



(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)



1-0025870

(51)⁷

C07K 16/28; C12N 5/16; A61K 39/395; (13) B
A61P 37/00

(21) 1-2014-00347

(22) 05/07/2011

(86) PCT/KR2011/004908 05/07/2011

(87) WO/2013/005873 10/01/2013

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/08/2014 317A

(73) 1. DINONA INC. (KR)

65 Woomyeon-dong, Seocho-gu Seoul 137-140, Republic of Korea

2. SNU R&DB FOUNDATION (KR)

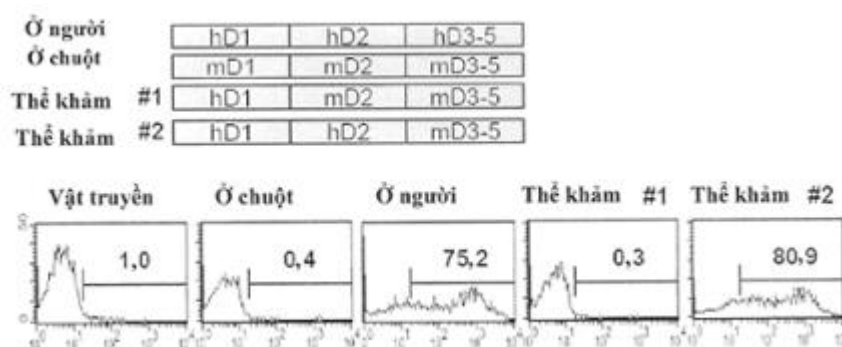
San 56-1, Sillim-dong, Gwanak-gu Seoul 151-742, Korea

(72) PARK, Seong Hoe (KR); Jung, Kyeong Cheon (KR).

(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG MD-3 ĐƯỢC THIẾT KẾ GÂY RA SỰ DUNG NẠP TẾ BÀO T ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN VÀ ĐƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng MD-3 được thiết kế mà liên kết với miền 2 của phân tử kết dính nội bào-1 (ICAM-1) của người, trong đó kháng thể này có thể điều biến quá trình biệt hoá của các tế bào đuôi gai và gây cảm ứng dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, bằng cách đó có hiệu quả trong việc ngăn ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T như thải loại mảnh cây ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cây ghép, và bệnh tự miễn. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với phân tử kết dính nội bào-1 (ICAM-1) của người, trong đó kháng thể này có thể điều biến quá trình biệt hoá và chức năng của các tế bào đuôi gai và kéo dài sự sống của mảnh cấy ghép. Ngoài ra, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể này, và phương pháp điều trị các rối loạn miễn dịch sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tế bào đuôi gai (Dendritic cells - DC) là tế bào trình diện kháng nguyên được biệt hoá cao mà hợp nhất nhiều loại đáp ứng miễn dịch (Nature. 1998, 382:245-252), và gồm họ dị thể của các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp có liên quan đến sự khởi đầu của tính miễn dịch và tính dung nạp miễn dịch. Cho đến nay, các DC chưa trưởng thành được tin là gây ra sự mất ứng tế bào T, trong khi DC biến đổi thành DC trưởng thành bằng cách kích thích hoạt hoá như lipopolysaccharit (LPS) được cho rằng gây ra đáp ứng tế bào T bậc một (Blood. 2006, 108:1435-1440). Ngoài ra, DC nửa trưởng thành với profil sản xuất xytokin phân biệt có thể được cấp cho với chức năng sinh dung nạp (Blood. 2006, 108:1435-1440).

ICAM-1 là glycoprotein bề mặt tế bào loại I 90 kDa được tạo thành bởi năm miền siêu họ globulin miễn dịch ngoại bào (Cell. 1990, 61:243-54). ICAM-1 làm trung gian cho tương tác bạch cầu/bạch cầu như tương tác giữa tế bào T và tế bào trình diện kháng nguyên. Nó còn làm trung gian cho sự thoát mạch của bạch cầu vào mô trong quá trình viêm (Transplantation. 1999, 67:729-736). Nghiên cứu *in vitro* cho thấy rằng các kháng thể gây trở ngại cho tương tác kháng nguyên-1 (LFA-1)

chức năng ICAM-1/bạch cầu có thể làm ức chế sự dính tế bào T với tế bào màng trong và sự hoạt hoá tế bào T cũng có thể được làm giảm đáng kể trong phản ứng tế bào lympho hỗn hợp nhờ các kháng thể này (Proc Natl Acad Sci USA. 1988, 85:3095-3099). Trong nghiên cứu ở khỉ sử dụng kháng thể đơn dòng của chuột, R6-5-D6 (enlimomab), mà liên kết miễn của ICAM-1 của người, sự sống của mảnh cấy ghép khác loại ở thận được kéo dài và hiện tượng thâm nhập tế bào T trong mảnh cấy ghép giảm đi so với đối chứng (J Immunol. 1990, 144:4604-4612). Enlimomab còn được chứng minh là có lợi trong việc làm suy giảm hoạt tính bệnh ở bệnh nhân mắc bệnh viêm khớp dạng thấp (Arthritis Rheum. 1994, 37:992-999; J Rheumatol. 1996, 23:1338-1344). Tuy nhiên, trị liệu cảm ứng enlimomab sau khi ghép thận trong nghiên cứu nhiều tâm ngẫu nhiên không thể làm giảm tốc độ thải loại cấp tính hoặc nguy cơ bắt đầu muộn của chức năng mảnh cấy ghép (Transplantation. 1999, 67:729-736). Ngoài ra, thử nghiệm lâm sàng ở bệnh nhân đột quỵ thiếu máu cục bộ cấp tính cho thấy việc trị liệu kháng-ICAM-1 bằng enlimomab không hiệu quả và quả thực làm tồi tệ thêm đáng kể hậu quả đột quỵ và gây ra nhiều tác dụng phụ hơn, trước hết là sự lây nhiễm và sốt so với giả dược (Neurology. 2001, 57:1428-1434). Enlimomab đóng vai trò phong bế sự kết dính của tế bào T cũng như làm bạch cầu trung tính với tế bào màng trong mạch và do đó cho thấy việc gây trở ngại đối với sự di trú bạch cầu trung tính có khả năng làm tăng tính nhạy lây nhiễm (J Immunol. 1999, 162:2352-2357).

Kháng thể đơn dòng kháng-ICMA-1 khác, MD-3, đã biết là ngăn chặn sự thải loại mảnh cấy ghép (công bố patent Mỹ số 2010-0168394-A1). Không giống như R6-5-D6, kháng thể này liên kết với miễn của ICAM-1 và không phong bế tương tác giữa ICAM-1 và LFA-1. Ngoài ra, kháng thể này ngăn chặn chức năng tế bào T thông qua việc điều biến sự phát triển và chức năng của các tế bào đuôi gai.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với miền 2 của phân tử kết dính nội bào-1 (ICAM-1) của người, trong đó kháng thể này có thể điều biến quá trình biệt hoá và chức năng của các tế bào đuôi gai và gây cảm ứng dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, bằng cách đó có hiệu quả trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, và bệnh tự miễn. Ngoài ra, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể. Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa kháng thể để điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, kháng thể để sử dụng trong điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, và phương pháp điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T bằng cách sử dụng kháng thể này.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng ICAM-1 của người mà điều biến quá trình biệt hoá và chức năng của các tế bào đuôi gai bằng cách liên kết miền 2 của ICAM-1 của người, và gây cảm ứng dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên chứ không phải ngăn chặn tổng quát chức năng miễn dịch. Bằng cách đó, việc sử dụng kháng thể này có thể có hiệu quả trong việc ngăn ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, bệnh tự miễn, và bệnh tương tự, trong khi nó làm giảm thiểu tác dụng phụ bằng cách ức chế miễn dịch, như sự lây nhiễm và phát triển của bệnh ung thư.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể, và tế bào sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Sáng chế còn bao gồm tế bào lai để sản xuất kháng thể, và kháng thể được sản xuất bởi tế bào lai này.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm để phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối

loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, bệnh tự miễn, và bệnh tương tự. Dược phẩm có chứa chất ức chế miễn dịch được chọn từ nhóm gồm: kháng thể có khả năng liên kết miền 2 của ICAM-1 và gây cảm ứng sự dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, trong đó tốt hơn là kháng thể được sản xuất bởi tế bào lai; và mảnh kháng thể, mảnh này có khả năng liên kết miền 2 của ICAM-1 và gây cảm ứng dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, bệnh tự miễn và bệnh tương tự, mà bao gồm bước sử dụng một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ nhóm gồm kháng thể hoặc mảnh kháng thể cho bệnh nhân cần chúng. Tốt hơn là kháng thể hoặc mảnh kháng thể được chọn từ nhóm gồm kháng thể đơn dòng, và tốt hơn nữa là có nguồn gốc từ người và động vật.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kháng thể có khả năng liên kết miền 2 của ICAM-1 và gây cảm ứng dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, trong đó tốt hơn nếu kháng thể được sản xuất bởi tế bào lai, và mảnh kháng thể, có khả năng liên kết miền 2 của ICAM-1 và gây cảm ứng dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, để sử dụng trong phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, bệnh tự miễn, và bệnh tương tự.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sẽ dễ dàng hiểu rõ về sáng chế, và nhiều ưu điểm kèm theo của chúng, khi tham khảo phần mô tả chi tiết dưới đây kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

FIG. 1 thể hiện ảnh vẽ khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng MD-3

trên tế bào HEK293T được chuyển nhiễm với gen của ICAM-1 của người, ICAM-1 của chuột nhắt, và hai loại thể đột biến khảm (h1m2345 và h12m345) được tạo thành bởi mỗi miền từ ICAM-1 của người và của chuột nhắt.

FIG. 2 thể hiện mức biểu hiện của các phân tử khác nhau trên bề mặt của tế bào đuôi gai và nồng độ xytokin trong môi trường nuôi cấy của tế bào đuôi gai sau khi điều trị bằng kháng thể đối chứng, phong bế, và kháng thể MD-3.

FIG. 3A và 3B thể hiện động học phục hồi quần thể của tế bào T của người trong máu ngoại vi (3A) và mỗi quần thể con bạch cầu của người trong lách của chuột nhắt được làm giống người (3B).

FIG. 4 thể hiện đường cong sống sót của đảo Langerhans ở lợn được cấy ghép dưới bao nang thận của chuột nhắt được làm giống người mà tiếp nhận các kháng thể đối chứng, phong bế, hoặc kháng thể MD-3 trước khi ghép đảo Langerhans.

FIG. 5 thể hiện ảnh nhuộm màu hoá mô miễn dịch đối với insulin, CD3 của người, và CD68 của người trong thận được ghép đảo Langerhans được chiết từ mỗi con chuột nhắt được làm giống người.

FIG. 6 thể hiện kết quả tổng hợp của thử nghiệm ELISPOT để đánh giá đáp ứng tế bào T kháng đảo Langerhans được ghép ở lợn, tế bào máu đơn nhân khác loại của người (PBMC khác loại), và protein keyhole limpet haemocyanin (KLH).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế còn được giải thích rõ hơn dựa vào các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này cần được hiểu là không làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng của chuột nhắt kháng-ICAM-1 của

người, MD-3 được thiết kế (ví dụ, được sản xuất bởi tế bào lai được nộp lưu có số nộp lưu là KCLRF-BP-00264), các mảnh của MD-3, và dạng khảm hoặc dạng được làm giống người của MD-3 có khả năng gây cảm ứng dung nạp tế bào T. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng ICAM-1 của người được sản xuất bởi tế bào lai được nộp lưu có số nộp lưu là KCLRF-BP-00264 mà điều biến quá trình biệt hoá và chức năng của các tế bào đuôi gai bằng cách liên kết miền 2 của ICAM-1 của người và gây cảm ứng dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên chứ không phải ngăn chặn tổng quát chức năng miễn dịch. Bằng cách đó, việc sử dụng kháng thể này có thể hữu hiệu trong việc ngăn ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, và bệnh tự miễn, trong lúc vẫn giảm thiểu được tác dụng phụ bằng cách ức chế miễn dịch, như sự lây nhiễm và phát triển của bệnh ung thư.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể gồm bước (a) gây miễn dịch động vật bằng protein ICAM-1 của người (Số đăng ký ngân hàng gen NP_000192) hoặc mảnh protein hoặc tế bào biểu hiện ICAM-1 của người, như các tế bào máu đơn nhân ngoại vi của người đã kích hoạt và/hoặc DU 145 (ATCC HTB-81), (b) chiết tế bào lách từ động vật đã được gây miễn dịch, (c) dung hợp các tế bào lách của động vật với dòng tế bào u tủy, và (d) sàng lọc tế bào lai và chọn lọc tế bào lai mong muốn mà có khả năng điều biến quá trình biệt hoá và chức năng của các tế bào đuôi gai cũng như ức chế sự thải loại cơ quan cấy ghép mà không ức chế sự tương tác giữa ICAM-1 và LFA-1. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể thu được bằng cách nuôi cấy *in vitro* hoặc tiêm vào động vật tế bào sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể thu được từ bệnh cổ trướng của động vật, trong đó tế bào sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể được tiêm trong bụng. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được tinh chế từ dịch nổi bề mặt

môi trường nuôi cấy hoặc bệnh cổ trướng bằng sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký cột ái lực.

Sáng chế còn đề xuất tế bào lai sản xuất kháng thể MD-3, và theo một phương án, tế bào lai là tế bào có số tiếp nhận KCLRF-BP-00264.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm để phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, bệnh tự miễn, và bệnh tương tự. Được phẩm có thể chứa chất ức chế miễn dịch được chọn từ nhóm gồm kháng thể đơn dòng của chuột nhắt kháng-ICAM-1 của người, MD-3 được thiết kế (được sản xuất bởi tế bào lai có số tiếp nhận KCLRF-BP-00264), các mảnh của MD-3, hoặc dạng khảm hoặc dạng được làm giống người của MD-3. Việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương thức sử dụng được phẩm được chấp nhận bất kỳ.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, bệnh tự miễn, và bệnh tương tự, bao gồm bước sử dụng một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ nhóm gồm kháng thể (ví dụ, MD-3) hoặc mảnh kháng thể cho bệnh nhân cần chúng. Tốt hơn là kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể được chọn từ nhóm gồm kháng thể đơn dòng, và tốt hơn nữa là có nguồn gốc từ người và động vật. Ngoài ra, phương pháp này có thể bao gồm bước xác định bệnh nhân cần điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cấy ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy ghép, bệnh tự miễn, và bệnh tương tự, trước bước sử dụng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể (ví dụ, MD-3) hoặc mảnh kháng thể để sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn miễn dịch qua

trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cây ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cây ghép, bệnh tự miễn, và bệnh tương tự; hoặc trong việc bào chế được phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn miễn dịch qua trung gian tế bào T, như thải loại mảnh cây ghép, bệnh vật chủ chống lại mảnh cây ghép, bệnh tự miễn, và bệnh tương tự.

Kháng thể được làm giống người là kháng thể có vùng quyết định bổ thể (complementary determining regions: CDR) từ kháng thể thể cho và khung vùng biến đổi và vùng cố định từ kháng thể người. Như vậy, thông thường, kháng thể được làm giống người bao gồm (i) chuỗi nhẹ chứa ba CDR từ kháng thể của chuột nhất, ví dụ, MD-3, khung vùng biến đổi từ kháng thể người, và vùng cố định của người, và (ii) chuỗi nặng chứa ba CDR từ kháng thể của chuột nhất, ví dụ, MD-3, khung vùng biến đổi từ kháng thể người và vùng cố định của người.

Kháng thể khảm là kháng thể trong đó vùng biến đổi của kháng thể chuột nhất (hoặc động vật gặm nhấm khác) được kết hợp với vùng cố định của kháng thể người; việc tạo cấu trúc của chúng bằng cách thiết kế di truyền là đã biết. Các kháng thể này giữ lại độ đặc hiệu liên kết của kháng thể chuột nhất, mà bằng khoảng hai phần ba của người. Tỷ lệ của trình tự không phải của người có mặt trong các kháng thể khảm và được làm giống người của chuột nhất cho thấy khả năng sinh miễn dịch của các kháng thể khảm là giá trị trung gian giữa các kháng thể của chuột nhất và kháng thể được làm giống người.

Kháng thể đơn dòng (mAb) có thể có nguồn gốc động vật (ví dụ, từ chuột nhất, chuột cống, chuột đồng hoặc gà), hoặc chúng có thể được thiết kế di truyền. mAb động vật gặm nhấm được sản xuất bằng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực, gồm gây miễn dịch phức hợp bằng ICAM-1 trong tá dược thích hợp trong màng bụng, trong tĩnh mạch, hoặc vào chân, sau đó chiết tế bào lách hoặc

hạch lympho và dung hợp với dòng tế bào bất tử thích hợp, và sau đó chọn lọc tế bào lai mà sản xuất kháng thể liên kết với ICAM-1, ví dụ, xem các ví dụ dưới đây. mAb khám và được làm giống người là các phương án được ưu tiên của sáng chế.

Kháng thể đơn dòng tự nhiên (mAb) của sáng chế có thể được sản xuất từ tế bào lai của chúng. mAb được thiết kế di truyền, ví dụ, mAb khám hoặc được làm giống người, có thể được biểu hiện bởi nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, gen mã hoá cho các vùng V chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của chúng có thể được tổng hợp từ các oligonucleotit gộp lên nhau và được cài xen cùng với vùng C có sẵn vào vật truyền biểu hiện (ví dụ, có bán ngoài thị trường của hãng Invitrogen) mà cung cấp các vùng điều hoà cần thiết, ví dụ, gen khởi đầu, gen tăng cường, vị trí poly A, v.v.. Việc sử dụng gen khởi đầu-gen tăng cường CMV được ưu tiên. Sau đó, vật truyền biểu hiện có thể được biến nạp bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết khác nhau như lipofection hoặc điện di vào nhiều dòng tế bào động vật có vú như CHO hoặc dòng tế bào u tủy không sản xuất gồm Sp2/0 và NS0, và tế bào biểu hiện kháng thể được chọn bởi chất kháng sinh chọn lọc thích hợp.

Khi được biểu hiện, mAb hoặc các kháng thể khác theo sáng chế có thể được tinh chế theo quy trình tiêu chuẩn trong lĩnh vực này như vi lọc, siêu lọc, sắc ký ái lực protein A hoặc G, sắc ký loại trừ kích thước, sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation và/hoặc các dạng sắc ký ái lực khác dựa trên thuốc nhuộm hữu cơ hoặc dạng tương tự. Các kháng thể gần như tinh khiết có độ đồng nhất bằng ít nhất khoảng 90 hoặc 95% được ưu tiên, và độ đồng nhất 98% hoặc 99% hoặc cao hơn được ưu tiên nhất, để sử dụng làm dược phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể được nêu trong bản mô tả này. Tức là, các kháng thể có thể được sử dụng để sản xuất thuốc để điều trị bệnh. Dược phẩm (tức là, thuốc) chứa các kháng thể chứa

mAb trong chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý, tùy chọn với tá dược hoặc chất làm ổn định, ở dạng dung dịch được làm khô lạnh hoặc dung dịch trong nước. Chất mang, tá dược hoặc chất làm ổn định chấp nhận được là không độc đối với thể nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, và gồm chất đệm như phosphat, xitrat, hoặc axetat ở độ pH thường là nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0; các muối như natri clorua, kali clorua, v.v.. để tạo thành đẳng trương; chất chống oxy hóa, chất bảo quản, các polypeptit khối lượng phân tử thấp, protein, polyme ưa nước như polysorbat 80, axit amin, carbohydrat, chất cànghoá, đường, và các thành phần tiêu chuẩn khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

mAb thường có mặt ở nồng độ 1–100 mg/ml, ví dụ, 10 mg/ml.

Các kháng thể theo sáng chế thường là gần như tinh khiết từ chất tạp nhiễm không mong muốn. Điều này chỉ ra rằng kháng thể thường có độ tinh khiết bằng ít nhất khoảng 50% theo khối lượng (khối lượng/khối lượng), cũng như gần như không chứa từ protein cản trở và chất tạp nhiễm. Tốt hơn là các kháng thể có độ tinh khiết bằng ít nhất là 90%, 95% hoặc 99% theo khối lượng.

Theo phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh bằng cách sử dụng mAb kháng-ICAM-1 trong dược phẩm. mAb được điều chế trong dược phẩm có thể được sử dụng cho bệnh nhân theo đường thích hợp bất kỳ, đặc biệt là ngoài đường tiêu hoá bằng cách tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm liều lớn, trong cơ hoặc dưới da. Tiêm trong tĩnh mạch có thể được thực hiện trong khoảng thời gian ngắn là 15 phút, nhưng thông thường hơn là trong 30 phút, hoặc trong 1, 2 hoặc thậm chí là 3 giờ. mAb cũng có thể được tiêm trực tiếp vào vị trí bị bệnh (ví dụ, khối u), hoặc được bao nang để mang chất như liposom. Liều lượng được cấp sẽ đủ để làm thuyên giảm tình trạng bệnh được điều trị (“liều

lượng hữu hiệu để điều trị”) và có thể là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5 mg/kg thể trọng, ví dụ 1, 2, 3 hoặc 4 mg/kg, nhưng có thể là cao bằng 10 mg/kg hoặc thậm chí là 15 hoặc 20 mg/kg. Liều đơn vị cố định cũng có thể là, ví dụ, 50, 100, 200, 500 hoặc 1000 mg, hoặc liều lượng có thể dựa trên diện tích bề mặt của bệnh nhân, ví dụ, 100 mg/m².

mAb có thể được sử dụng hàng ngày, hàng tuần, hai lần một tuần, cách tuần, hàng tháng hoặc ở các khoảng thời gian khác, tùy thuộc vào, ví dụ thời gian bán hủy của mAb, trong 1 tuần, 2 tuần, 4 tuần, 8 tuần, 3–6 tháng hoặc lâu hơn. Các khoảng thời gian điều trị lặp lại cũng có thể được áp dụng khi điều trị bệnh mạn tính. Chế độ liều và các khoảng thời gian dùng thuốc mà làm thuyên giảm hoặc ít nhất là ngăn chặn một phần triệu chứng của bệnh (hoá sinh, mô và/hoặc lâm sàng), gồm các biến chứng của nó và kiểu hình bệnh học trung gian trong sự phát triển của bệnh được đề cập đến trong phác đồ có hiệu quả trị liệu.

Sáng chế được giải thích chi tiết hơn dựa vào các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này cần được hiểu là không làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tách tế bào lai có khả năng sản xuất kháng thể đơn dòng kháng ICAM-1 của người

Tế bào máu đơn nhân ngoại vi của người được phân lập từ tình nguyện viên khoẻ mạnh bằng cách ly tâm gradien mật độ trên Ficoll-Paque (GE Healthcare). Để sản xuất protein ICAM-1/Fc, ARN thông tin được chiết từ các tế bào máu đơn nhân ngoại vi của người phytohemagglutinin (PHA) đã kích hoạt và các mảnh cADN tương ứng với miền ngoại bào của ICAM-1 của người được khuếch đại bằng cách đưa các vị trí *NheI* và *EcoRI* ở lần lượt các đầu 5' và 3' bằng phản ứng chuỗi

polymeaza (PCR) sử dụng các đoạn mồi như sau: đoạn mồi 5' GCT AGC GCA ACC TCA GCC TCG CTA TGG CTC (SEQ ID NO: 1); đoạn mồi 3', GAA TTC ATC TCA TAC CGG GGG GAG AGC AC (SEQ ID NO: 2). Để tạo thành cấu trúc dung hợp của ICAM-1 của người và Fc IgG của người, mảnh này được nối vào plasmid pSecTag được cắt bằng *EcoRI* và *XhoI* (Invitrogen) chứa vùng Fc IgG1 của người. Các tế bào HEK293 (ATCC CRL-1573) được chuyển nhiễm tạm thời bằng plasmid, và protein ICAM-1/Fc được tinh chế từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng cột protein G.

Chuột nhắt Balb/c (chuột cái, 6~8 tuần, 17~25 g; KOATECH, Korea) được gây miễn dịch trong màng bụng bằng 100 µg protein ICAM-1/Fc đã nhũ hóa trong chất phụ trợ Freund hoàn toàn và sau đó gây miễn dịch hai lần với 100 µg protein ICAM-1/Fc đã nhũ hóa trong chất phụ trợ Freund không hoàn toàn trong thời gian hai tuần. Sau hai tuần, chuột đã gây miễn dịch được nâng lên 100 µg protein ICAM-1/Fc. Lách của chuột nhắt Balb/c được loại bỏ 3 ngày sau khi dùng lần cuối để sản xuất hỗn dịch tế bào lách. Kháng thể đơn dòng được tạo ra bằng cách dung hợp các tế bào lách của Balb/c được gây miễn dịch bằng ICAM-1/Fc của người với tế bào u tủy SP2/0-Ag14 của chuột nhắt (ATCC CRL-1581) kháng 9-azaguanin. Phương pháp dung hợp tế bào theo phương pháp Koeler và Milstein (Koeler & Milstein *Nature*, 1975, 256, 495-497). 10^8 tế bào lách được dung hợp với 10^7 tế bào u tủy sử dụng 50% polyetylen glycol 4000 (Roche). Tế bào được rửa và tái tạo huyền phù trong môi trường Eagle cải biến Dulbeco (Dulbeco's modified Eagle's medium - DMEM) chứa 20% huyết thanh thai bò (fetal bovine serum - FBS), 100 µM hypoxanthin, 0,44 µM aminopterin và 16 µM thymidin (môi trường HAT; Sigma). Các tế bào được đưa vào bốn đĩa 96 lỗ và nuôi cấy ở 37°C trong lồng ấp 5% CO₂.

Khi khuẩn lạc được tạo thành sau hai tuần, dịch nổi được sàng lọc sử dụng tế

bào HEK 293T được chuyển nhiễm ICAM-1 của người. Cả tế bào HEK293T được chuyển nhiễm ICAM-1 và tế bào HEK293T kiểu dại được nhuộm màu với dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy và tế bào sản xuất dịch nổi phản ứng kháng tế bào 293T được chuyển nhiễm ICAM-1 nhưng không chọn tế bào 293T kiểu dại. Tế bào lấy từ các lỗ dương tính được tách dòng 0,5 tế bào cho mỗi lỗ bằng thử nghiệm pha loãng giới hạn (Antibodies: A Laboratory Manual. Edited by ED HARLOW and DAVID LANE; Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1988) để sản xuất dòng tế bào lai ổn định với khả năng phản ứng của kháng thể cao.

Một dòng tế bào lai thu được từ thử nghiệm này tạo ra kháng thể IgG1 mà liên kết với cả kháng nguyên của người và của khỉ và gọi là MD-3 thiết kế. Tế bào lai có tên MD-3 được nộp lưu tại Tổ chức nghiên cứu dòng tế bào của Hàn Quốc (Korean Cell Line Research Foundation - KCLRF) đặt ở trường Đại học Seoul, viện nghiên cứu ung thư, Cancer Research Institute Seoul National University, College of Medicine, 28 Yongon-dong, Chongno-Gu, Seoul, 110-744, Republic of Korea vào ngày 04 tháng 05 năm 2011, và có số nộp lưu là KCLRF-BP-00264.

Ví dụ 2: Lập bản đồ miền liên kết MD-3 của ICAM-1 của người

ICAM-1 có cấu trúc được tạo thành bởi năm miền tương tự globulin miễn dịch (tương tự Ig), miền xuyên màng và miền tế bào chất (Cell. 1992, 68:71-81). Để xác định vị trí của liên kết MD-3 với miền tương tự Ig ICAM-1 cụ thể, hai loại cADN khảm được tạo ra mà mã hoá cho miền 1 của người/các miền 2-5 của chuột gồm miền xuyên màng và miền tế bào chất của chuột (h1m2345) và mã hoá cho các miền 1-2 của người/các miền 3-5 của chuột (h12m345), bằng cách sử dụng các dòng cADN ICAM-1 của người và của chuột. Kỹ thuật PCR gộp lên nhau được sử dụng để tạo cấu trúc các thể đột biến khảm này. cADN chứa miền 1 của người (h1) trước hết được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi như sau: đoạn mồi 5' GAA

TTC ATG GCT CCC AGC AGC CCC CGG CCC GCG CT (SEQ ID NO: 3); đoạn mồi 3' AGG TCT CAG CTC CAC CCG TTC TGG AGT CCA GTA CAC GGT GAG GAA G (SEQ ID NO: 4). Các đoạn mồi để tạo ra các miền 2-5 của chuột, miền xuyên màng và miền tế bào chất (m2345) là như sau: đoạn mồi 5', CTG GAC TCC AGA ACG G GTG GAG CTG AGA CCT CTG CCA GCC TGG CAG (SEQ ID NO: 5); đoạn mồi 3' GGA TCC GGG AGG TGG GGC TTG TCC CTT GAG TTT TAT GGC (SEQ ID NO: 6). Hai loại cADN này được trộn và được khuếch đại lại bằng cách sử dụng các đoạn mồi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6 và sản phẩm sau cùng (h1m2345) được tách dòng trong vật truyền pcADN3.1. Thể đột biến mà mã hoá cho h12m345 cũng được tách dòng theo cách tương tự như đối với h1m2345 bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây: đoạn mồi 5' đối với h12, GAA TTC ATG GCT CCC AGC AGC CCC CGG CCC GCG CT (SEQ ID NO: 7); đoạn mồi 3' đối với h12, GGT AGC TGG AAG ATC AAA GGT CTG GAG CTG GTA GGG GGC CGA GGT (SEQ ID NO: 8); đoạn mồi 5' đối với m345, CAG CTC CAG ACC TTT GAT CTT CCA GCT ACC ATC CCA AAG CTC GAC ACC (SEQ ID NO: 9); đoạn mồi 3' đối với m345, GGA TCC GGG AGG TGG GGC TTG TCC CTT GAG TTT TAT GGC (SEQ ID NO: 10).

Cấu trúc hoàn chỉnh được đọc trình tự để xác nhận rằng đã đạt được sự nối đúng và sau đó ADN plasmit được biến nạp vào tế bào HEK293T bằng cách sử dụng phương pháp kết tủa canxi phosphat. Sau khi ủ tế bào HEK293T với các chất đồng kết tủa của canxi phosphat và ADN plasmit trong thời gian 16-20 giờ, môi trường được thay bằng 10 ml dung dịch mới và tế bào được ủ trong thời gian 24 giờ nữa. Sau đó, thể biến nạp được nhuộm màu bằng kháng thể MD-3 trong đá. Sau khi ủ trong 30 phút, tế bào được rửa ba lần bằng nước muối đệm phosphat (PBS) với 5% huyết thanh thai bê và 0,1% azit và được ủ trong 30 phút với kháng thể của dê kháng Ig của chuột được kết hợp FITC (Ab thứ 2). Sau khi rửa ba lần nữa, tiến hành

phân tích đếm tế bào theo dòng để thử nghiệm khả năng phản ứng của tế bào với mỗi kháng thể (FIG. 1). Để làm đối chứng âm, sử dụng tế bào chỉ được chuyển nhiễm với vật truyền. Như được thể hiện trên FIG. 1, thể biến nạp ICAM-1 của người đầy đủ được nhuộm màu dương tính với kháng thể MD-3, trong khi nó không phản ứng với thể biến nạp ICAM-1 của chuột đầy đủ, cho thấy kháng thể MD-3 không phản ứng chéo với ICAM-1 của chuột. Trong trường hợp thể đột biến khảm, kháng thể MD-3 chỉ phản ứng với thể đột biến chứa miền 2 của ICAM-1 của người (h12m345), cho thấy kháng thể MD-3 đặc hiệu đối với epitop trên miền 2.

Ví dụ 3: Tác dụng ức chế của kháng thể MD-3 trong quá trình biệt hoá các tế bào đuôi gai có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân

Tế bào máu đơn nhân ngoại vi được phân lập từ máu thể cho khoẻ mạnh bằng cách ly tâm gradien mật độ Ficoll-hypaque. Sau khi rửa hai lần bằng PBS, tế bào được tái tạo huyền phù trong chất đệm MACS (Milteny-Biotech) ở nồng độ 1×10^8 tế bào/ml và sau đó được ủ với hạt từ tính kháng-CD14 ($20 \mu\text{l}/10^7$ tế bào; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) trong đá trong thời gian 15 phút, sau đó phân tách từ tính bằng cách sử dụng MACS (Milteny-Biotech). Các bạch cầu đơn nhân CD14⁺ đã tinh chế được tái tạo huyền phù trong RPMI (Invitrogen) với 10% (thể tích/thể tích) FBS và được nuôi cấy trong thời gian 6 ngày với yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-đại thực bào (GM-CSF, 1000 U/ml) và IL-4 (1000 U/ml). Môi trường nuôi cấy được bổ sung MD-3 hoặc isotyp kháng thể đối chứng được bắt cặp (10 mg/ml) vào ngày 0 và ngày 3 và LPS được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vào ngày 6. Một ngày sau, tế bào nuôi cấy được thu hoạch và sự biểu hiện của MHC lớp I, MHC lớp II, CD80, CD86, và CD40 được đánh giá dưới dạng cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) bằng cách đếm tế bào theo dòng (FIG. 2a). ELISA cũng được thực hiện để đo lượng của IL-12p70, IL-6, IFN- γ và TNF- α trong môi

trường nuôi cấy (FIG. 2b). Khi các bạch cầu đơn nhân CD14⁺ được nuôi cấy trong điều kiện có mặt GM-CSF và IL-4, chúng có thể biệt hoá thành các DC chưa trưởng thành và việc xử lý LPS gây cảm ứng trưởng thành của các DC chưa trưởng thành, dẫn đến việc điều hoà tăng sự biểu hiện bề mặt của MHC và đồng kích thích các phân tử và sản xuất xytokin. Tuy nhiên, việc xử lý trước kháng thể MD-3 trước khi kích thích LPS ngăn chặn đáng kể việc điều hoà tăng sự biểu hiện phân tử bề mặt và sự sản xuất xytokin ở DC, trong khi đây không phải là trường hợp của DC được xử lý bằng cách phong bế kháng thể (FIG. 5). Như vậy, các kết quả này chỉ ra rằng kháng thể MD-3 có thể làm ức chế sự trưởng thành của DC có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân.

Ví dụ 4: Tạo ra chuột nhắt được làm giống người

Để nghiên cứu tác dụng *in vivo* của các kháng thể kháng-ICAM-1, chuột nhắt được làm giống người được tạo ra bằng cách ghép tế bào gốc tạo máu của người vào chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch theo quy trình nêu trong tài liệu Ito, M. et al., Blood. 2002, 100:3175-82.

Tế bào máu dây rốn được thu gom trong quá trình phân phối thời gian đầy đủ bình thường và tế bào đơn nhân được tách bằng cách ly tâm Ficoll-hypaque. Tế bào đơn nhân đã tách được tạo huyền phù ở mật độ $3,3 \times 10^8$ tế bào/ml trong PBS chứa 5% FBS và 2mM EDTA và được ủ trong đá trong 30 phút với kháng thể phong bế Fc (Milteny-Biotech), sau đó ủ trong đá trong 30 phút với hạt từ tính kháng-CD34 (Milteny-Biotech). Sau khi rửa hai lần, tế bào được gắn với hạt được thu gom bằng cách phân tách từ tính sử dụng MACS. Sau hai chu kỳ phân tách từ tính, độ tinh sạch được đánh giá bằng cách đếm tế bào theo dòng và không ít hơn 95% tế bào được thu gom là CD34⁺. Chuột nhắt NOD.SCID/ γ^{null} 8 đến 12 tuần tuổi (Central Institute for Experimental Animal, Japan) được chiếu xạ bằng 240 cGy sử dụng

nguồn chiếu xạ coban và 1 ngày sau thì tiêm 1×10^5 tế bào CD34⁺ vào mỗi con chuột nhất qua tĩnh mạch đuôi. Máu ngoại vi được lấy từ hệ mạch máu tĩnh mạch sau hốc mắt liên tục giữa tuần 4 và tuần 20 sau khi ghép và được nhuộm màu bằng các kháng thể kháng-CD45 của người và kháng-CD3 của người (BD Biosciences) để đếm tế bào theo dòng. FIG. 3A thể hiện động học của tế bào T CD3⁺ của người tái tạo quần thể máu ngoại vi của chuột nhất vào tuần được chỉ thị sau khi cấy tế bào. Tế bào T của người xuất hiện vào tuần 8 sau khi cấy tế bào máu dây rốn và sau đó tăng nhanh. Ngoài ra, tế bào T CD4⁺, tế bào T CD8⁺, tế bào B CD19⁺, các bạch cầu đơn nhân CD14⁺, DC thông thường CD11c⁺, và DC plasmacytoid CD123⁺ của người được xác định trong lách của chuột nhất được làm giống người (FIG. 3B).

Ví dụ 5: Ngăn thải loại mảnh cấy ghép bằng cách sử dụng in vivo kháng thể MD-3 ở mẫu ghép đảo Langerhans ở lợn

Để chứng minh tác dụng của kháng thể MD-3 trong việc ức chế thải loại mảnh cấy ghép, mẫu ghép khác loài đảo Langerhans được sử dụng. Để thu được đảo Langerhans tuy ở lợn, tiến hành cắt bỏ toàn bộ tuyến tuy mà không cần thời gian thiếu máu cục bộ ấm, và sự tách đảo Langerhans được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp Ricordi cải biến, như đã được nêu ở trên (Cell Transplant 2010, 19:299-311). Đảo Langerhans đã tinh sạch được nuôi cấy qua đêm trong Môi trường 199 (Gibco, BRL, Life Technologies Ltd, Paisley, Scotland, UK) được bổ sung 10% huyết thanh ở lợn, 10 mM nicotinamit (Sigma), và 1% penixilin-streptomycin ở nhiệt độ 37°C, và sau đó dưới bao nang thận của chuột nhất được làm giống người. Máu ngoại vi được lấy mẫu hàng tuần từ xoang sau hốc mắt để giám sát hàm lượng glucoza trong máu bằng cách sử dụng dụng cụ đo glucoza cầm tay (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Seoul, South Korea), và hàm lượng peptit C ở lợn trong huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (Linco, St. Charles, MO,

USA). Việc ghép thành công được xác định khi peptit C ở lợn $>0,5$ ng/ml. Sự thải loại mảnh cấy ghép được xác định vào ngày thứ nhất khi peptit C $<0,1$ ng/ml và được xác nhận bằng cách phân tích mô của mảnh cấy ghép. Ở nhóm đối chứng, thời gian sống trung bình của mảnh cấy ghép là 21 ngày, và việc sử dụng kháng thể phong bế kháng-ICAM-1, R6-5-D6, kéo dài thời gian sống trung bình lên đến 40 ngày (FIG. 4). Tuy nhiên, cuối cùng đảo Langerhans được ghép bị thải loại trong cả hai nhóm. Ngược lại, chuột nhắt được điều trị bằng MD-3 không cho thấy bằng chứng nào về việc thải loại mảnh cấy ghép trong toàn bộ thời gian theo dõi.

Chuột nhắt bị giết sau khi ghép đảo Langerhans 42 ngày hoặc khi chúng thể hiện tình trạng ốm yếu, và mẫu cắt thận được phân tích mô để tìm bằng chứng cho sự thải loại mảnh cấy ghép. Mẫu cắt thận từ mỗi con chuột nhắt được cố định trong 10% formalin thần kinh, được nhúng trong parafin và sau đó được chia phần theo dãy ở độ dày 4 μ m. Để phân tích hoá mô miễn dịch, các phần mô được loại sáp trong xylen, được hydrat hoá lại bằng cách sử dụng dãy rượu được phân loại, và được ủ trong dung dịch phong bế peroxit nội sinh trong thời gian 5 phút. Sự thu hồi kháng nguyên được thực hiện bằng cách ủ các phần trong đệm xitrat 6 mM ở nhiệt độ 99°C trong thời gian 20 phút sử dụng hệ thống Leica Bond Max (Leica, Wetzlar, Germany), và ngăn nhuộm màu không đặc hiệu bằng cách xử lý các phần mô bằng huyết thanh thỏ (1% trong PBS) trong 30 phút. Các kháng thể kháng insulin của người (DAKO, Carpinteria, CA, USA), CD3 (F7.2.38; DAKO), CD20 (L26; DAKO), và CD68 (PG-M1; DAKO) được sử dụng trong 30 phút, và phát hiện sự liên kết kháng thể bằng cách sử dụng bộ kit VECTASTAIN Elite ABC (PK6101; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Như có thể thấy trên FIG. 5, tế bào đảo Langerhans dương tính với insulin bị tiêu diệt hoàn toàn và được thay thế bằng sự thâm nhập vượt trội của tế bào T CD3⁺ và đại thực bào CD68⁺ trong nhóm đối chứng. Tuy nhiên, trong nhóm được điều trị bằng MD-3, các nhóm lớn của tế bào

đảo Langerhans dương tính insulin được nhìn thấy rõ ràng với hiện tượng thâm nhập không đáng kể của tế bào đơn nhân trong diện tích xung quanh đảo Langerhans.

Để nhận ra sự thiếu đáp ứng miễn dịch ở chuột nhắt được điều trị bằng MD-3 là do sự dung nạp đặc hiệu kháng nguyên hay do sự ngăn chặn miễn dịch tổng quát, các tác giả sáng chế đã so sánh số lượng tế bào T đặc hiệu đảo Langerhans được ghép và tế bào T dị đặc hiệu ở các con chuột này. Để thực hiện việc này, tần suất tế bào T đặc hiệu kháng nguyên tiết IL-2 hoặc IFN- γ trong lách của chuột nhắt được làm giống người được đo bằng cách sử dụng bộ kit ELISPOT của hãng Mabtech (Nacka Strand, Sweden). Đã được phủ kháng thể bắt giữ kháng-IL-2 hoặc IFN- γ được rửa bốn lần bằng nước muối đệm phosphat tiết trùng (PBS; 200 μ l/lỗ) và được phong bế trong 30 phút bằng 10% môi trường RPMI1640 được bổ sung huyết thanh người ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi loại bỏ môi trường, nuôi cấy 3×10^5 tế bào lách từ chuột nhắt được làm giống người với 5×10^4 tế bào đảo Langerhans ở lộn trong môi trường RPMI1640 được bổ sung 10% huyết thanh người trong 40 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂. Để đánh giá sự dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, protein keyhole limpet haemocyanin (KLH; 0,1 mg/ml) hoặc tế bào máu đơn nhân ngoại vi của người được kích thích γ được làm nghèo tế bào T (PBMC; 7×10^5 /lỗ) được thu từ ba tình nguyện viên cũng được sử dụng làm chất kích thích. Để làm đối chứng âm (NC), tế bào lách của chuột nhắt được làm giống người mà không trải qua sự ghép đảo Langerhans được kích thích bằng đảo Langerhans ở lộn và sử dụng cho đáp ứng kháng đảo Langerhans. Ngược lại, tế bào lách của chuột nhắt được ghép được nuôi cấy vắng mặt kháng nguyên kích thích được sử dụng cho đáp ứng kháng-PBMC khác loại và kháng-KLH. Sau khi nuôi cấy 40-giờ, tế bào được loại bỏ, và đĩa được rửa năm lần bằng PBS (200 μ l/lỗ). Kháng thể phát hiện được kết hợp phosphatase kiềm được pha loãng ở độ pha loãng 1:200 hoặc 1:1.000 lần lượt đối với IL-2 hoặc IFN- γ , trong 100 μ l PBS chứa

0,5% huyết thanh thai bò sau đó được thêm vào và được ủ trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa này được rửa năm lần bằng PBS, và 100 μ l chất nền BCIP/NBP được thêm vào. Dừng phát triển màu sắc bằng cách rửa bằng nước máy. Đếm các điểm thu được trên hệ thống đọc AID EliSpot có sự hỗ trợ của máy vi tính (AID, Strassberg, Germany). Khi tổng số tế bào lách của chuột nhất đối chứng được kích thích bằng đảo Langerhans ở lợn, số lượng đáng kể tế bào T tiết IL-2-và IFN- γ được phát hiện (FIG. 6, bên trái). Ngược lại, tế bào T tiết IL-2-và IFN- γ không được phát hiện ở chuột nhất được điều trị bằng MD-3, thể hiện sự ức chế hoàn toàn của đáp ứng tế bào T đối với kháng nguyên ghép khác loài. Tuy nhiên, trong hệ thống này, đáp ứng tế bào T đối với PBMC khác loại của người có thể so sánh được với đáp ứng tế bào T của đối chứng (FIG. 6, ở giữa). Dữ liệu này cho thấy rằng tính không nhạy của tế bào T phản ánh cảm ứng dung nạp, đặc hiệu đối với kháng nguyên đảo Langerhans ở lợn. Cảm ứng dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên còn được chứng minh bằng thách thức *in vivo* với các kháng nguyên không liên quan. Vào ngày 28 sau khi cấy, khi MD-3 được thanh thải hoàn toàn, chuột nhất được gây miễn dịch bằng kháng nguyên KLH hoà tan. Hai tuần sau, số lượng tế bào T đặc hiệu KLH được đánh giá trong thử nghiệm ELISPOT. Như được thể hiện trên FIG. 6 (bên phải), tế bào T thu được từ chuột nhất được điều trị bằng MD-3 thể hiện đáp ứng bùng nổ kháng KLH về số lượng tế bào sản xuất IFN- γ và IL-2. Các dữ liệu này cho thấy việc sử dụng MD-3 gây cảm ứng dung nạp tế bào T kháng đặc hiệu kháng nguyên đảo Langerhans ghép.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng MD-3 được thiết kế được sản xuất bởi tế bào lai được nộp lưu có số nộp lưu là KCLRF-BP-00264.
2. Kháng thể đơn dòng liên kết với ICAM-1 của người bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng chứa ba vùng quyết định bổ thể (CDR) từ chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng MD-3 thiết kế được sản xuất bởi tế bào lai được nộp lưu có số nộp lưu là KCLRF-BP-00264 và chuỗi nhẹ chứa ba CDR từ chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng MD-3 thiết kế được sản xuất bởi tế bào lai được nộp lưu có số nộp lưu là KCLRF-BP-00264.
3. Kháng thể theo điểm 2, trong đó kháng thể này là dạng khảm hoặc dạng được làm giống người.
4. Tế bào lai được nộp lưu có số nộp lưu là KCLRF-BP-00264.
5. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
6. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó kháng thể đơn dòng là ở dạng được phân lập.

FIG. 1

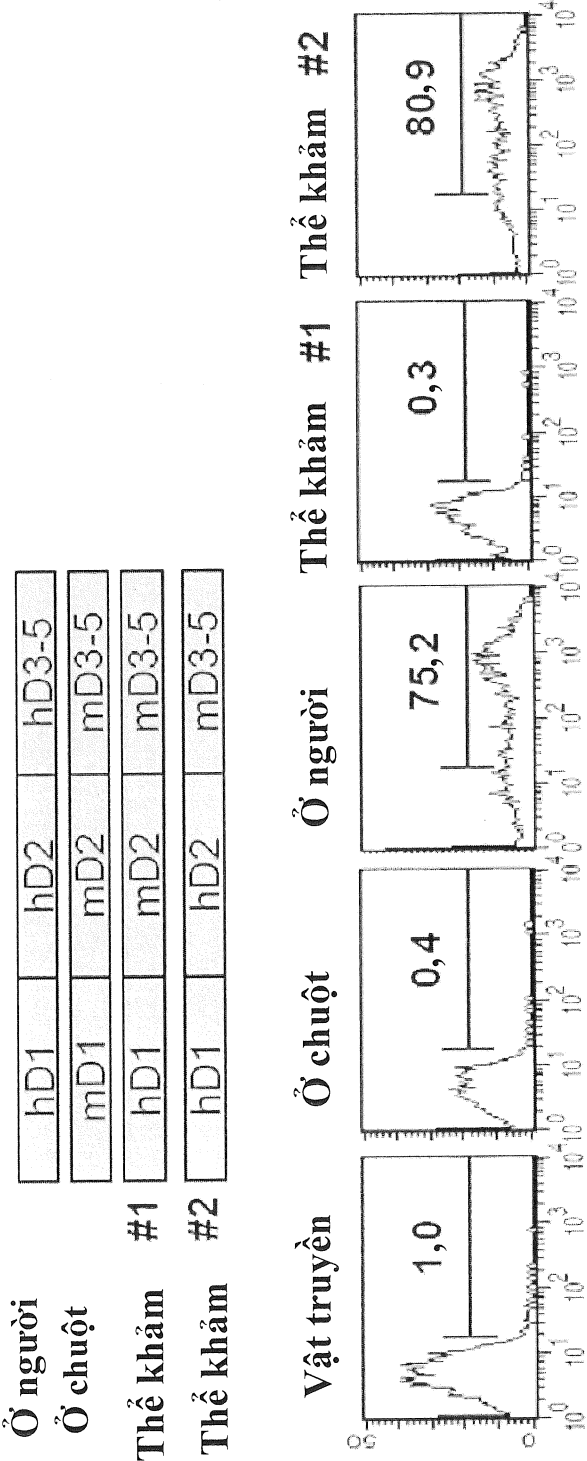


FIG. 2

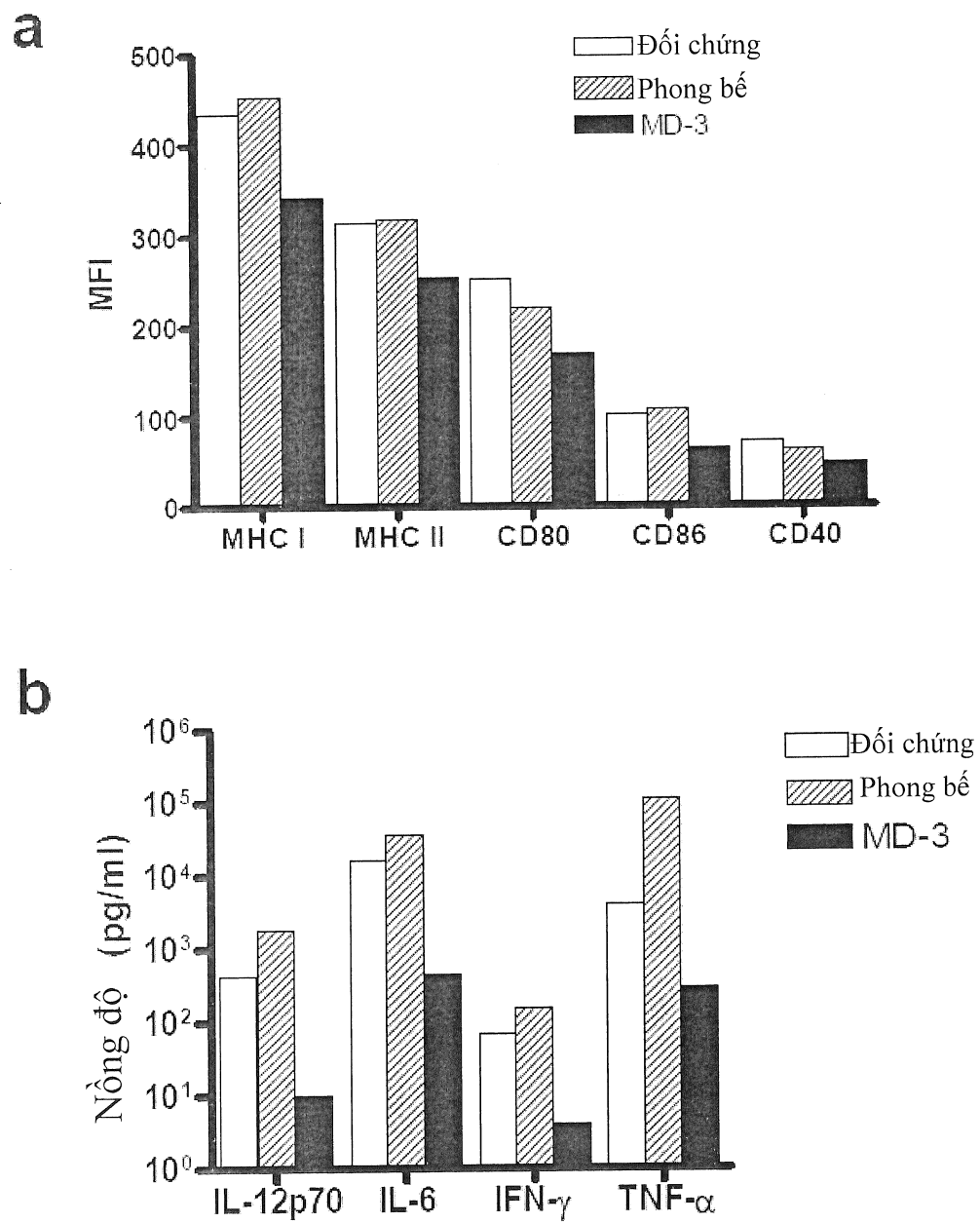


FIG. 3A

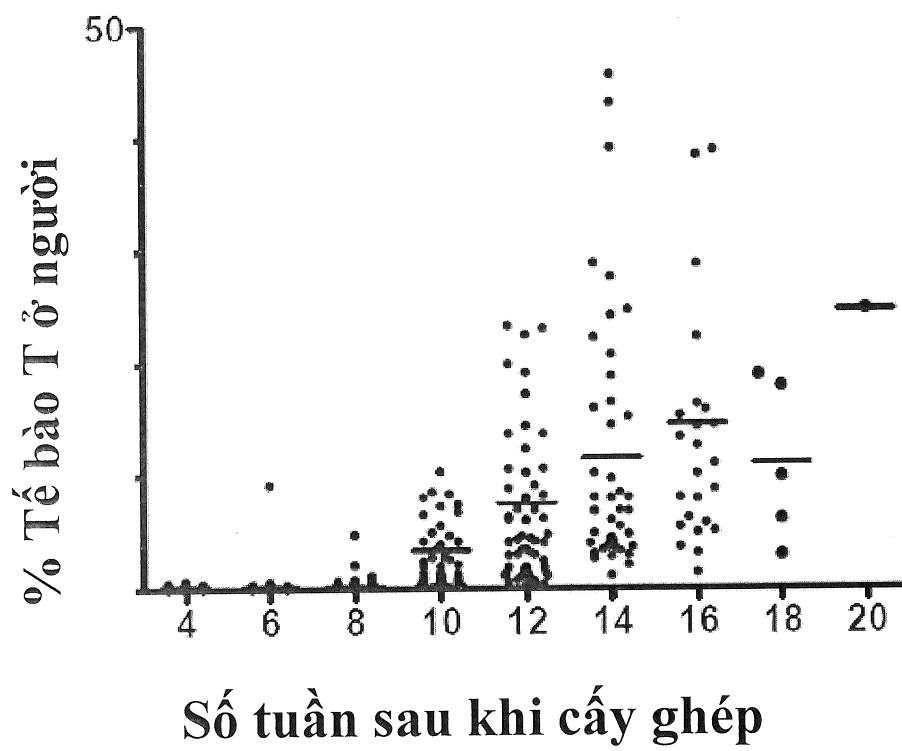


FIG. 3B

Tổng số tế bào ở lách

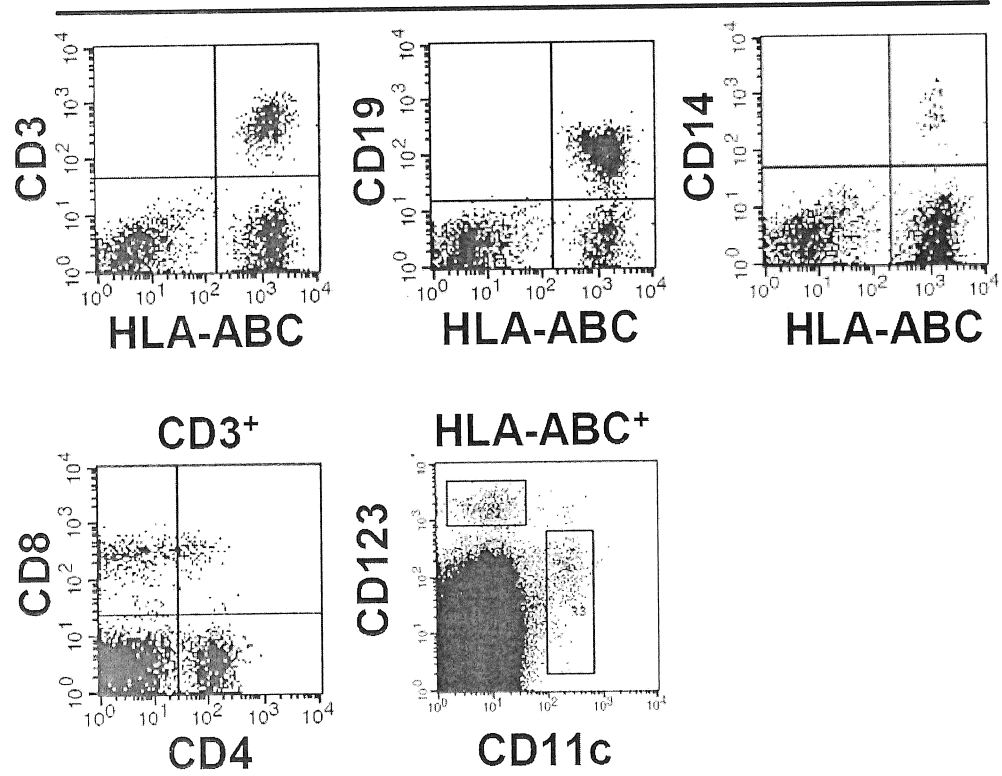


FIG. 4

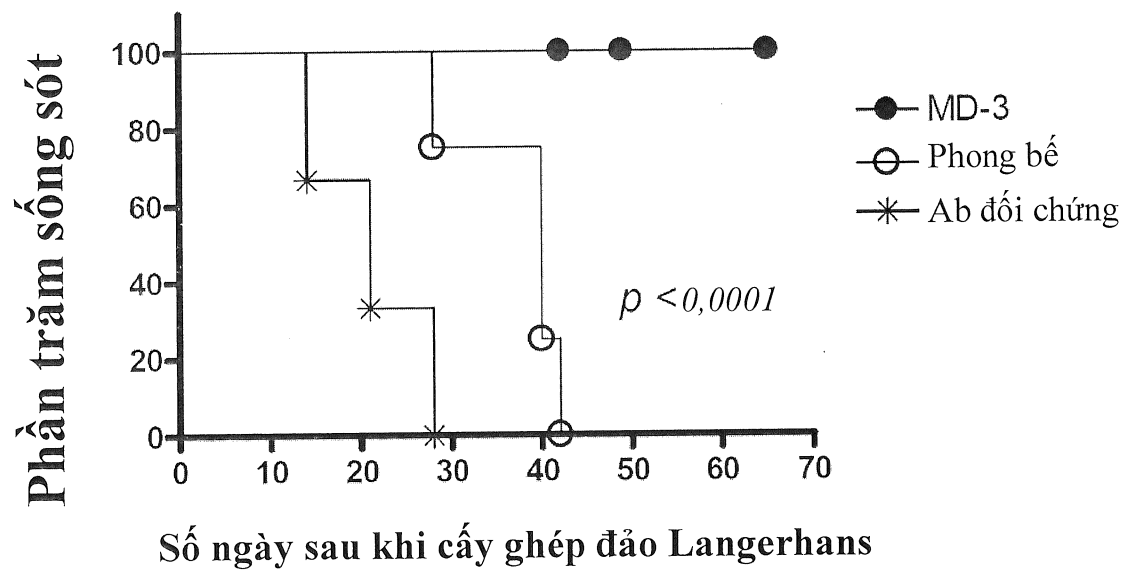


FIG. 5

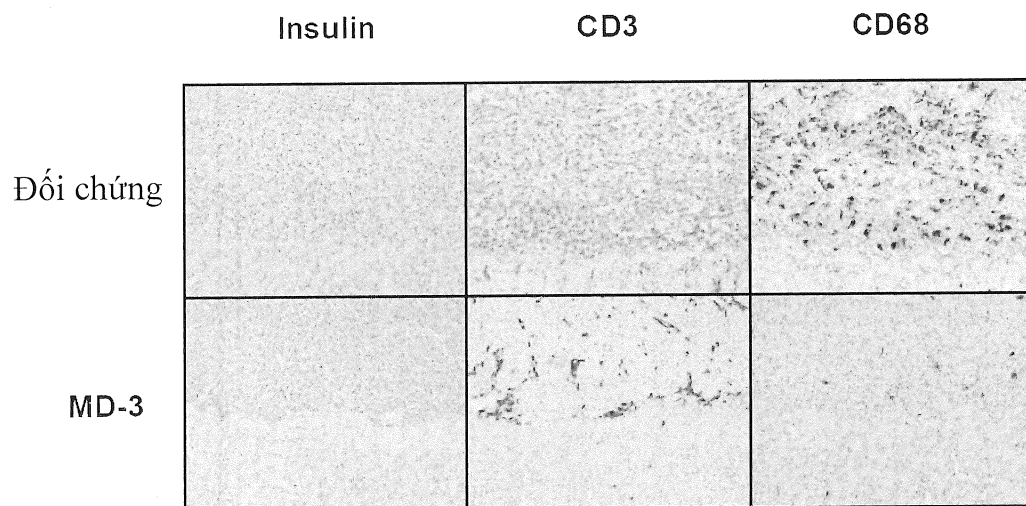
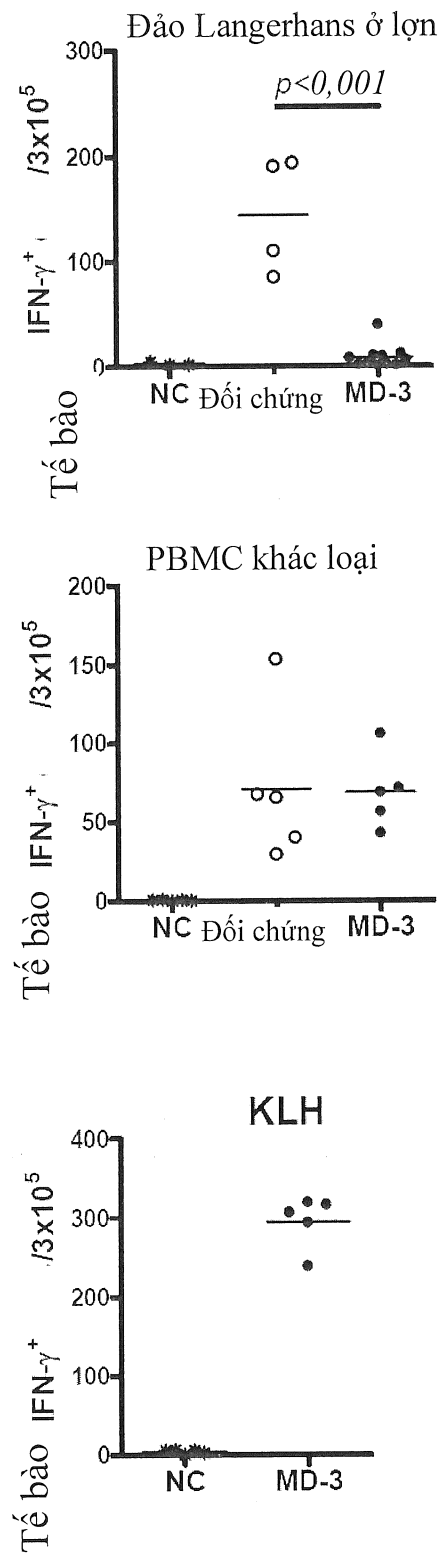


FIG. 6



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> DiNonA Inc.
SNU R&DB FOUNDATION
- <120> Kháng thể đơn dòng MD-3 được thiết kế gây ra sự dung nạp tế bào T đặc hiệu kháng nguyên và được phẩm chứa kháng thể này
- <160> 10
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Đoạn môi 5' để khuếch đại miền ngoại bào của ICAM-1 của người
- <400> 1
gctagcgcaa cctcagcctc gctatggctc 30
- <210> 2
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Đoạn môi 3' để khuếch đại miền ngoại bào của ICAM-1 của người

<400>	2	
gaattcatct cataccgggg ggagagcac		29
<210>	3	
<211>	35	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi 5' để khuếch đại miền 1 ICAM-1 của người (h1)	
<400>	3	
gaattcatgg ctcccagcag ccccgcccc gcgct		35
<210>	4	
<211>	46	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi 3' để khuếch đại miền 1 ICAM-1 của người (h1)	
<400>	4	
aggtctcagc tccaccgtt ctggagtcca gtacacggtg aggaag		46
<210>	5	
<211>	46	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		

<223> Đoạn môi 5' để khuếch đại các miền từ 2 đến 5 ICAM-1 của chuột, miền xuyên màng và miền tế bào chất (m2345)

<400> 5

ctggactcca gaacgggtgg agctgagacc tctgccagcc tggcag

46

<210> 6

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi 3' để khuếch đại các miền từ 2 đến 5 ICAM-1 của chuột, miền xuyên màng và miền tế bào chất (m2345)

<400> 6

ggatccggga ggtggggctt gtcccttgag ttttatggc

39

<210> 7

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi 5' để khuếch đại các miền từ 1 đến 2 ICAM-1 của người (h12)

<400> 7

gaattcatgg ctcccagcag cccccggccc gcgct

35

<210> 8

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi 3' để khuếch đại các miền từ 1 đến 2 ICAM-1 của người (h12)

<400> 8

ggtagctgga agatcaaagg tctggagctg gtagggggcc gaggt

45

<210> 9

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi 5' để khuếch đại các miền từ 3 đến 5 ICAM-1 của chuột (m345)

<400> 9

cagctccaga cctttgatct tccagctacc atcccaaagc tcgacacc

48

<210> 10

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi 3' để khuếch đại các miền từ 3 đến 5 ICAM-1 của chuột (m345)

<400> 10

gcatccggga ggtggggctt gtcccttgag ttttatggc

39