, nếu chúng được biểu hiện mà không có tín hiệu tiết.

Khi một phân tử kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây được tạo ra bằng cách biểu hiện tái tổ hợp, nó có thể được tinh chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để tinh chế phân tử globulin miễn dịch, ví dụ, bằng cách sắc ký (ví dụ, trao đổi ion, ái lực, cụ thể là theo ái lực đối với kháng nguyên đặc hiệu sau protein A, và sắc ký cột theo kích cỡ), ly tâm, độ tan khác nhau, kết tủa, lọc, HPLC đảo pha, hoặc các kỹ thuật tiêu chuẩn khác bất kỳ để tinh chế các protein để thu được chế phẩm gần như đồng nhất hoặc chế phẩm có hoạt tính sinh học của các phân tử. Ngoài ra, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây có thể được dung hợp với trình tự polypeptit khác loại để tạo điều kiện thuận lợi cho sự tinh chế.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây được phân lập hoặc tinh chế. Ví dụ, theo một phương án cụ thể, chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây gần như không chứa chất tế bào, các thành phần của môi trường và/hoặc tiền chất hóa học. Thuật ngữ “gần như không chứa chất tế bào” bao gồm các chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này được tách ra khỏi các thành phần của tế bào mà từ đó có thể phân lập hoặc được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp. Khi kháng

thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp, nói chung, nó cũng gần như không chứa môi trường nuôi cấy, nghĩa là môi trường nuôi cấy có thể tích chế phẩm protein thấp hơn khoảng 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5%, hoặc 0,1%. Khi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học, nói chung, nó gần như không chứa các tiền chất hóa học hoặc chất hóa học khác, nghĩa là nó được tách ra khỏi tiền chất hóa học hoặc các hóa chất khác liên quan đến sự tổng hợp protein. Theo đó, các chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể như vậy có hàm lượng tiền chất hóa học hoặc hợp chất không phải kháng thể quan tâm hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể quan tâm thấp hơn khoảng 30%, 20%, 10%, 5% (theo trọng lượng chất khô).

Dược phẩm

Sáng chế đề cập đến chế phẩm, dược phẩm, chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây. Theo các khía cạnh cụ thể, chế phẩm được mô tả ở đây có thể để sử dụng *in vitro*, *in vivo*, hoặc *ex vivo*. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây và chất mang hoặc tá dược được dụng.

Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được đề xuất ở đây có thể được bào chế để bảo quản bằng cách trộn lẫn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với chất mang, tá dược hoặc chất ổn định được dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD), ở dạng chế phẩm đông khô nhanh hoặc dung dịch nước. Các chất mang, tá dược hoặc chất ổn định được dụng không gây độc cho người sử dụng ở liều dùng và nồng độ sử dụng, và bao gồm các chất đệm như phosphat, xitrat, natri xitrat dehydrat, và các axit hữu cơ khác; và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như TWEEN™, PLURONICS™ hoặc polyetylen glycol (PEG).

Các chế phẩm, như các chế phẩm được mô tả ở đây, cũng có thể chứa nhiều hơn một hợp chất (ví dụ, các phân tử, ví dụ, kháng thể hoặc các kháng thể được mô tả ở đây) cần thiết cho chỉ định cụ thể cần được điều trị. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể và một hoặc nhiều hợp chất có hoạt tính có hoạt tính hỗ trợ không gây ảnh hưởng bất lợi cho nhau. Các phân tử này có mặt trong chế phẩm với lượng thích hợp để có hiệu quả cho mục đích dự định. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị khác. Liệu pháp kết hợp này có thể được sử dụng cho bệnh nhân theo cách lần lượt hoặc đồng thời.

Các chế phẩm cần được sử dụng *in vivo* có thể là chế phẩm vô khuẩn. Điều này được thực hiện dễ dàng bằng cách lọc, ví dụ, bằng màng lọc vô khuẩn.

Theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây, và tùy ý chứa một hoặc nhiều chất có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bổ sung, trong chất mang dược dụng. Dược phẩm theo sáng chế hữu ích để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây như bệnh vẩy nến, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó. Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" để chỉ lượng an toàn và đủ để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị", "được điều trị", "việc điều trị" hoặc "sự điều trị" được sử dụng ở đây có nghĩa là tạo ra kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn ở đối tượng bị bệnh. Các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm giảm các triệu chứng, hạn chế sự phát triển của bệnh, tình trạng của bệnh được ổn định (nghĩa là không làm xấu thêm), làm trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc làm nhẹ tình trạng của bệnh, và làm thuyên giảm (bất kể là một phần hoặc hoàn toàn), bất kể có thể phát hiện được hoặc không phát hiện được. Thuật ngữ "sự điều trị" cũng có thể có nghĩa là kéo dài thời gian sống so với thời gian sống dự định nếu không được điều trị.

Sáng chế đề cập đến chất mang dược dụng thích hợp để sử dụng cho kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể bao gồm các chất

mang bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là thích hợp cho chế độ sử dụng cụ thể. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được bào chế thành chế phẩm được thích hợp, như dung dịch hoặc huyền phù vô khuẩn để sử dụng ngoài đường tiêu hóa.

Ngoài ra, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây có thể được bào chế dưới dạng thành phần có hoạt tính được duy nhất trong chế phẩm hoặc có thể kết hợp với các thành phần có hoạt tính khác (như một hoặc nhiều chất có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị khác).

Trong các chế phẩm này, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được đề xuất ở đây được trộn với chất mang được dụng thích hợp. Nồng độ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể trong chế phẩm có thể có hiệu quả, ví dụ, để cung cấp một lượng, khi sử dụng, để có tác dụng phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây (ví dụ, rối loạn do viêm) hoặc triệu chứng của nó.

Theo một phương án, các chế phẩm được bào chế để sử dụng với liều dùng duy nhất. Để bào chế chế phẩm, tỷ lệ trọng lượng của hợp chất được hòa tan, được tạo hỗn dịch, phân tán hoặc trộn theo cách khác trong chất mang đã chọn với nồng độ hữu hiệu sao cho rối loạn được giảm bớt, được điều trị hoặc một hoặc nhiều triệu chứng được cải thiện.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được đưa vào chất mang được dụng với lượng hữu hiệu đủ để tạo ra hiệu quả có lợi về mặt điều trị khi không có, hoặc có ở mức độ rất ít hoặc không đáng kể, các tác dụng phụ không mong muốn ở bệnh nhân được điều trị. Nồng độ có hiệu quả về mặt điều trị có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng cách thử nghiệm các hợp chất trong hệ *in vitro* và *in vivo* bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường và sau đó ngoại suy ra liều dùng cho người.

Nồng độ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể trong dược phẩm sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, đặc tính hóa lý của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, chế độ dùng liều và lượng được sử dụng cũng như các yếu tố khác đã biết với người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực này.

Theo phương án khác, dược phẩm cung cấp liều dùng nằm trong khoảng từ 0,001mg đến 100mg của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể tính theo kg trọng lượng cơ thể mỗi ngày. Các dạng đơn vị liều dùng của dược phẩm có thể được bào chế để cung cấp từ 0,001mg đến 100mg, và/hoặc tổ hợp của các thành phần quan trọng tùy chọn khác cho mỗi dạng đơn vị liều dùng. Theo một phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này được bào chế với nồng độ 40 mg/ml.

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể có thể được sử dụng một lần, hoặc có thể được chia thành nhiều liều nhỏ hơn để sử dụng ở các thời điểm khác nhau. Cần hiểu rằng liều dùng chính xác và khoảng thời gian điều trị là một hàm số của bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây cần được điều trị và có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng cách sử dụng các kỹ thuật thử nghiệm đã biết hoặc bằng cách ngoại suy từ dữ liệu thử nghiệm *in vivo* hoặc *in vitro*. Cần lưu ý rằng giá trị nồng độ và liều dùng cũng có thể thay đổi theo mức độ nặng của bệnh hoặc rối loạn cần được làm giảm nhẹ. Cần hiểu thêm rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, các chế độ liều dùng cụ thể có thể được điều chỉnh theo thời gian theo nhu cầu của đối tượng và đánh giá chuyên môn của người sử dụng hoặc theo dõi việc sử dụng các chế phẩm này.

Các dược phẩm được đề xuất để sử dụng cho người và động vật ở dạng liều dùng đơn vị, như dung dịch hoặc hỗn dịch vô khuẩn dùng ngoài đường tiêu hóa chứa lượng thích hợp của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể này được bào chế và sử dụng ở dạng đơn vị liều dùng đơn vị hoặc nhiều dạng liều dùng. Các dạng liều dùng đơn vị được sử dụng ở đây để chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp cho đối tượng là người và động vật và được bao gói riêng biệt như đã biết trong lĩnh vực này. Mỗi liều đơn vị chứa một lượng định trước của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể đủ để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn, kết hợp với chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng. Ví dụ về các dạng liều đơn vị bao gồm ống tiêm và bơm tiêm. Các dạng liều đơn vị có thể được sử dụng ở dạng các

phần hoặc dạng đa liều của nó. Dạng đa liều là nhiều dạng liều dùng đơn vị giống nhau được bao gói trong một đồ chứa để sử dụng ở dạng liều đơn vị độc lập. Ví dụ về các dạng đa liều bao gồm các lọ, chai dạng nửa lít hoặc năm lít. Do đó, dạng đa liều là nhiều liều đơn vị không được đóng gói riêng lẻ.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây là dược phẩm dạng lỏng. Dược phẩm dạng lỏng có thể sử dụng để điều trị bệnh có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách hòa tan, phân tán, hoặc trộn theo cách khác kháng thể được mô tả ở đây trong chất mang, ví dụ như nước, nước muối, dung dịch dextroza, glyxerol, glycol, etanol, và chất tương tự, để nhờ đó tạo thành dạng dung dịch hoặc hỗn dịch. Nếu muốn, dược phẩm cần được sử dụng cũng có thể chứa một lượng nhỏ các chất bổ trợ không gây độc như chất làm ướt, chất nhũ hóa, chất ổn định, và chất đệm pH và chất tương tự.

Các phương pháp thực tế để bào chế các dạng liều dùng này là đã biết, hoặc sẽ trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này; ví dụ, xem tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Các dạng liều dùng hoặc chế phẩm chứa kháng thể với lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 99,9% và lượng còn lại được lấy từ chất mang không gây độc có thể được bào chế. Các phương pháp để bào chế các dạng chế phẩm này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa được đặc trưng bằng cách tiêm, hoặc dưới da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch cũng được dự định ở đây. Dạng tiêm được có thể được bào chế ở dạng thuận tiện, dưới dạng dung dịch nước hoặc hỗn dịch, các dạng rắn thích hợp cho dạng dung dịch hoặc hỗn dịch trong chất lỏng trước khi tiêm hoặc dưới dạng nhũ tương. Dạng tiêm, dung dịch và nhũ tương cũng chứa một hoặc nhiều tá dược. Các tá dược thích hợp bao gồm, ví dụ, nước, nước muối, dextroza, glyxerol hoặc etanol. Ngoài ra, nếu muốn, dược phẩm được sử dụng cũng có thể chứa một lượng nhỏ chất bổ trợ không độc như chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất đệm độ pH, chất ổn định, chất làm tăng độ tan, và các chất tương tự khác. Các cách sử dụng khác có thể bao gồm, sử dụng ở

dạng lớp bao tan ở ruột, sử dụng qua đường trong não, sử dụng qua đường mũi, sử dụng qua đường trong động mạch, sử dụng qua đường trong tim, tiêm truyền trong xương, sử dụng qua đường trong nội tủy mạc, tiêm truyền trong tĩnh mạch, cấy ghép hoặc tiêm dưới da, sử dụng qua đường trong cơ, sử dụng qua đường trong trực tràng, sử dụng qua đường trong âm đạo, sử dụng qua đường trong dạ dày, sử dụng qua đường trong khí quản, sử dụng qua đường trong phổi và sử dụng qua đường trong màng bụng.

Chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa chứa dung dịch vô khuẩn dùng được ngay để tiêm, sản phẩm hòa tan dạng khô vô khuẩn, như bột đông khô nhanh, để sẵn sàng kết hợp với dung môi ngay trước khi sử dụng, bao gồm hỗn dịch vô khuẩn dùng được ngay để tiêm, sản phẩm không tan dạng khô vô khuẩn để sẵn sàng kết hợp với chất dẫn thuốc ngay trước khi sử dụng và nhũ tương vô khuẩn. Các dung dịch này có thể chứa nước hoặc không chứa nước.

Nếu được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch, các chất mang thích hợp bao gồm nước muối sinh lý hoặc nước muối đệm phosphat (phosphate buffered saline: PBS), nước và dung dịch chứa chất làm đặc và chất hòa tan, như glucoza, polyetylen glycol, và polypropylen glycol và hỗn hợp của chúng.

Các chất mang được dùng được sử dụng trong chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm chất dẫn thuốc chứa nước, chất dẫn thuốc không chứa nước, chất kháng khuẩn, Chất tạo đẳng trương, chất đệm, chất chống oxy hóa, chất gây tê cục bộ, chất tạo hỗn dịch và chất phân tán, chất nhũ hóa, chất càn hóa hoặc chất tạo chelat và các chất mang được dùng khác. Các chất mang được dùng cũng bao gồm rượu etylic, polyetylen glycol và propylen glycol dùng cho chất dẫn thuốc trộn lẫn được với nước; và natri hydroxit, axit clohydric, axit xitric hoặc axit lactic để điều chỉnh độ pH.

Để minh họa, phương pháp tiêm truyền dung dịch nước vô khuẩn qua đường trong tĩnh mạch hoặc trong động mạch chứa kháng thể là cách sử dụng hữu hiệu. Phương án khác là dung dịch hoặc hỗn dịch dạng dầu hoặc nước vô khuẩn chứa chất có hoạt tính được tiêm, nếu cần, để tạo ra hiệu quả được lý mong muốn.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm được chứa natri xitrat, natri clorua, axit xitric, polysorbat 80, và nước. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm được

chứa natri xitrat, natri clorua, và axit xitric. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm được chứa 9,1mM natri xitrat, 150mM natri clorua, và 0,9mM axit xitric. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm được chứa kháng thể hoặc thể liên hợp được mô tả ở đây với nồng độ 0,267mM. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm được chứa 2,676 g/l natri xitrat, 8,766 g/l natri clorua, 0,2 g/l polysorbat 80, và 0,189 g/l axit xitric. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm được chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây với nồng độ 40 g/l. Tốt hơn, nếu chế phẩm được nêu trên có độ pH = 6,0.

Theo các phương án khác, được phẩm này là bột đông khô nhanh, bột này có thể hoàn nguyên để sử dụng dưới dạng dung dịch, nhũ tương và các hỗn hợp khác. Chúng cũng có thể được hoàn nguyên và bào chế dưới dạng chất rắn hoặc gel.

Bột đông khô nhanh được bào chế bằng cách hòa tan kháng thể được đề xuất ở đây trong dung môi thích hợp. Theo một số phương án, bột đông khô nhanh này là bột vô khuẩn. Dung môi có thể chứa tá dược có tác dụng cải thiện tính ổn định hoặc các thành phần dược lý khác của bột hoặc dung dịch hoàn nguyên, được bào chế từ bột nêu trên. Các tá dược có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dextroza, sorbital, fructoza, xirô ngô, xylitol, glyxerin, glucoza, sucroza hoặc chất thích hợp khác. Dung môi cũng có thể chứa chất đệm như xitrat, natri hoặc kali phosphat hoặc chất đệm khác đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, theo một phương án, ở độ pH trung tính. Việc lọc vô khuẩn sau đó dung dịch này bằng cách đông khô nhanh trong các điều kiện tiêu chuẩn là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để tạo ra dạng sản phẩm mong muốn. Theo một phương án, dung dịch tạo thành sẽ được chia thành từng lọ nhỏ để đông khô nhanh. Mỗi lọ này chứa một liều dùng hoặc nhiều liều dùng của hợp chất. Bột đông khô nhanh này có thể được bảo quản trong các điều kiện thích hợp, như ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến nhiệt độ trong phòng.

Việc hoàn nguyên bột đông khô nhanh này với nước để tiêm tạo ra chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Để hoàn nguyên, bột đông khô nhanh này được cho vào nước vô khuẩn hoặc chất mang thích hợp khác. Lượng chính xác phụ thuộc vào hợp chất được chọn. Lượng này có thể xác định theo kinh nghiệm.

Phương pháp điều trị

Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả trong sáng chế là hữu ích để điều trị các rối loạn và bệnh liên quan đến hoặc gây ra bởi (hoàn toàn hoặc một phần) sự tăng sinh hơn mức bình thường và/hoặc sự gia tăng số lượng của các tế bào T được hoạt hoá so với sự tăng sinh và/hoặc số lượng tế bào T được hoạt hoá được tìm thấy ở các đối tượng khỏe mạnh hoặc các đối tượng không có rối loạn hoặc bệnh cụ thể. Các bệnh và rối loạn như vậy là đã biết hoặc có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo một phương án cụ thể, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây là hữu ích để điều trị bệnh viêm hoặc rối loạn. Theo một phương án, bệnh viêm là bệnh tự miễn. Theo một phương án cụ thể, bệnh viêm hoặc rối loạn là bệnh vảy nến, bệnh vảy nến thể mảng, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh Crohn, và bệnh viêm đốt sống dạng thấp.

Các ví dụ không giới hạn về rối loạn và bệnh có thể được điều trị bằng cách sử dụng các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây bao gồm bệnh vảy nến, bệnh Crohn, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh viêm khớp (bao gồm bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm đa khớp dạng thấp ở trẻ em, bệnh viêm xương khớp, và bệnh viêm khớp vảy nến), bệnh tiểu đường, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm não, bệnh nhược cơ, bệnh lupút ban đỏ hệ thống, bệnh tuyến giáp do tự miễn dịch, bệnh viêm da (bao gồm bệnh viêm da cơ địa và bệnh viêm da eczema), hội chứng Sjogren, bệnh nhiệt miệng, bệnh viêm móng mắt, bệnh viêm kết mạc, bệnh viêm giác mạc, bệnh tiểu đường typ I, bệnh viêm ruột, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh hen, bệnh hen dị ứng, bệnh lupút ban đỏ trên da, bệnh xơ cứng bì, bệnh viêm âm đạo, bệnh viêm trực tràng, bệnh dị ứng với thuốc, bệnh phong phản ứng đảo ngược, bệnh phong thể u ban đỏ, bệnh viêm màng mạch nho tự miễn, bệnh viêm não dị ứng, bệnh xuất huyết não hoại tử cấp tính, bệnh điếc dẫn truyền tự phát tiến triển cả hai tai, bệnh thiếu máu bất sản tủy, bệnh thiếu máu không tái tạo bẩm sinh, bệnh giảm tiểu cầu tự phát, bệnh viêm đa sụn, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm gan hoạt mạn tính, hội chứng Stevens-Johnson, bệnh viêm ruột loét miệng tự phát, bệnh liken phẳng, bệnh Graves, bệnh sarcoit,

bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm màng mạch nhỏ ở lưng, chứng xơ hóa kẽ phổi, các bệnh dị ứng như bệnh dị ứng cơ địa, AIDS, và bệnh u tế bào T như bệnh bạch cầu hoặc u lymphô.

Ngoài ra, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể hữu ích để phòng ngừa và/hoặc điều trị một số rối loạn và bệnh liên quan đến hoặc gây ra bởi (hoàn toàn hoặc một phần) sự tăng sinh hơn bình thường và/hoặc gia tăng số lượng tế bào T hoạt hoá so với sự tăng sinh và/hoặc số lượng tế bào T hoạt hoá được tìm thấy ở các đối tượng khỏe mạnh hoặc các đối tượng không có rối loạn hoặc bệnh cụ thể này. Các ví dụ không làm giới hạn về các rối loạn và bệnh có thể được phòng ngừa và/hoặc điều trị bằng cách sử dụng các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế bao gồm bệnh mô ghép chống túc chủ và các ca bệnh thải bỏ mô ghép (bao gồm thải bỏ loại mô ghép sử dụng các mô ghép khác alen cùng loài hoặc khác gen khác loài) như ghép tủy xương, ghép gan, ghép thận, hoặc ghép cơ quan hoặc mô bất kỳ.

Theo đó, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa và điều trị các bệnh và rối loạn được mô tả ở đây bằng cách sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, các phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả của điều trị kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, kháng thể được sử dụng để điều trị rối loạn hoặc bệnh được mô tả theo sáng chế là 15A7H.

Theo một phương án, “điều trị” hoặc “việc điều trị” rối loạn hoặc bệnh để chỉ sự làm thuyên giảm rối loạn hoặc bệnh, hoặc ít nhất là một triệu chứng có thể thấy rõ của rối loạn hoặc bệnh này. Theo phương án khác, “điều trị” hoặc “việc điều trị” để chỉ sự làm thuyên giảm ít nhất một thông số thể chất có thể xác định liên quan đến bệnh hoặc rối loạn, không nhất thiết là có thể thấy rõ bởi đối tượng. Theo phương án khác nữa, “điều trị” hoặc “việc điều trị” chỉ việc ức chế sự tiến triển của bệnh hoặc rối loạn, hoặc về thể chất, ví dụ, sự ổn định hóa của triệu chứng có thể thấy rõ, hoặc về sinh lý, ví dụ, sự ổn định hóa của thông số thể chất, hoặc cả hai.

Theo các phương án cụ thể, các phương pháp điều trị được mô tả theo sáng chế làm giảm hoặc làm thuyên giảm sự tiến triển, mức độ nặng và/hoặc thời gian có rối loạn hoặc bệnh được mô tả theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể hơn nữa, các phương pháp điều trị được mô tả theo sáng chế làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn hoặc bệnh được mô tả theo sáng chế.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị rối loạn hoặc bệnh được mô tả theo sáng chế, có thể thu được ít nhất một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn bốn tác dụng dưới đây nhờ việc sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế: (i) làm giảm hoặc làm thuyên giảm mức độ nặng của rối loạn hoặc bệnh và/hoặc một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan tới nó; (ii) làm giảm khoảng thời gian có một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn hoặc bệnh; (iii) ngăn ngừa sự tái phát của rối loạn hoặc bệnh; (iv) sự suy giảm của rối loạn hoặc bệnh và/hoặc một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan tới nó; (v) làm giảm số lần nhập viện của đối tượng; (vi) làm giảm khoảng thời gian điều trị ở bệnh viện; (vii) làm tăng thời gian sống của đối tượng; (viii) ức chế sự tiến triển của rối loạn hoặc bệnh và/hoặc một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan tới nó; (ix) nâng cao hoặc cải thiện hiệu quả điều trị của liệu pháp khác; (x) làm giảm hoặc loại trừ rối loạn hoặc bệnh; (xi) làm giảm tỷ lệ tử vong; (xii) làm giảm tỷ lệ phải vào viện; (xiii) ngăn ngừa sự phát triển hoặc khởi phát của một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn hoặc bệnh này.

Theo một phương án, “phòng ngừa” hoặc “việc phòng ngừa” rối loạn hoặc bệnh để chỉ sự ức chế hoàn toàn hoặc một phần sự khởi phát hoặc phát triển của rối loạn hoặc bệnh này.

Theo một phương án cụ thể, bệnh hoặc rối loạn được điều trị bằng các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh vảy nến. Nói chung, các tế bào lympho T đã được thừa nhận là đóng vai trò then chốt trong sinh bệnh học của bệnh vảy nến. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh vảy nến bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể khác, phương pháp làm thuyên giảm hoặc phòng

ngừa một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh vảy nến bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Triệu chứng của bệnh vảy nến bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vết mẩn đỏ trên da được bao phủ bằng vảy màu bạc, các mẩn nổi trên da, các nốt vảy nhỏ trên da, da khô, da bị nứt, bao gồm các mụn mủ, ngứa da, sần da, móng tay vệt gợn sóng hoặc lõm xuống, các khớp cứng và phồng lên.

Theo phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh vảy nến thể mảng. Bệnh vảy nến thể mảng hoặc bệnh vảy nến thông thường là dạng phổ biến nhất của bệnh vảy nến và được đặc trưng bởi các mảng ban đỏ nổi trên da và có ranh giới rõ ràng được bao phủ bằng lớp vảy màu bạc. Các tổn thương có xu hướng tập chung nhiều ở bề mặt cơ dưới của tứ chi, khu vực thắt lưng, và da đầu. Các phát hiện mô bệnh học tương ứng bao gồm sự thâm nhiễm đáng kể của tế bào viêm trên da và biểu bì, sự gia tăng số lượng của các ống mạch bị giãn, và sự tăng độ dày đáng kể của biểu bì với sự biệt hóa của các tế bào keratin bị rối loạn và chứng dày sừng bị rối loạn. Khoảng một phần ba số bệnh nhân mắc bệnh vảy nến thể mảng được phân loại là mắc bệnh ở mức trung bình hoặc nặng và các bệnh nhân này cần được điều trị không chỉ bằng liệu pháp tại chỗ.

Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh vảy nến thể mảng bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể khác, phương pháp làm thuyên giảm hoặc phòng ngừa một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh vảy nến thể mảng bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh vảy nến thể mảng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vết mẩn đỏ trên da được bao phủ bằng các vảy màu bạc, các vết mẩn nổi trên da, các nốt vảy nhỏ trên da, da khô, da bị nứt, bao gồm các mụn mủ, ngứa da, sần da, móng tay vệt gợn sóng hoặc lõm xuống, các khớp cứng và phồng lên.

Theo phương án khác, rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô

tả theo sáng chế là bệnh vảy nến thể mảng mạn tính. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh vảy nến thể mảng mạn tính bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp được mô tả theo sáng chế là nhằm làm thuyên giảm hoặc phòng ngừa một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh vảy nến thể mảng mạn tính bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh vảy nến thể mảng mạn tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều vết mẩn đỏ nổi lên trên da, từ cỡ đồng xu đến cỡ lớn, ở phần bất kỳ của cơ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đầu gối, khuỷu tay, vùng thắt lưng, da đầu, và móng.

Theo phương án khác, rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh vảy nến lốm đốm. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp điều trị bệnh vảy nến lốm đốm bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh vảy nến lốm đốm bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh vảy nến lốm đốm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mảng ban đỏ hình giọt nước xếp như vảy trên, sau đó là nhiễm khuẩn, như bệnh nhiễm cầu khuẩn ở họng.

Theo phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh vảy nến ngược. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh vảy nến ngược (còn được gọi là bệnh vảy nến hăm và bệnh vảy nến uốn bong tróc) bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể khác, phương pháp phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh vảy nến ngược bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có

hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh vảy nến ngược bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vùng da thường ẩm bị đỏ và tây, không giống vảy liên quan đến bệnh vảy nến thể mảng, ở một hoặc nhiều bộ phận cơ thể sau: nách, háng, dưới vú, và và các phần da khác xung quanh cơ quan sinh dục ngoài và mông.

Theo phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh vảy nến mụn mủ. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh vảy nến mụn mủ bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp được mô tả theo sáng chế là để phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh vảy nến mụn mủ bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh vảy nến mụn mủ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chỗ phòng rộp chứa đầy mủ mà khác nhau về kích thước và vị trí, nhưng phần lớn là ở trên tay và chân.

Theo phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh vảy nến da đỏ toàn thân. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh vảy nến da đỏ toàn thân bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp được mô tả theo sáng chế là để phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh vảy nến da đỏ toàn thân bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh vảy nến da đỏ toàn thân bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, da nổi màu đỏ như lửa, lan rộng và theo thời kỳ và sự bong tróc vảy dạng tấm hơn là dạng mảnh nhỏ. Da nổi đỏ và bong tróc, thường kèm theo ngứa và đau dữ dội, tăng nhịp tim, và nhiệt độ cơ thể thay đổi bất thường.

Theo phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh viêm đa khớp dạng thấp. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh viêm đa khớp dạng thấp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp được mô tả theo sáng chế là để phòng ngừa hoặc điều trị một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh viêm đa khớp dạng thấp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh viêm đa khớp dạng thấp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mệt mỏi, mất cảm giác thèm ăn, sốt nhẹ, hạch bị sưng, thể trạng yếu, đau khớp nối cổ tay, khuỷu tay, vai, hông, đầu gối, mắt cá chân, ngón chân, quai hàm, tay, chân, các ngón tay, và/hoặc cổ, khó cử động vào buổi sáng, đau ngực khi hít thở (viêm màng phổi), nóng mắt, ngứa, và chảy mủ, bثور nhỏ dưới da, tê, cảm giác kim châm, hoặc nóng tay hoặc chân.

Theo phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh Crohn. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh Crohn bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp được mô tả theo sáng chế là để phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh Crohn bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh Crohn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đau bụng mềm (vùng bụng), sốt, mệt mỏi, mất cảm giác thèm ăn, đi ngoài có cảm giác đau (đau mót), dai dẳng, tiêu chảy nước, sụt cân, táo bón, viêm mắt, rò (thường là xung quanh khu vực trực tràng, có thể dẫn đến ra mủ, nước nhầy, hoặc phân), đau các khớp, sưng gan, loét miệng, chảy máu trực tràng và phân dính máu, các chổ sưng hoặc đau (loét) trên da, và sung lợi.

Theo phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được điều trị theo các phương

pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh viêm đốt sống dạng thấp. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh viêm đốt sống dạng thấp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp làm thuyên giảm hoặc phòng ngừa một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh viêm đốt sống dạng thấp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh viêm đốt sống dạng thấp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thường xuyên thấy đau và cứng ở phần lưng dưới và mông, gáy, và/hoặc cổ; và thấy đau và mềm ở vùng trái rộng từ xương vai, xương sườn, hông, đùi và tới gót chân; viêm mắt (viêm móng mắt và viêm màng mạch nhỏ), gây ra đỏ mắt, đau mắt, giảm thị lực, các vết mờ đục trước mắt và sợ ánh sáng; mệt mỏi; và buồn nôn.

Theo phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được điều trị theo các phương pháp được mô tả theo sáng chế là bệnh tiểu đường. Theo một phương án cụ thể, phương pháp điều trị bệnh tiểu đường bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, phương pháp làm thuyên giảm hoặc phòng ngừa một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh tiểu đường bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Các triệu chứng của bệnh tiểu đường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sụt cân, đi tiểu nhiều (đi tiểu thường xuyên), hay khát nước (cơn khát gia tăng), ăn nhiều (cơn đói gia tăng), bệnh tim mạch, bệnh võng mạc do tiểu đường, bệnh thần kinh do tiểu đường, tình trạng tăng thẩm thấu không nhiễm keton, và bệnh nhiễm axit keton do tiểu đường.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân đã được điều trị trước đó, hoặc hiện đang được điều trị bằng một hoặc nhiều liệu pháp khác.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có

nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân đã được điều trị trước đó, hoặc hiện đang được điều trị bằng một hoặc nhiều liệu pháp khác. Theo các phương án cụ thể khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân bị nghi ngờ là có sự kháng thuốc hoặc khó điều trị bằng liệu pháp kháng viêm.

Theo một số khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp tiêu diệt các tế bào T ở đối tượng cần điều trị, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng nêu trên sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp gây chết theo chương trình của tế bào T hoạt hoá ở đối tượng cần điều trị, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng nêu trên sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế hoặc được phẩm chứa chúng có thể được sử dụng theo phương pháp thích hợp bất kỳ cho đối tượng cần điều trị. Các ví dụ không làm giới hạn về các phương pháp sử dụng bao gồm tiêm truyền qua đường tĩnh mạch, tiêm dưới da hoặc cấy dưới da, phân phối qua đường trong cơ, trong nội tuỷ mạc, trong màng bụng, trong trực tràng, trong âm đạo, trong mũi, trong dạ dày, trong khí quản, hoặc trong phổi và/hoặc phương pháp khác bất kỳ để cung cấp cho cơ thể đã mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể hoặc được phẩm chứa chúng được sử dụng qua đường toàn thân (ví dụ, ngoài đường tiêu hoá) cho đối tượng cần điều trị. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc được phẩm chứa nó được sử dụng khu trú (ví dụ, trong khối u) cho đối tượng cần điều trị. Mỗi liệu có thể có hoặc có thể không được sử dụng qua một đường sử dụng giống nhau. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế có thể được sử dụng qua nhiều đường sử dụng đồng thời hoặc lần lượt với các liệu khác của kháng thể giống nhau hoặc khác nhau được mô tả ở đây.

Khi bệnh hoặc triệu chứng của nó, cần được điều trị, việc sử dụng kháng thể

hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể thường được thực hiện sau khi bệnh hoặc các triệu chứng của nó khởi phát. Khi triệu chứng của bệnh cần được phòng ngừa, việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể thường được thực hiện trước khi triệu chứng của bệnh khởi phát.

Liều dùng và tần suất sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế hoặc được phẩm chứa chúng được sử dụng theo các phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị trong khi làm giảm đến mức tối thiểu các tác dụng phụ. Liều dùng chính xác của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế để sử dụng cho đối tượng cụ thể hoặc được phẩm chứa chúng có thể được xác định bởi bác sĩ thực hành, dựa vào các yếu tố liên quan đến đối tượng cần điều trị. Các yếu tố có thể được tính đến bao gồm mức độ nặng của tình trạng bệnh, sức khỏe tổng thể của đối tượng, độ tuổi, và thể trọng của đối tượng, chế độ ăn uống, thời gian và tần suất sử dụng, (các) sự phối hợp với các chất hoặc được chất điều trị khác, sự miễn cảm với thuốc, và khả năng dung nạp/đáp ứng với liệu pháp. Liều dùng và tần suất sử dụng của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế hoặc được phẩm chứa chúng có thể được điều chỉnh theo thời gian để tạo ra mức đủ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, hoặc để duy trì hiệu quả mong muốn.

Liều chính xác để sử dụng trong chế phẩm cũng sẽ phụ thuộc vào đường sử dụng, và mức độ nặng của rối loạn hoặc bệnh viêm, và cần phải được quyết định theo đánh giá của bác sĩ thực hành và tùy theo tình trạng của mỗi bệnh nhân.

Các liều hữu hiệu có thể được ngoại suy từ đường cong đáp ứng liều thu được *in vitro* hoặc từ các hệ thử nghiệm trên mô hình động vật.

Theo một phương án, liều dùng của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây thường nằm trong khoảng từ 0,001 mg/kg đến 100 mg/kg thể trọng của bệnh nhân. Theo phương án khác, liều dùng thích hợp của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể là lượng có hiệu quả điều trị để phòng ngừa

và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây thường nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 100 mg/kg thể trọng bệnh nhân.

Theo các phương án cụ thể, “lượng hữu hiệu” của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây để chỉ lượng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây là đủ để đạt được ít nhất một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn trong số các hiệu quả sau đây: (i) làm giảm hoặc thuyên giảm mức độ nặng của bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây và/hoặc một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan tới nó; (ii) làm giảm thời gian có một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn hoặc bệnh được mô tả ở đây; (iii) phòng ngừa sự tái phát của bệnh hoặc rối loạn; (iv) sự suy giảm của bệnh hoặc rối loạn và/hoặc một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan tới nó; (v) làm giảm số lần điều trị ở bệnh viện của đối tượng; (vi) làm giảm tổng thời gian điều trị ở bệnh viện; (vii) làm tăng thời gian sống của đối tượng; (viii) ức chế sự tiến triển bệnh hoặc rối loạn và/hoặc một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan tới nó; (ix) nâng cao hoặc cải thiện hiệu quả điều trị của liệu pháp khác; (x) làm giảm hoặc loại trừ bệnh hoặc rối loạn; (xi) làm giảm tỷ lệ tử vong; (xii) làm giảm tỷ lệ phải điều trị ở bệnh viện; (xiii) phòng ngừa sự phát triển hoặc khởi phát của một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc rối loạn; và (xiv) nâng cao chất lượng cuộc sống như được đánh giá bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng các câu hỏi đánh giá. Theo một số phương án, khi được sử dụng trong bản mô tả này, “lượng hữu hiệu” để chỉ lượng kháng thể được mô tả theo sáng chế để thu được kết quả cụ thể được nêu trong phần mô tả chi tiết sáng chế nêu trên. Theo một số phương án nhất định, lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể nằm trong khoảng từ 0,01mg đến 1000mg.

Theo một số phương án, liều duy nhất của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế được sử dụng một hoặc nhiều lần cho bệnh nhân để phòng ngừa và/hoặc điều trị rối loạn hoặc bệnh được mô tả ở đây.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, hoặc được phẩm chứa chúng được sử dụng cho đối tượng theo các phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị rối loạn hoặc bệnh được nêu ở

đây theo các chu kỳ, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, hoặc được phẩm được sử dụng trong một khoảng thời gian, sau đó là khoảng thời gian nghỉ (nghĩa là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, hoặc được phẩm không được sử dụng trong một khoảng thời gian).

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được đề xuất ở đây có thể được sử dụng trước, đồng thời, hoặc sau khi sử dụng một hoặc nhiều liệu pháp bổ sung (ví dụ, các chất) để sử dụng trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị rối loạn hoặc bệnh được mô tả ở đây. Việc sử dụng thuật ngữ “kết hợp” không giới hạn thứ tự mà kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể và một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung được sử dụng cho đối tượng. Theo các phương án cụ thể, các liệu pháp này có thể được sử dụng liên tục hoặc theo từng đợt.

Theo phương án cụ thể khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây được sử dụng kết hợp với lượng của liệu pháp khác (ví dụ như, chất kháng viêm) để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây. Theo một phương án cụ thể, các liệu pháp kết hợp này có tác dụng hiệp đồng. Theo các phương án khác, sự kết hợp này có tác dụng bổ sung.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể và chất điều trị bổ sung cho phép sử dụng các liều dùng thấp hơn (ví dụ, các liều dưới mức tối ưu) của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể và/hoặc liệu pháp bổ sung và/hoặc tần suất sử dụng ít hơn của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây hoặc liệu pháp bổ sung cho đối tượng. Theo một số phương án nhất định, khả năng sử dụng các liều dùng thấp hơn của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây và/hoặc liệu pháp bổ sung và/hoặc để sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, hoặc liệu pháp bổ sung nêu trên với tần suất ít hơn làm giảm độc tính liên quan đến việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể, hoặc liệu pháp bổ sung nêu trên, tương ứng,

cho đối tượng mà không làm giảm hiệu quả của kháng thể hoặc của liệu pháp bổ sung nêu trên, tương ứng, trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị rối loạn hoặc bệnh được mô tả ở đây. Theo một số phương án, việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây kết hợp với liệu pháp bổ sung làm tăng hiệu quả của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế và/hoặc của liệu pháp bổ sung nêu trên trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị rối loạn hoặc bệnh được mô tả theo sáng chế. Theo một số phương án, việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế và một hoặc nhiều liệu pháp bổ sung tránh được hoặc làm giảm tác dụng phụ bất lợi hoặc không mong muốn liên quan đến việc sử dụng liệu pháp riêng rẽ bất kỳ.

Theo một phương án cụ thể, đối tượng được cho sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây là động vật (ví dụ, đối tượng là khỉ mặt chó hoặc người). Theo một phương án được ưu tiên, đối tượng được cho sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả ở đây là người. Theo một phương án cụ thể, đối tượng được cho sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể có một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây.

Các phương pháp trên cơ sở tế bào

Sáng chế đề xuất phương pháp gây hoặc làm tăng sự chết theo chương trình của tế bào biểu hiện PSGL-1 bao gồm bước cho tế bào này tiếp xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây. Theo một phương án, tế bào này là tế bào miễn dịch. Theo phương án cụ thể, tế bào này là tế bào T. Theo một phương án cụ thể hơn, tế bào này là tế bào T được hoạt hoá. Các phương pháp phát hiện sự chết theo chương trình của tế bào đã được mô tả trong lĩnh vực này và có thể được tiến hành một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo các phương án cụ thể, phương pháp gây ra hoặc làm tăng sự chết theo chương trình của tế bào T được hoạt hoá biểu hiện PSGL-1 bao gồm bước cho các tế bào này tiếp xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây, trong đó lượng hữu hiệu là lượng đủ để gây ra hoặc làm tăng sự chết theo chương trình của tế bào như

được đánh giá bằng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm hoặc ức chế sự sống của các tế bào biểu hiện PSGL-1 bao gồm bước cho tế bào này tiếp xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây. Theo một phương án, tế bào này là tế bào miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, tế bào này là tế bào T. Theo một phương án cụ thể hơn, tế bào này là tế bào T được hoạt hoá. Các thử nghiệm về sự sống của tế bào đã được mô tả trong lĩnh vực này và có thể được thực hiện một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, khả năng sống của tế bào có thể được đánh giá bằng cách sử dụng thuốc nhuộm màu xanh trypan hoặc các chất đánh dấu sự chết của tế bào khác (ví dụ, nhuộm màu bằng Anexin-5) hoặc các chất đánh dấu khả năng sống của tế bào (ví dụ, propidi iod hoặc loại trừ 7-AAD) đã biết trong lĩnh vực này. Theo các phương án cụ thể, phương pháp làm giảm hoặc ức chế sự sống của tế bào T được hoạt hoá biểu hiện PSGL-1 bao gồm bước cho các tế bào này tiếp xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây, trong đó lượng hữu hiệu này làm giảm hoặc ức chế sự sống của các tế bào này như được đánh giá bằng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, thử nghiệm loại trừ phẩm màu xanh trypan hoặc propidi iod hoặc loại trừ 7-AAD).

Kit

Sáng chế đề xuất gói hoặc kit được phẩm bao gồm một hoặc nhiều đồ chứa được nạp một hoặc nhiều thành phần của được phẩm được mô tả theo sáng chế, như kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được đề xuất ở đây. Tùy ý, liên quan đến (các) đồ chứa như vậy có thể có chú thích được thể hiện theo quy định bởi cơ quan nhà nước quản lý việc sản xuất, sử dụng hoặc bán các sản phẩm được hoặc sản phẩm sinh học, chú thích này cho thấy cơ quan nêu trên đã chấp thuận cho việc sản xuất, sử dụng hoặc bán sản phẩm này để sử dụng cho người.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kit bao gồm đồ chứa thứ nhất chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được

mô tả theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, kit bao gồm đồ chứa thứ nhất là lọ chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể nêu trên ở dạng bột vô khuẩn được đông khô nhanh trong chân không, và kit này còn có thêm đồ chứa thứ hai mà chứa chất lỏng được dụng.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất dụng cụ tiêm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, dụng cụ tiêm này chứa kháng thể trong dung dịch vô khuẩn. Theo một phương án cụ thể, dụng cụ tiêm được đề xuất theo sáng chế là bơm tiêm.

Sáng chế cũng đề xuất kit có thể được sử dụng trong các phương pháp nêu trên. Theo một phương án, kit chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể được mô tả theo sáng chế, tốt hơn là kháng thể được tinh chế, trong một hoặc nhiều đồ chứa. Theo một phương án cụ thể, kit được mô tả theo sáng chế chứa PSGL-1 gần như được phân lập làm đối chứng. Theo một phương án cụ thể khác, các kit được mô tả theo sáng chế còn chứa kháng thể đối chứng không phản ứng với PSGL-1. Theo phương án cụ thể khác, các kit được mô tả theo sáng chế chứa một hoặc nhiều thành phần để phát hiện sự gắn kết của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể với PSGL-1 (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể có thể được liên hợp với cơ chất phát hiện được như hợp chất phát huỳnh quang, cơ chất enzym, hợp chất có hoạt tính phóng xạ hoặc hợp chất phát quang, hoặc kháng thể thứ hai nhận biết kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể có thể được liên hợp với cơ chất có thể phát hiện). Theo các phương án cụ thể, kit này có thể bao gồm PSGL-1 được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp hoặc được tổng hợp bằng phương pháp hoá học. PSGL-1 được đề xuất trong kit này cũng có thể được gắn vào nền dạng rắn. Theo một phương án cụ thể hơn, các phương tiện phát hiện của kit được mô tả trên đây bao gồm nền dạng rắn mà PSGL-1 được gắn vào đó. Kit như vậy cũng có thể bao gồm kháng thể kháng kháng thể của người được đánh dấu bằng chất chỉ thị không được gắn kèm. Theo phương án này, sự gắn kết của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể với PSGL-1 có thể được phát hiện bằng sự gắn kết của kháng thể được

đánh dấu bằng chất chỉ thị nêu trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ trong phần này (ví dụ, phần mô tả chi tiết sáng chế) được đưa ra nhằm mục đích minh hoạ mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể đơn dòng kháng PSGL-1

Kháng thể h15A7 chứa vùng chuỗi nhẹ biến đổi và vùng chuỗi nặng biến đổi 15A7 được làm giống như của người được mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO 2005/110475, công bố ngày 24/11/2005, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó. Kháng thể h15A7 là kháng thể isotyp IgG4 có chuỗi nhẹ kiểu kappa. Đột biến Ser²²⁸ → Pro²²⁸ được đưa vào vùng bản lề của h15A7 bằng phương pháp PCR sử dụng các đoạn môi đột biến gen. Thể đột biến ở vùng bản lề của h15A7 tạo thành được gọi ở đây là 15A7H. Trình tự protein còn lại của 15A7H là giống với h15A7. Trình tự axit amin của 15A7H được thể hiện trên Fig.7A và Fig.7B và được thể hiện trong SEQ ID NO 1 và 2. Kháng thể mã hoá các trình tự gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đưa vào vector biểu hiện của tế bào có nhân điển hình thu được từ vector pAD-CMV1 (được mô tả trong Bảng độc quyền sáng chế châu Âu số EP 393 438).

15A7H được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Tóm lại, các vector biểu hiện tái tổ hợp ngoài mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 15A7H còn mã hoá lần lượt các chất đánh dấu chọn lọc dihydrofolat reductaza (DHFR) và neomycin phosphotransferaza, các vector này được đồng chuyển nhiễm vào huyền phù được thích ứng với tế bào chủ CHO-DG44. Sự chọn lọc các tế bào đã chuyển nhiễm ổn định diễn ra trong hai ngày sau khi chuyển nhiễm trong môi trường chọn lọc không chứa hypoxanthin/thymidin và bổ sung chất kháng sinh G418. Khi các tế bào được thu hồi từ sự chọn lọc ban đầu, sự khuếch đại gen trên cơ sở DHFR được tạo ra bằng cách bổ sung methotrexat. Bằng cách lắng phủ đơn bào, dòng tế bào sản sinh ra kháng thể đơn dòng bằng cách sử dụng tế bào chủ CHO-DG44 được phát triển đối với kháng thể 15A7H. Để tạo ra kháng thể 15A7H, các tế bào được cấy mở rộng để dùng làm nguyên liệu cấy vào

bình phản ứng sinh học để sản xuất. Bình phản ứng sinh học để sản xuất này được nuôi cấy theo mẻ trong khoảng thời gian từ 8 đến 14 ngày. Để hỗ trợ cho việc tạo ra kháng thể và kéo dài thời kỳ nuôi cấy tế bào, môi trường bổ sung chất dinh dưỡng được cho thêm vào trong giai đoạn sản xuất này. Canh thang của môi trường nuôi cấy tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm và lọc theo kiểu vuông góc để loại bỏ một cách hiệu quả tế bào, thu được dịch nuôi cấy không chứa tế bào (Cell free culture fluid: CCF) để tiếp tục tinh chế sản phẩm. Sau khi loại bỏ tế bào trong quá trình thu hoạch, protein được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực protein A và phương pháp sắc ký trao đổi anion và cation. Ngoài ra, có hai bước làm sạch virus chính, bước làm bất hoạt virus ở độ pH thấp và bước lọc nano để loại bỏ virus được thực hiện.

Độ tinh khiết của 15A7H được xác định bằng phương pháp điện di trên gel mao quản. Các mẫu được làm biến tính bằng SDS (natri dodecyl sulphat) và được tách theo kích thước trong mao quản được nạp chất đệm dạng gel có tác dụng làm môi trường sàng. Trong các mẫu được khử, các liên kết disulfua được khử bằng 2-mercaptoetanol, dẫn đến sự tách các đỉnh của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Trong các mẫu không được khử, iodoacetamid, chất alkyl hóa được thêm vào để tránh sự phân mảnh bất kỳ gây ra bởi việc chuẩn bị mẫu và để đảm bảo rằng đỉnh IgG chính vẫn không bị ảnh hưởng.

Các mẫu được bơm bằng phương pháp điện động học và các protein di chuyển được phát hiện bằng sự hấp thụ tia UV ở bước sóng 200 nm bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện UV. Đối với các mẫu được khử, tỷ lệ phần trăm diện tích được hiệu chỉnh theo thời gian (Time corrected area percents: TCA %) của tổng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (% LC+HC) được thông báo. Giá trị báo cáo được đối với các mẫu không được khử là giá trị TCA theo tỷ lệ % của đỉnh IgG chính.

Lượng thấp hơn của các phân tử nửa kháng thể được phát hiện bằng phương pháp điện di trên gel mao quản (Capillary gel electrophoresis: CGE) không được khử. (Fig.1) cho thấy rằng sự đột biến Ser²²⁸ → Pro²²⁸ làm giảm đáng kể sự tạo ra liên kết disulfua nội chuỗi trong vùng bản lề. Lượng các phân tử nửa kháng thể giảm đi khoảng từ 8 đến 10% đối với h15A7 xuống còn dưới 1% đối với 15A7H.

Chế phẩm chứa 15A7H được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6: Chế phẩm chứa 15A7H

Thành phần	Nồng độ [mmol/l]	Nồng độ [g/l]	Tác dụng của thành phần
Natri xitric dihydrat $C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$	9,1	2,676	Thành phần chất đệm
Natri clorua	150	8,766	Chất tạo đẳng trương
Polysorbat 80	----	0.2	Chất ổn định
Axit xitric monohydrat $C_6H_8O_7 \times H_2O$	0,9	0,189	Thành phần chất đệm
15A7H	0,267	40	Thành phần có hoạt tính
Nước dùng để tiêm (Water for injection: WFI)	----	Thêm WFI cho đủ dung tích cuối là 1,0 l	Dung môi

Độ pH của chế phẩm này là 6,0.

Ví dụ 2: Sự gắn kết của các kháng thể 15A7H trên tế bào T của người sơ cấp được hoạt hoá

15A7H được thử nghiệm về sự gắn kết trong các tế bào T CD4⁺ của người được hoạt hóa sơ cấp.

Nguyên liệu và phương pháp

Môi trường nuôi cấy tế bào và sự hoạt hoá tế bào T: Các tế bào T CD4⁺ của máu ngoại vi được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C với nồng độ 1×10^6 trong môi trường RPMI đầy đủ và được kích thích trong 2 ngày bằng cách cho thêm 20ug/ml PHA-L (Sigma, Catalog#L2769). Các tế bào được ủ trong từ bốn đến năm ngày nữa ở nhiệt độ 37°C với 20ng/ml IL-2 (R&D systems, Catalog #RD202-IL) để tạo ra “các tế bào T CD4⁺ được hoạt hoá”.

Thử nghiệm gắn kết tế bào: Các tế bào T CD4⁺ của người đã hoạt hoá được đếm và đàn mỏng với mật độ 1×10^5 tế bào/100µl dung dịch đệm FACS trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ và đáy hình chữ V (Falcon BD, Catalog # 353263) và được ủ trên

nước đá trong 30 phút.

Kháng thể isotyp IgG4 kháng lysozym, kháng thể h15A7 và 15A7H được pha loãng đến nồng độ 90ug/ml trong dung dịch đệm FACS trong đĩa pha loãng đáy tròn (Falcon, Catalog # 353077). Điều chế mười một chế phẩm mẫu kháng thể được pha loãng ba lần đối với mỗi kháng thể cho qua đĩa với nồng độ ban đầu là 30ug/ml.

Các mẫu bản sao tế bào được tạo viên và tái tạo hỗn dịch trong 100µl CUE mỗi dung dịch chứa kháng thể nêu trên với nồng độ ban đầu là 30µg/ml. Các tế bào được ủ trên nước đá trong 60 phút. Các tế bào được tạo viên và rửa bằng dung dịch đệm rửa sau khi bổ sung 100µl kháng thể tiếp hợp R-PE kháng Ig của người của kháng thể F(ab)₂ của dê thứ cấp được pha loãng. Kháng thể tiếp hợp R-PE kháng Ig của người của kháng thể F(ab)₂ của dê thứ cấp (BD Biosciences, Catalog # 554655; dung dịch gốc ở nồng độ 1,05mg/ml) đã được pha loãng trước đó bằng dung dịch đệm FACS với tỷ lệ 1:800, các tế bào này được ủ trên nước đá trong 30 phút trong bóng tối, sau đó được tạo viên và rửa hai lần bằng dung dịch đệm rửa. Các tế bào được tái tạo hỗn dịch trong 150µl dung dịch đệm rửa và được cố định bằng cách cho thêm 50µl dung dịch đệm cố định cytofix/Cytoperm BD (BD Biosciences, Catalog# 554655).

Các mẫu được phân tích trên thiết bị phân tích sinh học BD FACS Array. Bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng BD FACS Array, thu được khoảng 5000 sự kiện cho mỗi mẫu tế bào có cổng “tế bào lympho” được thiết lập theo SSC, FSC và sự phát huỳnh quang trung bình được xác định đối với mỗi mẫu.

Phân tích dữ liệu: Ái lực gắn kết của kháng thể IgG4, h15A7, 15A7H kháng lysozym với các tế bào T CD4⁺ hoạt hoá được xác định bằng cách vẽ đồ thị nồng độ kháng thể theo chỉ số phát huỳnh quang trung bình (Mean fluorescence index: MFI) đối với mỗi bản sao mẫu bằng cách sử dụng XLfit (mô hình: một vị trí đáp ứng liều, 205). Các giá trị EC₅₀ được xác định đối với mỗi đường cong gắn kết.

Kết quả:

Sự gắn kết với tế bào T của người được hoạt hoá: Bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng, sự gắn kết của 15A7H với các tế bào T CD4⁺ của người hoạt hoá được xác định. Fig.2 cho thấy rằng 15A7H đã được gắn kết với

giá trị EC50 là 0,22 nM.

Số liệu về sự gắn kết tập hợp từ nhiều người cho thấy rằng 15A7H đã gắn kết với các tế bào T CD4+ hoạt hoá với giá trị EC50 trung bình là 0,22 $\pm$ 0,02. Các giá trị EC50 từ 4 người cho được sử dụng để tính giá trị trung bình $\pm$ SEM. Kháng thể h15A7 được thử nghiệm trong cùng các điều kiện và gắn kết với các tế bào T CD4+ được hoạt hoá với giá trị EC50 trung bình là 0,27 $\pm$ 0,05. Do đó, 15A7H và h15A7 đã cho thấy mức độ gắn kết tương đương với các tế bào T được hoạt hoá (xem bảng 7).

Bảng 7: thử nghiệm sự gắn kết với các tế bào T CD4+ được hoạt hoá.

EC50 (nM)	Giá trị trung bình $\pm$ SEM
15A7H	0,22 $\pm$ 0,02
h15A7	0,27 $\pm$ 0,05

Ví dụ 3: Hoạt tính *in-vivo* của 15A7H ở người

mô hình chuột quá mẫn cảm kiểu chậm *trans-vivo*

15A7H được thử nghiệm trong mô hình quá mẫn cảm kiểu chậm *trans-vivo* (delayed-type hypersensitivity: DTH) ở chuột cái giống C57BL/6. Các liều của kháng thể 15A7H bằng 0,03, 0,10, 0,3, 1 và 10 mg/kg trong dung dịch đệm của chế phẩm được sử dụng qua đường trong ổ màng bụng. Kháng thể h15A7 được thử nghiệm trong cùng điều kiện.

Nguyên liệu và phương pháp

Thử nghiệm *Trans Vivo*: Chuột cái giống C57BL/6 được mua từ Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, Ấn Độ) từ 6 đến 8 tuần tuổi và được sử dụng trong vòng bốn tuần kể từ khi mua về. Tất cả các con chuột này được nhốt trong môi trường không chứa mầm bệnh, và được điều trị theo hướng dẫn của NIH. Tất cả các thử nghiệm trên động vật được xem xét và phê chuẩn bởi Ủy ban sử dụng và chăm sóc động vật (Institutional Animal Care và Use Committee: IACUC) và được tiến hành tuân theo hướng dẫn của NIH, "Guiding Principles for Research Involving Animals và Human Beings".

Mẫu máu được lấy bằng cách chọc tĩnh mạch của người cho bình thường đã được biết là người đáp ứng tốt đối với bệnh uốn ván. 100ml máu toàn phần được

hút vào các ống Vacutainer CPT (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) và ly tâm ở lực ly tâm biểu kiến là 1800 (Round centrifugal force: RCF) trong 30 phút. Lốp đệm chứa các tế bào đơn nhân đo và tiểu cầu được tách, rửa ba lần, và được tái tạo hỗn dịch trong nước muối đệm phosphat (PBS) và được đếm. Mức độ tập chất tiểu cầu được làm giảm đến mức tối thiểu bằng cách rửa nhiều lần bằng PBS. Tỷ lệ giữa các tiểu cầu và PBMC không được lớn hơn 1:1. Các tế bào này được tiêm ngay vào gan bàn chân chuột.

Giải độc tố uốn ván hấp phụ nhôm sulphat (TT-Tetguard) được sử dụng với nồng độ 0,25 Lf cho mỗi vị trí tiêm (đơn vị Lf là giá trị kết bông, lượng giải độc tố mà khi được trộn với một đơn vị quốc tế của kháng độc tố sẽ tạo ra một hỗn hợp kết bông tối ưu).

7-10 $\times 10^6$ PBMC được trộn với 0,25 đơn vị Lf của TT trong tổng thể tích 50 μ l, được tiêm vào gan bàn chân sau của chuột. Độ dày gan bàn chân được xác định trước khi tiêm và sau khi tiêm 24 giờ, bằng cách sử dụng dụng cụ đo độ dày kiểu quay (Mitutoyo, Aurora, IL). Lấy giá trị độ dày sau khi tiêm 24 giờ trừ đi giá trị độ dày trước khi tiêm để thu được mức độ thay đổi độ dày chân. Tất cả các giá trị được tính theo inơ (2,54mm).

Thử nghiệm kháng thể 15A7H và h15A7: 15A7H và h15A7 (10mg/ml) được hoà tan trong chất dẫn thuốc chứa 25mM natri xitric và 115mM natri clorua với 0,04% Tween 80, độ pH = 5,97. Chuột được tiêm qua đường trong màng bụng 0,2ml chất dẫn thuốc hoặc 15A7H hoặc h15A7 với liều 0,03, 0,1, 0,3, 1, và 10mg/kg, một giờ trước khi chuột được tiêm vào gan bàn chân PBMC có hoặc không có TT. Mỗi liều kháng thể 15A7H và h15A7 được thử nghiệm về nồng độ tế bào PBMC từ bốn người cho khác nhau và sử dụng một chuột cho mỗi lần điều trị của một người cho. Các nhóm được điều trị bằng kháng thể 15A7H và h15A7 được so sánh với nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc.

Các số liệu thống kê: Tất cả các giá trị được thông báo dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM trừ khi được chỉ rõ theo cách khác. Sự thay đổi độ dày gan bàn chân của nhóm được điều trị bằng chất được so sánh với nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Độ dày bàn chân theo delta từ 4 thử nghiệm của người cho riêng biệt được cộng gộp và tính giá trị trung bình $\pm$ SEM. Tỷ lệ phần trăm mức độ

ức chế độ dày của chân được tính như sau: $100 \times (\Delta \text{ độ dày chân}_{\text{chất dẫn thuốc}} - \Delta \text{ độ dày chân}_{\text{được chất}}) / (\Delta \text{ độ dày chân}_{\text{chất dẫn thuốc}} - \Delta \text{ độ dày chân}_{\text{PBMc}})$. Mức có ý nghĩa của hiệu quả ức chế được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều (ANOVA) Kruskal-Wallis theo đây. Giá trị p nhỏ hơn 0,05 được cho là có ý nghĩa thống kê.

Nồng độ 15A7H và h15A7 trong huyết tương của chuột C57BL/6: Chuột cái giống C57BL/6 được tiêm 15A7H và h15A7 qua đường trong màng bụng với liều 0,03, 0,1, 0,3, 1, và 10mg/kg. Nồng độ 15A7H và h15A7 trong huyết tương được xác định ở thời điểm 24 giờ sau khi tiêm. Các mẫu huyết tương được thu thập từ động vật thử nghiệm DTH *trans-vivo* vào lúc kết thúc thử nghiệm. Tiến hành phân tích sinh học đối với tất cả các mẫu này.

Nghiên cứu được động học đi kèm với 15A7H: Chuột cái giống C57BL/6 đi kèm đã được cho sử dụng 15A7H qua đường trong màng bụng (với cùng mức liều như trên đây) được sử dụng để thu thập dữ liệu chi tiết hơn về nồng độ của 15A7H trong huyết tương. Các con chuột này không được điều trị bằng PBMC của người hoặc giải độc tố uốn ván. Các thời điểm lấy mẫu đối với các chuột "PK" này là 1, 3, 5, và 24 giờ sau khi chuột được cho sử dụng kháng thể. Mỗi nhóm chuột PK sử dụng liều gồm 6 con. Trong mỗi nhóm sử dụng liều, nhóm phụ gồm 3 con chuột được sử dụng để lấy mẫu ở thời điểm 1 giờ và 5 giờ, và nhóm phụ còn lại gồm 3 chuột được sử dụng để lấy mẫu ở thời điểm 3 giờ và 24 giờ.

Phân tích sinh học đối với h15A7 và 15A7H: Thử nghiệm ELISA kiểu bánh mì kẹp sandwich được sử dụng để định lượng nồng độ h15A7 hoặc 15A7H trong huyết tương của chuột. Tóm lại, các đĩa vi chuẩn có 96 lỗ đã phủ PSGL-1 được sử dụng để gắn kết với h15A7 hoặc 15A7H trong các mẫu huyết tương đã được pha loãng. Sau khi rửa, h15A7 hoặc 15A7H đã gắn kết được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG₄ của người đơn dòng được đánh dấu bằng biotin và enzym streptavidin được đánh dấu bằng (HRP). Lượng sản phẩm có màu được tạo ra trong quá trình phản ứng với cơ chất được xác định bằng phương pháp trắc quang và tăng lên cùng với sự tăng nồng độ của h15A7 hoặc 15A7H trong mẫu này. Nồng độ h15A7 hoặc 15A7H tương ứng với sự hấp thụ quang đo xác định được tính bằng cách làm khớp đường cong của chất chuẩn không tuyến tính. Khoảng hiệu chỉnh các mẫu

nằm trong khoảng từ 0,04 đến 1,2ng/ml. Các mẫu được pha loãng theo tỷ lệ ít nhất là 1:100. Do đó, giới hạn dưới của sự định lượng h15A7 hoặc 15A7H trong huyết tương toàn phần là 4 ng/ml. Bằng cách sử dụng các hệ số pha loãng cao hơn, giới hạn của sự định lượng có thể gia tăng lên tới 2,4 mg/ml (1:2000000).

Do sự khác biệt nhỏ về khả năng phản ứng của nguyên liệu tham chiếu của h15A7 và 15A7H trong thử nghiệm ELISA, hai đường cong hiệu chỉnh và hai tập hợp mẫu đối chứng chất lượng được sử dụng. Các mẫu lấy từ các động vật được điều trị bằng h15A7 được phân tích theo đường cong hiệu chỉnh của h15A7, và các mẫu lấy từ các con động vật được điều trị bằng 15A7H được phân tích theo đường cong hiệu chỉnh của 15A7H.

Kết quả

DTH *trans vivo*: Fig.3 thể hiện mức độ đáp ứng liều được cộng gộp của kháng thể 15A7H trong mô hình DTH *trans vivo* trong PBMC của 4 người cho như được thể hiện bằng tỷ lệ % mức độ của DTH sau khi điều trị bằng 15A7H. Khi chuột được sử dụng kháng thể qua đường trong màng bụng ở thời điểm 1 giờ, với liều 0,03, 0,1, 0,3, 1, và 10 mg/kg, cả h15A7 và 15A7H đều ức chế DTH *trans vivo* theo cách phụ thuộc liều. Bảng 8 cho thấy mức độ đáp ứng liều và tỷ lệ phần trăm ức chế DTH *trans-vivo* của 15A7H và h15A7. Một liều duy nhất 15A7H hoặc h15A7 bằng 0,3mg/kg và cao hơn, cho thấy sự ức chế có ý nghĩa đối với DTH *trans vivo*. Giá trị ED₅₀ đối với h15A7 và 15A7H trong thử nghiệm này lần lượt là 0,09 và 0,1 mg/kg, n = 4 người cho.

Bảng 8: Mức độ đáp ứng liều và mức độ ức chế theo tỷ lệ % DTH *trans-vivo*

Delta (inσ)		Giá trị trung bình	SEM	n
	PBMC	0,0005	0,0000	4
	Chất dẫn thuốc	0,0090	0,0010	4
	h15A7 0,03mg/kg	0,0061	0,0007	4
	h15A7 0,1mg/kg	0,0047	0,0008	4

	h15A7 0,3mg/kg	0,0033	0,0006	4
	h15A7 1mg/kg	0,0018	0,0003	4
	h15A7 10 mg/kg	0,0009	0,0001	4
	15A7H 0,03mg/kg	0,0060	0,0007	4
	15A7H 0,1mg/kg	0,0049	0,0006	4
	15A7H 0,3mg/kg	0,0040	0,0010	4
	15A7H mg/kg	0,0024	0,0006	4
	15A7H 10 mg/kg	0,0012	0,0004	4
Mức độ ức chế theo tỷ lệ %				
	Chất dẫn thuốc	0,00	0,00	4
	h15A7 0,03mg/kg	33,31	6,67	4
	h15A7 0,1mg/kg	51,02	2,52	4
	h15A7 0,3mg/kg	67,83	4,26	4
	h15A7 1mg/kg	85,14	3,17	4
	h15A7 10mg/kg	95,43	1,41	4

	15A7H 0,03mg/kg	35,56	3,25	4
	15A7H 0,1mg/kg	47,95	2,88	4
	15A7H 0,3mg/kg	61,20	5,62	4
	15A7H 1mg/kg	79,15	5,19	4
	15A7H 10mg/kg	91,32	4,94	4

Nồng độ của các hợp chất trong huyết tương: Nồng độ 15A7H trong huyết tương đối với cả chuột PK và chuột DTH được tóm tắt trên hình Fig.5. Fig.4 thể hiện các nồng độ cộng gộp sau 24 giờ của 15A7H trong huyết tương được vẽ đồ thị theo tỷ lệ % ức chế DTH. Cần lưu ý rằng các nồng độ trung bình ở thời điểm 24 giờ sau khi sử dụng kháng thể đối với chuột PK và chuột DTH ở mức liều lượng đã cho là rất giống nhau. Điều này gợi ý rằng mặc dù chuột PK và chuột DTH được điều trị khác nhau (chỉ chuột DTH được điều trị bằng PBMC và giải độc tố uốn ván), dược động học của 15A7H trong hai trường hợp này rất giống nhau. Nồng độ của cả h15A7 và 15A7H trong huyết tương chỉ thay đổi trong khoảng khá hẹp trong quá trình nghiên cứu (các giá trị nồng độ xác định giữa thời điểm 1 giờ và 24 giờ sau khi sử dụng liều).

PK-PD (Dược động học-dược lực học): Bảng 9 và bảng 10 thể hiện nồng độ của các kháng thể h15A7 và 15A7H trong huyết tương sau hai mươi bốn giờ (PK) và tỷ lệ phần trăm ức chế DTH *trans- vivo* tương ứng (PD) ở cùng liều. Fig.4 thể hiện kết quả so sánh mối quan hệ giữa PK-PD của 15A7H trong mô hình DTH *trans- vivo*. ED₅₀ đối với h15A7 và 15A7H tính được tương ứng là 687 và 770 ng/ml, n = 4 người cho.

Bảng 9: Mối quan hệ PK-PD trong mô hình DTH *trans- vivo*

(A) Dược động học (PK) ng/ml			
Liều h15A7 mg/kg, dùng qua đường trong màng bụng	Giá trị trung bình	SEM	n
0,03	111	12	4
0,1	618	64	4
0,3	2320	172	4
1	9355	642	4
10	67668	23686	4
(B) Dược lực học (PD) tỷ lệ % ức chế			
Liều h15A7 mg/kg, dùng qua đường trong màng bụng.	Giá trị trung bình	SEM	n
0,03	33	7	4
0,1	51	3	4
0,3	68	4	4
1	85	3	4
10	95	1	4

Bảng 10: Mối quan hệ PK-PD trong mô hình DTH *trans- vivo*.

(A) Dược động học (PK) ng/ml			
Liều lượng 15A7H mg/kg, dùng qua đường trong màng bụng	Giá trị trung bình	SEM	n
0,03	228	20	4
0,1	708	79	4
0,3	1968	228	4
1	6163	469	4
10	54725	13612	4
(B) Dược lực học (PD) tỷ lệ % ức chế			
Liều lượng 15A7H	Giá trị	SEM	n

mg/kg, dùng ở màng bụng	trung bình		
0,03	36	3	4
0,1	48	3	4
0,3	61	6	4
1	79	5	4
10	91	5	4

Kết luận

Một liều duy nhất của 15A7H hoặc h15A7 bằng 0,3mg/kg và cao hơn, cho thấy tỷ lệ phần trăm mức độ ức chế có ý nghĩa của DTH *trans vivo*. ED₅₀ đối với h15A7 và 15A7H trong thử nghiệm DTH *trans-vivo* lần lượt là 0,09 và 0,1 mg/kg. Các nồng độ trong huyết tương của cả h15A7 và 15A7H chỉ thay đổi trong khoảng khá hẹp trong quá trình nghiên cứu.

Ví dụ 4: Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)

Với nỗ lực nhằm xác định xem liệu 15A7H có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (Complement-Dependent Cytotoxicity: CDC) hay không, các thử nghiệm giải phóng lactat dehydrogenaza được sử dụng để xác định hoạt tính CDC ở nhiều nồng độ khác nhau.

Nguyên liệu và phương pháp

Các tế bào Ramos (thu được từ ATCC; cat# CRL-1596) được dùng làm các tế bào đích và được nuôi cấy trong môi trường DMEM hoàn toàn (Invitrogen, Carlsbad, CA; Catalog số 11995) chứa 0,5 mg/ml Gentamicin (Invitrogen, Carlsbad, CA; Catalog số 10131). Bổ thể của thỏ được sử dụng làm nguồn protein bổ thể (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY; catalog số: AIC4000-1). Môi trường gây độc tế bào Cedarlane (Cedarlane Cytotoxicity medium: Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY; Catalog Number: CL95100) được sử dụng làm môi trường thử nghiệm.

Hoạt tính CDC được xác định theo sự giải phóng LDH của các tế bào đích, bằng cách sử dụng kit phát hiện độc tính tế bào (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) của Roche Applied Science, Indianapolis, IN; Catalog số: 04 744 934 001).

Kháng thể của chuột kháng CD20 của người được tinh chế từ tế bào lai 1F5 (ATCC, Birmingham, AL; Catalog số: 6140-01) được sử dụng để hoạt hóa bổ thể làm kháng thể đối chứng dương trong thử nghiệm này. IgG4 κ của người (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Catalog số: I4639) được sử dụng được sử dụng làm đối chứng isotyp. Các mẫu và mẫu đối chứng được thiết lập như sau (tất cả các mẫu đều có bản sao):

- Các mẫu: 100μl bổ thể của thỏ chuẩn (được pha loãng bằng môi trường thử nghiệm theo tỷ lệ 1:6) + 50μl tế bào đích (các tế bào Ramos trong môi trường thử nghiệm) + 50μl dung dịch pha loãng kháng thể
- Đối chứng cơ sở: 200μl môi trường thử nghiệm.
- Đối chứng giải phóng tối đa: 50μl tế bào đích + 100μl bổ thể của thỏ chuẩn + 50μl môi trường thử nghiệm.
- Đối chứng giải phóng tự nhiên: 50μl tế bào đích + 100μl bổ thể của thỏ chuẩn + 50μl môi trường thử nghiệm.

Đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong máy ủ ẩm và giàu CO₂ trong 3 giờ. 30 phút trước khi kết thúc ủ (sau 2,5 giờ ủ), 10μl dung dịch phân giải (có trong kit phát hiện độc tính tế bào (Cytotoxicity Detection Kit)) được cho thêm vào mẫu đối chứng giải phóng tối đa. Khi kết thúc ủ, đĩa này được ly tâm với vận tốc 200g trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, và 100μl dịch nổi bề mặt không chứa tế bào được chuyển vào các lỗ tương ứng của đĩa có 96 lỗ dạng đáy phẳng để phát hiện LDH. 100μl hỗn hợp phản ứng (có trong Kit phát hiện độc tính tế bào) được cho thêm vào mỗi lỗ và đĩa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian từ 15 đến 30 phút trong bóng tối. Khi kết thúc lần ủ thứ hai, phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung 50μl dung dịch làm ngừng phản ứng (có trong Kit phát hiện độc tính tế bào). Hệ số hấp thụ được xác định ở bước sóng nằm trong khoảng từ 490 đến 492nm trong đầu đọc đĩa SpectraMAX Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Tỷ lệ % CDC được tính như sau:
$$\frac{[\text{kháng thể tạo ra sự giải phóng}] - [\text{kháng thể đối chứng giải phóng tự nhiên}]}{([\text{sự giải phóng tối đa}] - [\text{kháng thể đối chứng giải phóng tự nhiên}])} \times 100\%$$

Kết quả

Hoạt tính CDC của 15A7H được thử nghiệm trong các điều kiện được tối ưu

hóa đối với mức độ đáp ứng với CDC của kháng thể kháng CD20 với các tế bào Ramos. Như được thể hiện trên Fig.6 và trong bảng 11, các nồng độ khác nhau của các kháng thể với dung dịch pha loãng bỏ thể được cố định theo tỉ lệ 1:12 được thử nghiệm về hoạt tính CDC. Không phát hiện được hoạt tính của CDC đối với 15A7H, h15A7 hoặc đối chứng âm IgG4. Kháng thể của chuột kháng CD20 của người cho thấy có đáp ứng liều với kháng thể rõ ràng.

Bảng 11: Tỷ lệ phần trăm hoạt tính CDC của 15A7H ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ kháng thể ($\mu\text{g/ml}$)	h15A7	IgG4 Kappa	kháng thể của chuột kháng CD20	15A7H
5	1,54	-0,87	na	-0,45
0,5	4,25	0,50	68,26	-0,15
0,05	0,84	3,22	59,60	-2,59
0,005	2,08	3,29	31,42	-1,37
0,0005	na	na	6,77	na

Kết luận

Kháng thể 15A7H không có hoạt tính CDC cho tới nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$ ở tỷ lệ pha loãng bỏ trợ 1:12 trong các thử nghiệm được tiến hành với các tế bào Ramos.

Ví dụ 5: Nghiên cứu lâm sàng

Các đối tượng được cho sử dụng kháng thể 15A7H qua đường trong tĩnh mạch với các liều đơn tăng dần 125 $\mu\text{g/kg}$, 500 $\mu\text{g/kg}$, 1000 $\mu\text{g/kg}$ và 2000 $\mu\text{g/kg}$ và các đối tượng khác được cho sử dụng qua đường dưới da với liều 500 $\mu\text{g/kg}$ và 1000 $\mu\text{g/kg}$. Việc sử dụng liều được làm thích ứng. Kháng thể 15A7H được tái tạo hỗn dịch trong chế phẩm được mô tả trong bảng 6 được sử dụng. Sau khi sử dụng, các thử nghiệm lâm sàng trong phòng thử nghiệm (ví dụ, huyết học, phân tích nước tiểu và phân tích hóa học lâm sàng) được thực hiện, ví dụ trên cơ sở hàng tuần, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các thông số được động học cũng được xác định, ví dụ, trên cơ sở hàng tuần, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Tất cả các tài liệu công bố, Bằng độc quyền sáng chế, và công bố đơn đăng ký sáng chế trích dẫn trong bản mô tả này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng với phạm vi giống như mỗi tài liệu công bố hoặc đơn đăng ký sáng chế được chỉ ra cụ thể và riêng biệt là được đưa vào để tham khảo. Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết theo cách minh họa và ví dụ nhằm hiểu rõ hơn về sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, với các kỹ thuật được bộc lộ trong sáng chế, sẽ biết rõ rằng một số thay đổi và cải biến nhất định có thể được tạo ra mà không nằm ngoài phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với phối tử P-selectin glycoprotein 1 (P-selectin glycoprotein ligand-1: PSGL-1) của người, trong đó kháng thể này chứa:
 - (i) vùng chuỗi nhẹ biến đổi (“variable light: VL”) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3;
 - (ii) chuỗi nặng chứa vùng chuỗi nặng biến đổi (“variable heavy: VH”) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; và
 - (iii) vùng ổn định IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin thành Prolin ở axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU.

2. Kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người, trong đó kháng thể này chứa:
 - (i) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1; và
 - (ii) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

3. Kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người, trong đó kháng thể này chứa:
 - (i) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2; và
 - (ii) chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

4. Kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với PSGL-1 của người, trong đó kháng thể này chứa:
 - (i) chuỗi nặng chứa vùng chuỗi VH có chứa vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 8, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 9, và vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 10;
 - (ii) chuỗi nhẹ chứa vùng chuỗi VL có chứa vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 5, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 6, và vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 7; và
 - (iii) vùng ổn định chuỗi nặng IgG4 của người có sự thay thế axit amin Serin

thành Prolin ở axit amin 228 của chuỗi nặng được đánh số theo chỉ số EU.

5. Kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này được tinh chế.
6. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và chất mang dược dụng.
7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó kháng thể đơn dòng được tinh chế.
8. Kit bao gồm đồ chứa thứ nhất chứa kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
9. Dụng cụ tiêm chứa kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
10. Dụng cụ tiêm theo điểm 9, trong đó dụng cụ tiêm này là bơm tiêm.
11. Dược phẩm để điều trị rối loạn viêm hoặc bệnh mô ghép chống túc chủ hoặc tình trạng thải bỏ mô ghép, trong đó dược phẩm này chứa lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 hoặc dược phẩm theo điểm 6 hoặc 7.

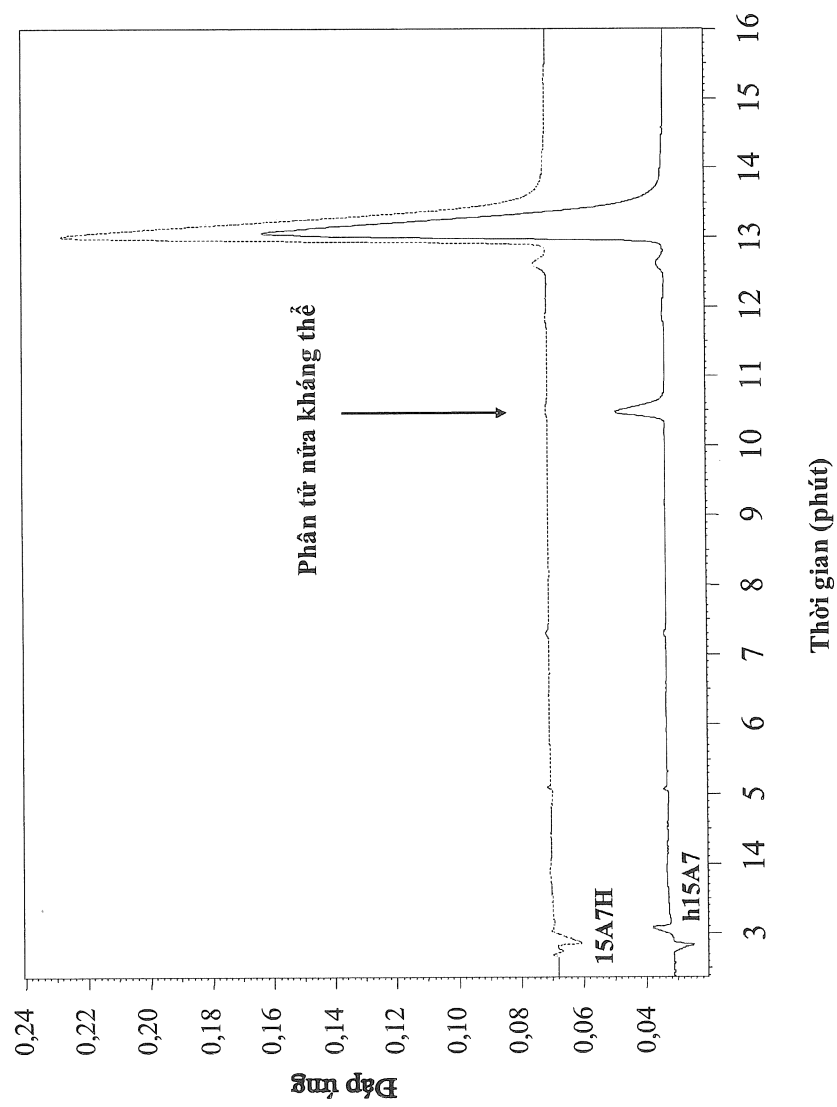


FIG. 1

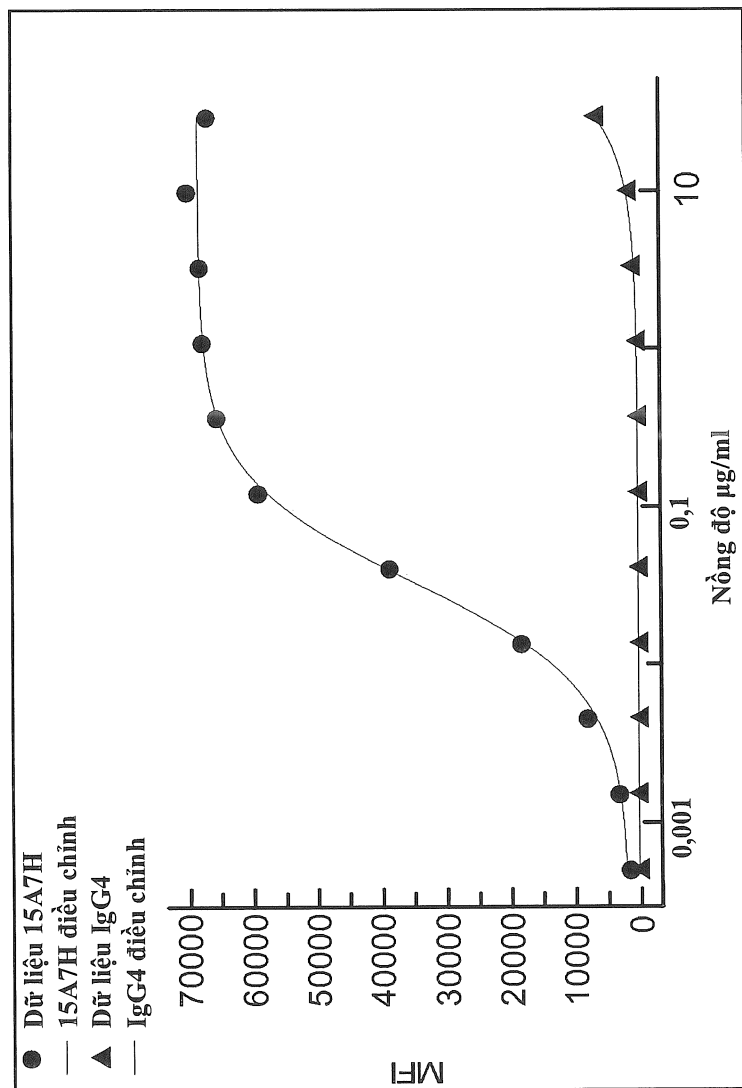
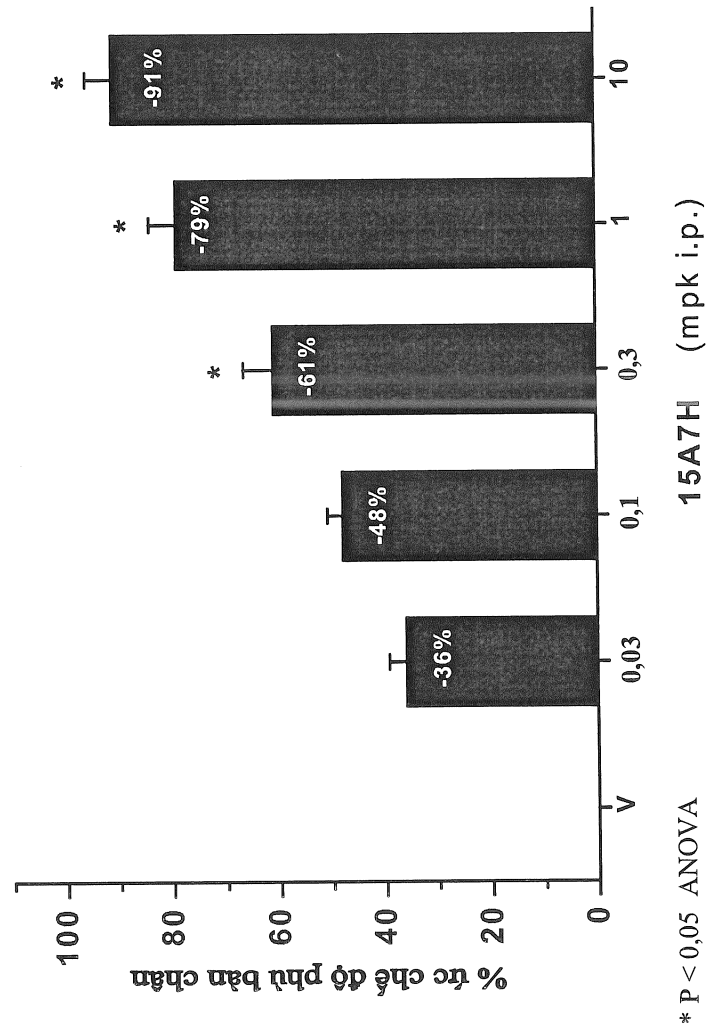


FIG.2

3/7

FIG. 3

n = 4 người cho



4/7

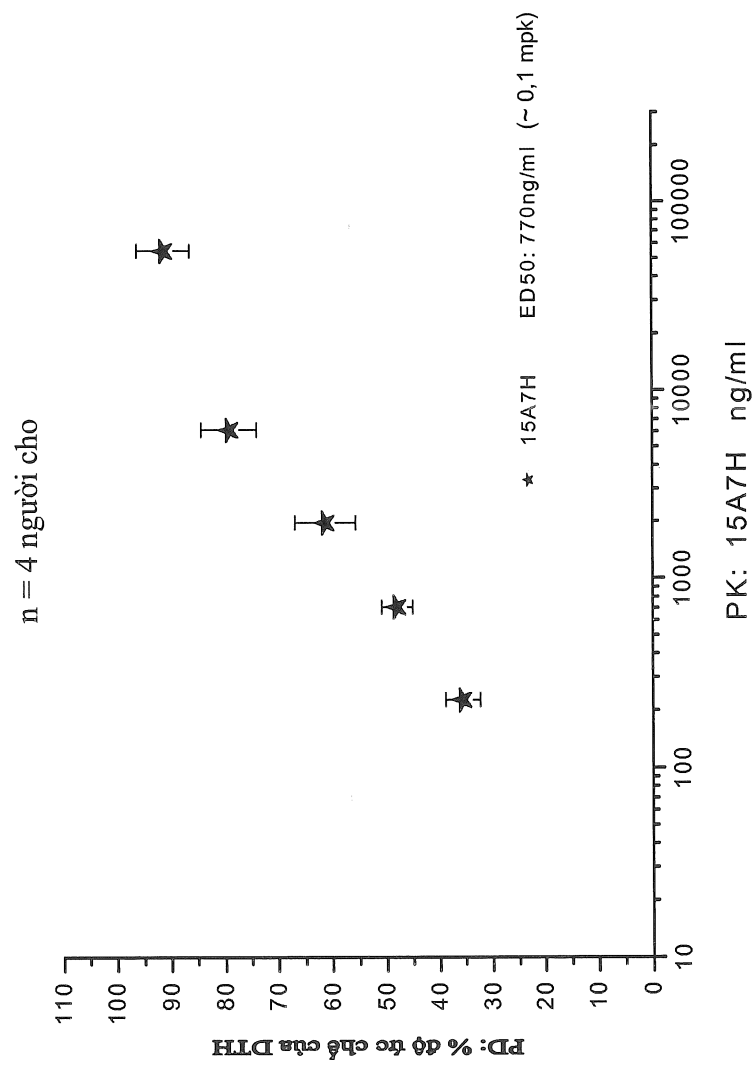


FIG. 4

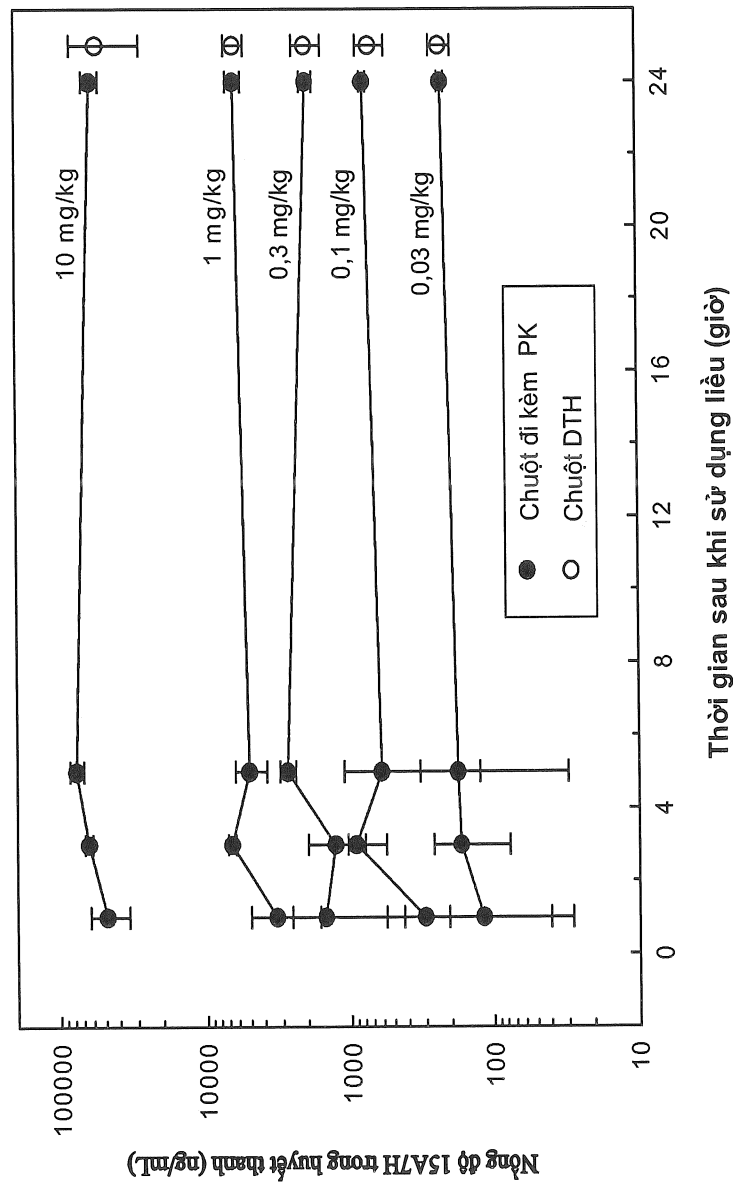


FIG. 5

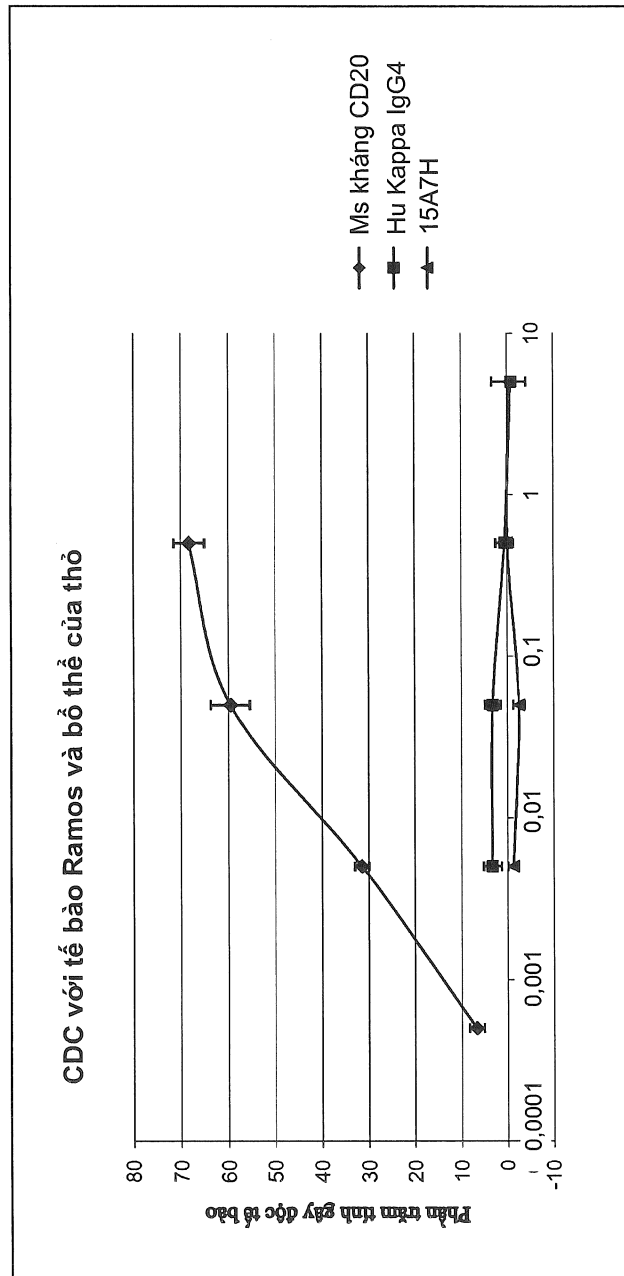


Fig.6

7/7

A. Chuỗi nặng

```

      {(vùng biến đổi)          FR1          CDR1          FR2
1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
      CDR2          FR3
51  INGGSTIFY ANAVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARYA
      CDR3          FR4      }{
101 SYGGGAMYW GQGTLLTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK

151 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT
      (Vùng bản lề)
201 YTCNVDHKPS NTKVDKRV ES KYGPPCPFCP A PEFLGGPSV FLFPPKPKDT
      (Vùng ổn định)
251 LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY

301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT

351 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
      }
401 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK

```

B. Chuỗi nhẹ

```

      {          FR1 (vùng biến đổi)          CDR1          FR2
1  DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HNDGNTYFEW YQQKPGKAPK
      CDR2          FR3          CDR3
51  LLIIYKVSNRFSGVPSRFSGS GSGTHFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSYVP
      FR4      }
101 LTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
      (vùng ổn định)
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
      }
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

FIG. 7A - 7B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> AbGenomics Cooperatief U.A.
 BASSARAB, Stefan
 ENENKEL, Barbara
 GARIDEL, Patrick
 SCHOTT, Heidrun
 SINGH, Sanjaya
 LITZENBURGER, Tobias
- <120> KHÁNG THỂ KHÁNG PHỐI TỬ P-SELECTIN GLYCOPROTEIN 1,
 KIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỮA KHÁNG THỂ NÀY
- <130> A0871.70004W000
- <140> N/A
 <141> 2012-06-11
- <150> US 61/496249
 <151> 2011-06-13
- <160> 21
- <170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0
- <210> 1
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ 15A7H
- <400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Asn
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser Tyr Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 2
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nặng 15A7H

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Asn Gly Gly Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asn Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

```

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
    275                280                285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                295                300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
    305                310                315                320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
    325                330                335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    340                345                350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
    355                360                365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                375                380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
    385                390                395                400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
    405                410                415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    420                425                430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
    435                440                445

```

<210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL)15A7H

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) 15A7H

<400> 4

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Tyr	Ile	Asn	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ala	Asn	Ala	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng CDR1 VL 15A7H

<400> 5

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Asn	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Phe	Glu
1				5					10					15	

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng CDR2 VL 15A7H

<400> 6

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng CDR3 VL 15A7H

<400> 7

Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng CDR1 VH 15A7H

<400> 8

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng CDR2 VH 15A7H

<400> 9

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

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng CDR3 VH 15A7H

<400> 10

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

<210> 11

<211> 412

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự axit amin PSGL-1 của người có chiều dài đầy đủ

<400> 11

```

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
 1           5           10           15
Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
 20           25           30
Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr
 35           40           45
Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg
 50           55           60
Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser
 65           70           75           80
Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly
 85           90           95
Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu
100          105          110
Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala
115          120          125
Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Val Pro Thr Glu Ala Gln Thr Thr
130          135          140
Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Arg Leu Thr Ala Thr Glu
145          150          155          160
Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro
165          170          175
Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Gly Leu Glu Ala Gln
180          185          190
Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala
195          200          205
Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr
210          215          220
Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Glu Ala Thr Glu
225          230          235          240
Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu
245          250          255
Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro Ser Ala Thr Glu Ala Leu
260          265          270
Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu Phe Ile Pro Phe Ser Val
275          280          285
Ser Ser Val Thr His Lys Gly Ile Pro Met Ala Ala Ser Asn Leu Ser
290          295          300
Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His Ile Ser Val Lys Gln Cys
305          310          315          320
Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val Ala Thr Ile Phe Phe Val
325          330          335
Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr
340          345          350
Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu
355          360          365
Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu
370          375          380
Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg
385          390          395          400

```

Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe Leu Pro
 405 410

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin vùng bản lề IgG4

<400> 12
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> FR1 VL 15A7H

<400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> FR2 VL 15A7H

<400> 14
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> FR3 VL 15A7H

<400> 15

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	His	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FR4 VL 15A7H

<400> 16

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
1				5					10	

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FR1 VH 15A7H

<400> 17

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser		
			20					25					30		

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FR2 VH 15A7H

<400> 18

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala
1				5					10				

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FR3 VH 15A7H

<400> 19

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FR4 VH 15A7H

<400> 20

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<223> Trình tự axit amin vùng bản lề IgG4 kiểu đại

<400> 21

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala
1				5					10			