



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0028035

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/00; A61K 39/395 (13) B

(21) 1-2016-01448

(22) 26/09/2014

(86) PCT/US2014/057821 26/09/2014

(87) WO2015/048520 02/04/2015

(30) 61/883,953 27/09/2013 US

(45) 25/04/2021 397

(43) 27/06/2016 339A

(73) GENENTECH, INC. (US)

1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, United States of America

(72) YANG, Ying (US); ALAVATTAM, Sreedhara (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) DƯỢC PHẨM DẠNG NƯỚC CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG PHỐI TỬ CHẾT
THEO CHƯƠNG TRÌNH 1 (PDL1) VÀ VẬT PHẨM SẢN XUẤT BAO GỒM
DƯỢC PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề xuất dược phẩm dạng nước ổn định chứa kháng thể kháng PDL1 và vật
phẩm sản xuất gồm đồ chứa đựng dược phẩm dạng nước ổn định này. Sáng chế cũng đề
xuất phương pháp bào chế dược phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm dạng nước ổn định chứa kháng thể kháng phối tử chết theo chương trình 1 (programmed death ligand 1 - PDL1).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc cung cấp hai tín hiệu phân biệt cho tế bào T là mô hình được chấp nhận rộng rãi để hoạt hóa lympho bào đối với các lympho bào T nghỉ bởi các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen-presenting cell - APC). Lafferty et al, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci 53: 27-42 (1975). Mô hình này còn dùng để phân biệt tự thân với không tự thân và dung nạp miễn dịch. Bretscher et al, Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins et al, J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987). Tín hiệu hàng đầu hay tín hiệu đặc hiệu kháng nguyên, được tải nạp qua thụ thể tế bào T (T-cell receptor - TCR) sau khi nhận dạng peptit kháng nguyên lạ được trình diện trong tình huống phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility-complex - MHC). Tín hiệu thứ hai hay tín hiệu đồng kích thích được phân phối đến tế bào T bởi các phân tử đồng kích thích được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC), và cảm ứng tế bào T để thúc đẩy sự phát triển dòng, tiết cytokin và chức năng tác động. Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996). Khi không có mặt yếu tố đồng kích thích, các tế bào T có thể trở nên trơ với kích thích của kháng nguyên, không tạo ra đáp ứng miễn dịch hiệu quả, và hơn nữa có thể dẫn đến không còn tác dụng hoặc dung nạp kháng nguyên lạ.

Trong mô hình hai tín hiệu, tế bào T nhận được cả tín hiệu đồng kích thích thứ cấp tích cực và tiêu cực. Sự điều hòa tín hiệu tích cực và tiêu cực như vậy là quan trọng để tối đa hóa đáp ứng miễn dịch bảo vệ của vật chủ, trong khi đó duy trì sự dung nạp miễn dịch và ngăn ngừa tự miễn dịch. Các tín hiệu thứ cấp tiêu cực dường như là cần thiết để cảm ứng sự dung nạp của tế bào T, trong khi đó các tín hiệu tích cực thúc đẩy sự hoạt hóa tế bào T. Trong khi mô hình hai tín hiệu vẫn đưa ra sự giải thích hợp lý về các lympho bào tự nhiên, đáp ứng miễn dịch của vật chủ là quy trình động lực học, và các tín hiệu đồng kích thích cũng có thể được tạo ra cho các tế bào T phối

nhiễm với kháng nguyên. Cơ chế của yếu tố đồng kích thích được quan tâm trong lĩnh vực điều trị bệnh vì việc vận dụng các tín hiệu đồng kích thích đã cho thấy là phương tiện để tăng cường hoặc kết thúc đáp ứng miễn dịch trên cơ sở tế bào. Gần đây, đã phát hiện được rằng sự rối loạn chức năng hoặc trợ của tế bào T xảy ra đồng thời với sự biểu hiện được cảm ứng và duy trì của thụ thể ức chế, polypeptit chết theo chương trình 1 (programmed death 1 - PD-1). Kết quả là, định hướng điều trị của PD-1 và các phân tử khác mà phát tín hiệu thông qua tương tác với PD-1, như phối tử chết theo chương trình 1 (programmed death ligand 1 - PD-L1) và phối tử chết theo chương trình 2 (programmed death ligand 2- PD-L2) là lĩnh vực được quan tâm nhiều.

PD-L1 được biểu hiện quá mức ở nhiều bệnh ung thư và thường có liên quan đến tiên lượng kém (Okazaki T et al., Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson RH et al., Cancer Res 2006, 66(7):3381). Thú vị là, đa số các lympho bào T thâm nhập vào khối u chủ yếu biểu hiện PD-1, trái với các lympho bào T ở các mô bình thường và các lympho bào T máu ngoại vi cho thấy rằng sự điều chỉnh tăng PD-1 trên tế bào T đáp ứng khối u có thể góp phần gây suy yếu đáp ứng miễn dịch chống khối u (Blood 2009 114(8):1537). Điều này có thể do khai thác sự phát tín hiệu PD-L1 qua trung gian tế bào khối u biểu hiện PD-L1 tương tác với tế bào T biểu hiện PD-1 để dẫn đến giảm hoạt hóa tế bào T và mất kiểm soát miễn dịch (Sharpe et al., Nat Rev 2002) (Keir ME et al., 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677). Do đó, việc ức chế tương tác PD-L1/PD-1 có thể tăng cường khả năng tiêu diệt khối u qua trung gian tế bào T CD8+.

Định hướng điều trị của PD-1 và các phân tử khác mà phát tín hiệu thông qua tương tác với PD-1, như phối tử chết theo chương trình 1 (PD-L1) và phối tử chết theo chương trình 2 (PD-L2) là lĩnh vực được quan tâm nhiều. Sự ức chế phát tín hiệu PD-L1 đã được đề xuất làm phương tiện để tăng cường miễn dịch tế bào T để điều trị bệnh ung thư (ví dụ, miễn dịch khối u) và tình trạng nhiễm khuẩn, bao gồm cả nhiễm khuẩn cấp và mạn tính (ví dụ, dai dẳng). Tuy nhiên, do chưa có liệu pháp thương mại tối ưu hướng đích theo con đường này, nên vẫn tồn tại nhu cầu y tế chưa được đáp ứng đáng kể. WO2013/019906 mô tả các kháng thể kháng PD-L1. WO2013/093809 mô tả chế phẩm chứa không quá 20 mg/ml kháng thể, natri axetat và polysorbat 80 ở khoảng pH từ 5 đến 6.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất dược phẩm dạng nước ổn định chứa kháng thể. Dược phẩm này chứa kháng thể đơn dòng kháng PDL1 với nồng độ từ 40 mg/ml đến 125 mg/ml, histidin axetat hoặc natri axetat với nồng độ từ 15 mM đến 25 mM, sacaroza với nồng độ từ 60 mM đến 240 mM, polysorbat với nồng độ từ 0,005% (khối lượng/thể tích) đến 0,06% (khối lượng/thể tích), và độ pH từ 5,0 đến 6,3; trong đó kháng thể đơn dòng này chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:7, và vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:32; và trong đó kháng thể đơn dòng này là kháng thể IgG1 được làm tương thích với người.

Theo một số phương án, nồng độ kháng thể đơn dòng trong dược phẩm là từ 40 mg/ml đến 80 mg/ml. Theo một số phương án, nồng độ kháng thể đơn dòng trong dược phẩm từ 54 mg/ml đến 66 mg/ml. Theo một số phương án, nồng độ kháng thể đơn dòng trong dược phẩm là 60 mg/ml. Theo một số phương án, nồng độ kháng thể đơn dòng trong dược phẩm từ 60 mg/ml đến 125 mg/ml. Theo một số phương án, nồng độ kháng thể đơn dòng trong dược phẩm là 125 mg/ml.

Theo một số phương án, histidin axetat hoặc natri axetat đã nêu có mặt trong dược phẩm với nồng độ từ 17 mM đến 22 mM. Theo một số phương án, histidin axetat hoặc natri axetat đã nêu có mặt trong dược phẩm với nồng độ là 20 mM.

Theo một số phương án, nồng độ sacaroza đã nêu trong dược phẩm là từ 60 mM đến 180 mM. Theo một số phương án, nồng độ sacaroza đã nêu trong dược phẩm là 120 mM. Theo một số phương án, nồng độ sacaroza đã nêu trong dược phẩm là 240 mM.

Theo một số phương án, dược phẩm này có độ pH từ 5,5 đến 6,1. Theo một số phương án, dược phẩm này có độ pH là 5,5 hoặc 5,8.

Theo một số phương án, polysorbat đã nêu trong dược phẩm là polysorbat 20. Theo một số phương án, polysorbat đã nêu (chẳng hạn, polysorbat 20) trong dược phẩm là từ 0,02% đến 0,04%.

Theo một số phương án, nồng độ kháng thể đơn dòng đã nêu trong dược phẩm là 60 mg/ml, nồng độ sacaroza trong dược phẩm là 120 mM, và độ pH là 5,8. Theo một

số phương án, nồng độ kháng thể đơn dòng đã nêu trong dược phẩm là 125 mg/ml, nồng độ sacaroza trong dược phẩm là 240 mM, và độ pH 5,5.

Theo một số phương án, dược phẩm này chứa kháng thể đơn dòng (ví dụ, kháng thể kháng PDL1 được mô tả trong bản mô tả) với lượng 60 mg/mL, histidin axetat với nồng độ 20 mM, sacaroza với nồng độ 120 mM, và polysorbat mà là polysorbat 20 với nồng độ 0,04% (khối lượng/thể tích), và dược phẩm này có độ pH 5,8.

Theo một số phương án, dược phẩm này chứa kháng thể đơn dòng với lượng 125 mg/mL, histidin axetat với nồng độ 20 mM, sacaroza với nồng độ 240 mM, và polysorbat mà là polysorbat 20 với nồng độ 0,02%, và dược phẩm này có độ pH 5,5.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng đã nêu trong dược phẩm không được đông khô trước.

Theo một số phương án trong bản mô tả, kháng thể đơn dòng đã nêu trong dược phẩm chứa:

(a) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa:

- (1) HVR-L1 chứa trình tự axit amin RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:1);
- (2) HVR-L2 chứa trình tự axit amin SASFLYS (SEQ ID NO:2);
- (3) HVR-L3 chứa trình tự axit amin QQYLYHPAT (SEQ ID NO:3); và

(b) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa:

- (1) HVR-H1 chứa trình tự axit amin GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:4);
- (2) HVR-H2 chứa trình tự axit amin AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:5);
- (3) HVR-H3 chứa trình tự axit amin RHWPGGFDY (SEQ ID NO:6).

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng đã nêu trong dược phẩm chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:7, và vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:32. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng đã nêu trong dược phẩm chứa chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:9, và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:10.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa kháng thể này được bảo quản trong lọ thủy tinh hoặc đồ chứa bằng hợp kim. Theo một số phương án, hợp kim này là thép

Fig. 3 là loạt đồ thị thể hiện kết quả phân tích thống kê dữ liệu về độ ổn định của dược phẩm α -PDL1 ở 40°C bằng SE-HPLC bằng cách sử dụng phần mềm JMP. A) Giá trị trung bình tốc độ tổn thất đỉnh chính từ thiết kế thử nghiệm (design of experiment- DOE) nhân tố từng phần. B) Kết quả phân tích đỉnh chính từ DOE nhân tố từng phần. Đỉnh chính chứa monome α -PDL1.

Fig. 4 là loạt đồ thị thể hiện kết quả phân tích thống kê dữ liệu về độ ổn định của dược phẩm α -PDL1 ở 25°C bằng SE-HPLC bằng cách sử dụng phần mềm JMP. A) Giá trị trung bình tốc độ tổn thất đỉnh chính từ thiết kế thử nghiệm (design of experiment- DOE) nhân tố từng phần. B) Kết quả phân tích đỉnh chính từ DOE nhân tố từng phần. Đỉnh chính chứa monome α -PDL1.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện sự thiếu hụt khả năng phân hủy PS20 đáng kể của nhiều dược phẩm chứa α -PDL1 được bảo quản ở nhiều nhiệt độ và thời gian khác nhau. Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) PS20 còn lại trong dược phẩm được phát hiện bằng đầu dò tán xạ ánh sáng bay hơi (evaporative light scattering detector - ELSD) trong các dược phẩm từ F1 đến F10. a là thời điểm 0 (T0); b là 40°C, 1M; c là 25°C, 2M; d là 5°C, 2M; e là 5°C, 6M; f là 5°C, 6M, lọ thủy tinh (glass vial - GV) 20cc, nắp đầy; và g là 5°C, 6M, lọ thủy tinh (GV) 20cc, nắp vơi.

Fig. 6 là loạt đồ thị thể hiện độ ổn định của dược phẩm chứa α -PDL1 được bảo quản ở -20°C hoặc 5°C trong không quá 6 tháng trong lọ thủy tinh (GV). A) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) monome trong dược phẩm sau năm chu kỳ làm lạnh đông - làm tan băng trong quá trình bảo quản ở -20°C trong thời gian đã định. B) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) monome trong dược phẩm được bảo quản ở 5°C trong thời gian đã định. C) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) đỉnh chính thu được từ dược phẩm sau năm chu kỳ làm lạnh đông - làm tan băng trong quá trình bảo quản ở -20°C trong thời gian đã định. D) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) đỉnh chính thu được từ dược phẩm được bảo quản ở 5°C trong thời gian đã định.

Fig. 7 là loạt đồ thị thể hiện độ ổn định của dược phẩm chứa α -PDL1 sau ba chu kỳ làm lạnh đông - làm tan băng và bảo quản trong hộp nhỏ bằng thép không gỉ hoặc hợp kim hastelloy. A) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) monome trong dược phẩm sau quá trình bảo quản ở nhiệt độ đã định trong 3 tháng. B) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) đỉnh chính trong dược phẩm sau quá trình bảo quản ở nhiệt độ đã định trong 3 tháng.

không gỉ 316L hoặc hợp kim hastelloy. Theo một số phương án, dược phẩm này ổn định ở nhiệt độ 2-8°C trong ít nhất 6 tháng, ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng hoặc ít nhất 24 tháng. Theo một số phương án, kháng thể trong dược phẩm duy trì được, sau bảo quản, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90% hoạt tính sinh học trước khi bảo quản. Theo một số phương án, hoạt tính sinh học được đo bằng khả năng liên kết với PD-L1 của kháng thể.

Theo một số phương án, dược phẩm được mô tả trong bản mô tả là vô trùng. Theo một số phương án, dược phẩm được mô tả trong bản mô tả là thích hợp để sử dụng cho đối tượng. Theo một số phương án, dược phẩm được mô tả trong bản mô tả để sử dụng trong tĩnh mạch (intravenous - IV).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật phẩm sản xuất hoặc kit chứa đồ chứa đựng dược phẩm dạng nước ổn định bất kỳ được mô tả trên đây và trong bản mô tả. Theo một số phương án, đồ chứa là lọ thủy tinh hoặc đồ chứa bằng hợp kim. Theo một số phương án, hợp kim này là thép không gỉ 316L hoặc hợp kim hastelloy.

Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng bao gồm cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu dược phẩm được mô tả trong bản mô tả, trong đó bệnh hoặc rối loạn này được chọn từ nhóm gồm tình trạng nhiễm trùng, bệnh ung thư, và bệnh do viêm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là loạt đồ thị thể hiện kết quả phân tích thống kê dữ liệu về độ ổn định của dược phẩm α -PDL1 ở 40°C bằng ICIEF bằng cách sử dụng phần mềm JMP. A) Giá trị trung bình tốc độ tổn thất đỉnh chính từ thiết kế thử nghiệm (design of experiment-DOE) nhân tố từng phần. B) Kết quả phân tích đỉnh chính từ DOE nhân tố từng phần. Đỉnh chính bao gồm thành phần tích điện của α -PDL1 có cùng độ pH với điểm đẳng điện pI (isoelectric point - pI) của phân tử.

Fig. 2 là loạt đồ thị thể hiện kết quả phân tích thống kê dữ liệu về độ ổn định của dược phẩm α -PDL1 ở 25°C bằng ICIEF bằng cách sử dụng phần mềm JMP. A) Giá trị trung bình tốc độ tổn thất đỉnh chính từ thiết kế thử nghiệm (design of experiment-DOE) nhân tố từng phần. B) Kết quả phân tích đỉnh chính từ DOE nhân tố từng phần. Đỉnh chính bao gồm thành phần tích điện của α -PDL1 có cùng độ pH với pI (điểm đẳng điện) của phân tử.

Fig. 8 là loạt đồ thị thể hiện độ ổn định của dược phẩm chứa α -PDL1 bảo quản trong lọ 20cc. A) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) monome trong dược phẩm sau quá trình bảo quản ở nhiệt độ đã định trong 3 tháng. B) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) đỉnh chính trong dược phẩm sau quá trình bảo quản ở nhiệt độ đã định trong 3 tháng.

Fig. 9 là loạt đồ thị thể hiện độ ổn định của dược phẩm chứa α -PDL1 chứa PS20 với nhiều nồng độ khác nhau khi được lắc trong lọ thủy tinh. A) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) monome trong dược phẩm sau khi lắc trong thời gian đã định ở nhiệt độ trong phòng. B) Đồ thị về độ đục đo được bằng độ hấp thụ ở 350nm sau khi lắc trong thời gian đã định ở nhiệt độ trong phòng.

Fig. 10 là đồ thị thể hiện độ ổn định của dược phẩm chứa α -PDL1 được bảo quản trong lọ thủy tinh trong một khoảng thời gian ở nhiệt độ đã định và sau đó lắc. Sự thay đổi tỷ lệ phần trăm monome trong dược phẩm được xác định bằng SEC.

Fig. 11 là loạt đồ thị thể hiện sự tương đồng về tốc độ tổn thất α -PDL1 mỗi tuần so với sự gia tăng độ pH. A) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) monome tổn thất mỗi tuần trong dược phẩm sau khi bảo quản ở 40°C. B) Đồ thị tỷ lệ phần trăm (%) tổn thất đỉnh chính mỗi tuần trong dược phẩm sau khi bảo quản ở 40°C.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Trước khi mô tả chi tiết sáng chế, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các chế phẩm hoặc hệ sinh học cụ thể, mà có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng, thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không dự định để hạn chế. Như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít “một” và dạng xác định bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi được định nghĩa một cách rõ ràng trong nội dung đó theo cách khác. Do đó, ví dụ, khi nói đến “một phân tử” là tùy ý bao gồm tổ hợp hai hay nhiều phân tử như vậy, và các cách diễn đạt tương tự.

Thuật ngữ “khoảng” như được sử dụng trong bản mô tả chỉ khoảng sai số thông thường đối với trị số tương ứng dễ dàng biết được đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Khi nói “khoảng” giá trị hoặc thông số trong bản mô tả là bao gồm (và mô tả) các phương án mà thực chất hướng đến giá trị hoặc thông số đó.

Cần hiểu rằng các khía cạnh và phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả bao gồm các khía cạnh và phương án “chứa,” “bao gồm,” và “chủ yếu bao gồm”.

Thuật ngữ "dược phẩm" chỉ chế phẩm mà ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính là hữu hiệu, và không chứa các thành phần bổ sung mà gây độc một cách không chấp nhận được cho đối tượng sử dụng dược phẩm này. Các dược phẩm như vậy là vô trùng. Các tá dược (chất dẫn, chất phụ trợ) "dược dụng" là các chất mà có thể được sử dụng một cách hợp lý cho đối tượng động vật có vú để tạo ra liều hữu hiệu của thành phần hoạt tính được sử dụng.

Dược phẩm "vô trùng" là dược phẩm vô khuẩn hoặc không có hoặc hầu như không có mọi vi sinh vật sống và bào tử của chúng.

Dược phẩm "đông lạnh" là dược phẩm ở nhiệt độ dưới 0°C. Nói chung, dược phẩm đông lạnh không được làm khô đông lạnh, hay không được đông khô trước hoặc sau khi đông lạnh. Theo các phương án nhất định, dược phẩm đông lạnh chứa dược chất đông lạnh để bảo quản (trong hộp thép không gỉ) hoặc thuốc đông lạnh (dạng lọ thành phẩm).

Dược phẩm "ổn định" là dược phẩm trong đó protein của nó chủ yếu duy trì độ ổn định vật lý và/hoặc độ ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Tốt hơn, nếu dược phẩm chủ yếu duy trì được độ ổn định vật lý và hóa học, cũng như hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Thời hạn bảo quản thường được chọn dựa trên thời hạn sử dụng đã định của dược phẩm. Nhiều kỹ thuật phân tích khác nhau để xác định độ ổn định của protein là đã biết trong lĩnh vực này và được đánh giá trong tài liệu *Pepide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) và tài liệu của Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), chẳng hạn. Độ ổn định có thể được xác định ở nhiệt độ đã chọn trong khoảng thời gian đã chọn. Độ ổn định có thể được đánh giá định tính và/hoặc định lượng theo nhiều cách khác nhau, bao gồm đánh giá sự hình thành khối kết tụ (ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ, bằng cách đo độ đục, và/hoặc bằng cách kiểm tra bằng mắt thường); bằng cách đánh giá trạng thái không đồng nhất về điện tích bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi cation, ảnh điện di mao quản hội tụ đẳng điện (image capillary isoelectric focusing - icIEF) hoặc điện

di mao quản vùng; phân tích trình tự đầu tận cùng amino hoặc đầu tận cùng carboxy; phân tích phổ khối; phân tích SDS-PAGE để so sánh kháng thể khử và kháng thể nguyên vẹn; phân tích bản đồ peptit (ví dụ tryptic hoặc LYS-C); đánh giá hoạt tính sinh học hoặc chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể; v.v.. Sự không ổn định có thể bao gồm một hoặc nhiều trạng thái: kết tụ, khử amit (ví dụ, khử amit Asn), oxy hóa (ví dụ, oxy hóa Met), đồng phân hóa (ví dụ, đồng phân hóa Asp), phân cắt/thủy phân/phân đoạn (ví dụ, phân đoạn vùng bản lề), tạo thành suxinimit, (các) xystein không kết cặp, kéo dài đầu tận cùng N, xử lý đầu tận cùng C, khác biệt về glycosyl hóa, v.v..

Protein "duy trì độ ổn định vật lý của nó" trong được phẩm nếu nó không thể hiện dấu hiệu hoặc rất ít bị kết tụ, kết tủa và/hoặc biến tính khi kiểm tra bằng mất thường màu sắc và/hoặc độ trong, hoặc như được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng UV hoặc bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ.

Protein "duy trì độ ổn định hóa học của nó" trong được phẩm nếu độ ổn định hóa học ở thời điểm nhất định là sao cho protein được xem là vẫn giữ được hoạt tính sinh học của nó như xác định dưới đây. Độ ổn định hóa học có thể được đánh giá bằng cách phát hiện và định lượng các dạng biến đổi hóa học của protein. Sự biến đổi hóa học có thể bao gồm thay đổi về kích thước (ví dụ phân cắt) mà có thể được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ, SDS-PAGE và/hoặc phương pháp ion hóa rửa giải bằng laze hỗ trợ bằng chất nền/phương pháp phối khối thời gian bay (matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry - MALDI/TOF MS), chẳng hạn. Các loại biến đổi hóa học khác bao gồm thay đổi điện tích (ví dụ xảy ra khi khử amit) mà có thể được đánh giá bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion hoặc icIEF, chẳng hạn.

Kháng thể "duy trì được hoạt tính sinh học của nó" trong được phẩm nếu hoạt tính sinh học của kháng thể ở thời gian nhất định bằng ít nhất khoảng 60% (trong phạm vi sai số thử nghiệm) hoạt tính sinh học được biểu hiện ở thời điểm được phẩm được bào chế như xác định bằng thử nghiệm (ví dụ, thử nghiệm liên kết kháng nguyên). Các thử nghiệm "hoạt tính sinh học" khác dùng cho kháng thể được thảo luận chi tiết dưới đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "hoạt tính sinh học" của kháng thể đơn dòng bao gồm khả năng liên kết kháng nguyên của kháng thể và dẫn đến đáp ứng sinh học do được mà có thể được xác định in vitro hoặc in vivo.

Kháng thể đơn dòng "được khử amit" trong bản mô tả là kháng thể có một hoặc nhiều gốc asparagin của nó đã được tạo dẫn xuất, ví dụ thành axit aspartic hoặc axit iso-aspartic.

Kháng thể đơn dòng được "oxy hóa" trong bản mô tả là kháng thể mà một hoặc nhiều gốc tryptophan và/hoặc một hoặc nhiều methionin của nó đã được oxy hóa.

Kháng thể đơn dòng được "kết hợp đường" trong bản mô tả là kháng thể mà một hoặc nhiều gốc lysin của nó đã được kết hợp đường.

Kháng thể "dễ bị khử amit" là kháng thể chứa một hoặc nhiều gốc, mà đã được phát hiện là có xu hướng khử amit.

Kháng thể "dễ bị oxy hóa" là kháng thể chứa một hoặc nhiều gốc, mà đã được phát hiện là có xu hướng oxy hóa.

Kháng thể "dễ kết tụ" là kháng thể mà đã được phát hiện là kết tụ với (các) phân tử kháng thể khác, đặc biệt khi đông lạnh và/hoặc lắc.

Kháng thể "dễ phân đoạn" là kháng thể mà đã được phát hiện là bị phân cắt thành hai hay nhiều mảnh, ví dụ ở vùng bản lề của nó.

Khi nói "giảm sự khử amit, oxy hóa, kết tụ, hoặc phân đoạn" là dự định ngăn ngừa hoặc làm giảm lượng kháng thể đơn dòng được bào chế trong dược phẩm bị khử amit, oxy hóa, kết tụ, hoặc phân đoạn.

Kháng thể được bào chế tốt hơn là hầu như tinh khiết và mong muốn là hầu như đồng nhất (ví dụ, không chứa protein nhiễm tạp, v.v.). Kháng thể "hầu như tinh khiết" nghĩa là chế phẩm chứa ít nhất khoảng 90% khối lượng là kháng thể, dựa trên tổng khối lượng của các protein trong chế phẩm này, tốt hơn là ít nhất khoảng 95% khối lượng. Kháng thể "hầu như đồng nhất" nghĩa là chế phẩm chứa ít nhất khoảng 99% khối lượng là kháng thể, dựa trên tổng khối lượng của các protein trong chế phẩm này.

Khi nói "đẳng trương" nghĩa là dược phẩm cần quan tâm hầu như có cùng áp suất thẩm thấu như máu người. Dược phẩm đẳng trương nói chung có áp suất thẩm thấu từ

khoảng 250 đến 350 mOsm. Độ đẳng trương có thể được xác định bằng cách sử dụng áp suất bay hơi hoặc thẩm áp kế loại đông đá, chẳng hạn.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "dung dịch đệm" chỉ dung dịch được đệm mà chống lại những thay đổi về độ pH bằng hoạt động của các thành phần liên hợp axit-bazơ của nó. Dung dịch đệm được mô tả tốt hơn là có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến khoảng 7,0, tốt hơn là từ khoảng 5,6 đến khoảng 7,0, ví dụ từ 5,6 đến 6,9, từ 5,7 đến 6,8, từ 5,8 đến 6,7, từ 5,9 đến 6,6, từ 5,9 đến 6,5, 6,0, từ 6,0 đến 6,4, hoặc từ 6,1 đến 6,3. Theo một phương án dung dịch đệm có độ pH=5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, hoặc 7,0. Chẳng hạn, natri phosphat là ví dụ về dung dịch đệm mà sẽ điều chỉnh độ pH trong khoảng này.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "chất hoạt động bề mặt" chỉ chất có hoạt tính bề mặt, tốt hơn là chất hoạt động bề mặt không ion. Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả bao gồm polysorbat (ví dụ, polysorbat 20 và polysorbat 80); poloxame (ví dụ poloxame 188); Triton; natri dodecyl sulfat (SDS); natri laurel sulfat; natri octyl glycosit; lauryl-, myristyl-, linoleyl-, hoặc stearyl-sulfobetain; lauryl-, myristyl-, linoleyl- hoặc stearyl-sarcosin; linoleyl-, myristyl-, hoặc xetyl-betain; lauroamidopropyl-, cocamidopropyl-, linoleamidopropyl-, myristamidopropyl-, palmidopropyl-, hoặc isostearamidopropyl-betain (ví dụ lauroamidopropyl); myristamidopropyl-, palmidopropyl-, hoặc isostearamidopropyl-dimetylamin; natri methyl cocoyl-, hoặc dinatri methyl oleyl-taurat; và loạt MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polyetyl glycol, polypropyl glycol, và các copolyme của etylen và propylen glycol (ví dụ Pluronic, PF68 v.v.); v.v.. Theo một phương án, chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả là polysorbat 20.

Về mặt dược lý, theo ngữ cảnh của sáng chế, "lượng hữu hiệu điều trị" của kháng thể chỉ lượng hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn mà kháng thể là hữu hiệu để điều trị nó. "Rối loạn" là tình trạng bệnh lý bất kỳ mà có thể có lợi từ việc điều trị bằng kháng thể. Rối loạn bao gồm rối loạn hoặc bệnh mạn tính và cấp tính bao gồm các tình trạng bệnh lý mà làm cho động vật có vú mắc rối loạn bị nghi ngờ.

"Chất bảo quản" là hợp chất mà có thể tùy ý đưa vào trong dược phẩm để về cơ bản làm giảm hoạt động của vi khuẩn trong đó, do đó tạo thuận tiện cho việc sản xuất dược phẩm dùng nhiều lần, chẳng hạn. Ví dụ về các chất bảo quản tiềm năng bao gồm

octadexyldimethylbenzyl amoni clorua, hexamethoni clorua, benzalkoni clorua (hỗn hợp của alkylbenzyldimethylamoni clorua trong đó các nhóm alkyl là các hợp chất mạch dài), và benzethoni clorua. Các loại chất bảo quản khác bao gồm các rượu thơm như rượu phenolic, butylic và benzylic, các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben, catechol, resorxinol, xyclohexanol, 3-pentanol, và m-cresol. Theo một phương án, chất bảo quản trong bản mô tả là rượu benzylic.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “điều trị” chỉ việc can thiệp lâm sàng được thiết kế để thay đổi tiến trình tự nhiên của cá thể hoặc tế bào được điều trị trong tiến trình bệnh học lâm sàng. Cá tác dụng mong muốn của việc điều trị bao gồm giảm tốc độ tiến triển bệnh, làm thuyên giảm hoặc làm dịu tình trạng bệnh, và tiên lượng thuyên giảm hoặc cải thiện. Ví dụ, cá thể được “điều trị” thành công nếu một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến bệnh ung thư được giảm nhẹ hoặc loại bỏ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giảm tăng sinh (hoặc phá hủy) tế bào ung thư, giảm triệu chứng do bệnh, tăng chất lượng cuộc sống của bệnh nhân mắc bệnh này, giảm liều các thuốc khác cần để điều trị bệnh, làm chậm sự tiến triển bệnh, và/hoặc kéo dài sự sống của cá thể này.

Như được sử dụng trong bản mô tả, “làm chậm sự tiến triển bệnh” nghĩa là trì hoãn, ngăn cản, làm chậm, giảm tốc độ, ổn định, và/hoặc hoãn sự phát triển của bệnh (như bệnh ung thư). Sự làm chậm này có thể là trong thời gian thay đổi, tùy thuộc vào tiền sử bệnh và/hoặc cá thể được điều trị. Đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này có bằng chứng cho thấy, sự trì hoãn đủ hoặc đáng kể có thể, trong thực tế, ngăn ngừa, trong đó cá thể không phát triển bệnh. Ví dụ, bệnh ung thư giai đoạn cuối, như phát triển di căn, có thể bị trì hoãn.

“Lượng hữu hiệu” ít nhất là lượng tối thiểu cần để tạo ra hiệu quả cải thiện hoặc ngăn ngừa đo được đối với một rối loạn cụ thể. Lượng hữu hiệu trong bản mô tả có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và thể trọng của bệnh nhân, và khả năng tạo ra đáp ứng mong muốn của kháng thể ở cá thể. Lượng hữu hiệu cũng là lượng mà trong đó tác dụng độc hoặc bất lợi bất kỳ của việc điều trị bị lấn át bởi tác dụng điều trị có lợi. Để sử dụng dự phòng, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm kết quả như loại bỏ hoặc giảm nguy cơ, giảm mức độ nghiêm trọng, hoặc trì hoãn sự khởi phát của bệnh, bao gồm các triệu chứng sinh hóa, mô học và/hoặc biểu hiện của bệnh, biến chứng của nó và các kiểu hình bệnh lý trung gian có mặt trong sự

phát triển của bệnh. Để sử dụng trong điều trị, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm các kết quả lâm sàng như giảm một hoặc nhiều triệu chứng do bệnh, tăng chất lượng cuộc sống của bệnh nhân mắc bệnh này, giảm liều các thuốc khác cần để điều trị bệnh, tăng cường tác dụng của liệu pháp điều trị khác như qua hướng đích, làm chậm sự tiến triển bệnh, và/hoặc kéo dài sự sống. Trong trường hợp bệnh ung thư hoặc khối u, lượng hữu hiệu của dược chất có thể có tác dụng giảm số tế bào ung thư; giảm kích thước khối u; ức chế (*tức là*, làm chậm đến một số phạm vi nhất định hoặc tốt hơn là dừng) sự thâm nhiễm của tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại vi; ức chế (*tức là*, làm chậm đến một số phạm vi nhất định hoặc tốt hơn là dừng) sự di căn của khối u; ức chế đến một số phạm vi nhất định sự sinh trưởng của khối u; và/hoặc làm dịu một số phạm vi nhất định một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến rối loạn này. Lượng hữu hiệu có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều lần sử dụng. Theo các mục đích của sáng chế, lượng hữu hiệu dược chất, hợp chất, hoặc dược phẩm là lượng đủ để tiến hành điều trị dự phòng hoặc điều trị trực tiếp hoặc gián tiếp. Trong ngữ cảnh lâm sàng, cần hiểu rằng, lượng hữu hiệu dược chất, hợp chất, hoặc dược phẩm có thể đạt được khi kết hợp với các dược chất, hợp chất, hoặc dược phẩm khác hoặc không. Do đó, “lượng hữu hiệu” có thể được xem xét trong ngữ cảnh sử dụng một hoặc nhiều tác nhân điều trị, và có thể xem xét sử dụng tác nhân duy nhất với lượng hữu hiệu nếu, kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân khác, có thể đạt được hoặc đạt được hiệu quả mong muốn.

Như được sử dụng trong bản mô tả, “kết hợp với” chỉ việc sử dụng một phương thức điều trị ngoài một phương thức điều trị khác. Chẳng hạn, “kết hợp với” chỉ việc sử dụng một phương thức điều trị trước, trong, hoặc sau khi sử dụng một phương thức điều trị khác trên cá thể.

"Rối loạn" là tình trạng bất kỳ có thể có lợi từ việc điều trị bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn hoặc bệnh mạn tính hoặc cấp tính bao gồm các tình trạng bệnh lý mà dẫn đến rối loạn nghi ngờ ở động vật có vú.

Thuật ngữ "rối loạn tăng sinh tế bào" và "rối loạn tăng sinh" chỉ các rối loạn mà có liên quan ở một số mức độ với sự tăng sinh tế bào bất thường. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh ung thư. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào là khối u.

"Khối u", như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ tất cả sự sinh trưởng và tăng sinh của tế bào tế bào tân sinh, ác tính hoặc lành tính, và tất cả các tế bào và mô tiền ung thư và ung thư. Các thuật ngữ "ung thư", "có tính chất ung thư", "rối loạn tăng sinh tế bào", "rối loạn tăng sinh" và "khối u" không loại trừ lẫn nhau như được đề cập trong bản mô tả.

Các thuật ngữ "ung thư" và "có tính chất ung thư" chỉ hoặc mô tả tình trạng bệnh lý ở động vật có vú mà thường đặc trưng bởi sự sinh trưởng tế bào không bình thường. Ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, caxinom, u lympho, u nguyên bào, sarcom, và bệnh bạch cầu hoặc u lympho ác tính. Ví dụ cụ thể hơn về các bệnh ung thư như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh ung thư tế bào vảy (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy biểu mô), bệnh ung thư phổi bao gồm bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tuyến ở phổi và caxinom vảy ở phổi, bệnh ung thư phúc mạc, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư dạ dày hoặc bao tử bao gồm bệnh ung thư dạ dày ruột và ung thư mô đệm đường tiêu hóa, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào thần kinh đệm, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư đường niệu, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư kết trực tràng, caxinom nội mạc tử cung hoặc tử cung, caxinom tuyến nước bọt, hoặc bệnh ung thư tận hoặc gần thận, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, caxinom gan, caxinom hậu môn, caxinom dương vật, u hắc tố, u hắc tố phát triển trên bề mặt, u hắc tố ác tính tại chỗ, u hắc tố dạng nốt ruồi son ở ngón chi, u hắc tố dạng phát triển thể cục, đa u tuyến và u lympho tế bào B (bao gồm u lympho không Hodgkin cấp độ thấp/dạng nang (non-Hodgkin's lymphoma - NHL); NHL lympho bào nhỏ (small lymphocytic - SL) ; NHL cấp độ trung bình/dạng nang; NHL cấp độ trung bình lan tỏa; NHL nguyên bào miễn dịch cấp độ cao; NHL nguyên bào lympho cấp độ cao; NHL tế bào không khía nhỏ cấp độ cao; NHL hạch lớn; u lympho tế bào vỏ; u lympho liên quan đến bệnh AIDS; và bệnh macroglobulin huyết Waldenstrom); bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia - CLL); bệnh bạch cầu lympho bào cấp (acute lymphoblastic leukemia - ALL); bệnh bạch cầu tế bào tóc; bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính; và rối loạn tăng sinh bạch huyết sau cấy ghép (post-transplant lymphoproliferative disorder - PTLD), cũng như tăng sinh mạch bất thường có liên

quan đến hội chứng u thần kinh-da ngoại bì, phù (như phù có liên quan đến các khối u não), hội chứng Meigs, bệnh ung thư não, cũng như bệnh ung thư đầu và cổ, và di căn có liên quan. Theo các phương án nhất định, bệnh ung thư tuân thủ việc điều trị bằng kháng thể theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, u nguyên bào thần kinh đệm, u lympho không Hodgkins (NHL), bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, sarcom mô mềm, sarcom kaposi, caxinom carcinoid, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư buồng trứng, u trung biểu mô, và đa u tủy. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ: bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, u nguyên bào thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh, u hắc tố, caxinom vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư kết trực tràng (colorectal cancer - CRC), và caxinom tế bào gan. Theo một số phương án nữa, bệnh ung thư được chọn từ: bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư kết trực tràng, u nguyên bào thần kinh đệm và caxinom vú, bao gồm các thể di căn của các bệnh ung thư này.

"Tác nhân hóa trị" là hợp chất hóa học hữu dụng để điều trị bệnh ung thư. Ví dụ về các tác nhân hóa trị bao gồm tác nhân alkyl hóa như thiotepa và xyclophosphamid (CYTOXAN®); alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenphosphoramit và trimetylmelamin; axetogenin (đặc biệt là bullataxin và bullataxinon); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachon; lapachol; colchixin; axit betulic; camptothecin (bao gồm topotecan tương tự tổng hợp (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), axetylcamptothecin, scoplectin, và 9-aminocamptothecin); bryostatin; callistatin; CC-1065 (bao gồm các chất tương tự tổng hợp của nó adozelesin, carzelesin và bizelesin); podophyllotoxin; axit podophyllinic; teniposide; cryptophycin (cụ thể là cryptophycin 1 và cryptophycin 8); dolastatin; duocarmyxin (bao gồm các chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; nitơ mù tạc như clorambuxil, clornaphazin, clorophosphamid, estramustin, ifosfamid, meclorethamin, meclorethamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, uraxil mù tạc; nitrosoure như carmustin, clorozotocin, fotemustin, lomustin, nimustin, và ranimustin; các chất kháng sinh như chất kháng sinh enediyn (ví dụ,

calicheamixin, đặc biệt là calicheamixin gamaII và calicheamixin omegaII (xem, ví dụ, Nicolaou et al., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, chất ức chế alpha-4 integrin đường uống; dynemixin, bao gồm dynemixin A; esperamixin; cũng như neocarzinostatin chromophor và chromophor kháng sinh chromoprotein enediyn liên quan), aclacinomycin, actinomycin, authramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, carabixin, caminomycin, carzinophilin, chromomycin, dactinomycin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin (bao gồm ADRIAMYCIN®, morpholino-doxorubixin, xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrrolino-doxorubixin, dung dịch tiêm doxorubixin HCl liposom (DOXIL®), doxorubixin TLC D-99 (MYOCET®), doxorubixin liposom PEG hóa (CAELYX®), và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marxellomycin, mitomycin như mitomycin C, axit mycophenolic, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, porfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tuberidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; chất chống chuyển hóa như methotrexat, gemcitabin (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabin (XELODA®), epothilon, và 5-fluorouraxil (5-FU); combretastatin; chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; chất tương tự pyrimidin như ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; các androgen như calusteron, dromostanolon propionat, epitioctanol, mepitioctan, testolacton; chất kháng thượng thận như aminoglutethimid, mitotan, chất thay thế axit trilostan folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamid glycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolcin; diaziqon; elformithin; eliptini axetat; epothilon; etoglucid; gali nitrat; hydroxyurea; lentinan; lonidainin; maytansinoid như maytansin và ansamitoxin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; 2-etylhydrazid; procarbazin; phức polysacarit PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxan; rhizoxin; sizofuran; spirogermani; axit tenuazonic; triaziqon; 2,2',2'-trichlorietylamin; trichothexen (đặc biệt là độc tố T-2, verracurin A, roridin A và anguidin); uretan; vindesin (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazin; manomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); thiotepa; taxoid, ví dụ, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology,

Princeton, N.J.), dược phẩm chứa hạt nano được xử lý bằng albumin chứa paclitaxel (ABRAXANE™), và doxorubicin (DOXIL™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambucil; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; các tác nhân chứa platin như cisplatin, oxaliplatin (ví dụ, ELOXATIN®), và carboplatin; vincas, mà ngăn ngừa sự polyme hóa tubulin từ các vi ống đang hình thành, bao gồm vinblastin (VELBAN®), vincristin (ONCOVIN®), vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®), và vinorelbine (NAVELBINE®); etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantron; leucovorin; novantrone; edatrexat; daunorubicin; aminopterin; ibandronate; topoisomerase chất ức chế RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); các retinoid như axit retinoic, bao gồm bexarotene (TARGRETIN®); bisphosphonate như clodronate (ví dụ, BONEFOS® hoặc OSTAC®), etidronate (DIDROCAL®), NE-58095, axit zoledronic/zoledronate (ZOMETA®), alendronate (FOSAMAX®), pamidronate (AREDIA®), tiludronate (SKELID®), hoặc risedronate (ACTONEL®); troxacitabine (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleoside cytosine); các oligonucleotide đối nghĩa, đặc biệt là các oligonucleotide ức chế sự biểu hiện các gen trong đường phát tín hiệu trong sự tăng sinh tế bào bất thường, như, ví dụ, PKC- α , Raf, H-Ras, và thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF-R) (ví dụ, erlotinib (Tarceva™)); và VEGF-A mà làm giảm sự tăng sinh tế bào; các vaccin như vaccin THERATOPE® và các vaccin dùng trong liệu pháp gen, ví dụ, vaccin ALLOVECTIN®, vaccin LEUVECTIN®, và vaccin VAXID®; chất ức chế topoisomerase 1 (ví dụ, LURTOTECAN®); mTOR (ví dụ, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosin, chất ức chế COX-2 (ví dụ celecoxib hoặc etoricoxib), chất ức chế proteasome (ví dụ PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; chất ức chế Bcl-2 như oblimersen natri (GENASENSE®); pixantrone; chất ức chế EGFR; chất ức chế tyrosine kinase; chất ức chế serine-threonine kinase như rapamycin (sirolimus, RAPAMUNE®); chất ức chế farnesyltransferase như lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); và muối, axit hoặc dẫn xuất dược dụng của chất bất kỳ trong số các chất trên; cũng như tổ hợp của hai hay nhiều chất nêu trên như CHOP, viết tắt của liệu pháp kết hợp cyclophosphamide, doxorubicin, vincristin, và prednisolone; và FOLFOX, viết tắt của chế độ điều trị bằng oxaliplatin (ELOXATIN™) kết hợp với 5-FU và leucovorin, và muối, axit hoặc dẫn xuất dược dụng của chất bất kỳ trên đây; cũng như tổ hợp của hai hay nhiều chất nêu trên.

Các tác nhân hóa trị như được xác định trong bản mô tả bao gồm "các tác nhân kháng hormon" hoặc "liệu pháp nội tiết" mà có hoạt tính điều hòa, giảm, ngăn chặn, hoặc ức chế tác dụng của các hormon mà có thể thúc đẩy sự phát triển của bệnh ung thư. Chính chúng có thể là các hormon, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: kháng estrogen và chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor modulator - SERM), bao gồm, ví dụ, tamoxifen (bao gồm tamoxifen NOLVADEX®), raloxifen, droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và FARESTON.cndot.toremifen; chất ức chế aromataza mà ức chế enzym aromataza, điều hòa sự sản xuất estrogen ở tuyến thượng thận, như, ví dụ, 4(5)-imidazol, aminoglutethimit, MEGASE® megestrol axetat, AROMASIN® exemestan, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, và ARIMIDEX® anastrozol; và kháng androgen như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolid, và goserelin; cũng như troxacitabin (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); các oligonucleotit đối nghĩa, cụ thể là các oligonucleotit mà ức chế sự biểu hiện các gen trong đường phát tín hiệu liên quan đến sự tăng sinh tế bào bất thường, như, ví dụ, PKC-alpha, Raf và H-Ras; các ribozym như chất ức chế sự biểu hiện VEGF (ví dụ, ANGIOZYME® ribozym) và chất ức chế sự biểu hiện HER2; các vaccin như các vaccin dùng trong liệu pháp gen, ví dụ, vaccin ALLOVECTIN®, vaccin LEUVECTIN®, và vaccin VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; chất ức chế LURTOTECAN® topoisomeraza 1; ABARELIX® rmRH; Vinorelbin và Esperamixin (xem patent Mỹ số 4,675,187), và muối, axit hoặc dẫn xuất được dụng của các chất bất kỳ trong số các chất nêu trên; cũng như tổ hợp của hai hay nhiều chất nêu trên.

"Tác nhân ức chế sinh trưởng" khi được sử dụng trong bản mô tả chỉ hợp chất hoặc chế phẩm mà ức chế sự sinh trưởng của tế bào in vitro hoặc in vivo. Theo một phương án, tác nhân ức chế sinh trưởng là kháng thể ức chế sinh trưởng mà ngăn ngừa hoặc giảm sự tăng sinh tế bào biểu hiện kháng nguyên mà kháng thể liên kết. Theo một phương án khác, tác nhân ức chế sinh trưởng có thể là tác nhân làm giảm đáng kể tỷ lệ phần trăm tế bào ở pha S. Ví dụ về tác nhân ức chế sinh trưởng bao gồm các tác nhân mà ngăn chặn sự tiến triển của chu kỳ tế bào (ở vị trí không phải pha S), như các tác nhân mà làm ngừng chu kỳ tế bào ở pha G1 và pha M. Các chất ngăn chặn pha M kinh điển bao gồm vincas (vincristin và vinblastin), taxan, và chất ức chế topoisomeraza II như doxorubixin, epirubixin, daunorubixin, etoposid, và bleomycin.

Các tác nhân làm ngừng chu kỳ tế bào ở pha G1 cũng ảnh hưởng đến khả năng ngừng chu kỳ tế bào ở pha S, chẳng hạn, các tác nhân alkyl hóa ADN như tamoxifen, prednison, dacarbazin, meclorethamin, xisplatin, methotrexat, 5-fluorouraxil, và ara-C. Có thể xem thêm thông tin trong tài liệu của Mendelsohn và Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Chapter 1, tài liệu "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" của Murakami và các đồng tác giả. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), ví dụ, trang 13. Các taxan (paclitaxel và docetaxel) là các thuốc chống ung thư đều thu được từ cây thủy tùng. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), thu được từ cây thủy tùng châu Âu, là chất tương tự bán tổng hợp của paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel và docetaxel thúc đẩy sự lắp ghép các vi cấu trúc hình ống từ các dime tubulin và ổn định các vi cấu trúc hình ống bằng cách ngăn ngừa sự giải trùng hợp, mà dẫn đến ức chế quá trình nguyên phân trong tế bào.

"Phương pháp xạ trị" nghĩa là việc sử dụng tia gama hoặc tia beta có định hướng để gây ra sự thương tổn tế bào đủ để hạn chế khả năng của nó đến mức hoạt động chức năng bình thường hoặc phá hủy hoàn toàn tế bào. Trong lĩnh vực này, có nhiều cách để xác định liều lượng và khoảng thời gian điều trị. Các phương pháp điều trị thông thường được thực hiện dưới dạng sử dụng một lần và liều lượng thông thường nằm trong khoảng từ 10 đến 200 đơn vị (Grays) mỗi ngày.

"Đối tượng" hoặc "cá thể" đối với các mục đích điều trị chỉ động vật bất kỳ được phân loại vào động vật có vú, bao gồm người, động vật nuôi trong nhà và ở trang trại, và động vật trong vườn thú, động vật thể thao, hoặc thú nuôi, như chó, ngựa, mèo, bò, v.v.. Tốt hơn, nếu động vật là người.

Thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả được sử dụng trong ngữ cảnh rộng nhất và cụ thể bao gồm các kháng thể đơn dòng (bao gồm kháng thể đơn dòng có độ dài đầy đủ), kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), và các mảnh kháng thể miễn là chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn.

Kháng thể "được phân lập" là kháng thể đã được nhận dạng và tách và/hoặc thu hồi từ thành phần trong môi trường tự nhiên của nó. Các thành phần nhiễm tạp trong môi trường tự nhiên của nó là các vật liệu mà có thể cản trở việc nghiên cứu, ứng dụng trong chẩn đoán hoặc điều trị của kháng thể, và có thể bao gồm các enzym, hormon, và

các chất hòa tan có bản chất protein hoặc không protein. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế (1) đến trên 95% khối lượng kháng thể như được xác định bằng, ví dụ, phương pháp Lowry, và theo một số phương án, đến trên 99% khối lượng; (2) đến mức độ đủ để thu được ít nhất 15 gốc trong trình tự axit amin đầu N hoặc trình tự axit amin bên trong bằng cách sử dụng, ví dụ, hệ thống giải trình tự spinning cup, hoặc (3) đến đồng nhất bằng SDS-PAGE trong điều kiện khử hoặc không khử bằng cách sử dụng, ví dụ, thuốc nhuộm xanh Coomassie hoặc thuốc nhuộm chứa bạc. Kháng thể được phân lập bao gồm kháng thể ở vị trí bình thường trong tế bào tái tổ hợp khi ít nhất một thành phần trong môi trường tự nhiên của kháng thể này không có mặt. Tuy nhiên, thông thường kháng thể được phân lập sẽ được tạo ra bằng ít nhất một bước tinh chế.

"Kháng thể tự nhiên" thường là các glycoprotein heterotetrame khoảng 150.000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ (L) giống nhau và hai chuỗi nặng (H) giống nhau. Mỗi chuỗi nhẹ được liên kết với một chuỗi nặng bằng một liên kết disulfua đồng hóa trị, trong khi đó số liên kết disulfua thay đổi giữa các chuỗi nặng của các globulin miễn dịch cùng lớp khác nhau. Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cũng có các cầu disulfua nội chuỗi cách đều nhau. Mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (V_H) ở một đầu tiếp theo là một số vùng hằng định. Mỗi chuỗi nhẹ có một vùng biến đổi (V_L) ở một đầu và một vùng hằng định ở đầu kia của nó; vùng hằng định của chuỗi nhẹ được sắp thẳng hàng với vùng hằng định thứ nhất của chuỗi nặng, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được sắp thẳng hàng với vùng biến đổi của chuỗi nặng. Các gốc axit amin cụ thể được cho là tạo ra giao diện giữa các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

Thuật ngữ "vùng hằng định" chỉ phần của phân tử globulin miễn dịch có trình tự axit amin được bảo toàn hơn so với vùng khác của globulin miễn dịch, vùng biến đổi mà chứa vị trí liên kết kháng nguyên. Vùng hằng định bao gồm 3 vùng C_H1 , C_H2 và C_H3 (gọi chung là CH) của chuỗi nặng và vùng CHL (hay CL) của chuỗi nhẹ.

"Miền biến đổi" hoặc "vùng biến đổi" của kháng thể chỉ các vùng tận cùng amino của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể. Vùng biến đổi của chuỗi nặng có thể gọi là " V_H ". Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có thể gọi là " V_L ". Các vùng này thường là những phần biến đổi nhiều nhất của kháng thể và chứa các vị trí liên kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "biến đổi" chỉ việc các phần nhất định của các vùng biến đổi khác đáng kể về trình tự giữa các kháng thể và được sử dụng trong khả năng liên kết và tính đặc hiệu của từng kháng thể cụ thể đối với kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, mức độ thay đổi là không đều trên các vùng biến đổi của kháng thể. Nó tập trung tại ba đoạn gọi là các vùng siêu biến đổi (hypervariable region - HVR) cả ở các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Các phần được bảo toàn cao hơn của vùng biến đổi được gọi là vùng khung (framework region - FR). Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tự nhiên bao gồm bốn vùng FR, phần nhiều có cấu hình phiến beta, được kết nối bằng ba HVR, mà tạo thành vòng nối, và trong một số trường hợp tạo thành phần của cấu trúc phiến beta. Các HVR trong mỗi chuỗi được giữ cùng nhau ở khoảng cách gần bởi các vùng FR và, cùng với các HVR của chuỗi khác, góp phần tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể (xem Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Các vùng hằng định không có liên quan trực tiếp đến liên kết của kháng thể với kháng nguyên, nhưng thể hiện nhiều chức năng tác động khác nhau, như sự tham gia của kháng thể trong độc tố tế bào phụ thuộc kháng thể.

"Các chuỗi nhẹ" của kháng thể (globulin miễn dịch) từ các loài động vật có vú có thể được chia thành một trong số hai loại khác nhau rõ rệt, gọi là kappa ("κ") và lambda ("λ"), dựa trên trình tự axit amin vùng hằng định của chúng.

Thuật ngữ "lớp" hoặc "phân lớp" IgG như được sử dụng trong bản mô tả nghĩa là phân lớp bất kỳ của globulin miễn dịch được xác định bằng cách đặc tính hóa học và kháng nguyên của vùng hằng định của chúng.

Tùy thuộc vào các trình tự axit amin vùng hằng định của các chuỗi nặng của chúng, kháng thể (globulin miễn dịch) có thể chia thành các lớp khác nhau. Có năm lớp globulin miễn dịch chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một số trong đó có thể chia tiếp thành các phân lớp (phân lớp của kháng thể), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Các vùng hằng định của chuỗi nặng mà tương ứng với các lớp khác nhau của globulin miễn dịch lần lượt được gọi là α, γ, ε, γ, và μ. Các cấu trúc dưới đơn vị và cấu hình ba chiều của các lớp globulin miễn dịch khác nhau đã được biết rõ và được mô tả chung trong, ví dụ, tài liệu của Abbas và các đồng tác giả, *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Kháng thể có thể là một phần

của phân tử dung hợp lớn hơn, được tạo ra bằng cách kết hợp đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị kháng thể này với một hoặc nhiều protein hoặc peptit khác.

Thuật ngữ "kháng thể có độ dài đầy đủ," "kháng thể nguyên vẹn" và "kháng thể đầy đủ" được sử dụng trong bản mô tả thay đổi cho nhau để chỉ kháng thể ở dạng gần như nguyên vẹn của nó, không phải là các mảnh kháng thể như xác định dưới đây. Các thuật ngữ này đặc biệt chỉ kháng thể với các chuỗi nặng chứa vùng Fc.

"Kháng thể trần" đối với các mục đích trong bản mô tả là kháng thể mà không được liên hợp với gốc độc tế bào hoặc nhãn phóng xạ.

"Mảnh kháng thể" bao gồm phần của kháng thể nguyên vẹn, tốt hơn là bao gồm vùng liên kết kháng nguyên của nó. Theo một số phương án, mảnh kháng thể được mô tả trong bản mô tả là mảnh liên kết kháng nguyên. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv; diabody; kháng thể thẳng; các phân tử kháng thể chuỗi đơn; và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Phân giải các kháng thể bằng papain tạo ra hai mảnh liên kết kháng nguyên giống nhau, gọi là các mảnh "Fab", mỗi mảnh có một vị trí liên kết kháng nguyên, và mảnh "Fc" còn lại, mà tên của nó cho thấy khả năng dễ kết tinh. Xử lý bằng pepsin tạo ra mảnh F(ab')₂ mà có hai vị trí kết hợp kháng nguyên và vẫn có khả năng liên kết ngang với kháng nguyên.

"Fv" là mảnh kháng thể nhỏ nhất chứa vị trí liên kết kháng nguyên hoàn chỉnh. Theo một phương án, loại Fv hai chuỗi chứa dime của một vùng biến đổi chuỗi nặng và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ kết hợp chặt chẽ, không đồng hóa trị. Ở loại Fv một chuỗi (scFv), một vùng biến đổi chuỗi nặng và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết đồng hóa trị bằng mối liên kết peptit linh hoạt sao cho các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể kết hợp trong cấu trúc "dime" tương tự như ở loại Fv hai chuỗi. Ở cấu hình này, ba HVR của mỗi vùng biến đổi tương tác để định ra vị trí liên kết kháng nguyên trên bề mặt của dime VH-VL. Nói chung, sáu HVR tạo ra tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên cho kháng thể. Tuy nhiên, ngay cả vùng biến đổi đơn (hoặc một nửa của Fv chỉ bao gồm ba HVR đặc hiệu đối với kháng nguyên) cũng có khả năng nhận biết và liên kết kháng nguyên, mặc dù ái lực nhỏ hơn so với toàn vị trí liên kết.

Mảnh Fab chứa các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và cũng chứa vùng hằng định của chuỗi nhẹ và vùng hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Các mảnh

Fab' khác với các mảnh Fab nhờ việc bổ sung một số gốc ở đầu tận cùng carboxy của vùng CH1 chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề của kháng thể. Fab'-SH là tên gọi trong bản mô tả của Fab' trong đó (các) gốc xystein của các vùng hằng định mang nhóm thiol tự do. Các mảnh kháng thể $F(ab')_2$ ban đầu được tạo ra dưới dạng cặp mảnh Fab' mà có các xystein bản lề giữa chúng. Các cách kết hợp hóa học khác giữa các mảnh kháng thể cũng đã biết.

Các mảnh kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể, trong đó các vùng này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Nói chung, polypeptit scFv còn chứa liên kết polypeptit giữa các vùng VH và VL mà làm cho scFv tạo thành cấu trúc mong muốn để liên kết kháng nguyên. Để hiểu thêm về scFv, xem, ví dụ, tài liệu của Pluckthün, trong *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

Thuật ngữ "diabody" chỉ các mảnh kháng thể với hai vị trí liên kết kháng nguyên, các mảnh này chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) được kết nối với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) trong cùng chuỗi polypeptit (VH-VL). Bằng cách sử dụng đoạn liên kết rất ngắn để cho phép cặp đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, các miền buộc phải cặp đôi với các miền bổ trợ của một chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Các diabody có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Các diabody được mô tả đầy đủ hơn trong, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; tài liệu của Hudson và các đồng tác giả, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); và tài liệu của Hollinger các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Các triabody và tetrabody cũng được mô tả trong tài liệu của Hudson các đồng tác giả, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản đồng nhất, ví dụ, quần thể gồm các kháng thể riêng rẽ giống hệt nhau ngoại trừ chẳng hạn các thể đột biến có thể có, các thể đột biến có trong tự nhiên mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Do đó, từ bỏ nghĩa "đơn dòng" chỉ ra đặc tính của kháng thể là không phải là hỗn hợp các kháng thể riêng rẽ. Theo các phương án nhất định, kháng thể đơn dòng như vậy thường bao gồm kháng thể chứa trình tự polypeptit mà liên kết với đích, trong đó trình tự polypeptit liên kết với đích này thu được bằng quy trình bao gồm bước chọn trình tự polypeptit liên kết với đích duy nhất từ nhiều trình tự polypeptit. Ví dụ, quy trình chọn có thể là

chọn dòng đơn nhất từ nhiều dòng, như hỗn hợp các dòng lai, các dòng thể thực khuẩn, hoặc các dòng ADN tái tổ hợp. Cần hiểu rằng trình tự liên kết với đích được chọn có thể được thay đổi tiếp, ví dụ, để cải thiện ái lực với đích, để làm cho trình tự liên kết với đích giống như của người, để cải thiện khả năng sản xuất của nó trong môi trường nuôi cấy tế bào, để giảm tính sinh miễn dịch *in vivo* của nó, để tạo ra kháng thể đa đặc hiệu, v.v., và kháng thể chứa trình tự liên kết với đích được thay đổi này cũng là kháng thể đơn dòng được mô tả. Trái với các chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau được định hướng chống lại các yếu tố quyết định khác nhau (các epitop), mỗi kháng thể đơn dòng trong chế phẩm kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại một yếu tố quyết định kháng nguyên duy nhất. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, các chế phẩm kháng thể đơn dòng có ưu điểm ở chỗ chúng thường không bị nhiễm tạp bởi các globulin miễn dịch khác.

Từ bỏ nghĩa “đơn dòng” chỉ ra đặc tính của kháng thể là có thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản đồng nhất, và không được hiểu như là cần phải sản xuất ra kháng thể này theo phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng cần sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm, ví dụ, phương pháp lai (ví dụ, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), phương pháp ADN tái tổ hợp (xem, ví dụ, patent Mỹ No. 4,816,567), các kỹ thuật biểu hiện bằng thể thực khuẩn (xem, ví dụ, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), và các kỹ thuật tạo ra kháng thể người hoặc giống của người ở động vật mà có các phần hoặc tất cả locus hoặc gen globulin miễn dịch người mã hóa các trình tự globulin miễn dịch người (xem, ví dụ, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); patent Mỹ số 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; và 5,661,016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992);

Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); và Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Kháng thể đơn dòng trong bản mô tả cụ thể bao gồm kháng thể “khảm” trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương đương trong kháng thể được tạo dẫn xuất từ các loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi (các chuỗi) là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương đương trong kháng thể được tạo dẫn xuất từ các loài khác hoặc thuộc một lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như là các mảnh của các kháng thể này, miễn là chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn (xem patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Các kháng thể khảm bao gồm kháng thể PRIMATTZED® trong đó vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể này thu được từ kháng thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, gây miễn dịch khi macaque bằng kháng nguyên cần quan tâm.

Các dạng được "làm tương thích với người" của kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) là các kháng thể khảm mà chứa trình tự tối thiểu thu được từ globulin miễn dịch không phải của người. Theo một phương án, kháng thể được làm tương thích với người là globulin miễn dịch người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ HVR của kháng thể nhận được thay bằng các gốc từ HVR của loài không phải người (kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột cống, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực, và/hoặc khả năng mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc FR của globulin miễn dịch người được thay bằng các gốc tương ứng không phải của người. Hơn thế nữa, các kháng thể được làm tương thích với người có thể bao gồm các gốc mà không có ở kháng thể nhận hoặc ở kháng thể cho. Các cải biến này có thể được thực hiện để cải tiến thêm hiệu năng của kháng thể. Nhìn chung, kháng thể được làm giống như ở người sẽ bao gồm về cơ bản ít nhất một, và điển hình là hai, miền thay đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vòng siêu biến tương ứng với các vòng siêu biến của globulin miễn dịch không phải từ người và tất cả hoặc gần như tất cả các vùng FR là các vùng FR của trình tự globulin miễn dịch từ người. Kháng thể được làm giống như ở người tùy ý cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định globulin miễn dịch (Fc), điển hình là vùng ổn định của globulin miễn dịch từ người. Để biết thêm chi tiết, xem, ví dụ, tài liệu của Jones và các đồng tác giả, *Nature*

321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); và Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Tương tự xem, ví dụ, tài liệu của Vaswani và Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle và Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); và patent Mỹ số 6,982,321 và 7,087,409.

"Kháng thể người" là kháng thể mà có trình tự axit amin tương ứng với trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bởi con người và/hoặc đã được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ để tạo ra kháng thể người như được bộc lộ ở đây. Định nghĩa này về kháng thể người đặc biệt loại trừ kháng thể được làm tương thích với người bao gồm các gốc liên kết kháng nguyên không phải của người. Các kháng thể người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm thư viện biểu hiện bằng thể thực khuẩn. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Các phương pháp được mô tả trong tài liệu của Cole và các đồng tác giả, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991) cũng sẵn có để tạo ra kháng thể đơn dòng người. Tương tự, xem tài liệu của van Dijk và van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Các kháng thể người có thể được tạo ra bằng cách cho động vật chuyển gen mà đã được cải biến để sản xuất kháng thể này sử dụng kháng nguyên để đáp ứng lại kích thích kháng nguyên, nhưng các locus nội sinh của chúng đã được bất hoạt, ví dụ, chuột xenomice được gây miễn dịch (xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,075,181 và 6,150,584 về kỹ thuật XENOMOUSE™). Tương tự, xem, ví dụ, tài liệu của Li và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) về kháng thể người được tạo ra bằng công nghệ lai tế bào B người.

"Kháng thể phụ thuộc loài" là kháng thể có ái lực liên kết với kháng nguyên từ loài động vật có vú thứ nhất lớn hơn so với ái lực liên kết với kháng nguyên tương đồng từ loài động vật có vú thứ hai. Thông thường, kháng thể phụ thuộc loài "liên kết đặc hiệu" với kháng nguyên người (ví dụ, có giá trị ái lực liên kết (K_d) không quá khoảng 1×10^{-7} M, tốt hơn là không quá khoảng 1×10^{-8} M và tốt hơn là không quá khoảng 1×10^{-9} M) nhưng có ái lực liên kết với kháng nguyên tương đồng từ loài động vật có vú không phải người thứ hai yếu hơn ít nhất khoảng 50 lần, hoặc ít nhất khoảng 500 lần, hoặc ít nhất khoảng 1000 lần, so với ái lực liên kết của nó với kháng nguyên

người. Kháng thể phụ thuộc loài có thể là kháng thể bất kỳ trong số nhiều loại kháng thể khác nhau được định nghĩa trên đây, nhưng tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể người.

Thuật ngữ "vùng siêu biến đổi," "HVR," hoặc "HV," khi được sử dụng ở đây chỉ các vùng thuộc vùng biến đổi của kháng thể mà siêu biến đổi về trình tự và/hoặc tạo ra các vòng có cấu trúc xác định. Nói chung, các kháng thể bao gồm sáu HVR; ba ở VH (H1, H2, H3), và ba ở VL (L1, L2, L3). Ở các kháng thể tự nhiên, H3 và L3 thể hiện tính đa dạng nhất trong số sáu HVR, và cụ thể H3 được xem là đóng vai trò đặc biệt trong việc tạo ra tính đặc hiệu tốt cho các kháng thể. Xem, *ví dụ*, tài liệu của Xu và các đồng tác giả, *Immunity* 13:37-45 (2000); tài liệu của Johnson và Wu, trong *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). Thực tế, các kháng thể lạc đà có trong tự nhiên chỉ bao gồm một chuỗi nặng có chức năng và ổn định khi không có chuỗi nhẹ. Xem, *ví dụ*, tài liệu của Hamers-Casterman và các đồng tác giả, *Nature* 363:446-448 (1993); tài liệu của Sheriff và các đồng tác giả, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Một số HVR được sử dụng và bao gồm trong bản mô tả. Các vùng quyết định bổ cứu (Complementarity Determining Region - CDR) Kabat dựa trên khả năng thay đổi về trình tự và được sử dụng phổ biến nhất (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Thay vào đó, Chothia là các vòng cấu trúc (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Các HVR AbM là sự thỏa hiệp giữa HVR Kabat và vòng cấu trúc Chothia, và được sử dụng trong phần mềm xây dựng mô hình kháng thể AbM của hãng Oxford Molecular. Các HVR "tiếp xúc" dựa trên phân tích về các cấu trúc tinh thể phức tạp sẵn có. Các gốc từ mỗi HVR trong số các HVR này được chú thích dưới đây.

Vòng	Kabat	AbM	Chothia	Tiếp xúc
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (cách đánh số Kabat)

H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (cách đánh số Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Các HVR có thể bao gồm các "HVR kéo dài" như sau: 24-36 hoặc 24-34 (L1), 46-56 hoặc 50-56 (L2) và 89-97 hoặc 89-96 (L3) trong VL và 26-35 (H1), 50-65 hoặc 49-65 (H2) và 93-102, 94-102, hoặc 95-102 (H3) trong VH. Các gốc vùng biến đổi được đánh số theo Kabat và các đồng tác giả, *trên đây*, đối với mỗi lần xác định này.

Các gốc "vùng khung" hay "FR" là các gốc vùng biến đổi không phải các gốc HVR như được xác định trong bản mô tả.

Thuật ngữ "đánh số gốc vùng biến đổi theo Kabat" hay "đánh số vị trí axit amin theo Kabat," và các cách nói khác, chỉ hệ thống đánh số được sử dụng đối với các vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của tập hợp các kháng thể theo Kabat và các đồng tác giả, *trên đây*. Sử dụng hệ thống đánh số này, trình tự axit amin thẳng thực tế có thể chứa ít hoặc nhiều axit amin hơn tương ứng với việc rút ngắn, hoặc chèn thêm vào, FR hoặc HVR của vùng biến đổi. Ví dụ, vùng biến đổi của chuỗi nặng có thể bao gồm một đoạn chèn axit amin duy nhất (gốc 52a theo Kabat) sau gốc 52 của H2 và các gốc được chèn (ví dụ các gốc 82a, 82b, và 82c, v.v. theo Kabat) sau gốc FR 82 của chuỗi nặng. Việc đánh số các gốc theo Kabat có thể được xác định cho kháng thể nhất định bằng cách sắp thẳng hàng ở các vùng đồng nhất về trình tự của kháng thể với trình tự được đánh số "chuẩn" theo Kabat.

Hệ thống đánh số Kabat thường được sử dụng khi đề cập đến gốc trong vùng biến đổi (khoảng các gốc 1-107 của chuỗi nhẹ và các gốc 1-113 của chuỗi nặng) (ví dụ, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Hệ thống đánh số EU" hay "chỉ số EU" thường được dùng khi đề cập đến gốc trong vùng hằng định của chuỗi nặng globulin miễn dịch (ví dụ, chỉ số EU được báo cáo trong tài liệu của Kabat và các đồng tác giả, *trên đây*). "Chỉ số EU như theo Kabat" chỉ cách đánh số gốc của kháng thể EU IgG1 người.

"Kháng thể thẳng" chỉ các kháng thể được mô tả trong tài liệu của Zapata và các đồng tác giả. (1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062). Tóm lại, các kháng thể này bao

gồm cặp đoạn Fd nối tiếp (VH-CH1-VH-CH1) mà, cùng với các polypeptit chuỗi nhẹ bổ sung, tạo thành cặp vùng liên kết kháng nguyên. Các kháng thể thẳng có thể là đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu đơn.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "liên kết đặc hiệu với" hoặc "đặc hiệu với" chỉ tương tác đo được và lặp lại được như liên kết giữa đích và kháng thể, mà chỉ thị sự có mặt của đích trong sự có mặt của tập hợp các phân tử khác loại bao gồm các phân tử sinh học. Ví dụ, kháng thể mà liên kết đặc hiệu với đích (mà có thể là epitop) là kháng thể mà liên kết với đích này với ái lực, khả lực lớn hơn, dễ dàng hơn, và/hoặc trong khoảng thời gian dài hơn so với khi nó liên kết với các đích khác. Theo một phương án, phạm vi liên kết của kháng thể với đích không liên quan nhỏ hơn khoảng 10% liên kết của kháng thể với đích như được đo, *ví dụ*, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể mà liên kết đặc hiệu với đích có hằng số phân ly (K_d) $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, hoặc $\leq 0,1\text{ nM}$. Theo các phương án nhất định, kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop trên protein mà được bảo toàn trong số protein này từ các loài khác nhau. Theo một phương án khác, liên kết đặc hiệu có thể bao gồm, nhưng không nhất thiết là liên kết loại trừ.

II. Dược phẩm chứa kháng thể và bào chế

Trong bản mô tả, sáng chế đề cập đến dược phẩm dạng nước ổn định chứa kháng thể kháng PDL1. Theo một số phương án, kháng thể PDL1 được mô tả trong bản mô tả có trong dược phẩm với lượng từ 40 mg/ml đến 125 mg/ml. Theo một số phương án, chất đệm là histidin axetat hoặc natri axetat. Theo một số phương án, chất đệm có mặt trong dược phẩm với nồng độ từ 15 mM đến 25 mM. Theo một số phương án, nồng độ sacaroza trong dược phẩm từ 60 mM đến 240 mM. Theo một số phương án, chất hoạt động bề mặt trong dược phẩm là polysorbat (ví dụ, polysorbat 20). Theo một số phương án, polysorbat có mặt trong dược phẩm với nồng độ từ 0,005% (khối lượng/thể tích) đến 0,06% (khối lượng/thể tích). Theo một số phương án, dược phẩm này có độ pH từ 5,0 đến 6,3. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm dạng nước ổn định, dược phẩm này chứa kháng thể đơn dòng kháng PDL1 với nồng độ từ 40 mg/ml đến 125 mg/ml, histidin axetat hoặc natri axetat với nồng độ từ 15 mM đến 25 mM, sacaroza với nồng độ từ 60 mM đến 240 mM, polysorbat với nồng độ từ 0,005% (khối lượng/thể tích) đến 0,06% (khối lượng/thể tích), và độ pH từ 5,0 đến 6,3.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng kháng PDL1 với lượng 125 mg/ml, sacaroza với nồng độ 240 mM, và độ pH 5,5. Theo một số phương án, dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng kháng PDL1 với lượng 60 mg/ml, sacaroza với nồng độ 120 mM, và độ pH 5,8.

Theo một số phương án, kháng thể trong dược phẩm ổn định ở -20°C trong ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, ít nhất hai năm, ít nhất ba năm, hoặc ít nhất bốn năm. Theo một số phương án, kháng thể trong dược phẩm ổn định ở 2-8°C trong ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, ít nhất hai năm, hoặc ít nhất ba năm. Theo một số phương án, sau khi bảo quản, kháng thể giữ được ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95% hoạt tính sinh học của nó (ví dụ, liên kết với đích, hoặc hiệu lực điều trị) đã thể hiện trước khi bảo quản, tức là, ở thời điểm dược phẩm được bào chế.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm này ổn định ở khoảng 40°C trong ít nhất khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, hoặc nhiều ngày hơn. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này ổn định ở khoảng 40°C trong ít nhất khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều tuần hơn. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này ổn định ở khoảng 25°C trong ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc nhiều tháng hơn. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này ổn định ở khoảng 5°C trong ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc nhiều tháng hơn. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này ổn định ở khoảng 20°C trong ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, hoặc nhiều tháng hơn. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này ổn định ở 5°C hoặc -20°C trong ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, hoặc nhiều tháng hơn. Hơn thế nữa, tốt hơn nếu dược phẩm này ổn định sau khi làm lạnh đông (đến, ví dụ, -20°C, -40°C hoặc -70°C) và rã đông dược phẩm, ví dụ sau 1, 2 3, 4, hoặc 5 chu kỳ lạnh đông và rã đông.

A. Kháng thể (như kháng thể kháng PDL1)

Theo một số phương án, kháng thể trong được phẩm là kháng thể kháng PDL1. PD-L1 (phối tử 1 chết tế bào theo chương trình 1), còn được biết đến là PDL1, B7-H1, B7-4, CD274, và B7-H, là protein xuyên màng, và tương tác của nó với PD-1 ức chế sự hoạt hóa tế bào T và sự sản sinh xytokin. Theo một số phương án, kháng thể kháng PDL1 được mô tả trong bản mô tả liên kết với PD-L1 người. Ví dụ về các kháng thể kháng PDL1 mà có thể được bào chế bằng các được phẩm đã được mô tả trong bản mô tả được mô tả trong đơn sáng chế PCT WO 2010/077634 A1 và US 8,217,149.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PDL1 có khả năng ức chế liên kết giữa PD-L1 và PD-1 và/hoặc giữa PD-L1 và B7-1. Theo một số phương án, kháng thể kháng PDL1 là kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, kháng thể kháng PDL1 là kháng thể được làm tương thích với người.

Vẫn theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PDL1 được phân lập chứa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó:

(a) trình tự chuỗi nặng chứa:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWV
AWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRH
WPGGFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:10), hoặc

(b) các trình tự chuỗi nhẹ chứa:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO:9).

Theo một số phương án, kháng thể kháng PDL1 được phân lập là kháng thể đơn dòng được oxy hóa. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được oxy hóa trong được phẩm chứa chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:9, và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được oxy hóa trong được phẩm bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:10, trong đó một hoặc nhiều W33, W50, hoặc W101 được oxy hóa. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được oxy hóa trong được phẩm chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:10, trong đó một hoặc nhiều M253 và M429 được oxy hóa. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được oxy hóa giữ được ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95% hoạt tính sinh học của nó (ví dụ, liên kết với đích, hoặc hiệu lực điều trị) đã thể hiện trước khi bảo quản, tức là, ở thời điểm được phẩm được bào chế.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PDL1 được phân lập là kháng thể đơn dòng được kết hợp đường. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được kết hợp đường trong được phẩm chứa chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:9, và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được kết hợp đường trong được phẩm chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:10, trong đó một hoặc nhiều lysin được kết hợp đường. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được kết hợp đường trong được phẩm chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:10, trong đó K65 được kết hợp đường.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PDL1 được phân lập không được glycosyl hóa.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án trong bản mô tả, kháng thể kháng PDL1 được phân lập có thể liên kết với PD-L1 người, ví dụ PD-L1 người như trong UniProtKB/Swiss-Prot số truy cập Q9NZQ7.1, hoặc biến thể của nó.

Vẫn theo một phương án khác, bản mô tả bộc lộ axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả trong bản mô tả. Theo một số phương án trong bản mô tả, axit nucleic này còn bao gồm vector thích hợp để biểu hiện axit nucleic mã hóa kháng thể kháng PDL1 bất kỳ trong số các kháng thể kháng PDL1 được mô tả trên đây. Vẫn theo một phương án cụ thể khác trong bản mô tả, vector này

nằm trong tế bào chủ thích hợp để biểu hiện axit nucleic. Vẫn theo một phương án cụ thể khác trong bản mô tả, tế bào chủ là tế bào nhân điển hình hoặc tế bào nhân nguyên thủy. Vẫn theo một phương án cụ thể khác trong bản mô tả, tế bào nhân điển hình là tế bào động vật có vú, như trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO).

Kháng thể có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng quy trình bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể kháng PDL1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ được mô tả trên đây ở dạng thích hợp để biểu hiện, trong các điều kiện thích hợp để tạo ra kháng thể hoặc mảnh này, và thu hồi kháng thể hoặc mảnh này.

B. Tạo kháng thể

Kháng thể trong được phẩm được tạo ra bằng các kỹ thuật sẵn có trong lĩnh vực này để tạo kháng thể, các phương pháp làm ví dụ được mô tả chi tiết hơn trong các mục sau.

Kháng thể được định hướng kháng lại kháng nguyên cần quan tâm (*tức là*, PD-L1, như PD-L1 người). Tốt hơn, nếu kháng nguyên là polypeptit quan trọng về mặt sinh học và việc cho động vật có vú mắc rối loạn sử dụng kháng thể có thể có lợi trong điều trị cho động vật có vú này.

(i) Tạo kháng nguyên

Các kháng nguyên hòa tan hoặc mảnh của chúng, tùy ý được liên hợp với các phân tử khác, có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch để tạo ra kháng thể. Đối với các phân tử xuyên màng, như thụ thể, mảnh của chúng (ví dụ, vùng ngoại bào của thụ thể) có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch. Theo cách khác, các tế bào biểu hiện phân tử xuyên màng có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch. Các tế bào như vậy có thể thu được từ nguồn tự nhiên (ví dụ các dòng tế bào ung thư) hoặc có thể là các tế bào đã được biến nạp bằng các kỹ thuật tái tổ hợp để biểu hiện phân tử xuyên màng. Các kháng nguyên khác và các dạng của chúng hữu dụng để tạo ra kháng thể sẽ được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này biết rõ.

(ii) Các phương pháp dựa trên kháng thể nhất định

Các kháng thể đa dòng tốt hơn là được tạo ra ở các động vật bằng nhiều lần tiêm kháng nguyên có liên quan và tá được dưới da (subcutaneous - sc) hoặc trong màng bụng (intraperitoneal - ip). Có thể hữu dụng khi liên hợp kháng nguyên có liên quan với protein mà sinh miễn dịch ở loài cần gây miễn dịch, ví dụ, hemoxyanin của ốc nón lỗ khóa (keyhole limpet), albumin huyết thanh, thyroglobulin bò, hoặc chất ức chế trypsin đậu tương sử dụng tác nhân hai chức năng hoặc tác nhân tạo dẫn xuất, ví dụ, este maleimidobenzoyl sulfosucinimit (liên hợp qua các gốc xystein), N-hydroxysucinimit (qua các gốc lysin), glutaraldehyt, anhydrit succinic, SOCl_2 , hoặc $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, trong đó R và R^1 là các nhóm alkyl khác nhau.

Các động vật được gây miễn dịch kháng lại kháng nguyên, các thể liên hợp sinh miễn dịch, hoặc dẫn xuất bằng cách kết hợp, ví dụ, 100 μg hoặc 5 μg protein hoặc thể liên hợp (lần lượt đối với thỏ hoặc chuột nhắt) với 3 thể tích tá được hoàn chỉnh Freund và tiêm dung dịch này qua da ở nhiều vị trí. Một tháng sau, các động vật này được tiêm nhắc lại bằng 1/5 đến 1/10 lượng peptit hoặc thể liên hợp ban đầu trong tá được hoàn chỉnh Freund bằng cách tiêm dưới da ở nhiều vị trí. Bảy đến 14 ngày sau đó các động vật này được lấy máu và huyết thanh được thử nghiệm về hiệu giá kháng thể. Các động vật này được tiêm nhắc lại đến khi hiệu giá ổn định. Tốt hơn, nếu động vật được tiêm nhắc lại bằng thể liên hợp của cùng kháng nguyên, nhưng được liên hợp với protein khác và/hoặc qua chất phản ứng liên kết ngang khác. Các thể liên hợp có thể được tạo ra trong môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp dưới dạng thể dung hợp protein. Tương tự, các tác nhân kết tụ như phen được sử dụng theo cách thích hợp để tăng cường đáp ứng miễn dịch.

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp lai được mô tả đầu tiên bởi Kohler và các đồng tác giả, *Nature*, 256:495 (1975), và mô tả tiếp, ví dụ, trong tài liệu của Hongo và các đồng tác giả, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), tài liệu của Harlow và các đồng tác giả, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); tài liệu của Hammerling và các đồng tác giả, trong: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), và Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) về các tế bào lai người-người. Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 7,189,826 về sản xuất kháng thể đơn dòng tự nhiên IgM của người từ các dòng tế bào lai. Công nghệ lai tế bào người (công nghệ

Trioma) được mô tả trong tài liệu của Vollmers và Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) và Vollmers và Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Để biết thêm về các kỹ thuật lai tế bào khác, xem, ví dụ, US 2006/258841; US 2006/183887 (kháng thể người đầy đủ), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; và patent Mỹ số 7,078,492 và 7,153,507. Quy trình làm ví dụ để sản xuất kháng thể đơn dòng bằng cách sử dụng phương pháp lai tế bào được mô tả như sau. Theo một phương án, chuột nhắt hoặc động vật chủ thích hợp khác, như chuột đồng, được gây miễn dịch để kích thích lympho bào mà sản xuất hoặc có khả năng sản xuất kháng thể liên kết với protein được sử dụng để gây miễn dịch. Các kháng thể được tạo ra ở động vật bằng nhiều lần tiêm dưới da (sc) hoặc trong màng bụng (ip) bằng polypeptit theo sáng chế hoặc mảnh của nó, và tá được, như monophosphoryl lipit A (MPL)/trehaloza dicrynomycolat (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.). Polypeptit theo sáng chế (ví dụ, kháng nguyên) hoặc mảnh của nó có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này, như các phương pháp tái tổ hợp, một số trong đó được mô tả tiếp trong bản mô tả. Huyết thanh từ các động vật được gây miễn dịch được thử nghiệm về kháng thể kháng kháng nguyên, và những lần gây miễn dịch nhắc lại tùy ý được sử dụng. Các lympho bào từ động vật sản xuất ra kháng thể kháng kháng nguyên được phân lập. Theo cách khác, các lympho bào có thể được gây miễn dịch *in vitro*.

Sau đó, các lympho bào này được dung hợp với các tế bào u tủy bằng cách sử dụng tác nhân dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo ra tế bào lai. Xem, ví dụ, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986). Các tế bào u tủy mà dung hợp hữu hiệu, hỗ trợ việc sản xuất kháng thể ở mức cao ổn định bởi các tế bào sản xuất kháng thể chọn lọc, và nhạy với môi trường như môi trường HAT có thể được sử dụng. Các tế bào u tủy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dòng u tủy chuột, như các dòng thu được từ khối u chuột nhắt MOPC-21 và MPC-11 sẵn có trong Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, và các tế bào SP-2 hoặc X63-Ag8-653 sẵn có trong American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA. Các dòng tế bào u tủy người và dị u tủy người-chuột cũng được mô tả để sản xuất kháng thể đơn dòng người (Kozbor, J.

Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Do đó, các tế bào lai đã được tạo ra được cấy và nuôi trong môi trường nuôi cấy thích hợp, ví dụ, môi trường chứa một hoặc nhiều chất ức chế sự sinh trưởng hoặc sống sót của các tế bào u tủy gốc không được dung hợp. Ví dụ, nếu các tế bào u tủy gốc thiếu enzym hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hay HPRT), môi trường nuôi cấy tế bào lai thường bao gồm hypoxanthin, aminopterin, và thymidine (môi trường HAT), các chất này ngăn cản sự sinh trưởng của các tế bào thiếu hụt HGPRT. Tốt hơn, nếu dùng các phương pháp nuôi cấy tế bào lai không sử dụng huyết thanh để giảm việc sử dụng huyết thanh có nguồn gốc động vật như huyết thanh thai bò, như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu của Even và các đồng tác giả, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

Các oligopeptit là công cụ để cải thiện hiệu suất nuôi cấy tế bào lai được mô tả trong tài liệu của Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Cụ thể, môi trường nuôi cấy chuẩn được làm giàu bằng các axit amin nhất định (alanin, serin, asparagin, prolin), hoặc các phân đoạn sản phẩm thủy phân protein, và sự chết tế bào theo chương trình có thể bị kìm hãm đáng kể bởi các oligopeptit tổng hợp, cấu thành ba đến sáu gốc axit amin. Các peptit có mặt với nồng độ milimol hoặc cao hơn.

Môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào lai đang sinh trưởng có thể được thử nghiệm về khả năng sản xuất các kháng thể đơn dòng mà liên kết với kháng thể theo sáng chế. Độ đặc hiệu liên kết của các kháng thể đơn dòng được sản xuất bởi các tế bào lai có thể được xác định bằng phương pháp kết tủa miễn dịch hoặc bằng thử nghiệm liên kết *in vitro*, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunoadsorbent assay - ELISA). Ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng có thể được xác định, ví dụ, bằng cách phân tích Scatchard. Xem, ví dụ, tài liệu của Munson và các đồng tác giả, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Sau khi các tế bào lai được nhận dạng là sản xuất ra kháng thể có độ đặc hiệu, ái lực, và/hoặc hoạt tính mong muốn, các dòng có thể được tách dòng phụ bằng các quy trình pha loãng hạn chế và nuôi bằng các phương pháp chuẩn. Xem, ví dụ, tài liệu của

Goding, *trên đây*. Môi trường nuôi cấy thích hợp cho mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường D-MEM hoặc RPMI-1640. Ngoài ra, các tế bào lai có thể được nuôi *in vivo* dưới dạng các khối u cổ trướng ở động vật. Các kháng thể đơn dòng được tiết ra bởi các dòng phụ được tách theo cách thích hợp từ môi trường nuôi cấy, dịch cổ trướng, hoặc huyết thanh bằng các quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharosa, sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực. Một quy trình để phân lập protein từ các tế bào lai được mô tả trong US 2005/176122 và patent Mỹ số 6,919,436. Phương pháp này bao gồm việc sử dụng các muối tối thiểu, như các muối thay đổi pha theo nồng độ, trong quá trình liên kết và tốt hơn là cả việc sử dụng lượng nhỏ dung môi hữu cơ trong quá trình rửa giải.

(iii) Các phương pháp sàng lọc thư viện nhất định

Các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các thư viện tái tổ hợp để sàng lọc kháng thể với hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này để sàng lọc thư viện biểu hiện bằng thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện để có được các kháng thể với các đặc tính liên kết mong muốn. Các phương pháp như vậy được mô tả chung trong tài liệu của Hoogenboom và các đồng tác giả trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001). Ví dụ, một phương pháp tạo kháng thể được quan tâm là thông qua việc sử dụng thư viện kháng thể thể thực khuẩn như được mô tả trong tài liệu của Lee và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93.

Về nguyên tắc, các dòng kháng thể tổng hợp được chọn bằng cách sàng lọc thư viện thể thực khuẩn chứa thể thực khuẩn mà biểu hiện nhiều mảnh vùng biến đổi của kháng thể (Fv) khác nhau đã được dung hợp với protein vỏ của thể thực khuẩn. Các thư viện thể thực khuẩn như vậy được sàng lọc bằng phương pháp sắc ký ái lực chống lại kháng nguyên mong muốn. Các dòng biểu hiện mảnh Fv có khả năng liên kết với kháng nguyên mong muốn được hấp phụ vào kháng nguyên và do đó được tách khỏi các dòng không liên kết trong thư viện. Các dòng liên kết sau đó được rửa giải khỏi kháng nguyên, và có thể được làm giàu tiếp bằng các chu kỳ hấp phụ kháng nguyên/rửa giải khác. Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể theo sáng chế có thể thu được bằng cách thiết kế quy trình sàng lọc bằng kháng nguyên phù hợp để chọn dòng thể thực khuẩn cần quan tâm tiếp theo là xây dựng dòng kháng thể có độ dài đầy

đủ bằng cách sử dụng các trình tự Fv từ dòng thể thực khuẩn cần quan tâm và các trình tự vùng hằng định (Fc) thích hợp được mô tả trong tài liệu của Kabat và *các đồng tác giả*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

Theo các phương án nhất định, vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể được tạo ra từ hai vùng biến đổi (V) gồm khoảng 110 axit amin, một từ chuỗi nhẹ (VL) và một từ chuỗi nặng (VH), cả hai đều có ba vòng siêu biến đổi (HVR) hoặc vùng xác định bổ cứu (CDR). Các vùng biến đổi có thể được biểu hiện bằng chức năng trên thể thực khuẩn, dưới dạng các mảnh chuỗi đơn Fv (scFv), trong đó VH và VL được liên kết đồng hóa trị qua một peptit ngắn, linh hoạt, hoặc dưới dạng mảnh Fab, trong đó mỗi chúng được dung hợp với vùng hằng định và tương tác không đồng hóa trị, như được mô tả trong tài liệu của Winter và *các đồng tác giả*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Như được sử dụng trong bản mô tả, các dòng thể thực khuẩn mã hóa scFv và các dòng thể thực khuẩn mã hóa Fab gọi chung là "các dòng thể thực khuẩn Fv" hoặc "các dòng Fv".

Tập hợp các gen VH và VL có thể được tách dòng riêng rẽ bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) và được kết hợp lại ngẫu nhiên trong thư viện thể thực khuẩn, mà sau đó có thể được tìm kiếm để có được các dòng liên kết kháng nguyên như được mô tả trong tài liệu của Winter và *các đồng tác giả*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Các thư viện từ nguồn được gây miễn dịch cung cấp các kháng thể có ái lực cao với chất sinh miễn dịch mà không đòi hỏi phải tạo ra các tế bào lai. Theo cách khác, các tập hợp tự nhiên có thể được tách dòng để cung cấp nguồn kháng thể người duy nhất với một phạm vi rộng các kháng nguyên không tự thân và cả tự thân mà không cần bước gây miễn dịch bất kỳ như được mô tả bởi Griffiths và *các đồng tác giả*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, các thư viện tự nhiên cũng có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp bằng cách tách dòng các đoạn gen V không được sắp xếp lại từ các tế bào mầm, và sử dụng các đoạn mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa các vùng CDR3 siêu biến và để thực hiện việc sắp xếp lại in vitro như được mô tả bởi Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Theo các phương án nhất định, thể thực khuẩn dạng sợi được sử dụng để biểu hiện các mảnh kháng thể bằng cách dung hợp với protein vỏ thứ yếu pIII. Các mảnh kháng thể có thể được biểu hiện dưới dạng các mảnh Fv chuỗi đơn, trong đó các vùng

VH và VL được nối trên cùng chuỗi polypeptit bằng đoạn polypeptit đệm linh hoạt, ví dụ như được mô tả bởi Marks và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), hoặc dưới dạng các mảnh Fab, trong đó một chuỗi được dung hợp với pIII và chuỗi kia được tiết vào chu chất của tế bào chủ vi khuẩn tại đó lắp ghép cấu trúc Fab-protein vỏ mà được biểu lộ trên bề mặt thể thực khuẩn bằng cách thay thế một số protein vỏ kiểu hoang dại, ví dụ như được mô tả trong tài liệu của Hoogenboom và các đồng tác giả, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

Nói chung, các axit nucleic mã hóa mảnh gen kháng thể thu được từ các tế bào miễn dịch thu được từ động vật hoặc người. Nếu mong muốn thư viện thiên về các dòng kháng kháng nguyên, đối tượng được gây miễn dịch bằng kháng nguyên để tạo ra đáp ứng kháng thể, và các tế bào lách và/hoặc tế bào B tuần hoàn, các lympho bào máu ngoại vi (peripheral blood lymphocyte - PBL) khác được thu hồi để xây dựng thư viện. Theo một phương án, thư viện mảnh gen kháng thể người thiên về các dòng kháng kháng nguyên thu được bằng cách tạo ra đáp ứng kháng thể kháng kháng nguyên ở chuột nhắt chuyển gen mang mảnh gen chức năng globulin miễn dịch người (và thiếu hệ thống sản xuất kháng thể chức năng nội sinh) sao cho việc gây miễn dịch bằng kháng nguyên làm cho tế bào B sản xuất ra kháng thể chống lại kháng nguyên. Việc tạo ra chuột chuyển gen sản xuất kháng thể người được mô tả dưới đây.

Việc làm giàu thêm cho quần thể tế bào phản ứng kháng kháng nguyên có thể thực hiện bằng quy trình sàng lọc thích hợp để phân lập tế bào B biểu hiện kháng thể liên kết màng đặc hiệu kháng nguyên, ví dụ, bằng cách tách tế bào sử dụng phương pháp sắc ký ái lực kháng nguyên hoặc phương pháp hấp phụ tế bào lên kháng nguyên được đánh dấu florocrom tiếp theo là phân loại tế bào được hoạt hóa dưới dạng dòng chảy (flow-activated cell sorting - FACS).

Theo cách khác, việc sử dụng các tế bào lách và/hoặc tế bào B hoặc các PBL khác từ đối tượng cho được gây miễn dịch tạo ra trình diện tốt hơn cho tập hợp kháng thể có thể có, và cũng cho phép xây dựng thư viện kháng thể bằng cách sử dụng loài động vật bất kỳ (người hoặc không phải người) trong đó kháng nguyên không có tính kháng nguyên. Đối với các thư viện kết hợp việc xây dựng gen kháng thể in vitro, các tế bào mầm được thu nhận từ đối tượng để tạo ra các axit nucleic mã hóa các đoạn gen kháng thể không được sắp xếp lại. Các tế bào miễn dịch cần quan tâm có thể thu được

từ nhiều loài động vật khác nhau, như người, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, chó sói, chó, mèo, lợn, bò, ngựa, và loài chim, v.v..

Axit nucleic mã hóa các đoạn gen vùng biến đổi của kháng thể (bao gồm các đoạn VH và VL) được thu hồi từ các tế bào cần quan tâm và khuếch đại. Trong trường hợp thư viện gen VH và VL được sắp xếp lại, ADN mong muốn có thể thu được bằng cách tách ADN hệ gen hoặc mRNA từ các tế bào lympho tiếp theo thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) với các đoạn mồi bắt cặp các đầu 5' và 3' của gen VH và VL được sắp xếp lại như được mô tả trong tài liệu của Orlandi và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), nhờ đó tạo ra tập hợp gen V phong phú để biểu hiện. Các gen V có thể được khuếch đại từ cADN và ADN hệ gen, bằng cách đoạn mồi ngược ở đầu 5' của exon mã hóa vùng V trưởng thành và các đoạn mồi xuôi được bố trí trong đoạn J như được mô tả trong tài liệu của Orlandi và các đồng tác giả (1989) và trong tài liệu của Ward và các đồng tác giả, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Tuy nhiên, để khuếch đại từ cADN, các đoạn mồi ngược cũng có thể được bố trí trong exon đầu như được mô tả trong tài liệu của Jones và các đồng tác giả, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), và các đoạn mồi ngược trong vùng hằng định như được mô tả trong tài liệu của Sastry và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Để tối đa hóa tính bổ sung, có thể kết hợp thoái hóa vào các đoạn mồi như được mô tả trong tài liệu của Orlandi và các đồng tác giả (1989) hoặc của Sastry và các đồng tác giả (1989). Theo các phương án nhất định, mức độ đa dạng của thư viện được tối đa hóa bằng cách sử dụng các đoạn mồi PCR được hướng đích vào từng họ gen V để khuếch đại tất cả các cách sắp xếp VH và VL sẵn có trong mẫu axit nucleic của tế bào miễn dịch, ví dụ như được mô tả trong phương pháp của Marks và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) hoặc như được mô tả trong phương pháp của Orum và các đồng tác giả, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Để tách dòng ADN được khuếch đại vào các vector biểu hiện, các vị trí cắt giới hạn hiếm có thể được đưa vào trong đoạn mồi dưới dạng đuôi ở một đầu như được mô tả trong tài liệu của Orlandi và các đồng tác giả (1989), hoặc bằng cách khuếch đại bằng PCR tiếp bằng đoạn mồi có gắn đuôi như được mô tả trong tài liệu của Clackson và các đồng tác giả, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Tập hợp các gen V tổng hợp được sắp xếp lại có thể thu được in vitro từ các đoạn gen V. Hầu hết các đoạn gen VH của người đã được tách dòng và giải trình tự (được

báo cáo bởi Tomlinson và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), và được lập bản đồ (được báo cáo bởi Matsuda và các đồng tác giả, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); các đoạn được tách dòng này (bao gồm tất cả các cấu tạo chính của vòng H1 và H2) có thể được sử dụng để tạo ra tập hợp gen VH phong phú bằng các đoạn mồi PCR mã hóa các vòng H3 có trình tự và độ dài khác nhau như được mô tả trong tài liệu của Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Tập hợp các VH cũng có thể được tạo ra với tất cả tính đa dạng về trình tự tập trung vào vòng H3 dài có độ dài duy nhất như được mô tả trong tài liệu của Barbas và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Các đoạn V κ và V λ của người đã được tách dòng và giải trình tự (được báo cáo bởi Williams và Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) và có thể được sử dụng để tạo ra tập hợp chuỗi nhẹ tổng hợp. Tập hợp các gen V tổng hợp dựa trên phạm vi số lần gấp nếp của VH và VL, và độ dài L3 và H3, sẽ mã hóa các kháng thể có độ đa dạng về trình tự lớn. Sau khi khuếch đại các ADN mã hóa gen V, các đoạn gen V dòng mầm có thể được sắp xếp lại in vitro theo các phương pháp của Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Tập hợp các mảnh kháng thể có thể được xây dựng bằng cách kết hợp các tập hợp gen VH và VL cùng nhau theo nhiều cách. Mỗi tập hợp có thể được tạo ra trong các vectơ khác nhau, và các vectơ được tái tổ hợp in vitro, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu của Hogrefe và các đồng tác giả, *Gene*, 128: 119-126 (1993), hoặc in vivo bằng cách chuyển nhiễm kết hợp, ví dụ, hệ loxP được mô tả trong tài liệu của Waterhouse và các đồng tác giả, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). Phương pháp tái tổ hợp in vivo khai thác bản chất hai chuỗi của các mảnh Fab để khắc phục hạn chế về cỡ thư viện do hiệu quả biến nạp bằng *E. coli*. Các tập hợp VH và VL tự nhiên được tách dòng riêng rẽ, một tập hợp vào phagemid và tập hợp còn lại vào vectơ thể thực khuẩn. Sau đó, hai thư viện được kết hợp bằng cách chuyển nhiễm thể thực khuẩn vi khuẩn chứa phagemid sao cho mỗi tế bào chứa tổ hợp khác nhau và cỡ thư viện chỉ được giới hạn bằng số các tế bào có mặt (khoảng 10^{12} dòng). Cả hai vectơ chứa các dấu hiệu tái tổ hợp in vivo sao cho các gen VH và VL được tái tổ hợp vào một đơn vị sao chép duy nhất và được cùng đưa vào các virion thể thực khuẩn. Các thư viện lớn này tạo ra số lượng lớn các kháng thể khác nhau có ái lực tốt (K_d^{-1} khoảng 10^{-8} M).

Theo cách khác, sau đó các tập hợp có thể được tách dòng vào cùng vectơ, ví dụ như được mô tả trong tài liệu của Barbas và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), hoặc lắp ghép cùng nhau bằng phương pháp PCR và sau đó tách dòng, ví dụ như được mô tả trong tài liệu của Clackson và các đồng tác giả, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Phương pháp lắp ghép bằng PCR cũng có thể được sử dụng để nối các ADN VH và VL với ADN mã hóa đoạn đệm peptit linh hoạt để tạo ra các tập hợp chuỗi đơn Fv (scFv). Theo kỹ thuật khác nữa, "phương pháp lắp ghép bằng PCR trong tế bào" được sử dụng để kết hợp các gen VH và VL trong lympho bào bằng PCR và sau đó tách dòng tập hợp các gen được liên kết như được mô tả trong tài liệu của Embleton và các đồng tác giả, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Các kháng thể được tạo ra bằng thư viện tự nhiên (tự nhiên hoặc tổng hợp) có thể có ái lực vừa phải (K_d^{-1} khoảng 10^6 đến 10^7 M⁻¹), nhưng sự thuần thực ái lực cũng có thể được bắt chước *in vitro* bằng cách xây dựng và chọn lọc lại từ các thư viện thứ cấp như được mô tả trong tài liệu của Winter và các đồng tác giả (1994), trên đây. Ví dụ, sự trưởng thành có thể được tạo ra ngẫu nhiên *in vitro* bằng cách sử dụng polymeraza dễ bị lỗi (được báo cáo trong tài liệu của Leung và các đồng tác giả, *Technique* 1: 11-15 (1989)) trong phương pháp của Hawkins và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) hoặc trong phương pháp của Gram và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Ngoài ra, sự thuần thực ái lực có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên một hoặc nhiều CDR, ví dụ bằng phương pháp PCR với các đoạn mồi mang trình tự ngẫu nhiên mở rộng CDR cần quan tâm, trong số các dòng Fv riêng rẽ được chọn và sàng lọc các dòng có ái lực cao hơn. WO 9607754 (công bố ngày 14/03/1996) mô tả phương pháp gây đột biến ở vùng quyết định bảo cứu của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch để tạo ra thư viện các gen chuỗi nhẹ. Một phương pháp hiệu quả khác là tái tổ hợp các vùng VH hoặc VL được chọn bằng kỹ thuật biểu hiện bằng thể thực khuẩn với tập hợp các biến thể vùng V có trong tự nhiên từ các thể cho không được gây miễn dịch và sàng lọc về ái lực cao hơn theo một số vòng bố trí lại chuỗi như được mô tả trong tài liệu của Marks và các đồng tác giả, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Kỹ thuật này cho phép sản xuất kháng thể và mảnh kháng thể với ái lực khoảng 10^{-9} M hoặc thấp hơn.

Việc sàng lọc thư viện có thể được thực hiện bằng nhiều kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, kháng nguyên có thể được sử dụng để phủ lên các giếng

của đĩa hấp phụ, biểu hiện trên các tế bào chủ được bổ sung vào các đĩa hấp phụ hoặc được sử dụng trong phân loại tế bào, hoặc được liên hợp với biotin để bắt giữ bằng hạt được phủ streptavidin, hoặc được sử dụng trong phương pháp bất kỳ khác để sàng lọc thư viện biểu hiện bằng thể thực khuẩn.

Các mẫu thư viện thể thực khuẩn được cho tiếp xúc với kháng nguyên cố định trong các điều kiện thích hợp để liên kết ít nhất một phần của các hạt thể thực khuẩn với chất hấp phụ. Thông thường, các điều kiện này bao gồm độ pH, nồng độ ion, nhiệt độ và điều kiện tương tự được chọn để bắt chước các điều kiện sinh lý. Các thể thực khuẩn liên kết với pha rắn được rửa và sau đó rửa giải bằng axit, ví dụ như được mô tả trong tài liệu của Barbas và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), hoặc bằng kiềm, ví dụ như được mô tả trong tài liệu của Marks và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), hoặc bằng cách cạnh tranh kháng nguyên, ví dụ trong quy trình tương tự phương pháp cạnh tranh kháng nguyên của Clackson và các đồng tác giả, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Các thể thực khuẩn có thể được làm giàu 20-1000 lần bằng cách chọn lọc một vòng duy nhất. Hơn nữa, các thể thực khuẩn đã được làm giàu có thể được nuôi trong giống nuôi cấy vi khuẩn và được chọn lọc thêm một số vòng.

Hiệu quả chọn lọc tùy thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm động lực học hòa tan trong quá trình rửa, và xem liệu nhiều mảnh kháng thể trên một thể thực khuẩn duy nhất có thể đồng thời gắn kết với kháng nguyên hay không. Các kháng thể với động lực học hòa tan nhanh (và ái lực liên kết yếu) có thể được giữ lại bằng cách sử dụng những lần rửa ngắn, biểu hiện thể thực khuẩn đa hóa trị và mật độ phủ kháng nguyên trong pha rắn cao. Mật độ cao không chỉ ổn định thể thực khuẩn thông qua tương tác đa hóa trị, mà còn hỗ trợ sự liên kết lại của thể thực khuẩn mà đã bị hòa tan. Việc chọn lọc kháng thể bằng động lực học hòa tan chậm (và ái lực liên kết tốt) có thể được thúc đẩy bằng cách sử dụng những lần rửa kéo dài và biểu hiện bằng thể thực khuẩn hóa trị một như được mô tả trong tài liệu của Bass và các đồng tác giả, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) và trong WO 92/09690, và mật độ phủ kháng nguyên thấp như được mô tả trong tài liệu của Marks và các đồng tác giả, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Có thể chọn lọc giữa các kháng thể thể thực khuẩn có ái lực với kháng nguyên khác nhau, ngay cả với ái lực mà chỉ khác nhau chút ít. Tuy nhiên, đột biến ngẫu nhiên của kháng thể được chọn (ví dụ như được thực hiện trong một số kỹ thuật thuần thực ái

lực) có khả năng tạo ra nhiều đột biến, hầu hết liên kết với kháng nguyên, và một số có ái lực cao hơn. Với các kháng nguyên hạn chế, thể thực khuẩn có ái lực cao hiếm có thể bị loại bỏ bằng cạnh tranh. Để duy trì tất cả các thể đột biến có ái lực cao hơn, thể thực khuẩn có thể được ủ với kháng nguyên được biotin hóa dư, nhưng với kháng nguyên được biotin hóa ở nồng độ mol thấp hơn so với hằng số ái lực mol của đích đối với kháng nguyên. Các thể thực khuẩn liên kết với ái lực cao sau đó có thể được bắt giữ bằng các hạt thuận từ được phủ streptavidin. Việc "bắt giữ cân bằng" cho phép các kháng thể được chọn theo ái lực liên kết của chúng, với độ nhạy mà cho phép tách các dòng đột biến với ái lực chỉ thấp ở mức cao hơn hai lần từ lượng dư thể thực khuẩn với ái lực thấp hơn. Các điều kiện được sử dụng trong việc rửa thể thực khuẩn liên kết với pha rắn cũng có thể được vận dụng để phân biệt trên cơ sở động lực học hòa tan.

Các dòng kháng kháng nguyên có thể được chọn dựa vào hoạt tính. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng kháng nguyên mà liên kết với các tế bào sống mà biểu hiện kháng nguyên trong tự nhiên hoặc liên kết với kháng nguyên trôi nổi tự do hoặc kháng nguyên gắn vào các cấu trúc tế bào khác. Các dòng Fv tương ứng với các kháng thể kháng kháng nguyên này có thể được chọn bằng cách (1) phân lập các dòng kháng kháng nguyên từ thư viện thể thực khuẩn như được mô tả trên đây, và tùy ý khuếch đại quần thể dòng thể thực khuẩn được phân lập bằng cách nuôi quần thể này trong tế bào chủ vi khuẩn thích hợp; (2) chọn kháng nguyên và protein thứ hai lần lượt chống lại hoạt tính phong bế hoặc không phong bế của nó, nếu muốn; (3) hấp phụ các dòng thể thực khuẩn kháng kháng nguyên lên kháng nguyên cố định; (4) sử dụng lượng dư protein thứ hai để rửa giải các dòng không mong muốn mà nhận biết các yếu tố xác định liên kết kháng nguyên mà gởi lên hoặc cùng là yếu tố xác định liên kết của protein thứ hai; và (5) rửa giải các dòng mà duy trì hấp phụ sau bước (4). Tùy ý, các dòng với các đặc tính phong bế/không phong bế mong muốn có thể được làm giàu tiếp bằng cách lặp lại quy trình chọn lọc được mô tả trong bản mô tả một hoặc nhiều lần.

ADN mã hóa các kháng thể đơn dòng thu được bằng cách lai tế bào hoặc các dòng Fv biểu hiện bằng thể thực khuẩn theo sáng chế dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ bằng cách sử dụng các đoạn mồi oligonucleotit được thiết kế để đặc biệt khuếch đại các vùng mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cần quan tâm từ tế bào lai hoặc khuôn ADN thể thực khuẩn). Khi đã

được phân lập, ADN có thể được đặt vào vector biểu hiện, mà sau đó được chuyển nhiễm vào tế bào chủ như tế bào *E. coli*, tế bào COS của khỉ, tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), hoặc tế bào u tủy mà không sản xuất protein globulin miễn dịch theo cách khác, để tổng hợp được các kháng thể đơn dòng mong muốn trong tế bào chủ tái tổ hợp. Xem thêm các bài báo về việc biểu hiện tái tổ hợp ADN mã hóa kháng thể ở vi khuẩn bao gồm bài báo của Skerra và các đồng tác giả, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) và bài báo của Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

ADN mã hóa các dòng Fv theo sáng chế có thể được kết hợp với các trình tự ADN đã biết mã hóa vùng hằng định của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ (ví dụ các trình tự ADN thích hợp có thể thu được từ Kabat và các đồng tác giả, *trên đây*) để tạo ra các dòng mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ hoặc một phần. Sẽ rõ ràng rằng các vùng hằng định của phân lớp kháng thể bất kỳ có thể được sử dụng cho mục đích này, bao gồm vùng hằng định IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE, và các vùng hằng định như vậy có thể thu được từ người hoặc loài động vật bất kỳ. Dòng Fv thu được từ ADN vùng biến đổi của một loài động vật (như người) và sau đó được dung hợp với ADN vùng hằng định của động vật khác để tạo ra (các) trình tự mã hóa cho chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ "lai", có độ dài đầy đủ cũng nằm trong khái niệm kháng thể "khảm" và "lai" như được sử dụng trong bản mô tả. Theo các phương án nhất định, dòng Fv thu được từ ADN vùng biến đổi của người được dung hợp với ADN vùng hằng định của người để tạo ra (các) trình tự mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của người có độ dài đầy đủ hoặc một phần.

ADN mã hóa kháng thể kháng kháng nguyên thu được từ tế bào lai theo sáng chế cũng có thể được cải biến, ví dụ, bằng cách thể trình tự mã hóa vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ người bằng trình tự tương đồng của chuột thu được từ dòng tế bào lai (ví dụ như trong phương pháp của Morrison và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). ADN mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể lai hoặc kháng thể thu được từ dòng Fv có thể được cải biến tiếp bằng cách liên kết cộng hóa trị trình tự mã hóa globulin miễn dịch và toàn bộ hoặc một phần trình tự mã hóa polypeptit không thuộc globulin miễn dịch. Theo cách này, kháng thể "khảm" hoặc "lai" được tạo ra có độ đặc hiệu liên kết của kháng thể dòng Fv hoặc kháng thể thu được từ dòng tế bào lai theo sáng chế.

(iv) Kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể người

Nhiều phương pháp khác nhau để làm cho các kháng thể không phải của người giống như của người đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, kháng thể được làm tương thích với người có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào đó từ nguồn mà không phải của người. Các gốc axit amin không phải của người này thường gọi là gốc "nhập khẩu", mà thường được lấy từ vùng biến đổi "nhập khẩu". Việc làm cho giống như của người có thể được thực hiện chủ yếu theo phương pháp của Winter và các đồng tác giả (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), bằng cách thế các CDR loài gặm nhấm hoặc các trình tự CDR cho các trình tự tương ứng của kháng thể người. Theo đó, các kháng thể "được làm tương thích với người" là kháng thể khảm (patent Mỹ số 4,816,567) trong đó hầu như nhỏ hơn vùng biến đổi nguyên vẹn của người đã được thế bằng trình tự tương ứng từ loài không phải người. Thực tế, các kháng thể được làm tương thích với người thường là kháng thể người trong đó một số gốc CDR và có thể một số gốc FR được thế bằng các gốc từ vị trí tương tự ở kháng thể loài gặm nhấm.

Việc chọn các vùng biến đổi của người, cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, cần sử dụng để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người là rất quan trọng để giảm tính kháng nguyên. Theo phương pháp gọi là phương pháp "thích hợp nhất", trình tự vùng biến đổi của kháng thể loài gặm nhấm được sàng lọc khỏi toàn bộ thư viện các trình tự vùng biến đổi đã biết của người. Trình tự của người mà gần với trình tự của loài gặm nhấm nhất sau đó được chấp nhận làm vùng khung của người (FR) cho kháng thể được làm tương thích với người (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Một phương pháp khác sử dụng vùng khung đặc biệt thu được từ trình tự liên ứng của tất cả các kháng thể người thuộc phân nhóm cụ thể của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng. Cùng vùng khung như vậy có thể được sử dụng cho một số kháng thể được làm tương thích với người khác nhau (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Còn quan trọng hơn ở chỗ các kháng thể được làm tương thích với người giữ được ái lực cao đối với kháng nguyên và các đặc tính sinh học có lợi khác. Để đạt được mục đích này, theo một phương án về phương pháp, các kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bằng quy trình phân tích trình tự gốc và nhiều sản phẩm thuộc khái niệm được làm tương thích với người khác nhau bằng cách sử dụng

các mô hình ba chiều của trình tự gốc và trình tự được làm tương thích với người. Các mô hình globulin miễn dịch ba chiều thường sẵn có và quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Các chương trình máy tính mà minh họa và thể hiện các cấu trúc có cấu hình ba chiều có thể có của trình tự globulin miễn dịch được chọn là sẵn có. Việc kiểm tra các hiển thị này cho phép phân tích vai trò có vẻ thích hợp của các gốc trong việc tạo ra chức năng cho trình tự globulin miễn dịch tiềm năng, tức là phân tích các gốc mà ảnh hưởng đến khả năng liên kết của globulin miễn dịch tiềm năng với kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc FR có thể được chọn và kết hợp từ bên nhận và các trình tự nhập khẩu sao cho đạt được đặc tính mong muốn của kháng thể, như ái lực với (các) kháng nguyên đích tăng. Nói chung, các gốc vùng siêu biến đổi trực tiếp và gần như có liên quan nhất đến ảnh hưởng lên liên kết kháng nguyên.

Các kháng thể người được mô tả có thể được kết cấu bằng cách kết hợp (các) trình tự vùng biến đổi của dòng Fv được chọn từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn thu được từ người với (các) trình tự vùng hằng định đã biết của người như được mô tả trên đây. Theo cách khác, các kháng thể đơn dòng của người được mô tả có thể được tạo ra bằng phương pháp lai tế bào. Các dòng tế bào u tủy của người và dị u tủy chuột-người để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả, ví dụ, bởi Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur và các đồng tác giả, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner và các đồng tác giả, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Có thể sản xuất các động vật chuyển gen (ví dụ, chuột nhắt) mà có khả năng, khi gây miễn dịch, sản xuất tập hợp kháng thể người đầy đủ khi không sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Ví dụ, đã có mô tả rằng việc xóa bỏ đồng nhất gen vùng liên kết chuỗi nặng kháng thể (J_H) ở chuột đột biến khảm và dòng mầm dẫn đến sự ức chế hoàn toàn sự sản xuất kháng thể nội sinh. Việc chuyển gen globulin miễn dịch dòng mầm của người trong chuột đột biến dòng mầm sẽ dẫn đến sản xuất kháng thể người khi có kích thích kháng nguyên. Xem, ví dụ, tài liệu của Jakobovits và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); tài liệu của Jakobovits và các đồng tác giả, *Nature*, 362:255-258 (1993); tài liệu của Bruggermann và các đồng tác giả, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); và tài liệu của Duchosal và các đồng tác giả, *Nature* 355:258 (1992).

Sự bố trí lại gen cũng có thể được sử dụng để thu được kháng thể người từ kháng thể không phải của người, ví dụ loài gặm nhấm, trong đó kháng thể người có ái lực và độ đặc hiệu tương tự với kháng thể ban đầu không phải của người. Theo phương pháp này, mà còn gọi là "phương pháp ảnh hưởng epitop", vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của mảnh kháng thể không phải của người thu được bằng kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn như được mô tả trong bản mô tả được thay bằng tập hợp các gen vùng V người, tạo ra quần thể các thể khám chuỗi không phải của người/chuỗi của người scFv hoặc Fab. Việc chọn lọc bằng kháng nguyên dẫn đến khả năng phân lập scFv hoặc Fab khám chuỗi không phải của người/chuỗi của người trong đó chuỗi của người phục hồi được vị trí liên kết kháng nguyên bị phá hủy khi loại bỏ chuỗi không phải của người tương ứng trong dòng biểu hiện thể thực khuẩn đầu tiên, tức là epitop chỉ phối (ảnh hưởng) đến sự lựa chọn chuỗi của người để kết hợp. Khi quy trình được lặp lại nhằm thay thế chuỗi không phải của người còn lại, thu được kháng thể người (xem PCT WO 93/06213 công bố ngày 01/04/1993). Không như việc làm cho kháng thể không phải của người giống như của người thông thường bằng cách ghép CDR, kỹ thuật này tạo ra các kháng thể người hoàn chỉnh, không có các góc FR hay CDR mà có nguồn gốc không phải từ người.

(v) Mảnh kháng thể

Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng cách thông thường, như phân giải bằng enzym, hoặc bằng các kỹ thuật tái tổ hợp. Trong các trường hợp nhất định, có lợi khi dùng các mảnh kháng thể, hơn là toàn bộ kháng thể. Kích thước nhỏ hơn của các mảnh cho phép thanh thải nhanh, và có thể dẫn đến khả năng tiếp cận tốt hơn đến khối u rắn. Để biết thêm về các mảnh kháng thể nhất định, xem tài liệu của Hudson và các đồng tác giả (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

Nhiều kỹ thuật khác nhau đã được phát triển để sản xuất các mảnh kháng thể. Thông thường, các mảnh này thu được thông qua việc phân giải protein các kháng thể nguyên vẹn (xem, ví dụ, tài liệu của Morimoto và các đồng tác giả, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); và tài liệu của Brennan và các đồng tác giả, *Science*, 229:81 (1985)). Tuy nhiên, các mảnh này hiện có thể được sản xuất trực tiếp bằng các tế bào chủ tái tổ hợp. Các mảnh kháng thể Fab, Fv và ScFv đều có thể được biểu hiện trong và được tiết ra từ *E. coli*, do đó cho phép dễ dàng sản xuất lượng lớn các mảnh này. Các mảnh kháng thể có thể được phân lập từ thư viện

kháng thể thực khuẩn đã thảo luận trên đây. Theo cách khác, các mảnh Fab'-SH có thể được thu hồi trực tiếp từ *E. coli* và được kết hợp hóa học để tạo ra các mảnh $F(ab')_2$ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Theo phương pháp khác, các mảnh $F(ab')_2$ có thể được phân lập trực tiếp từ giống nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Mảnh Fab và $F(ab')_2$ với thời gian bán hủy *in vivo* tăng chứa các gốc epitop liên kết thụ thể thu hồi được mô tả trong patent Mỹ Số 5,869,046. Các kỹ thuật khác để sản xuất các mảnh kháng thể sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Theo các phương án nhất định, kháng thể là mảnh Fv chuỗi đơn (scFv). Xem WO 93/16185; patent Mỹ số 5,571,894; và 5,587,458. Fv và scFv là những mảnh duy nhất có vị trí kết hợp nguyên vẹn mà không có các vùng hằng định; do đó, chúng có thể thích hợp để giảm các liên kết không đặc hiệu khi sử dụng *in vivo*. Các protein dung hợp scFv có thể được chế tạo để tạo ra thể dung hợp của protein đáp ứng ở đầu tận cùng amino hoặc carboxy của scFv. Xem *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, trên đây. Mảnh kháng thể cũng có thể là "kháng thể thẳng", ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số 641,870, chẳng hạn. Các kháng thể thẳng có thể là đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép.

(vi) Kháng thể đa đặc hiệu

Kháng thể đa đặc hiệu có tính đặc hiệu liên kết với ít nhất hai epitop khác nhau, trong đó các epitop thường từ các kháng nguyên khác nhau. Trong khi các phân tử như vậy thường chỉ liên kết với hai epitop khác nhau (tức là kháng thể đặc hiệu kép, BsAbs), các kháng thể với tính đặc hiệu khác như đặc hiệu ba lần cũng bao gồm trong cách thể hiện này khi được sử dụng trong bản mô tả. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra dưới dạng kháng thể có độ dài đầy đủ hoặc mảnh kháng thể (ví dụ kháng thể đặc hiệu kép $F(ab')_2$).

Các phương pháp để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép là đã biết trong lĩnh vực này. Việc sản xuất kháng thể đặc hiệu kép có độ dài đầy đủ thông thường là dựa trên sự đồng biểu hiện hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, trong đó hai chuỗi có tính đặc hiệu khác nhau (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Do sự sắp xếp ngẫu nhiên của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, các tế bào lai (ghép bốn) tạo ra hỗn hợp tiềm năng gồm 10 phân tử kháng thể khác nhau, trong đó chỉ có một là có cấu trúc đặc hiệu kép đúng. Việc tinh chế phân tử đúng, mà thường được thực hiện bằng các bước sắc ký ái lực, là hơi khó khăn, và hiệu suất sản phẩm thấp.

Các quy trình tương tự được bộc lộ trong WO 93/08829, và trong tài liệu của Traunecker và các đồng tác giả., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Theo phương pháp khác, các vùng biến đổi của kháng thể với tính đặc hiệu liên kết mong muốn (vị trí kết hợp kháng thể-kháng nguyên) được dung hợp với trình tự vùng hằng định globulin miễn dịch. Việc dung hợp tốt hơn là với vùng hằng định của chuỗi nặng globulin miễn dịch, chứa ít nhất một phần vùng bản lề, CH2, và CH3. Thường có vùng hằng định của chuỗi nặng thứ nhất (CH1) chứa vị trí cần thiết để liên kết chuỗi nhẹ, có trong ít nhất một trong số các thể dung hợp. Các ADN mã hóa các thể dung hợp chuỗi nặng globulin miễn dịch và, nếu muốn, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, được chèn vào các vector biểu hiện riêng rẽ, và được cùng chuyển nhiễm vào sinh vật chủ thích hợp. Điều này tạo ra khả năng linh hoạt lớn trong điều chỉnh các phần chung của ba mảnh polypeptit theo các phương án khi tỷ lệ không đều của ba chuỗi polypeptit được sử dụng trong việc chế tạo tạo ra hiệu suất tối ưu. Tuy nhiên, có thể chèn trình tự mã hóa hai hoặc cả ba chuỗi polypeptit trong một vector biểu hiện khi biểu hiện ít nhất hai chuỗi polypeptit với tỷ lệ bằng nhau tạo ra hiệu suất cao hoặc khi tỷ lệ không có ý nghĩa cụ thể.

Theo một phương án của phương pháp này, các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng globulin miễn dịch lai với tính đặc hiệu liên kết thứ nhất ở một nhánh, và cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch lai (tạo ra tính đặc hiệu liên kết thứ hai) ở nhánh còn lại. Đã phát hiện rằng cấu trúc bất đối này tạo thuận lợi cho việc tách hợp chất đặc hiệu kép khỏi hỗn hợp chuỗi globulin miễn dịch không mong muốn, vì sự có mặt của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch chỉ trong một nửa phân tử đặc hiệu kép làm cho việc tách dễ dàng. Phương pháp này được bộc lộ trong WO 94/04690. Để biết thêm chi tiết về việc tạo ra kháng thể đặc hiệu kép xem, ví dụ, tài liệu của Suresh và các đồng tác giả, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Theo phương pháp khác mô tả trong WO96/27011, giao diện giữa cặp phân tử kháng thể có thể được xử lý để tối đa hóa tỷ lệ phần trăm heterodime thu hồi từ giống nuôi cấy tế bào tái tổ hợp. Một giao diện bao gồm ít nhất một phần vùng CH 3 của vùng hằng định kháng thể. Theo phương pháp này, một hoặc nhiều chuỗi bên axit amin từ giao diện của phân tử kháng thể thứ nhất được thay bằng các chuỗi bên lớn hơn (ví dụ tyrosin hoặc tryptophan). “Các đoạn trống” bù có cùng kích thước bằng hoặc kích thước tương tự với (các) chuỗi bên lớn được tạo ra trên giao diện của phân

từ kháng thể thứ hai bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin lớn bằng cách chuỗi nhỏ hơn (ví dụ alanin hoặc threonin). Điều này tạo ra cơ chế để tăng hiệu suất heterodime so với sản phẩm cuối không mong muốn như homodime.

Các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm các kháng thể được liên kết ngang hoặc "dị liên hợp". Ví dụ, một trong số các kháng thể trong thể dị liên hợp có thể được kết hợp với avidin, kháng thể còn lại được kết hợp với biotin. Các kháng thể như vậy, chẳng hạn, đã được đề xuất để hướng đích các tế bào hệ miễn dịch đến các tế bào không mong muốn (patent Mỹ số 4,676,980), và để điều trị nhiễm HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, và EP 03089). Các kháng thể dị liên hợp có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp liên kết ngang thuận tiện bất kỳ. Các tác nhân liên kết ngang thích hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực này, và được bộc lộ trong patent Mỹ Số 4,676,980, cùng với một số kỹ thuật liên kết ngang.

Các kỹ thuật để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép từ các mảnh kháng thể cũng đã được mô tả trong tài liệu. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách sử dụng liên kết hóa học. Brennan và các đồng tác giả, *Science*, 229: 81 (1985) mô tả quy trình trong đó kháng thể nguyên vẹn được phân cắt protein để tạo ra các mảnh $F(ab')_2$. Các mảnh này được khử với sự có mặt của tác nhân tạo phức dithiol natri arsenit để làm ổn định các dithiol lân cận và ngăn ngừa sự tạo thành disulfua giữa các phân tử. Các mảnh Fab' được tạo ra sau đó được chuyển thành dẫn xuất thionitrobenzoat (TNB). Một dẫn xuất Fab'-TNB sau đó được chuyển lại thành Fab'-thiol bằng cách khử bằng mercaptoethylamin và được trộn với lượng đẳng mol dẫn xuất Fab'-TNB khác để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra có thể được sử dụng làm tác nhân để cố định chọn lọc các enzym.

Những tiến bộ gần đây đã tạo thuận lợi cho việc thu hồi trực tiếp các mảnh Fab'-SH từ *E. coli*, mà có thể được kết hợp hóa học để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép. Shalaby và các đồng tác giả, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) mô tả việc sản xuất phân tử kháng thể đặc hiệu kép được làm tương thích với người $F(ab')_2$ có độ dài đầy đủ. Mỗi mảnh Fab' được tiết riêng rẽ từ *E. coli* và được kết hợp hóa học có định hướng in vitro để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép.

Nhiều kỹ thuật khác nhau để tạo ra và phân lập các mảnh kháng thể đặc hiệu kép trực tiếp từ giống nuôi cấy tế bào tái tổ hợp cũng đã được mô tả. Ví dụ, các kháng thể

đặc hiệu kép đã được sản xuất bằng cách sử dụng cấu trúc khóa kép loxin. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Các peptit khóa kéo loxin từ protein Fos và Jun được liên kết với các phần Fab' của hai kháng thể khác nhau bằng cách dung hợp gen. Các homodime kháng thể được khử ở vùng bản lề để tạo ra monome và sau đó oxy hóa lại để tạo ra heterodime kháng thể. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để sản xuất homodime kháng thể. Công nghệ "diabody" được mô tả trong tài liệu của Hollinger và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) đã đề xuất cơ chế khác để tạo ra các mảnh kháng thể đặc hiệu kép. Các mảnh chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) được nối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) bằng cầu liên kết quá ngắn để cho phép bắt cặp giữa hai vùng trong cùng chuỗi. Theo đó, các vùng V_H và V_L của một mảnh được làm cho bắt cặp với các vùng V_L và V_H bổ sung của mảnh kia, nhờ đó tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên. Một chiến lược khác để tạo ra mảnh kháng thể đặc hiệu kép bằng việc sử dụng các dime Fv chuỗi đơn (sFv) cũng đã được báo cáo. Xem tài liệu của Gruber và các đồng tác giả, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Các kháng thể với nhiều hơn hai hóa trị được dự định. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu bộ ba có thể được tạo ra. Tuft et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Kháng thể vùng đơn

Theo một số phương án trong bản mô tả, kháng thể theo sáng chế là kháng thể vùng đơn. Kháng thể vùng đơn là chuỗi polypeptit đơn chứa toàn bộ hoặc một phần vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc toàn bộ hoặc một phần vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, kháng thể vùng đơn là kháng thể vùng đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,248,516 B1). Theo một phương án, kháng thể vùng đơn bao gồm toàn bộ hoặc một phần vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể.

(viii) Biến thể của kháng thể

Theo một số phương án trong bản mô tả, việc cải biến trình tự axit amin của kháng thể được mô tả trong bản mô tả được dự định. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các thay đổi thích hợp trong trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến như vậy bao gồm, ví dụ, xóa bỏ, và/hoặc chèn và/hoặc thay thế, các gốc

trong trình tự axit amin của kháng thể. Có thể kết hợp xóa bỏ, chèn, và thay thế theo cách bất kỳ để đạt được cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc cuối cùng có các đặc tính mong muốn. Các phép thay đổi axit amin có thể được đưa vào trình tự axit amin của kháng thể cần quan tâm ở thời điểm tạo ra trình tự này.

(ix) Dẫn xuất của kháng thể

Các kháng thể trong bản mô tả có thể được cải biến tiếp để chứa các gốc không phải protein khác mà đã biết trong lĩnh vực này và sẵn có. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất kháng thể là các polyme tan trong nước. Ví dụ không hạn chế về các polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinyllic, polyvinyl pyrrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, polyaxit amin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, homopolyme propylen glycol, co-polyme propylen oxit/etylen oxit, rượu đa chức được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glycerol), rượu polyvinyllic, và hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có các ưu điểm trong sản xuất vì độ ổn định trong nước của nó. Polyme này có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số polyme gắn với kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn vào, thì chúng có thể là các phân tử giống hoặc khác nhau. Nói chung, số và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các xem xét bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đặc tính hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần cải thiện, liệu dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng trong điều trị trong các điều kiện xác định hay không, v.v..

(x) Vector, tế bào chủ, và phương pháp tái tổ hợp

Các kháng thể cũng có thể được sản xuất bằng các phương pháp tái tổ hợp. Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng kháng nguyên, axit nucleic mã hóa kháng thể được phân lập và chèn vào vector sao chép được để tách dòng tiếp (khuếch đại ADN) hoặc để biểu hiện. ADN mã hóa kháng thể có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng các mẫu dò oligonucleotit mà có thể liên kết với các gen mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Nhiều vector là sẵn có. Các thành phần vector thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều thành phần sau: trình tự tín hiệu, điểm khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, đoạn khởi đầu, và trình tự kết thúc phiên mã.

(a) Thành phần trình tự tín hiệu

Kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất theo cách tái tổ hợp không chỉ trực tiếp, mà còn dưới dạng polypeptit dung hợp với polypeptit khác loại, tốt hơn là trình tự tín hiệu hoặc polypeptit khác có vị trí phân cắt đặc hiệu ở đầu tận cùng N của protein hoặc polypeptit trưởng thành. Tốt hơn nếu trình tự tín hiệu được chọn là trình tự được nhận biết và xử lý (ví dụ, được phân cắt bởi peptidaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Các tế bào chủ nhân nguyên thủy mà không nhận biết và xử lý trình tự tín hiệu của kháng thể tự nhiên, trình tự tín hiệu được thay bằng trình tự tín hiệu của tế bào nhân nguyên thủy được chọn, ví dụ, từ nhóm phosphataza kiềm, penixilinaza, lpp, các đoạn dẫn độc tố ruột II bền nhiệt. Để tiết ra bởi nấm men, trình tự tín hiệu tự nhiên có thể được thay thế, ví dụ, bằng trình tự dẫn invertaza nấm men, trình tự dẫn nhân tố (bao gồm các trình tự dẫn nhân tố α của *Saccharomyces* và *Kluyveromyces*), hoặc trình tự dẫn phosphataza axit, trình tự dẫn glucoamylaza của *C. albicans*, hoặc trình tự tín hiệu được mô tả trong WO 90/13646. Trong biểu hiện bằng tế bào động vật có vú, các trình tự tín hiệu của động vật có vú cũng như các trình tự dẫn xuất tiết của virus, ví dụ, trình tự tín hiệu gD của herpes simplex, là sẵn có.

(b) Điểm khởi đầu sao chép

Cả vector biểu hiện và vector tách dòng chứa trình tự axit nucleic làm cho vector có khả năng sao chép trong một hoặc nhiều tế bào chủ được chọn. Thông thường, trong các vector tách dòng trình tự này là trình tự làm cho vector sao chép độc lập trong ADN nhiễm sắc thể chủ, và bao gồm các điểm khởi đầu sao chép hoặc trình tự sao chép tự động. Các trình tự như vậy đã được biết rõ ở vi khuẩn, nấm men, và virus. Điểm khởi đầu sao chép từ plasmid pBR322 thích hợp đối với hầu hết các vi khuẩn gram âm, 2 μ , điểm khởi đầu sao chép của plasmid thích hợp đối với nấm men, và nhiều điểm khởi đầu sao chép của virus khác nhau (SV40, polyoma, adenovirus, VSV hoặc BPV) hữu dụng trong các vector tách dòng ở tế bào động vật có vú. Thông thường, thành phần điểm khởi đầu sao chép không cần đối với các vector biểu hiện

động vật có vú (điểm khởi đầu sao chép SV40 thường có thể được dùng vì nó chứa đoạn khởi đầu sớm).

(c) Thành phần gen chọn lọc

Các vector biểu hiện và tách dòng có thể chứa các gen chọn lọc, còn gọi là dấu chuẩn chọn lọc được. Các gen chọn lọc thông thường mã hóa các protein mà (a) tạo ra tính kháng kháng sinh hoặc các độc tố khác, ví dụ, ampicilin, neomycin, methotrexat, hoặc tetracyclin, (b) bổ sung cho các thiếu hụt khuyết dưỡng, hoặc (c) cung cấp chất dinh dưỡng quan trọng không có trong môi trường phức tạp, ví dụ, gen mã hóa D-alanine racemase cho *Bacilli*.

Một ví dụ về mục đích chọn lọc sử dụng thuốc để làm ngừng sự sinh trưởng của tế bào chủ. Các tế bào mà được biến nạp thành công với gen khác loại tạo ra protein kháng thuốc và do đó sống sót trong chế độ dinh dưỡng chọn lọc. Ví dụ về các phương pháp chọn lọc ưu thế sử dụng các thuốc neomycin, axit mycophenolic và hygromycin.

Ví dụ khác về dấu chuẩn chọn lọc thích hợp đối với tế bào động vật có vú là các dấu chuẩn để nhận dạng các tế bào có khả năng hấp thu axit nucleic mã hóa kháng thể, như DHFR, glutamine synthetase (GS), thymidine kinase, metallothionein-I và -II, tốt hơn là các gen metallothionein, adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, v.v..

Ví dụ, các tế bào được biến nạp với gen DHFR được nhận dạng bằng cách nuôi cấy thể biến nạp trong môi trường nuôi cấy chứa methotrexat (Mtx), chất đối kháng cạnh tranh của DHFR. Trong các điều kiện này, gen DHFR được khuếch đại cùng với axit nucleic được cùng biến nạp bất kỳ khác. Dòng tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) thiếu hụt hoạt tính DHFR nội sinh (ví dụ, ATCC CRL-9096) có thể được sử dụng.

Theo cách khác, các tế bào được biến nạp với gen GS được nhận dạng bằng cách nuôi cấy thể biến nạp trong môi trường nuôi cấy chứa L-methionine sulfoximine (Mtx), chất ức chế GS. Trong các điều kiện này, gen GS được khuếch đại cùng với axit nucleic được cùng biến nạp bất kỳ khác. Hệ thống chọn lọc/khuếch đại GS có thể được sử dụng kết hợp với hệ thống chọn lọc/khuếch đại DHFR được mô tả trên đây.

Theo cách khác, các tế bào chủ (cụ thể là các tế bào chủ kiểu hoang dại mà chứa DHFR nội sinh) được biến nạp hoặc cùng biến nạp với các trình tự ADN mã hóa

kháng thể cần quan tâm, gen DHFR kiểu hoang dại, và dấu chuẩn chọn lọc khác như aminoglycosit 3'-phosphotransferaza (APH) có thể được chọn bằng cách nuôi tế bào trong môi trường chứa tác nhân chọn lọc đối với dấu chuẩn chọn lọc được như kháng sinh aminoglycosidic, ví dụ, kanamycin, neomycin, hoặc G418. Xem patent Mỹ số 4,965,199.

Gen chọn lọc thích hợp để sử dụng trong nấm men là gen *trp1* có trong plasmid YRp7 của nấm men (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). Gen *trp1* tạo ra dấu chuẩn chọn lọc đối với chủng nấm men đột biến không có khả năng sinh trưởng trong tryptophan, ví dụ, ATCC No. 44076 hoặc PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). Sự có mặt của *trp1* trong hệ gen tế bào chủ nấm men khi đó tạo ra môi trường hữu hiệu để phát hiện biến nạp nhờ sự sinh trưởng khi không có tryptophan. Tương tự, các chủng nấm men thiếu hụt *Leu2* (ATCC 20,622 hoặc 38,626) được bổ sung các plasmid đã biết là mang gen *Leu2*.

Ngoài ra, các vector thu được từ plasmid vòng pKD1 1,6 µm có thể được sử dụng để biến nạp nấm men *Kluyveromyces*. Theo cách khác, hệ biểu hiện để sản xuất chymosin bê tái tổ hợp quy mô lớn được báo cáo đối với *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Các vector biểu hiện nhiều bản sao ổn định để tiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp trưởng thành nhờ các chủng công nghiệp *Kluyveromyces* cũng đã được bộc lộ. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(d) Thành phần đoạn khởi đầu

Các vector biểu hiện và tách dòng thường chứa đoạn khởi đầu mà được nhận biết bởi sinh vật chủ và được liên kết linh hoạt với axit nucleic mã hóa kháng thể. Các đoạn khởi đầu thích hợp để sử dụng với tế bào chủ nhân nguyên thủy bao gồm đoạn khởi đầu *phoA*, hệ thống đoạn khởi đầu β -lactamaza và lactoza, đoạn khởi đầu phosphataza kiềm, hệ thống đoạn khởi đầu tryptophan (*trp*), và các đoạn khởi đầu lai như đoạn khởi đầu tac. Tuy nhiên, các đoạn khởi đầu vi khuẩn đã biết khác là thích hợp. Các đoạn khởi đầu để sử dụng trong hệ thống vi khuẩn cũng chứa trình tự Shine-Dalgarno (S.D.) được liên kết linh hoạt với ADN mã hóa kháng thể.

Các trình tự đoạn khởi đầu đã biết đối với tế bào nhân điển hình. Hầu như tất cả các gen của tế bào nhân điển hình có vùng giàu AT nằm ở khoảng 25 đến 30 bazơ phía trước vị trí khởi đầu phiên mã. Một trình tự khác được phát hiện ở 70 đến 80 bazơ phía

trước vị trí khởi đầu phiên mã của nhiều gen là vùng CNCAAT trong đó N có thể là nucleotit bất kỳ. Đầu 3' của hầu hết các gen thuộc tế bào nhân điển hình là trình tự AATAAA mà có thể là tín hiệu để bổ sung đuôi poly A vào đầu 3' của trình tự mã hóa. Tất cả các trình tự này thích hợp để chèn vào vectơ biểu hiện của tế bào nhân điển hình.

Ví dụ về các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng với tế bào chủ nấm men bao gồm các đoạn khởi đầu cho 3-phosphoglyxerat kinaza hoặc các enzym đường phân khác, như enolaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglyxerat mutaza, pyruvat kinaza, triozaphosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza, và glucokinaza.

Các đoạn khởi đầu nấm men khác, các đoạn khởi đầu cảm ứng được có ưu điểm bổ sung là sự phiên mã được điều khiển bởi các điều kiện sinh trưởng, là các vùng khởi đầu đối với dehydrogenaza rượu 2, isoxytocrom C, phosphataza axit, các enzym phân hủy có liên quan đến sự chuyển hóa nitơ, metallothionein, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, và các enzym chịu trách nhiệm cho việc sử dụng maltoza và galactozo. Các vectơ và đoạn khởi đầu thích hợp để sử dụng trong biểu hiện bằng nấm men được mô tả tiếp trong EP 73,657. Các yếu tố tăng cường của nấm men cũng được sử dụng một cách có lợi với các đoạn khởi đầu nấm men.

Việc phiên mã kháng thể từ các vectơ trong tế bào chủ động vật có vú có thể được kiểm soát, ví dụ, bằng các đoạn khởi đầu thu được từ hệ gen virus như virus polyoma, virus đậu gà, adenovirus (như Adenovirus 2), virus papilloma bò, virus sarcoma chim, xytomegalovirus, retrovirus, virus hepatitis-B, virus Simian 40 (SV40), hoặc từ các đoạn khởi đầu động vật có vú khác loại, ví dụ, đoạn khởi đầu actin hoặc đoạn khởi đầu globulin miễn dịch, từ các đoạn khởi đầu sốc nhiệt, miễn là các đoạn khởi đầu này tương hợp với hệ thống tế bào chủ.

Các đoạn khởi đầu sớm và muộn của virus SV40 thu được một cách thuận tiện dưới dạng mảnh giới hạn SV40 mà cũng chứa điểm khởi đầu sao chép của virus SV40. Đoạn khởi đầu sớm tức thì của xytomegalovirus ở người thu được một cách thuận tiện dưới dạng mảnh giới hạn HindIII E. Hệ biểu hiện ADN ở tế bào chủ động vật có vú sử dụng virus papilloma bò làm vectơ được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,419,446. Cải biến

của hệ này được mô tả trong patent Mỹ số 4,601,978. Tương tự xem tài liệu của Reyes và các đồng tác giả, *Nature* 297:598-601 (1982) về sự biểu hiện cADN interferon β ở tế bào chuột với sự điều khiển của đoạn khởi đầu thymidin kinaza từ virus herpes simplex. Theo cách khác, đoạn lặp đầu dài của virus Sarcom Rous có thể được sử dụng làm đoạn khởi đầu.

(e) Thành phần yếu tố tăng cường

Mức phiên mã ADN mã hóa kháng thể theo sáng chế bởi tế bào nhân điển hình bậc cao hơn thường tăng khi chèn thêm trình tự tăng cường vào vector. Nhiều trình tự tăng cường hiện đã biết từ gen của động vật có vú (globin, elastaza, albumin, fetoprotein α , và insulin). Tuy nhiên, thông thường sẽ sử dụng trình tự tăng cường từ virus ở tế bào nhân điển hình. Ví dụ bao gồm trình tự tăng cường SV40 ở phía sau của điểm khởi đầu sao chép (cặp bazơ 100-270), trình tự tăng cường đoạn khởi đầu sớm của cytomegalovirus, trình tự tăng cường của polyoma ở phía sau của điểm khởi đầu phiên mã, và trình tự tăng cường của adenovirus. Tương tự, xem tài liệu của Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) về các yếu tố tăng cường để hoạt hóa các đoạn khởi đầu của tế bào nhân điển hình. Trình tự tăng cường có thể được ghép vào vector ở vị trí 5' hoặc 3' so với trình tự mã hóa kháng thể, nhưng tốt hơn là nằm ở vị trí 5' tính từ đoạn khởi đầu.

(f) Thành phần kết thúc phiên mã

Các vector biểu hiện được sử dụng trong tế bào chủ nhân điển hình (nấm men, nấm mốc, côn trùng, thực vật, động vật, người, hoặc tế bào có nhân từ sinh vật đa bào khác) cũng sẽ chứa các trình tự cần để kết thúc sự phiên mã và để ổn định mRNA. Các trình tự như vậy thường có ở đầu 5' và, đôi khi ở đầu 3', các vùng không được dịch mã của ADN hoặc cADN của sinh vật nhân điển hình hoặc virus. Các vùng này chứa các đoạn nucleotit được phiên mã dưới dạng mảnh polyadenyl hóa trong phần không được dịch mã của mRNA mã hóa kháng thể. Một thành phần kết thúc phiên mã hữu dụng là vùng polyadenyl hóa hormon sinh trưởng của bò. Xem WO94/11026 và vector biểu hiện được bộc lộ trong tài liệu này.

(g) Chọn và biến nạp tế bào chủ

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện ADN trong các vector ở đây là tế bào nhân nguyên thủy, nấm men, hoặc tế bào nhân điển hình bậc cao hơn được

mô tả trên đây. Các sinh vật nhân nguyên thủy thích hợp cho mục đích này bao gồm vi khuẩn thật, như các sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ, Enterobacteriaceae như *scherrichia*, ví dụ, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, ví dụ, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, ví dụ, *Serratia marcescans*, và *Shigella*, cũng như Bacilli như *B. subtilis* và *B. licheniformis* (ví dụ, *B. licheniformis* 41P được bộc lộ trong DD 266,710 công bố ngày 12/04/1989), *Pseudomonas* như *P. aeruginosa*, và *Streptomyces*. Một tế bào chủ tách dòng *E. coli* được ưu tiên là *E. coli* 294 (ATCC 31,446), mặc dù các chủng khác như *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), và *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) là thích hợp. Các ví dụ này minh họa chứ không hạn chế.

Kháng thể có độ dài đầy đủ, các protein dung hợp kháng thể, và các mảnh kháng thể có thể được sản xuất ở vi khuẩn, cụ thể là khi sự glycosyl hóa và chức năng tác động Fc là không cần thiết, như khi kháng thể trị liệu được liên hợp với tác nhân độc tế bào (ví dụ, độc tố) mà bản thân nó thể hiện sự hữu hiệu trong phá hủy tế bào khối u. Kháng thể có độ dài đầy đủ có thời gian bán hủy lớn hơn trong hệ tuần hoàn. Việc sản xuất trong *E. coli* nhanh hơn và hiệu quả về mặt chi phí hơn. Để biểu hiện các mảnh kháng thể và các polypeptit ở vi khuẩn, xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,648,237 (Carter et al.), patent Mỹ số 5,789,199 (Joly et al.), patent Mỹ số 5,840,523 (Simmons et al.), mà mô tả vùng khởi đầu dịch mã (translation initiation region - TIR) và các trình tự tín hiệu để tối ưu hóa sự biểu hiện và xuất tiết. *Tương tự, xem tài liệu của Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, mô tả sự biểu hiện các mảnh kháng thể ở *E. coli*. Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ hồ tế bào *E. coli* ở phân đoạn hòa tan và có thể được tinh chế bằng, ví dụ, cột protein A hoặc G tùy thuộc vào phân lớp của kháng thể. Việc tinh chế lần cuối có thể được tiến hành tương tự như quy trình tinh chế kháng thể được biểu hiện ví dụ, trong tế bào CHO.

Ngoài các tế bào nhân nguyên thủy, các vi khuẩn nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện đối với các vector mã hóa kháng thể. *Saccharomyces cerevisiae*, hay thường gọi là nấm men bánh mỳ, là vi sinh vật thường dùng nhất trong số các vi sinh vật chủ nhân điển hình bậc thấp hơn. Tuy nhiên, một số chi, loài, và chủng thường có sẵn và hữu dụng ở đây, như *Schizosaccharomyces pombe*; vật chủ *Kluyveromyces* như, ví dụ, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K.*

waltii (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, và *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* như *Schwanniomyces occidentalis*; và nấm sợi như, ví dụ, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, và vật chủ *Aspergillus* như *A. nidulans* và *A. niger*. Để thảo luận đánh giá việc sử dụng nấm men và nấm sợi để sản xuất các protein trị liệu, xem, ví dụ, tài liệu của Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Các chủng nấm mốc và nấm men nhất định có thể được chọn trong đó con đường glycosyl hóa đã được "làm tương thích với người", dẫn đến sự sản xuất kháng thể với phổ glycosyl hóa của người từng phần hoặc hoàn toàn. Xem, ví dụ, tài liệu của Li và các đồng tác giả, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (mô tả việc làm cho con đường glycosyl hóa giống như của người ở *Pichia pastoris*); và tài liệu của Gerngross và các đồng tác giả, *trên đây*.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể được glycosyl hóa cũng thu được từ các sinh vật đa bào (không có xương sống và có xương sống). Ví dụ về các tế bào không có xương sống bao gồm tế bào thực vật và côn trùng. Nhiều chủng baculovirus và biến thể và các tế bào chủ côn trùng chấp nhận được tương ứng từ vật chủ như *Spodoptera frugiperda* (sâu bướm), *Aedes aegypti* (muỗi), *Aedes albopictus* (muỗi), *Drosophila melanogaster* (ruồi giấm), và *Bombyx mori* đã được nhận dạng. Nhiều chủng virus để chuyển nhiễm là sẵn có chung, ví dụ, biến thể L-1 của *Autographa californica* NPV và chủng Bm-5 của *Bombyx mori* NPV, và các virus như vậy có thể được sử dụng làm virus theo sáng chế, đặc biệt để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Giống nuôi cấy tế bào thực vật của cây bông, ngô, khoai tây, đậu tương, dẻ yên thảo, cà chua, bèo tấm (*Leninaceae*), cỏ linh lăng (*M. truncatula*), và thuốc lá cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất kháng thể ở thực vật chuyển gen).

Các tế bào có xương sống có thể được sử dụng làm vật chủ, và việc nhân giống tế bào có xương sống trong môi trường nuôi cấy (nuôi cấy mô) đã trở thành quy trình thường quy. Ví dụ về các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu dụng là dòng tế bào thận

khi CV1 được biến nạp SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); dòng tế bào thận phôi người (tế bào 293 hoặc 293 được tách dòng phụ để nuôi trong môi trường nuôi cấy huyền phù, Graham và các đồng tác giả, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); tế bào thận chuột đồng con (BHK, ATCC CCL 10); tế bào sertoli chuột nhắt (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); tế bào thận khi (CV1 ATCC CCL 70); tế bào thận khi xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1587); tế bào carxinom cổ tử cung người (HELA, ATCC CCL 2); tế bào thận chó (MDCK, ATCC CCL 34); tế bào gan chuột cống buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); tế bào phổi người (W138, ATCC CCL 75); tế bào gan người (Hep G2, HB 8065); tế bào khối u vú chuột nhắt (MMT 060562, ATCC CCL51); tế bào TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); tế bào MRC 5; tế bào FS4; và dòng tế bào ung thư gan người (Hep G2). Các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu dụng khác bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm các tế bào DHFR⁻ CHO (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như NS0 và Sp2/0. Nhận định về các dòng tế bào chủ động vật có vú nhất định để sản xuất kháng thể, xem, ví dụ, tài liệu của Yazaki và Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268.

Các tế bào chủ được biến nạp với các vector biểu hiện hoặc tách dòng được mô tả trên đây để sản xuất kháng thể và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến nếu thích hợp để cảm ứng các đoạn khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp, hoặc khuếch đại các gen mã hóa các trình tự mong muốn.

(h) Nuôi cấy tế bào chủ

Các tế bào chủ được sử dụng để sản xuất kháng thể theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong nhiều môi trường khác nhau. Các môi trường có bán trên thị trường như Ham's F10 (Sigma), môi trường thiết yếu tối thiểu ((Minimal Essential Medium - MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), và môi trường Eagle được cải biến Dulbecco ((DMEM), Sigma) là thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ. Ngoài ra, môi trường bất kỳ được mô tả trong tài liệu của Ham và các đồng tác giả, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), tài liệu của Barnes và các đồng tác giả, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patent Mỹ số 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; hoặc 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; hoặc patent Mỹ Re. 30,985 có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy tế bào chủ. Môi trường bất kỳ trong số các môi trường này có thể được bổ sung nếu cần

các hormon và/hoặc các yếu tố sinh trưởng khác (như insulin, transferrin, hoặc yếu tố sinh trưởng biểu bì), muối (như natri clorua, canxi, magie, và phosphat), các dung dịch đệm (như HEPES), các nucleotit (như adenosin và thymidin), các chất kháng sinh (như thuốc GENTAMYCIN™), các nguyên tố vi lượng (được xác định là các hợp chất vô cơ thường có mặt ở nồng độ cuối trong phạm vi micromol), và glucoza hoặc nguồn năng lượng tương đương. Các chất bổ sung cần thiết bất kỳ khác nếu cũng có thể được đưa vào với nồng độ thích hợp mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết. Các điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, độ pH, và tương tự, là các điều kiện trước đó đã được sử dụng với tế bào chủ được chọn để biểu hiện, và sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

(xi) Tinh chế kháng thể

Khi sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, kháng thể có thể được sản xuất nội bào, trong khoang chu chất, hoặc được tiết trực tiếp vào môi trường. Nếu kháng thể được sản xuất nội bào, bước đầu tiên, các mảnh vụn dạng hạt, tế bào chủ hoặc mảnh dung giải, được loại bỏ, ví dụ, bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc. Carter và các đồng tác giả, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) mô tả quy trình tách kháng thể mà được tiết vào khoang chu chất của *E. coli*. Tóm lại, hồ tế bào được làm tan với sự có mặt của natri axetat (độ pH=3,5), EDTA, và phenylmetylsulfonylflorua (PMSF) trong khoảng 30 phút. Các mảnh vụn tế bào có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm. Nếu kháng thể được tiết vào môi trường, dịch nổi từ hệ biểu hiện như vậy thường đầu tiên được cô đặc bằng cách sử dụng bộ lọc cô protein có bán trên thị trường, ví dụ bộ siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Chất ức chế proteaza như PMSF có thể được đưa vào ở bước bất kỳ trên đây để ức chế sự thủy phân protein và chất kháng sinh có thể được đưa vào để ngăn ngừa sự sinh trưởng của sinh vật nhiễm tạp ngẫu nhiên.

Chế phẩm chứa kháng thể được bào chế từ các tế bào có thể được tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, phương pháp sắc ký hydroxylapatit, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, điện di trên gel, thẩm tách, và phương pháp sắc ký ái lực, trong đó phương pháp sắc ký ái lực là một trong số bước tinh chế thường được ưu tiên. Sự thích hợp của protein A làm phối tử ái lực tùy thuộc vào loài và phân lớp kháng thể của vùng Fc globulin miễn dịch mà có trong kháng thể. Protein A có thể được sử dụng để tinh chế kháng thể mà dựa trên các chuỗi nặng $\gamma 1$, $\gamma 2$, hoặc $\gamma 4$ của người (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Protein G được khuyến nghị đối với tất cả

phân lớp kháng thể của chuột và đối với $\gamma 3$ của người (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). Nền mà phối tử ái lực gắn vào phổ biến nhất là agarosa, nhưng các nền khác là sẵn có. Các nền ổn định về mặt cơ học như thủy tinh xốp có điều chỉnh hoặc poly(styrenediviny)benzen cho phép tốc độ dòng nhanh hơn và thời gian xử lý ngắn hơn có với có thể đạt được bằng agarosa. Khi kháng thể chứa vùng CH_3 , nhựa Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) là hữu dụng để tinh chế. Các kỹ thuật khác để tinh chế protein như phân đoạn trên cột trao đổi ion, kết tủa etanol, HPLC đảo pha, sắc ký trên silic oxit, sắc ký trên heparin SEPHAROSE™ sắc ký trên nhựa trao đổi anion hoặc cation (như cột polyaxit aspartic), sắc ký điểm đẳng điện, SDS-PAGE, và kết tủa bằng amoni sulfat cũng sẵn có tùy thuộc vào kháng thể cần thu hồi.

Nói chung, nhiều phương pháp khác nhau để tạo ra kháng thể để sử dụng trong nghiên cứu, thử nghiệm, và trong lâm sàng đã được thiết lập trong lĩnh vực này, phù hợp với các phương pháp đã mô tả trên đây và/hoặc được xem là thích hợp đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đối với kháng thể cụ thể cần quan tâm.

C. Chọn lọc kháng thể có hoạt tính sinh học

Các kháng thể được tạo ra như được mô tả trên đây có thể được đưa vào một hoặc nhiều thử nghiệm về "hoạt tính sinh học" để chọn kháng thể với các đặc tính có lợi từ về triển vọng trong điều trị hoặc chọn các chế phẩm và điều kiện để duy trì hoạt tính sinh học của kháng thể. Kháng thể này có thể được thử nghiệm về khả năng liên kết của nó với kháng nguyên mà nó được phát triển để chống lại. Ví dụ, đối với kháng thể kháng PDL1, các đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được đánh giá trong thử nghiệm phát hiện khả năng liên kết với PDL1. Theo một số phương án, liên kết của kháng thể có thể được xác định bằng thử nghiệm liên kết bão hòa; thử nghiệm ELISA; và/hoặc các thử nghiệm cạnh tranh (ví dụ thử nghiệm RIA), chẳng hạn. Tương tự, kháng thể có thể được đưa vào các thử nghiệm về hoạt tính sinh học khác, ví dụ, để đánh giá độ hữu hiệu của nó trong điều trị. Các thử nghiệm như vậy đã được biết rõ trong lĩnh vực này và tùy thuộc vào kháng nguyên đích và ứng dụng được dự định của kháng thể. Ví dụ, các tác dụng sinh học phong bế PD-L1 của kháng thể có thể được đánh giá trong các tế bào T CD8+, mô hình virus viêm màng não lympho bào (lymphocytic choriomeningitis virus - LCMV) ở chuột nhắt và/hoặc mô hình khối u đồng ghép ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số 8,217,149.

Để sàng lọc kháng thể mà liên kết với epitop cụ thể trên kháng nguyên cần quan tâm (ví dụ, kháng thể mà chặn liên kết của kháng thể kháng PDL1 làm ví dụ với PD-L1), thử nghiệm chặn chéo thường quy như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, của Ed Harlow và David Lane (1988), có thể được thực hiện. Theo cách khác, việc lập bản đồ epitop, ví dụ như được mô tả trong tài liệu của Champe và các đồng tác giả, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995), có thể được thực hiện để xác định xem liệu kháng thể có liên kết với epitop cần quan tâm hay không.

D. Bào chế dược phẩm

Sau khi tạo kháng thể kháng thể cần quan tâm (ví dụ, các kỹ thuật để sản xuất kháng thể mà có thể được bào chế như được bộc lộ trong bản mô tả sẽ được thảo luận chi tiết dưới đây và đã biết rõ trong lĩnh vực này), dược phẩm chứa nó được bào chế. Theo các phương án nhất định, kháng thể được bào chế không được đông khô trước đó và dược phẩm cần quan tâm ở đây là dược phẩm dạng nước. Lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể có trong dược phẩm được xác định bằng cách tính đến thể tích liều mong muốn và (các) cách sử dụng, chẳng hạn. Từ khoảng 25 mg/mL đến khoảng 150 mg/mL, hoặc từ khoảng 30 mg/mL đến khoảng 140 mg/mL, hoặc từ khoảng 35 mg/mL đến khoảng 130 mg/mL, hoặc từ khoảng 40 mg/mL đến khoảng 120 mg/mL, hoặc từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 130 mg/mL, hoặc từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 125 mg/mL, hoặc từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 120 mg/mL, hoặc từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 110 mg/mL, hoặc từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 100 mg/mL, hoặc từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 90 mg/mL, hoặc từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 80 mg/mL, hoặc từ khoảng 54 mg/mL đến khoảng 66 mg/mL là nồng độ làm ví dụ của kháng thể trong dược phẩm trong bản mô tả.

Dược phẩm dạng nước được bào chế chứa kháng thể trong dung dịch đệm độ pH. Dung dịch đệm trong bản mô tả có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 7,0. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,5, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,4, nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,3, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,2, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,1, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,1, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,0, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 5,9, độ pH

nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến khoảng 5,8, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,1 đến khoảng 6,0, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,2 đến khoảng 6,0, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,3 đến khoảng 6,0, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,4 đến khoảng 6,0, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,6 đến khoảng 6,0, độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,7 đến khoảng 6,0, hoặc độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,8 đến khoảng 6,0. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 6,0 hoặc khoảng 6,0. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 5,9 hoặc khoảng 5,9. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 5,8 hoặc khoảng 5,8. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 5,7 hoặc khoảng 5,7. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 5,6 hoặc khoảng 5,6. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 5,5 hoặc khoảng 5,5. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 5,4 hoặc khoảng 5,4. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 5,3 hoặc khoảng 5,3. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dược phẩm có độ pH = 5,2 hoặc khoảng 5,2. Ví dụ về các dung dịch đệm mà điều chỉnh độ pH trong khoảng này bao gồm histidin (như L-histidin) hoặc natri axetat. Theo các phương án nhất định, dung dịch đệm chứa histidin axetat hoặc natri axetat với nồng độ khoảng 15 mM đến khoảng 25 mM. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, dung dịch đệm chứa histidin axetat hoặc natri axetat với nồng độ khoảng 15 mM đến khoảng 25 mM, khoảng 16 mM đến khoảng 25 mM, khoảng 17 mM đến khoảng 25 mM, khoảng 18 mM đến khoảng 25 mM, khoảng 19 mM đến khoảng 25 mM, khoảng 20 mM đến khoảng 25 mM, khoảng 21 mM đến khoảng 25 mM, khoảng 22 mM đến khoảng 25 mM, khoảng 15 mM, khoảng 16 mM, khoảng 17 mM, khoảng 18 mM, khoảng 19 mM, khoảng 20 mM, khoảng 21 mM, khoảng 22 mM, khoảng 23 mM, khoảng 24 mM, hoặc khoảng 25 mM. Theo một phương án trong bản mô tả, dung dịch đệm là histidin axetat hoặc natri axetat với lượng khoảng 20 mM, độ pH = 5,0. Theo một phương án trong bản mô tả, dung dịch đệm là histidin axetat hoặc natri axetat với lượng khoảng 20 mM, độ pH = 5,1. Theo một phương án trong bản mô tả, dung dịch đệm là histidin axetat hoặc natri axetat với lượng khoảng 20 mM, độ pH = 5,2. Theo một phương án trong bản mô tả, dung dịch đệm là histidin axetat hoặc natri axetat với lượng khoảng 20 mM, độ pH = 5,3. Theo

[illegible]

lượng khoảng 25 mM, độ pH = 6,2. Theo một phương án trong bản mô tả, dung dịch đệm là histidin axetat hoặc natri axetat với lượng khoảng 25 mM, độ pH = 6,3.

Dược phẩm này còn chứa sacaroza với lượng từ 60 mM đến 240 mM. Theo một số phương án trong bản mô tả, sacaroza trong dược phẩm với lượng khoảng 60 mM đến khoảng 230 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 220 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 210 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 200 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 190 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 180 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 170 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 160 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 150 mM, khoảng 60 mM đến khoảng 140 mM, khoảng 80 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 90 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 100 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 110 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 120 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 130 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 140 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 150 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 160 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 170 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 180 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 190 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 200 mM đến khoảng 240 mM, khoảng 80 mM đến khoảng 160 mM, khoảng 100 mM đến khoảng 140 mM, hoặc khoảng 110 mM đến khoảng 130 mM. Theo một số phương án, sacaroza trong dược phẩm với lượng khoảng 60 mM, khoảng 70 mM, khoảng 80 mM, khoảng 90 mM, khoảng 100 mM, khoảng 110 mM, khoảng 120 mM, khoảng 130 mM, khoảng 140 mM, khoảng 150 mM, khoảng 160 mM, khoảng 170 mM, khoảng 180 mM, khoảng 190 mM, khoảng 200 mM, khoảng 210 mM, khoảng 220 mM, khoảng 230 mM, hoặc khoảng 240 mM.

Theo một số phương án, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là từ 40 mg/ml đến 125 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 40 mg/ml đến khoảng 120 mg/ml, khoảng 40 mg/ml đến khoảng 110 mg/ml, khoảng 40 mg/ml đến khoảng 100 mg/ml, khoảng 40 mg/ml đến khoảng 90 mg/ml, khoảng 40 mg/ml đến khoảng 80 mg/ml, khoảng 40 mg/ml đến khoảng 70 mg/ml, khoảng 50 mg/ml đến khoảng 120 mg/ml, khoảng 60 mg/ml đến khoảng 120 mg/ml, khoảng 70 mg/ml đến khoảng 120 mg/ml, khoảng 80 mg/ml đến khoảng 120 mg/ml, khoảng 90 mg/ml đến khoảng 120 mg/ml, hoặc khoảng 100 mg/ml đến khoảng 120 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 60 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 65 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả,

nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 70 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 75 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 80 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 85 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 90 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 95 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 100 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 110 mg/ml. Theo một số phương án trong bản mô tả, nồng độ kháng thể trong dược phẩm là khoảng 125 mg/ml.

Theo một số phương án, chất hoạt động bề mặt được bổ sung vào dược phẩm chứa kháng thể. Các chất hoạt động bề mặt làm ví dụ bao gồm các chất hoạt động bề mặt không ion như polysorbat (ví dụ polysorbat 20, 80, v.v.) hoặc các poloxame (ví dụ poloxame 188, v.v.). Lượng chất hoạt động bề mặt được bổ sung sao cho nó làm giảm sự kết tụ của kháng thể được bào chế và/hoặc giảm thiểu sự hình thành các hạt trong dược phẩm và/hoặc giảm hấp phụ. Ví dụ, chất hoạt động bề mặt có thể có mặt trong dược phẩm với lượng từ khoảng 0,001% đến khoảng 0,5% (khối lượng/thể tích). Theo một số phương án trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt với lượng từ khoảng 0,005% đến khoảng 0,2%, từ khoảng 0,005% đến khoảng 0,1%, từ khoảng 0,005% đến khoảng 0,09%, từ khoảng 0,005% đến khoảng 0,08%, từ khoảng 0,005% đến khoảng 0,07%, từ khoảng 0,005% đến khoảng 0,06%, từ khoảng 0,005% đến khoảng 0,05%, từ khoảng 0,005% đến khoảng 0,04%, từ khoảng 0,008% đến khoảng 0,06%, từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,06%, từ khoảng 0,02% đến khoảng 0,06%, từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,05%, hoặc từ khoảng 0,02% đến khoảng 0,04%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,005% hoặc khoảng 0,005%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,006% hoặc khoảng 0,006%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,007% hoặc khoảng 0,007%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm

với lượng 0,008% hoặc khoảng 0,008%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,009% hoặc khoảng 0,009%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,01% hoặc khoảng 0,01%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,02% hoặc khoảng 0,02%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,03% hoặc khoảng 0,03%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,04% hoặc khoảng 0,04%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,05% hoặc khoảng 0,05%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,06% hoặc khoảng 0,06%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,07% hoặc khoảng 0,07%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,08% hoặc khoảng 0,08%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,1% hoặc khoảng 0,1%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,2% hoặc khoảng 0,2%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,3% hoặc khoảng 0,3%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,4% hoặc khoảng 0,4%. Theo các phương án nhất định trong bản mô tả, chất hoạt động bề mặt (ví dụ, polysorbat 20) có mặt trong dược phẩm với lượng 0,5% hoặc khoảng 0,5%.

Theo một phương án, dược phẩm chứa các chất xác định trên đây (ví dụ, kháng thể, dung dịch đệm, sacaroza, và/hoặc chất hoạt động bề mặt) và gần như không chứa một hoặc nhiều chất bảo quản, như rượu benzylic, phenol, m-cresol, clobutanol và benzethoni Cl. Theo một phương án khác, chất bảo quản có thể được đưa vào dược phẩm, cụ thể khi dược phẩm là dược phẩm đa liều. Nồng độ chất bảo quản có thể nằm

trong khoảng từ khoảng 0,1% đến khoảng 2%, tốt hơn là từ khoảng 0,5% đến khoảng 1%. Một hoặc nhiều chất mang được dụng khác, tá dược hoặc chất ổn định như các chất được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) có thể bao gồm trong dược phẩm miễn là chúng không ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính mong muốn của dược phẩm. Các chất mang, tá dược hoặc chất ổn định chấp nhận được phải không độc với người dùng ở liều lượng và nồng độ được sử dụng và bao gồm; các chất đệm bổ sung; đồng dung môi; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; chất tạo chelat như EDTA; phức kim loại (ví dụ phức Zn-protein); các polymephân hủy sinh học như polyeste; và/hoặc các ion đối tạo muối. Các chất mang được dụng làm ví dụ ở đây bao gồm chất phân tán thuốc trong kẽ như các hyaluronidaza glycoprotein trung tính hòa tan (soluble neutral-active hyaluronidase glycoprotein - sHASEGP), ví dụ, các hyaluronidaza glycoprotein PH-20 hòa tan của người, như rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Các sHASEGP nhất định làm ví dụ và phương pháp sử dụng, bao gồm rHuPH20, được mô tả trong công bố đơn patent Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Dược phẩm ở đây cũng chứa nhiều hơn một protein nếu cần đối với chỉ định cụ thể cần điều trị, tốt hơn là các protein với hoạt tính bổ sung mà không có tác dụng bất lợi đến protein kia. Ví dụ, nếu kháng thể là kháng thể kháng PDL1, nó có thể được kết hợp với một chất khác (ví dụ, tác nhân hóa liệu pháp, và chất chống ung thư).

Theo một số phương án, độ ổn định vật lý, độ ổn định hóa học, hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể trong dược phẩm được đánh giá và xác định. Các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong mục Ví dụ thực hiện sáng chế ở đây có thể được sử dụng để đánh giá độ ổn định và hoạt tính sinh học của kháng thể trong dược phẩm. Ví dụ, độ ổn định của kháng thể trong dược phẩm có thể được xác định bằng, nhưng không giới hạn ở, phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC hoặc SE-HPLC), phương pháp điện di mao quản hội tụ đẳng điện có chụp ảnh (imaged capillary isoelectric focusing - ICIEF), phương pháp lập bản đồ peptit, thử nghiệm che ánh sáng thể tích nhỏ (small-volume light obscuration - HIAC), và các kỹ thuật điện di mao quản (capillary electrophoresis - CE) như phân tích CE-natri dodecyl sulfat (CE-SDS) và CE-glycan. Theo một số phương án, kháng thể trong dược phẩm ổn định ở

-20°C trong ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 8 tháng, ít nhất khoảng 10 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 14 tháng, ít nhất khoảng 16 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, ít nhất khoảng 20 tháng, ít nhất khoảng 21 tháng, ít nhất khoảng 22 tháng, ít nhất khoảng 23 tháng, ít nhất khoảng 24 tháng, ít nhất khoảng 3 năm, hoặc ít nhất khoảng 4 năm. Theo một số phương án, kháng thể trong dược phẩm ổn định ở 2°C đến 8°C (ví dụ, 5°C) trong ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 8 tháng, ít nhất khoảng 10 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 14 tháng, ít nhất khoảng 16 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, ít nhất khoảng 20 tháng, ít nhất khoảng 21 tháng, ít nhất khoảng 22 tháng, ít nhất khoảng 23 tháng, hoặc ít nhất khoảng 24 tháng. Theo một số phương án, độ ổn định của kháng thể (*tức là*, monome kháng thể) được xác định bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ trong dược phẩm sau bảo quản. Theo một số phương án, độ ổn định của kháng thể (*tức là*, monome kháng thể) được xác định bằng phương pháp điện di mao quản hội tụ đẳng điện có chụp ảnh trong dược phẩm sau bảo quản. Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm monome kháng thể trong dược phẩm so với protein tổng số (ví dụ, bao gồm kháng thể và các chất kết tụ) là lớn hơn khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 86%, khoảng 87%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94% hoặc khoảng 95% sau bảo quản ở -20°C trong ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, hoặc ít nhất khoảng 24 tháng. Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm monome kháng thể trong dược phẩm so với protein tổng số (ví dụ, bao gồm kháng thể và các chất kết tụ) là lớn hơn khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 86%, khoảng 87%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94% hoặc khoảng 95% sau bảo quản ở 2°C đến 8°C (ví dụ 5°C) trong ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, hoặc ít nhất khoảng 24 tháng. Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm monome kháng thể trong dược phẩm so với protein tổng số (ví dụ, bao gồm kháng thể và các chất kết tụ) là lớn hơn khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 86%, khoảng 87%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94% hoặc khoảng 95% sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ khoảng 15°C đến 25°C) trong ít nhất khoảng 2 giờ, ít nhất khoảng 4 giờ, ít nhất khoảng 6 giờ, ít nhất khoảng 8 giờ, ít nhất

khoảng 10 giờ, ít nhất khoảng 12 giờ, ít nhất khoảng 14 giờ, ít nhất khoảng 16 giờ, ít nhất khoảng 18 giờ, ít nhất khoảng 20 giờ, hoặc ít nhất khoảng 24 giờ. Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm chất kết tụ tổng số (ví dụ, các chất có phân tử lượng cao và các chất có phân tử lượng thấp) trong dược phẩm là nhỏ hơn giá trị bất kỳ trong số khoảng 0,1%, khoảng 0,2%, khoảng 0,3%, khoảng 0,4%, khoảng 0,5%, khoảng 0,6%, khoảng 0,7%, khoảng 0,8%, khoảng 0,9%, khoảng 1%, khoảng 2%, khoảng 3%, khoảng 4%, khoảng 5%, khoảng 6%, khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, hoặc khoảng 10% sau bảo quản ở -20°C trong ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, hoặc ít nhất khoảng 24 tháng. Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm chất kết tụ tổng số (ví dụ, các chất có phân tử lượng cao và các chất có phân tử lượng thấp) trong dược phẩm là nhỏ hơn giá trị bất kỳ trong số khoảng 0,1%, khoảng 0,2%, khoảng 0,3%, khoảng 0,4%, khoảng 0,5%, khoảng 0,6%, khoảng 0,7%, khoảng 0,8%, khoảng 0,9%, khoảng 1%, khoảng 2%, khoảng 3%, khoảng 4%, khoảng 5%, khoảng 6%, khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, hoặc khoảng 10% sau bảo quản ở 2°C đến 8°C (ví dụ 5°C) trong ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, hoặc ít nhất khoảng 24 tháng. Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm chất kết tụ tổng số (ví dụ, các chất có phân tử lượng cao và các chất có phân tử lượng thấp) trong dược phẩm là nhỏ hơn giá trị bất kỳ trong số khoảng 0,1%, khoảng 0,2%, khoảng 0,3%, khoảng 0,4%, khoảng 0,5%, khoảng 0,6%, khoảng 0,7%, khoảng 0,8%, khoảng 0,9%, khoảng 1%, khoảng 2%, khoảng 3%, khoảng 4%, khoảng 5%, khoảng 6%, khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, hoặc khoảng 10% sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, khoảng 15°C đến 25°C) trong ít nhất khoảng 2 giờ, ít nhất khoảng 4 giờ, ít nhất khoảng 6 giờ, ít nhất khoảng 8 giờ, ít nhất khoảng 10 giờ, ít nhất khoảng 12 giờ, ít nhất khoảng 14 giờ, ít nhất khoảng 16 giờ, ít nhất khoảng 18 giờ, ít nhất khoảng 20 giờ, hoặc ít nhất khoảng 24 giờ. Theo phương án bất kỳ trong bản mô tả, dược phẩm ổn định có thể được bảo quản trong lọ thủy tinh, đồ chứa bằng hợp kim, hoặc túi truyền tĩnh mạch (IV). Theo một số phương án, hợp kim này là thép không gỉ 316L hoặc hợp kim hastelloy.

Các dược phẩm để sử dụng in vivo cần phải vô trùng. Điều này dễ dàng có được bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng, trước, hoặc sau khi bào chế dược phẩm.

III. Phương pháp điều trị và sử dụng dược phẩm chứa kháng thể

Dược phẩm được sử dụng cho động vật có vú cần điều trị bằng kháng thể, tốt hơn là người, theo các phương pháp đã biết, như sử dụng trong tĩnh mạch (ví dụ, dưới dạng liều lớn (bolus) hoặc truyền liên tục trong một khoảng thời gian), theo đường trong bắp, trong màng bụng, trong não tủy, dưới da, trong khớp, trong hoạt dịch, trong nội tủy mạc, đường uống, khu trú, hoặc đường hít. Theo một phương án, dược phẩm này được sử dụng cho động vật có vú theo đường tĩnh mạch. Vì các mục đích này, dược phẩm có thể được tiêm bằng xi lanh hoặc qua đường IV, chẳng hạn. Theo một phương án, dược phẩm này được sử dụng cho động vật có vú theo đường dưới da.

Liều thích hợp ("lượng hữu hiệu điều trị") của kháng thể sẽ phụ thuộc, ví dụ, và tình trạng bệnh cần điều trị, mức độ nghiêm trọng và diễn biến của tình trạng bệnh, liệu kháng thể được sử dụng để ngăn ngừa hay điều trị, liệu pháp trước đó, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể, loại kháng thể được sử dụng, và suy xét của bác sĩ điều trị. Kháng thể được sử dụng thích hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc qua loạt điều trị và có thể được sử dụng cho bệnh nhân ở thời điểm bất kỳ từ khi chẩn đoán trở đi. Kháng thể có thể được sử dụng một mình để điều trị hoặc kết hợp với các thuốc hoặc liệu pháp khác hữu dụng để điều trị tình trạng bệnh nghi vấn.

Theo nhân định chung, lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể được sử dụng cho người sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 đến khoảng 50 mg/kg thể trọng của bệnh nhân qua một hoặc nhiều lần sử dụng. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng với lượng khoảng 0,01 đến khoảng 45 mg/kg, khoảng 0,01 đến khoảng 40 mg/kg, khoảng 0,01 đến khoảng 35 mg/kg, khoảng 0,01 đến khoảng 30 mg/kg, khoảng 0,01 đến khoảng 25 mg/kg, khoảng 0,01 đến khoảng 20 mg/kg, khoảng 0,01 đến khoảng 15 mg/kg, khoảng 0,01 đến khoảng 10 mg/kg, khoảng 0,01 đến khoảng 5 mg/kg, hoặc khoảng 0,01 đến khoảng 1 mg/kg sử dụng hằng ngày, chẳng hạn. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng với lượng 15 mg/kg. Tuy nhiên, chế độ liều khác có thể là hữu dụng. Theo một phương án, kháng thể kháng PDL1 được mô tả trong bản mô tả được sử dụng cho người với liều khoảng 100 mg, khoảng 200 mg, khoảng 300 mg, khoảng 400 mg, khoảng 500 mg, khoảng 600 mg, khoảng 700 mg, khoảng 800 mg, khoảng 900 mg, khoảng 1000 mg, khoảng 1100 mg, khoảng 1200 mg, khoảng 1300 mg hoặc khoảng 1400 mg vào ngày 1 của các chu kỳ 21 ngày. Liều có thể được sử dụng dưới dạng liều đơn hoặc nhiều liều (ví dụ, 2 hoặc 3 liều), như truyền.

Liều kháng thể được sử dụng trong điều trị kết hợp với có thể giảm so với điều trị đơn. Tiến trình của việc điều trị này là dễ dàng theo dõi bằng các kỹ thuật thông thường.

Các dược phẩm chứa kháng thể kháng PDL1 được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng chẩn đoán và điều trị in vitro và in vivo. Ví dụ, dược phẩm chứa kháng thể có thể được sử dụng cho đối tượng hoặc cá thể để điều trị bệnh hoặc rối loạn (ví dụ, bệnh hoặc rối loạn qua trung gian PD-1 và tương tác PD-L1).

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn này bệnh ung thư. Theo một số phương án, bệnh ung thư tiến triển cục bộ hoặc di căn. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm khối u rắn, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư não, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, u thần kinh đệm, bệnh ung thư đầu, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), u lympho, u tủy, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư buồng trứng, u hắc tố, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến nước bọt, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư biểu mô tuyến ức, bệnh ung thư tuyến giáp, và carcinom tế bào vảy ở đầu và cổ. Theo một số phương án, đối tượng hoặc cá thể được điều trị có tế bào ung thư dương tính PD-L1 (ví dụ, được phát hiện bằng IHC).

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn này là nhiễm khuẩn. Theo một số phương án, nhiễm khuẩn là nhiễm khuẩn dai dẳng. Theo một số phương án, nhiễm khuẩn là nhiễm virus, nhiễm vi khuẩn, nhiễm nấm, nhiễm giun, hoặc nhiễm động vật nguyên sinh. Theo một số phương án, nhiễm virus được chọn từ nhóm gồm cytomegalovirus, virus Epstein-Barr, virus viêm gan B, virus viêm gan C, virus herpes, virus sởi, virus cúm, virus suy giảm miễn dịch ở người, virus T lymphotropic, virus viêm màng não lympho bào, virus hợp bào hô hấp, và/hoặc rhinovirus. Theo một số phương án, nhiễm vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm *Helicobacter spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Chlamydia spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Klebsiella spp.*, *Borrelia spp.*, *Bacterioides spp.*, và *Treponema spp.* Theo một số phương án, nhiễm động vật nguyên sinh được chọn từ nhóm gồm *Leishmania spp.*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trypanosoma spp.*, và *Taenia spp.* Theo một số phương án, nhiễm nấm được chọn từ nhóm gồm blastomycosis, coccidioiodomycosis,

histoplasmosis, candidiasis, cryptococcosis, aspergillosis, mucormycosis và pneumocystosis.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn này là bệnh viêm. Theo một số phương án, bệnh viêm được chọn từ nhóm gồm viêm não tuỷ rải rác cấp, bệnh Addison, bệnh Alzheimer, viêm cột sống dính khớp, hội chứng kháng thể kháng antiphospholipid, xơ vữa động mạch, bệnh thiếu máu huyết tán tự miễn, viêm gan tự miễn, viêm khớp, bệnh Behcet, bệnh Berger, Bullous dạng pemphigut, bệnh Celiac, bệnh Chagas, viêm túi mật, bệnh Crohn, viêm da cơ, đái tháo đường typ 1, viêm thận-tiểu-cầu, hội chứng Goodpasture, bệnh ghép chống chủ, bệnh Graves, hội chứng Guillain-Barré, bệnh Hashimoto, viêm thanh quản, hội chứng tăng IgE, ban xuất huyết giảm tiểu cầu không rõ nguyên nhân, luput ban đỏ, viêm thận luput, đa xơ cứng, bệnh nhược cơ, thải loại mảnh ghép cơ quan, bệnh Parkinson, pemphigut, thiếu máu ác tính, viêm đa cơ, xơ gan mật nguyên phát, bệnh vẩy nến, hội chứng Raynaud, viêm khớp dạng thấp, xơ cứng bì, hội chứng Sjögren, viêm động mạch thái dương, viêm tuyến giáp, viêm loét đại tràng, viêm màng bồ đào, viêm mạch, và bệnh u hạt Wegener.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa kháng thể có thể được sử dụng kết hợp với một tác nhân điều trị khác cho đối tượng hoặc cá thể để điều trị bệnh hoặc rối loạn. Ví dụ, để điều trị bệnh ung thư, dược phẩm chứa kháng thể kháng PDL1 được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng kết hợp với việc điều trị chống ung thư khác (ví dụ, hóa liệu pháp hoặc điều trị bằng kháng thể khác).

IV. Vật phẩm sản xuất hoặc kit

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất vật phẩm sản xuất hoặc kit bao gồm đồ chứa đựng dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế và tùy ý cung cấp hướng dẫn để sử dụng nó. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, túi và xi lanh. Đồ chứa có thể được làm từ nhiều vật liệu như thủy tinh, nhựa (như polyvinyl clorua hoặc polyolefin), hoặc hợp kim (như thép không gỉ hoặc hastelloy). Đồ chứa làm ví dụ là đồ chứa bằng hợp kim dung tích 300 cc (ví dụ, để bảo quản ở -20°C). Ví dụ khác về đồ chứa có thể là lọ thủy tinh dung tích 10-50 cc (ví dụ, để bảo quản ở 2-8°C). Ví dụ, đồ chứa có thể là lọ thủy tinh dung tích 10 cc, 15 cc, 20 cc, hoặc 50 cc. Đồ chứa đựng dược phẩm và nhãn trên, đi kèm với, đồ chứa có thể chỉ dẫn cách sử dụng. Vật phẩm sản xuất có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác theo nhu cầu thương mại hoặc của người dùng, bao

gồm các chất đệm, chất pha loãng, chất độn, kim, xi lanh, và tờ rời trong bao gói với hướng dẫn sử dụng. Theo một số phương án, vật phẩm sản xuất còn bao gồm một hoặc nhiều tác nhân khác (ví dụ, tác nhân hóa liệu pháp, và chất chống ung thư). Các đồ chứa thích hợp đối với một hoặc nhiều tác nhân bao gồm, ví dụ, chai, lọ, túi và xi lanh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Phát triển dược phẩm chứa kháng thể kháng PDL1

Kháng thể kháng PDL1 (α -PDL1) là kháng thể IgG1 không được glycosyl hóa thu được từ CHO được dự định để phục hồi chức năng tế bào T thông qua ức chế tương tác PDL1/PD1. Khó khăn khi bắt đầu phát triển bao gồm khả năng oxy hóa và kết hợp đường Trp ở hoặc gần các vùng CDR và oxy hóa một số methionin. Các nghiên cứu thô trước đó cho thấy độ pH cao hơn so với được định hướng trước đó (độ pH=5,5) là tối ưu. Việc phân liều mục tiêu là liều cố định nhưng liều dựa trên khối lượng cũng được dự định. Các nghiên cứu phân tích được tiến hành để phân tích độ ổn định của nhiều dược phẩm khác nhau và dược phẩm (60 mg/mL α -PDL1, 20 mM His AcO độ pH = 5,8, 120 mM sacaroza, 0,04% PS20) được chọn. Các nghiên cứu dược phẩm ban đầu xác nhận độ ổn định không quá ba năm đối với dược chất (Drug Substance - DS) và dược phẩm (Drug Product - DP).

Phương pháp và vật liệu

Sản xuất dược phẩm chứa α -PDL1

Nguyên liệu α -PDL1 mà đã trải qua quá trình siêu lọc/lọc thẩm tách được đưa vào nghiên cứu phát triển dược phẩm. Nguyên liệu này được thẩm tách vào nhiều dung dịch đệm bào chế khác nhau bằng cách sử dụng các catxet thẩm tách 10000 Dalton. Sau khi thẩm tách, nồng độ protein được điều chỉnh để đạt nồng độ đích và 10% dung dịch gốc PS20 được pha vào để đạt được nồng độ PS20 đích. Nguyên liệu được bào chế được nạp vô trùng vào lọ thủy tinh Forma Vitrum 2-cc với thể tích nạp 1 mL và bịt kín bằng nắp Daikyo 777-1 13 mm. Mẫu được bảo quản ở tư thế đứng ở 5°C, 25°C hoặc 40°C.

Màu sắc, biểu hiện, và độ trong (CAC)

Màu sắc, biểu hiện, và độ trong của mẫu được xác định bằng các kiểm tra bằng mắt thường dưới ánh sáng huỳnh quang trắng với nền đen và trắng ở nhiệt độ trong phòng như được mô tả trong các phương pháp của Dược điển châu Âu (European Pharmacopoeia - EP) (Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 2008, 7th Ed., EP 2.2.2 and EP 2.2.1). Lọ thủy tinh 3cc được nạp 1 mL mỗi mẫu thử nghiệm. Đối chứng âm (nước tinh khiết) với thể tích mẫu tương ứng được sử dụng để so sánh.

Xác định nồng độ protein

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo độ hấp thụ UV trên quang phổ kế Agilent 8453 (Santa Clara, CA.) thông qua việc pha loãng mẫu theo thể tích thành khoảng 0,5 mg/mL với nước muối 0,9%. Các mẫu được chỉnh trắng bằng nước muối 0,9% và độ hấp thụ được đo ở $A_{\max}$ khoảng 280 nm và cả ở 320 nm. Sự khác biệt giữa $A_{\max}$ và A_{320} được tính toán để thu được $A_{\max}$ hiệu chỉnh được sử dụng để xác định nồng độ protein cuối với khả năng hấp thụ $1,5 \text{ mL cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Xác định độ đục

Mật độ quang trung bình ở 350 nm của các mẫu được đo trong cuvet thạch anh với độ dài đường đi 1-cm trên quang phổ kế Agilent 8453. Nước tinh khiết được sử dụng làm mẫu trắng.

Phương pháp che ánh sáng đối với các hạt dưới mức nhìn thấy (thử nghiệm HIAC)

Việc đếm số hạt của mẫu được thực hiện bằng độ che ánh sáng đo được bằng thiết bị HIAC-Royco loại 9703 (HACH, Loveland, CO.). Số hạt trung bình tích lũy trong một millilit $\geq 2 \mu\text{m}$, $\geq 5 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$ và $\geq 25 \mu\text{m}$ được lập thành bảng kê đối với mỗi mẫu bằng cách sử dụng phần mềm PharmSpec v2.0. Bốn lần đọc, sử dụng tổng số 1,6 mL mỗi mẫu, được thực hiện cho mỗi thử nghiệm, với lần đọc đầu tiên được bỏ đi, và 3 lần đọc còn lại được lấy trung bình.

Sắc ký loại trừ theo kích cỡ (Size Exclusion Chromatography - SEC hay SE-HPLC)

Phân bố thay đổi kích cỡ được xác định bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) bằng cách sử dụng cột TosoHaas Bioscience G3000 SWXL (South San Francisco, CA.) ở 30°C trên thiết bị Agilent 1200 HPLC (Santa Clara, CA., USA). Tất cả các mẫu được tiêm không pha loãng ở 50 μg vào cột và rửa giải trong 60 phút có đo

độ hấp thụ UV ở 280 nm. Hai phương pháp SEC được sử dụng để thử nghiệm mẫu. Phương pháp 1 sử dụng 0,20 M kali phosphat, 0,25 M kali clorua, độ pH = 6,2, trong khi phương pháp 2 sử dụng 0,20 M kali phosphat, 0,25 M kali clorua, độ pH = 6,2 với 10% (thể tích/thể tích) isopropanol làm pha động. Kết quả được báo cáo dưới dạng diện tích đỉnh tương đối của tổng diện tích dưới đường cong.

Phương pháp điện di mao quản hội tụ đẳng điện có chụp ảnh (Imaged capillary isoelectric focusing - ICIEF)

Phân bố thành phần thay đổi điện tích được đánh giá bằng iCIEF sử dụng thiết bị phân tích iCE280 (ProteinSimple) với cột mao quản được phủ florocacbon (100 μ m x 5 cm). Dung dịch chất điện ly lưỡng tính chứa hỗn hợp 0,35% methyl xenluloza (MC), 0,75% chất mang điện ly lưỡng tính Pharmalyte 3-10, 4,2% chất mang điện ly lưỡng tính Pharmalyte 8-10,5, và 0,2% chất đánh dấu pI 7,40 và 0,15% chất đánh dấu pI 9,77 trong nước tinh khiết. Dung dịch anốt là 80 mM axit phosphoric, và dung dịch catốt là 100 mM natri hydroxit, đều trong 0,10% methylxenluloza. Các mẫu được pha loãng trong nước tinh khiết và CpB được bổ sung vào từng mẫu đã pha loãng ở tỷ lệ enzym so với cơ chất là 1:100 tiếp theo là ủ ở 37°C trong 20 phút. Các mẫu được xử lý CpB được trộn với dung dịch điện ly lưỡng tính và sau đó hội tụ bằng điện thế 1500 V trong một phút, tiếp theo bằng điện thế 3000 V trong 10 phút. Hình ảnh các thành phần thay đổi điện tích α -PDL1 thu được bằng cách cho ánh sáng cực tím 280 nm đi qua mao quản và vào trong ống kính của máy ảnh kỹ thuật số kết hợp điện tích. Ảnh này sau đó được phân tích để xác định phân bố của nhiều thành phần thay đổi điện tích khác nhau.

Lập bản đồ peptit

Kỹ thuật lập bản đồ peptit được sử dụng để theo dõi sự oxy hóa tryptophan (W) và methionin (M). Để tạo ra các bản đồ peptit α -PDL1, protein này được phân giải bằng trypsin sau khi phơi nhiễm protein với dithiothreitol (DTT) và axit iodoacetic (IAA), trong quy trình khử liên kết disulfua và thay đổi các thiol tự do thu được để tạo ra các dẫn xuất carboxymethyl. Các peptit thu được được tách bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đảo pha (reversed-phase highperformance liquid chromatography - RPHPLC) và theo dõi ở 214 nm. Khối lượng các peptit thuộc họ trypsin được xác định

bằng các phân tích LCMS hỗn hợp phân giải được tách bằng cách sử dụng máy phổ khối ThermoFisher Scientific LTQOrbitrap.

Kết quả

Chọn lọc hệ đệm

Trong quá trình phát triển dược phẩm, hai hệ đệm được đánh giá. Một hệ là 20mM histidin axetat với 240mM sacaroza ở độ pH = 5,5, hệ kia 200mM arginin suxinat ở độ pH=5,5. Thử nghiệm độ ổn định tăng tốc cho thấy rằng α -PDL1 có độ ổn định tốt hơn trong đệm histidin axetat so với đệm arginin suxinat (Bảng 1). Do đó, histidin axetat được chọn để tiếp tục phát triển dược phẩm.

Bảng 1. Tỷ lệ phân hủy ZeroOrder của α -PDL1 theo ICIEF và đỉnh chính SEHPLC trong đệm histidin axetat và đệm arginin suxinat ở 30°C

Đệm	Tỷ lệ % tổn thất đỉnh chính trong một tháng ở 30°C	
	ICIEF	SEHPLC
Histidin axetat*	5,7	1,0
Arginin suxinat**	17,6	1,5

Lưu ý: Tất cả các dược phẩm được bảo quản không quá 1 tháng ở 30°C. Phân tích được tiến hành bằng cách sử dụng ICIEF và SEHPLC; * 150 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM L-histidin axetat, 240 mM sacaroza, và 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20 ở độ pH=5,5; ** 150 mg/mL α -PDL1 trong 200 mM arginin suxinat, 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20 ở độ pH=5,5.

Chọn chất ổn định

Sacaroza (120 mM) được chọn làm chất ổn định cho dược phẩm dạng lỏng chứa α -PDL1 dựa trên khả năng bảo vệ protein của nó khỏi sự kết tụ do làm lạnh đông/làm tan băng cũng như chức năng làm chất bảo quản đông lạnh trong quá trình bảo quản đông lạnh kéo dài của dược chất (DS) và sau đó là bảo quản dược phẩm (DP) ở 2°C–8°C.

Trong quá trình phát triển dược phẩm, α -PDL1 ở 50 mg/mL trong 20 mM L-histidin axetat, độ pH =5,5, 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20, và nhiều nồng độ sacaroza khác nhau nằm trong khoảng từ 0 mM đến 120 mM được làm lạnh đông/làm tan băng năm chu kỳ. Chất lượng sản phẩm được xác định bằng SEHPLC

cho thấy rằng 60 mM sacaroza là đủ để ngăn ngừa sự gia tăng α -PDL1 HMWS do làm lạnh đông/làm tan băng (Bảng 2). Tương tự, 120 mM sacaroza thể hiện là duy trì độ ổn định của dược chất khi được bảo quản lạnh đông ở -20°C trong ít nhất 6 tháng (Bảng 3). Do đó, dựa trên các kết quả từ thử nghiệm làm lạnh đông/làm tan băng cũng như độ ổn định trong thời gian dài của dược chất được bảo quản ở -20°C , sacaroza ở nồng độ 120 mM được chọn làm chất bảo quản lạnh đông cho dược phẩm dạng lỏng chứa α -PDL1.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ sacaroza đến độ ổn định của α -PDL1 SEHPLC tỷ lệ phần trăm thành phần có trong lượng phân tử cao trong quá trình làm lạnh đông và làm tan băng

Nồng độ sacaroza (mM)	Chu kỳ F/T	SE-HPLC		CAC	Độ pH
		% HMWS	% Monome		
T0	NA	1,2	98,8	SY,CL,PFVP	5,6
0mM	5	1,4	98,6	SY,CL,PFVP	5,7
60mM	5	1,2	98,8	SY,CL,PFVP	5,7
120mM	5	1,2	98,8	SY,CL,PFVP	5,6

Lưu ý: Tất cả các dược phẩm chứa 50 mg/mL α -PDL1, 20 mM L-histidin axetat, 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20, độ pH = 5,5. Phân tích được tiến hành bằng cách sử dụng SEHPLC; F/T = làm lạnh đông/làm tan băng; HMWS = thành phần có phân tử lượng lớn; SY = vàng nhạt; CL = trong; PFVP = gần như không có hạt nhìn thấy được.

Bảng 3. Dữ liệu về độ ổn định trong thời gian dài đối với mẻ phát triển được chất α -PDL1

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (ngày/tháng)	Q12005 CAC	Q12003 Q12398 độ pH	Q12631 ICIEF				Q12589 SEC		Q12695 CESDSNGS (không khử)			
				Vùng axit		Vùng bazơ		Tổng số		Tổng số		Tổng số	
				Nồng độ Q12398 (mg/mL)	(% diện tích)	(% diện tích)	(% diện tích)	dạng HMW (% diện tích)	Đỉnh monome (% diện tích)	dạng LMW (% diện tích)	Đỉnh trước (% CPA)	Đỉnh chính (% CPA)	Tổng số sau (% lực tương đối)
NA	T = 0/0	SY,CL,PFVP	5,9	60,1	17,3	79,7	3,0	0,7	99,2	0,1	2,7	97,0	0,3
- 20°C	30/1	SY,CL,PFVP	5,9	62,9	16,9	80,2	2,9	0,6	99,3	0,1	2,8	97,0	0,2
- 20°C	61/2	SY,CL,PFVP	5,9	61,4	16,5	80,8	2,7	0,6	99,4	0,1	2,5	97,3	0,3
- 20°C	91/3	SY,CL,PFVP	5,9	62,5	18,1	79,0	3,0	0,6	99,3	0,1	2,8	97,1	0,2
- 20°C	183/6	SY,CL,PFVP	5,9	61,1	17,9	79,0	3,1	0,6	99,4	0,1	3,1	96,6	0,3
5°C	30/1	SY,CL,PFVP	5,9	61,1	18,1	79,0	2,9	0,7	99,2	0,1	2,6	97,0	0,4
5°C	61/2	SY,CL,PFVP	5,9	62,3	17,4	79,8	2,8	0,8	99,2	0,1	2,9	96,7	0,4
5°C	91/3	SY,CL,PFVP	5,9	63,9	17,4	80,1	2,5	0,9	99,0	0,1	3,0	96,5	0,5
5°C	183/6	SY,CL,PFVP	5,9	59,5	19,7	77,4	3,0	1,1	98,8	0,1	3,3	95,9	0,8

Lưu ý: Tất cả các được phẩm chứa 60 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM L-histidin axetat, 120mM sacaroza, 0,04% PS20, độ pH = 5,8. Bình nhỏ bằng thép không gỉ 316L dung tích 25cc được sử dụng trong thử nghiệm này; Na = không áp dụng; CAC = màu sắc, biểu hiện, và độ trong; SY = vàng nhạt, CL = trong, PFVP = gần như không có các hạt nhìn thấy được; HMW = phân tử lượng cao; LMW = phân tử lượng thấp; ICIEF = điện di mao quản hội tụ đẳng điện có chụp ảnh; CE-SDS = điện di mao quản natri dodecyl sulfat; Nt = không thử nghiệm; TBD = cần xác định.

Nghiên cứu thô tiền dược phẩm: Chọn nồng độ protein, độ pH và nồng độ polysorbat 20

Thiết kế thử nghiệm (design of experiment - DOE) nhân tố phân đoạn được sử dụng để kiểm tra tiếp ảnh hưởng của các thông số của dược phẩm chứa α -PDL1 đến độ ổn định của protein. Tổng số mười hai dược phẩm chứa α -PDL1 khác nhau được thử nghiệm (mười thử nghiệm và hai điểm giữa). Ba yếu tố thay đổi trong thử nghiệm là độ pH trong khoảng 5,0 – 6,0 với khoảng cách 0,5 đơn vị, nồng độ protein trong khoảng 40 – 120 mg/mL, và nồng độ polysorbat 20 trong khoảng 0,005% - 0,06% (khối lượng/thể tích) (Bảng 4). Tất cả các dược phẩm được đệm bằng 20mM histidin axetat với 120mM sacaroza trừ hai dược phẩm cuối cùng như thể hiện trên Bảng 4. Dược phẩm 25mM histidin axetat được đánh giá vì nó được xem là viễn cảnh xấu nhất về nguy cơ oxy hóa. Dung dịch đệm 20mM natri axetat được đánh giá làm hệ đệm dự phòng và so với đệm histidin axetat. Các dược phẩm được bảo quản ở 25°C trong 2 tháng và 40°C trong 1 tháng. Dữ liệu về độ ổn định từ các nghiên cứu trên đây được phân tích thống kê về tương tác giữa các thông số của dược phẩm bằng cách sử dụng phần mềm JMP (JMP, Version 9, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Bảng 4. Dược chất và dược phẩm chứa α -PDL1 được đánh giá trong thử nghiệm DOE

Dược phẩm	kháng-PDL1 (mg/mL)	Độ pH dung dịch	PS20 (% khối lượng/thể tích)	His-Axetat (mM)	sacaroza (mM)
F1 ^a	50	5,5	0,04	20	120
F2 ^a	100	5,5	0,04	20	120
F3	40	6,0	0,06	20	120
F4	120	5,0	0,06	20	120
F5	120	6,0	0,005	20	120
F6	40	5,0	0,06	20	120
F7	120	5,0	0,005	20	120
F8	40	6,0	0,005	20	120
F9	40	5,0	0,005	20	120
F10	120	6,0	0,06	20	120
F11 ^b	50	5,5	0,06	25	120
F12 ^c	50	5,5	0,04	20 (Na-Ace)	120

Lưu ý: ^a Các điểm giữa; ^b viễn cảnh xấu nhất: nồng độ protein thấp, nồng độ PS20 cao, nồng độ histidin cao; ^c dung dịch đệm 20 mM natri axetat (Na-Ace) được thử nghiệm.

So với độ pH=5,0 và 5,5, dược phẩm ở độ pH=6,0 có tốc độ tổn thất đỉnh chính hơi chậm hơn, như được xác định bằng ICIEF ở 40°C và 25°C (lần lượt FIG. 1A-B và FIG. 2A-B). Không quan sát được ảnh hưởng đáng kể của nồng độ đến sự tổn thất đỉnh chính bằng ICIEF. Phân tích dược phẩm F1 cho thấy rằng sự gia tăng thay đổi có tính axit chủ yếu góp phần vào sự tổn thất đỉnh chính trong ICIEF trong khi đó phần đóng góp vào sự tổn thất đỉnh chính của thành phần thay đổi điện tích bazơ là không đáng kể. Trong cùng điều kiện bảo quản, dược phẩm ở độ pH=6,0 cũng có tốc độ tổn thất đỉnh monome chậm hơn, như đo được bằng SE-HPLC ở 40°C và 25°C (lần lượt FIG. 3A-B và FIG. 4A-B). Phân tích dược phẩm F1 cho thấy rằng cả dược phẩm HMWS và LMWS góp phần vào sự

giảm monome theo SEC ở nhiệt độ tăng (tức là, 40°C và 25°C). Cả profin độ pH theo SEC và ICIEF cho thấy rằng độ pH=5,5-6,0 là khoảng pH tối ưu cho α -PDL1. Để nằm trong độ ổn định protein tối ưu trên độ pH=5,5 và để cho phép khoảng đơn vị độ pH $\pm 0,3$ pH trong dược chất và dược phẩm được bào chế, đích có độ pH=5,8 được chọn.

Các nghiên cứu về dược phẩm trên đây cũng cho thấy rằng 120 mg/mL dược phẩm α -PDL1 ở độ pH trong khoảng 5,0 - 6,0 có tốc độ tổn thất monome hơi cao hơn nhưng không đáng kể do tốc độ tạo HMWS cao hơn so với dược phẩm 40 mg/mL ở cùng độ pH, như được xác định bằng SE-HPLC (FIG. 3A-B và FIG. 4A-B). Dựa trên các dữ liệu này và để hỗ trợ dược phẩm với độ ổn định sản phẩm được cải thiện và để tạo thuận lợi cho việc định liều cho bệnh nhân, α -PDL1 ở nồng độ 60 mg/mL được chọn.

Không quan sát thấy ảnh hưởng đến độ ổn định protein với các nồng độ polysorbat 20 (PS20) nằm trong khoảng từ 0,005%-0,06% (khối lượng/thể tích) như được thể hiện trong phép phân tích thống kê trên đây (các FIG. 1-4).

Đã biết rằng tạp chất hydro peroxit có trong nguyên liệu polysorbat 20 thô có thể gây ra sự oxy hoá tryptophan (W) và methionin (M). L-histidin cũng có thể làm tăng nguy cơ oxy hóa. Các mẫu dược phẩm thuộc viển cảnh xấu nhất chứa nồng độ polysorbat 20 cao hơn và L-histidin được phân tích bằng cách lập bản đồ peptit. Kết quả phân tích cho thấy rằng ngay cả việc kết hợp nồng độ histidin cao hơn (dung dịch đệm 25mM histidin axetat) và lượng PS20 cao hơn (0,06% PS20) không chứng tỏ nguy cơ oxy hóa đáng kể (Bảng 5) và dung dịch đệm histidin thích hợp để sử dụng để bào chế α -PDL1.

Bảng 5. Tỷ lệ phần trăm oxy hóa Trp và M²⁵³ trong các dược phẩm được chọn theo bản đồ peptit

Các dược phẩm được chọn					% Oxy hóa			
	Nồng độ (mg/mL)	Đệm (mM)	PS20 (%)	Thời điểm	W CDR HC2	W CDR HC4	W CDR HC10	LC27 M253
F1	50	20mM His-Ace	0,04	T0	0,1	0,1	0,1	5,5
F3	40	20mM His-Ace	0,06	25°C, 2 tháng	0,2	0,2	0,2	6,4
F10	120	20mM His-Ace	0,06	25°C, 2 tháng	0,2	0,1	0,2	6,7
F11	50	25mM His-Ace	0,06	25°C, 2 tháng	0,2	0,2	0,2	6,6

Lưu ý: Tất cả các dược phẩm được bảo quản không quá 1 tháng ở 40°C. Phân tích được tiến hành bằng cách sử dụng bản đồ peptit.

W= Tryptophan; M=Methionin

Để đánh giá sự phân hủy có thể xảy ra của PS20 trong dược phẩm khi bảo quản, các dược phẩm F1 đến F10 (Bảng 4) được bảo quản ở 40°C trong 1 tháng, 25°C trong 2 tháng, 5°C trong 2 tháng hoặc 5°C trong 6 tháng. Không quan sát thấy sự phân hủy PS20 trong các dược phẩm được đánh giá ở nhiệt độ bất kỳ trong số các nhiệt độ tăng (*tức là*, 40°C và 25°C) và nhiệt độ bảo quản 5°C. Việc thay đổi thể tích nạp của các dược phẩm đã chọn (*tức là*, F1, F2, F3, và F6) thành 7 ml (nạp đầy) hoặc 4 ml (nạp vơi) sau đó bảo quản ở 5°C trong 6 tháng cũng không có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ phân hủy của PS20 (FIG. 5).

Sự hình thành các hạt dưới mức nhìn thấy (sub-visible particles - SbVP) trong các dược phẩm khác nhau khi bảo quản ở 5°C trong 6 tháng được đánh giá bằng thử nghiệm HIAC dưới dạng số đo độ ổn định (Bảng 6). Không quan sát được thay đổi đo được nào về SbVP trong dược phẩm được thử nghiệm.

Bảng 6. Dữ liệu HIAC đối với sự hình thành SbVP sau 6 tháng bảo quản ở 5°C

Mẫu	Thời điểm (tháng)	Cỡ hạt (số tích lũy/mL)			
		2 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M
F1	0	802	193	61	5
	6	1190	278	80	6
F2	0	799	146	43	12
	6	370	112	29	2
F3	0	485	133	34	4
	6	163	52	14	2
F4	0	211	65	31	8
	6	181	48	8	1
F5	0	872	359	195	79
	6	340	89	23	1
F6	0	233	61	16	3
	6	116	34	16	3
F7	0	134	29	13	4
	6	144	42	9	0
F8	0	433	118	34	1
	6	564	98	23	2
F9	0	498	114	17	1
	6	144	21	6	0
F10	0	610	124	23	0
	6	248	75	28	3

Lưu ý: Hai lọ nạp 1mL được kết hợp với nhau để thực hiện thử nghiệm HIAC thể tích nhỏ.

Độ ổn định của các dược phẩm được tiếp tục kiểm tra bằng thử nghiệm làm lạnh đông làm tan băng. Các dược phẩm từ F1 đến F10 (Bảng 4) được cho trải qua năm chu kỳ làm lạnh đông làm tan băng trong khi bảo quản ở -20°C hoặc được bảo quản ở nhiệt độ bảo quản cao 5°C từ 0 đến 6 tháng và sau đó được phân tích bằng SEC và ICIEF về tỷ lệ phần trăm monome α -PDL1 (FIG. 6A và B) và tỷ lệ phần trăm đỉnh chính trong dược

phẩm (FIG. 6C và D). Không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể về tỷ lệ phần trăm monome và tỷ lệ phần trăm đỉnh chính sau các chu kỳ làm lạnh đông làm tan băng và bảo quản ở các thời điểm được đưa ra.

Độ ổn định của dược chất trong dược phẩm F2 (Bảng 4) được đánh giá bằng cách tiến hành năm chu kỳ làm lạnh đông làm tan băng trong khi bảo quản trong bình nhỏ bằng thép không gỉ ở -20°C trong không quá 6 tháng tiếp theo là đo độ ổn định bằng CAC, SEC, và ICIEF (Bảng 7). Không quan sát thấy thay đổi nào sau 6 tháng bảo quản ở -20°C .

Bảng 7. Độ ổn định của dược chất trong bình nhỏ bằng thép không gỉ được bảo quản ở -20°C

Thời điểm	Chu kỳ F/T	Q12005 CAC Độ trong	Q12589 SEC (% monome)	Q12631 ICIEF (% đỉnh chính)
T0	0	CL/SY	98,6	80,1
1 tháng	1	CL/SY	98,6	79,1
2 tháng	2	CL/SY	98,7	80,2
3 tháng	3	CL/SY	98,8	80,9
6 tháng	5	CL/SY	98,6	80,2

Lưu ý: F/T = làm lạnh đông/làm tan băng; SY = vàng nhạt; CL = trong.

Độ ổn định của dược chất trong dược phẩm chứa 100 mg/mL α -PDL1, 20 mM histidin axetat, 120 mM sacaroza, 0,04% PS20, độ pH = 5,6 được đánh giá bằng cách tiến hành ba chu kỳ làm lạnh đông làm tan băng tiếp theo là bảo quản trong bình nhỏ bằng thép không gỉ hoặc bình nhỏ bằng hợp kim hastelloy ở -20°C , 5°C , hoặc 25°C trong không quá 3 tháng tiếp theo là đo độ ổn định bằng SEC (FIG.7A và B). Không quan sát được sự khác biệt giữa bảo quản trong bình nhỏ bằng thép không gỉ và bình nhỏ bằng hastelloy ở độ pH=5,6. Dược chất ổn định trong không quá 3 tháng ở -20°C sau ba chu kỳ làm lạnh đông làm tan băng. Dù có sự khác biệt nhẹ ở các bình nhỏ bằng thép không gỉ và bằng hợp kim hastelloy, cả hai đều thích hợp để dùng trong bảo quản dược chất.

Độ ổn định của dược phẩm đối với dược phẩm chứa 50 mg/mL α -PDL1, 20 mM histidin axetat, 120 mM sacaroza, 0,04% PS20, độ pH = 5,6 được đánh giá khi bảo quản

ở 16 mL nạp trong lọ 20cc ở -5°C, 25°C, hoặc 40°C trong không quá 3 tháng tiếp theo là đo độ ổn định bằng SEC và ICIEF (FIG. 8A và B). Không quan sát thấy sự thay đổi nào ở 5°C sau tháng bảo quản. Tỷ lệ phân hủy ở độ pH=5,6 trong mỗi tháng ở 40°C lần lượt là 0,66% và 22% theo phân tích bằng SEC và ICIEF.

Việc đánh giá dung dịch đậm trong dược phẩm F12 cho thấy rằng dung dịch đậm natri axetat tạo ra độ ổn định protein tương tự như dung dịch đậm histidin axetat, dựa trên tốc độ phân hủy đỉnh chính đo được bằng SE-HPLC và ICIEF (Bảng 8). Hai dược phẩm được thử nghiệm là 50 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM L-histidin axetat, 120 mM sacaroza, và 0,04% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20 ở độ pH=5,5 và 0 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM natri axetat, 120 mM sacaroza, và 0,04% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20 ở độ pH = 5,5.

Bảng 8. Tỷ lệ phân hủy ZeroOrder của α -PDL1 theo ICIEF và đỉnh chính SEHPLC trong đậm histidin axetat và đậm natri axetat ở 40°C

Nồng độ α -PDL1 (mg/mL)	Tỷ lệ % giảm đỉnh chính trong một tháng	
	ICIEF	SEHPLC
histidin axetat	23	0,67
natri axetat	21	0,74

Lưu ý: Tất cả các dược phẩm được bảo quản trong không quá 1 tháng ở 40°C.

Nói chung, các nghiên cứu về độ ổn định được thiết kế theo DoE cho thấy rằng ở 40°C không có ảnh hưởng đáng kể của nồng độ đến sự tổn thất đỉnh chính theo quan sát bằng ICIEF, trong khi độ pH thấp hơn có tốc độ tổn thất đỉnh chính hơi nhanh hơn (FIG. 1A-B). Ở 40°C cũng không quan sát thấy các tương tác đáng kể bằng SE-HPLC, dược phẩm có nồng độ cao hơn thể hiện tốc độ tổn thất monome nhanh hơn (FIG. 3A-B). Cũng đã phát hiện rằng độ pH thấp hơn có tốc độ tổn thất monome nhanh hơn. Quan sát được các kết quả tương tự ở 25°C (FIG. 2A-B và FIG. 4A-B). Phân tích thống kê cho thấy không có tương tác (kết nối) có ý nghĩa thực tiễn nào giữa bất kỳ thông số nào của dược phẩm được thử nghiệm.

Nghiên cứu tác động xáo trộn và nhiệt độ

Độ ổn định của dược phẩm với sự có mặt của nồng độ PS20 tăng dần khi trải qua quá trình lắc trong lọ thủy tinh được kiểm tra. Dược phẩm chứa 57 mg/mL trong 20 mM histidin axetat, 120 mM sacaroza, độ pH =5,5 được đánh giá trong lọ thủy tinh 2cc nạp 1 mL với nhiều nồng độ PS20 khác nhau nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,06%. Các lọ thủy tinh được lắc ở 70 vòng/phút trong 3 ngày ở nhiệt độ trong phòng trước khi đo độ ổn định bằng SEC (FIG. 9A) và đo độ đục (FIG. 9B). Dược phẩm với mức PS20 nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,06% không có thay đổi nào về độ ổn định trong khi lắc. Tuy nhiên, dược phẩm thiếu PS20 thể hiện sự tổn thất monome tăng do tăng HMWS. Trong thử nghiệm này, 0,005% PS20 là đủ để bảo vệ protein khỏi tác động lắc trong lọ thủy tinh.

Độ ổn định của dược phẩm (Bảng 4) khi được bảo quản ở nhiều nhiệt độ và thời gian khác nhau và sau đó trải qua tác động lắc trong lọ thủy tinh được kiểm tra. Từng dược phẩm F1-F10 được đánh giá trong lọ thủy tinh 2cc nạp 1mL. Các lọ thủy tinh được lắc ở 70 vòng/phút trong 1 ngày ở nhiệt độ trong phòng trước khi đo độ ổn định bằng SEC (FIG. 10). Trong thử nghiệm này, tác động lắc không ảnh hưởng đến độ ổn định của dược phẩm khi được bảo quản trong một khoảng thời gian ở 40°C, 25°C hoặc 5°C.

Để hỗ trợ việc vận chuyển túi IV mà thường ở bệnh viện, nghiên cứu lắc túi IV được tiến hành với α -PDL1 được bào chế trong 20mM histidin axetat, 240mM sacaroza, độ pH =5,5 với 0,005%-0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20. Các túi IV bằng polyvinyl clorua (PVC) hoặc polyolefin (PO) 250mL phổ biến nhất chứa dung dịch natri clorua đẳng trương (NaCl 0,9%) được đánh giá bằng cách tiêm 400-600mg dung dịch α -PDL1 và lắc bằng máy lắc theo quỹ đạo ở 100 vòng/phút ở 5°C trong không quá 6 giờ. Kết quả nghiên cứu xác nhận việc định liều dựa trên khối lượng và chứng tỏ rằng lượng tối thiểu 0,015% (khối lượng/thể tích) của polysorbat 20 trong dung dịch protein solution là cần thiết để ngăn ngừa sự hình thành các hạt nhìn thấy được (liên quan đến sự kết tủa protein) trong quá trình vận chuyển (Bảng 9). Ngoài ra, để giảm nguy cơ phân hủy polysorbat 20 trong thời hạn sử dụng, nồng độ polysorbat được tăng từ 0,02% (khối lượng/thể tích) đến 0,04% (khối lượng/thể tích).

Bảng 9. Nghiên cứu lắng túi IV với lượng PS20 khác nhau trong dược phẩm chứa α -PDL1

% PS20 trong DP	Mẫu	CAC	SEHPLC		Hạt dưới mức nhìn thấy (ppmL)	
			%HMWS	%Monome	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
0,005%	Túi PO 250mL, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	Túi PO 250mL, lắc ở 5°C trong 2 giờ	Các hạt nhìn thấy quan sát được Dùng thử nghiệm	NT	NT	NT	NT
	Túi PVC 250mL, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	Túi PVC 250mL, lắc ở 5°C trong 2 giờ	Các hạt nhìn thấy quan sát được Dùng thử nghiệm	NT	NT	NT	NT
0,01%	Túi PO 250mL, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	Túi PO 250mL, lắc ở 5°C trong 2 giờ	Các hạt nhìn thấy quan sát được Dùng thử nghiệm	NT	NT	NT	NT
	Túi PVC 250mL, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	Túi PVC 250mL, lắc ở 5°C trong 4 giờ	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
0,015%	Túi PO 250mL, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	21	2
	Túi PO 250mL, lắc ở 5°C trong 4 giờ	CO, CL, PFVP	1,3	98,7	195	19
	Túi PVC 250mL, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	16	0
	Túi PVC 250mL, lắc ở 5°C trong 4 giờ	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	24	2

Lưu ý: Tất cả các dược phẩm chứa 50 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM L-histidin axetat, 240 mM sacaroza ở độ pH = 5,5. Phân tích được tiến hành bằng cách sử dụng SEHPLC. NT = không thử nghiệm; CAC = màu sắc, biểu hiện, và độ trong; CO = không màu; CL = trong; PFVP = gần như không có các hạt nhìn thấy được.

Đánh giá độ ổn định của dược phẩm chứa α -PDL1

Việc sàng lọc độ pH được tiến hành thêm trên các nguyên liệu dược sản xuất từ Master Cell Bank và Working Cell Bank trong khoảng độ pH từ 5,2 đến 6,3 trong dược phẩm chứa 20 mM histidin axetat, 120 mM sacaroza, và 0,04% PS20 (Bảng 10). Phân

tích bằng SE-HPLC và ICIEF thể hiện rằng độ pH từ 5,7 đến 6,3 là khá ổn định về mặt hóa học và vật lý và khoảng cho phép của độ pH từ 5,5 đến 6,3 trong dược phẩm là thích hợp (FIG. 11A và B). Độ pH cao hơn làm giảm tỷ lệ monome và tỷ lệ phân hủy đỉnh chính, với các tỷ lệ này ổn định trong khoảng pH từ 5,7 đến 6,3.

Bảng 10. Sàng lọc độ pH của dược phẩm

Nồng độ (mg/mL)	Độ pH	Đồ chứa	Nhiệt độ (°C)	Thời điểm
120	5,2, 5,7, 6,0, 6,3	lọ 2cc nạp 1mL	40	T0, 1 tuần, 2 tuần, 1 tháng
40	5,2, 5,7, 6,0, 6,3	lọ 2cc nạp 1mL	40	T0, 1 tuần, 2 tuần, 1 tháng

Ảnh hưởng của các tá dược bào chế đến sự oxy hóa tryptophan (W) và methionin (M) trong dược phẩm chứa α -PDL1 được kiểm tra. Việc lập bản đồ peptit thể hiện là không có sự gia tăng oxy hóa đáng kể. Các dược phẩm chứa 20 mM histidin axetat, 120mM sacaroza, 0,04% PS20 với độ pH dung dịch = 5,8 không thể hiện sự gia tăng oxy hóa tryptophan và methionin rõ ràng khi dược phẩm được bảo quản trong một tháng ở nhiệt độ tăng đối với dược phẩm hoặc dược chất (Bảng 11).

Bảng 11. Tỷ lệ phần trăm oxy hóa của Trp, M²⁵³ và M⁴²⁹ trong các dược phẩm được chọn theo bản đồ peptit

Mẫu	% Oxy hóa				
	W CDR H2	W CDR H4	W CDR H10	M ²⁵³	M ⁴²⁹
DP, 50 mg/mL, T0	0,35	0,26	0,12	4,86	0,92
DP, 50 mg/mL, 40°C, T=1M	0,63	0,26	0,31	5,85	1,10
DS, 100 mg/mL, SS, 25°C, T=1M	0,52	0,27	0,28	5,61	1,17

Lưu ý: Tất cả các dược phẩm α -PDL1 chứa 20 mM L-histidin axetat, 120mM sacaroza, 0,04% PS20, độ pH = 5,8.

Dựa trên kết quả của các nghiên cứu bào chế và phân tích thống kê này, dược phẩm dạng lỏng chứa 60 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM histidin axetat, 120 mM sacaroza, 0,04% polysorbat 20 với độ pH đích = 5,8 được chọn để nghiên cứu lâm sàng.

Liều lượng cho thử nghiệm lâm sàng sẽ được tiến hành dưới dạng liều ổn định 1200 mg α -PDL1 cho mỗi bệnh nhân. Lọ hình dạng nhỏ nạp 20mL (1200mg α -PDL1) trong lọ thủy tinh 20cc được chọn để đáp ứng profin sản phẩm mong muốn.

Các nghiên cứu làm lạnh đông/làm tan băng được tiến hành với dược phẩm được dự định chứa 60 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM L-histidin axetat, 120 mM sacaroza, và 0,02% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20 ở độ pH=5,8. Kết quả thử nghiệm sau năm chu kỳ làm lạnh đông/làm tan băng xác nhận 120 mM sacaroza bảo vệ α -PDL1 khỏi sự kết tụ do làm lạnh đông/làm tan băng (Bảng 12). Độ ổn định thời gian dài tương tự của dược phẩm dạng lỏng được dự định cho thấy rằng dược phẩm này ổn định trong 6 tháng ở 2-8°C (Bảng 13). Đang tiến hành theo dõi liên tục trong 36 tháng đối với dược phẩm này. Dược phẩm đích và các khoảng nghiên cứu được thử nghiệm đối với dược chất và dược phẩm chứa α -PDL1 được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 12. Dữ liệu về độ ổn định khi làm lạnh đông/làm tan bằng đại diện đối với mẻ phát triển được chất α -PDL1

Số chu kỳ làm lạnh đông/làm tan bằng	CAC	Nồng độ (mg/mL)	Độ pH	ICIEF			SE-HPLC			CE SDS NGS (không khử)			Hiệu lực (% hoạt tính đặc hiệu)
				Vùng axit (% diện tích)	Đỉnh chính (% diện tích)	Vùng bazơ (% diện tích)	Tổng số dạng HMW (% diện tích)	Monome (% diện tích)	Tổng dạng LMW (% diện tích)	Tổng số đỉnh trước (% CPA)	Đỉnh chính (% CPA)	Tổng số đỉnh sau (% CPA)	
NA	CL/SY/PFVP	60,1	5,9	19	78	3	0,5	99,4	0,1	2,9	97,0	0,1	107
5	CL/SY/PFVP	62,0	5,9	20	77	3	0,5	99,4	0,1	2,7	97,1	0,2	111

Lưu ý: Mẻ PP400L-02142013 chứa 60 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM L-histidin axetat, 120 mM sacaroza, và 0,04% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20 ở độ pH = 5,8. CL = Trong; SY = vàng nhạt; PFVP = gần như không có các hạt nhìn thấy được; NA = không áp dụng, ICIEF = điện di mao quản hội tụ đẳng điện có chụp ảnh; CE-SDS = điện di mao quản natri dodecyl sulfat; HMW = phân tử lượng cao; LMW = phân tử lượng thấp.

Bảng 13. Dữ liệu về độ ổn định đối với mẻ phát triển được chất α -PDL1

Nhiệt độ (°C)	cIEF đã chụp ảnh				SE-HPLC				CE SDS NGS (không khử)				Các hạt dưới mức nhìn thấy ^a (ppmL)			
	Thời gian (ngày/tháng)	Độ pH	Nồng độ (mg/ml)	Vùng axit (%) diện tích	Đỉnh chính (%) diện tích	Vùng bazơ (%) diện tích	Tổng số dạng HMW (%) diện tích	Đỉnh monome (%) diện tích	Tổng số dạng LMW (%) diện tích	Tổng số đỉnh trước (%) CPA	Đỉnh chính (%) CPA	Tổng số đỉnh sau (%) CPA	Hiệu lực tính đặc biệt (%)	≥10um	≥25um	
NA	T=0/0	SY/CL/PFVP	5,9	59,9	18,1	78,9	2,9	0,6	99,3	0,1	2,7	97,0	0,3	99	37	30
5	30/1	SY/CL/PFVP	5,9	59,9	18,3	78,6	3,1	0,6	99,3	0,1	2,7	96,9	0,4	NT	26	2
5	61/2	SY/CL/PFVP	5,9	61,7	18,4	78,9	2,7	0,7	99,3	0,1	2,8	96,9	0,4	NT	3	0
5	91/3	SY/CL/PFVP	5,9	61,7	17,1	80,1	2,8	0,7	99,2	0,1	2,7	97,0	0,4	102	18	3
5	183/6	SY/CL/PFVP	5,9	60,8	18,4	78,6	3,0	0,7	99,2	0,1	3,1	96,5	0,4	101	3	0

Mẻ PP400L-02142013-DP chứa 60 mg/mL α -PDL1 trong 20 mM L-histidin axetat, 120 mM sacaroza, và 0,04% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20 ở độ pH = 5,8. Na = không áp dụng; CAC = màu sắc, biểu hiện, và độ trong; SY = vàng nhạt, CL=trong, PFVP = gần như không có các hạt nhìn thấy được; HMW=phân tử lượng cao; LMW=phân tử lượng thấp; ICIEF = điện di mao quản hội tụ đẳng điện có chụp ảnh; CE-SDS = điện di mao quản natri dodecyl sulfat; Nt=không thử nghiệm.

Bảng 14. Dược phẩm đích và các khoảng nghiên cứu được thử nghiệm đối với dược chất và dược phẩm chứa α -PDL1

Thông số	Đích	Khoảng trong dược phẩm được thử nghiệm
Nồng độ α -PDL1	60 mg/mL	40–120 mg/mL
Nồng độ L-histidin axetat	20 mM	20 mM
Độ pH dung dịch	5,8	5,0–6,0
Nồng độ sacaroza	120 mM	0-240 mM
Nồng độ polysorbat 20 (khối lượng/thể tích)	0,04%	0,005%–0,06% ^a

Vì dược phẩm chứa α -PDL1 (60 mg/mL) sẽ được sử dụng bằng cách truyền sau khi pha loãng trong dung dịch natri clorua đẳng trương (NaCl 0,9%), độ tương thích và độ ổn định của thành phần hoạt tính được thử nghiệm trong các điều kiện bảo chế và sử dụng được tái tạo sau: 1) Dịch pha loãng dược phẩm chứa α -PDL1 trong túi truyền chứa NaCl 0,9% nằm trong khoảng từ 2,4 đến 9,6 mg/ml (nồng độ danh nghĩa sau khi pha loãng) để bao gồm khoảng liều trong thử nghiệm lâm sàng; 2) Tiếp xúc trong thời gian ngắn với các túi truyền chứa dung dịch natri clorua đẳng trương (vật liệu bề mặt tiếp xúc của sản phẩm túi chứa PVC hoặc Polyolefin); 3) Sử dụng các đường truyền IV (bề mặt tiếp xúc của sản phẩm là PVC hoặc Polyolefin); và 4) Sử dụng bộ lọc 0,2 μ m trong đường truyền (màng lọc PES).

Các mẫu được thử nghiệm sau 24 giờ bảo quản ở 2°C–8°C hoặc sau 24 giờ ở 30°C có tiếp xúc với ánh sáng khuếch tán. Các mẫu được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp chỉ thị độ ổn định thích hợp bao gồm: độ tinh khiết bằng SE-HPLC và ICIEF, nồng độ protein (bằng UV), hạt dưới mức nhìn thấy bằng phương pháp che ánh sáng, màu sắc, độ trong/ánh opan, và độ pH (Bảng 15).

Bảng 15. Độ ổn định của α -PDL1 được pha loãng và bảo quản ở 5°C hoặc 30°C trong 24 giờ trong các túi truyền NaCl 0,9% có và không có bộ lọc 0,2 μ m trong đường truyền

Mẫu	CAC	Nồng độ (mg/mL)	Độ đục A ₃₅₀	ICIEF		SE-HPLC					Hạt (số hạt/mL)	
				% có tính axit	% có tính bazơ	% HMWS	% Monome	% LMWS	Độ pH		$\geq 10\mu$ m	$\geq 25\mu$ m
2,4 mg/mL trong túi PVC, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,5	75,7	4,8	0,4	99,5	0,1	5,9	25	1
2,4 mg/mL trong túi PVC, t=5°C, 24 giờ trước khi truyền	CL, CO, PFVP	2,2	0,02	19,6	75,5	4,9	0,4	99,5	0,1	5,8	32	0
2,4 mg/mL trong túi PVC, t=30°C, 24 giờ trước khi truyền	CL, CO, PFVP	2,2	0,01	19,3	76,6	4,1	0,3	99,5	0,1	5,8	32	0
2,4 mg/mL trong túi PVC, t=5°C, 24 giờ, qua bộ truyền không có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,04	19,5	76,4	4,1	0,4	99,5	0,1	5,8	44	1
2,4 mg/mL trong túi PVC, t=5°C, 24 giờ, qua bộ truyền có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,3	76,7	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	4	0
2,4 mg/mL trong túi PVC, t=30°C, 24 giờ, qua bộ truyền không có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20,0	75,7	4,3	0,3	99,6	0,1	5,9	29	0
2,4 mg/mL trong túi PVC, t=30°C, 24 giờ, qua bộ truyền có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	2,0	0,04	19,5	76,4	4,1	0,3	99,6	0,1	6,0	5	0

Bảng 15 (tiếp): Độ ổn định của α -PDL1 được pha loãng và bảo quản ở 5°C hoặc 30°C trong 24 giờ trong các túi truyền NaCl 0,9% có và không có bộ lọc 0,2 μ m trong đường truyền

Mẫu	CAC	Nồng độ (mg/mL)	ICIEF				SE-HPLC				Hạt (ppmL)	
			Độ đục A ₃₅₀	% có tính bazơ	% đỉnh chính	% có tính axit	% HMWS	% Monome	% LMWS	Độ pH	≥10um	≥25um
2,4 mg/mL trong túi PO, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,6	77,3	4,1	0,4	99,5	0,1	6,1	5	0
2,4 mg/mL trong túi PO, t=5°C, 24 giờ trước khi truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,03	17,8	77,8	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	3	0
2,4 mg/mL trong túi PO, t=30°C, 24 giờ trước khi truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20,6	75,3	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	8	0
2,4 mg/mL trong túi PO, t=5°C, 24 giờ, qua bộ truyền không có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	20,5	75,3	4,2	0,4	99,5	0,1	5,9	48	0
2,4 mg/mL trong túi PO, t=5°C, 24 giờ, qua bộ truyền có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	21,0	74,8	4,3	0,4	99,5	0,1	5,9	1	0
2,4 mg/mL trong túi PO, t=30°C, 24 giờ, qua bộ truyền không có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,7	76,9	4,4	0,3	99,5	0,1	5,9	22	0
2,4 mg/mL trong túi PO, t=30°C, 24 giờ, qua bộ truyền có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	21,2	73,9	4,9	0,4	99,5	0,1	6,0	0	0

CO = không màu, CL = trong, PFVP = gần như không có các hạt nhìn thấy được, A₃₅₀ = độ hấp thụ ở 350 nm

Bảng 15 (tiếp): Độ ổn định của α -PDL1 được pha loãng và bảo quản ở 5°C hoặc 30°C trong 24 giờ trong các túi truyền NaCl 0,9% có và không có bộ lọc 0,2 μ m trong đường truyền

Mẫu	CAC	Nồng độ (mg/mL)	Độ đục A ₃₅₀	ICIEF				SE-HPLC				Hạt (ppmL)	
				% có tính axit	% đỉnh chính	% có tính bazo	% HMWS	% Monome	% LMWS	% pH	Độ	$\geq 10\mu$ m	$\geq 25\mu$ m
9,6 mg/mL trong túi PVC, T0	CL, CO, PFVP	8,7	0,05	18,3	77,3	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	35	0	
9,6 mg/mL trong túi PVC, t=5°C, 24 giờ trước khi truyền	CL, CO, PFVP	8,6	0,03	19,0	76,8	4,2	0,4	9,5	0,1	5,9	6	1	
9,6 mg/mL trong túi PVC, t=30°C, 24 giờ trước khi truyền	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	18,9	77,0	4,1	0,4	99,5	0,2	5,9	10	0	
9,6 mg/mL trong túi PVC, t=5°C, 24 giờ, qua bộ truyền không có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	8,8	0,03	19,2	76,4	4,4	0,3	99,6	0,1	6,0	29	0	
9,6 mg/mL trong túi PVC, t=5°C, 24 giờ, qua bộ truyền có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	8,7	0,06	19,0	77,1	3,9	0,3	99,6	0,1	5,9	18	0	
9,6 mg/mL trong túi PVC, t=30°C, 24 giờ, qua bộ truyền không có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	8,1	0,04	19,1	76,6	4,3	0,4	99,5	0,2	6,0	8	0	
9,6 mg/mL trong túi PVC, t=30°C, 24 giờ, qua bộ truyền có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	8,8	0,04	19,6	76,4	4,0	0,3	99,6	0,1	5,9	19	2	

Bảng 15 (tiếp): Độ ổn định của α -PDL1 được pha loãng và bảo quản ở 5°C hoặc 30°C trong 24 giờ trong các túi truyền NaCl 0,9% có và không có bộ lọc 0,2 μ m trong đường truyền

Mẫu	CAC	Nồng độ (mg/mL)	ICIEF				SE-HPLC				Hạt (số hạt/mL)	
			% có tính bazơ	% đỉnh chính	% có tính axit	% có tính bazơ	% HMWS	% Monome	% LMWS	% Độ pH	$\geq 10\mu$ m	$\geq 25\mu$ m
9,6 mg/mL trong túi PO, T0	CL, CO, PFVP	8,4	0,03	18,6	78,0	3,4	0,4	99,5	0,1	5,8	33	2
9,6 mg/mL trong túi PO, t=5°C, 24 giờ trước khi truyền	CL, CO, PFVP	8,6	0,04	19,2	76,4	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	32	0
9,6 mg/mL trong túi PO, t=30°C, 24 giờ trước khi truyền	CL, CO, PFVP	8,7	0,04	19,3	76,7	4,0	0,4	99,5	0,1	5,9	18	0
9,6 mg/mL trong túi PO, t=5°C, 24 giờ, qua bộ truyền không có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	19,8	75,8	4,5	0,4	99,5	0,1	5,9	38	1
9,6 mg/mL trong túi PO, t=5°C, 24 giờ, qua bộ truyền có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	8,2	0,04	18,6	77,2	4,3	0,3	99,5	0,1	5,8	8	0
9,6 mg/mL trong túi PO, t=30°C, 24 giờ, qua bộ truyền không có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	8,5	0,03	19,4	76,0	4,6	0,4	99,5	0,1	5,9	48	7
9,6 mg/mL trong túi PO, t=30°C, 24 giờ, qua bộ truyền có bộ lọc trong đường truyền	CL, CO, PFVP	8,0	0,05	19,7	76,1	4,2	0,3	99,5	0,1	5,8	10	0

CO = không màu, CL = trong, PFVP = gần như không có các hạt nhìn thấy được, A₃₅₀ = độ hấp thụ ở 350 nm

Bảng 16. Độ ổn định khi lắc của α -PDL1 được pha loãng trong các túi truyền NaCl 0,9% ở 5°C trong không quá 6 giờ

Mẫu	CAC	Nồng độ (mg/mL)	ICIEF				SE-HPLC				Hạt (số hạt/mL)	
			Độ đục A_{350}	% có tính axit	% đỉnh chính	% có tính bazo	HMWS %	% Monome	% LMWS	Độ pH	$\geq 10\mu m$	$\geq 25\mu m$
2,4 mg/mL trong túi PO, T0	CL, CO, PFVP	2,13	0,02	17,5	79,1	3,4	0,8	99,1	0,1	5,9	3	0
2,4 mg/mL trong túi PO, lắc 2 giờ	CL, CO, PFVP	2,09	0,01	17,1	79,8	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	113	2
2,4 mg/mL trong túi PO, lắc 4 giờ	CL, CO, PFVP	2,12	0,02	17,3	79,6	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	31	0
2,4 mg/mL trong túi PO, lắc 6 giờ	CL, CO, PFVP	2,02	0,02	16,8	79,6	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	4	1
2,4 mg/mL trong túi PVC, T0	CL, CO, PFVP	2,42	0,02	17,9	78,6	3,5	0,8	99,1	0,1	5,9	6	0
2,4 mg/mL trong túi PVC, lắc 2 giờ	CL, CO, PFVP	2,04	0,02	17,6	79,2	3,2	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 mg/mL trong túi PVC, lắc 4 giờ	CL, CO, PFVP	2,10	0,03	18,5	78,0	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 mg/mL trong túi PVC, lắc 6 giờ	CL, CO, PFVP	2,05	0,01	18,6	78,2	3,3	0,8	99,1	0,1	5,9	10	0

CO = không màu, CL= trong, PFVP = gần như không có các hạt nhìn thấy được, A_{350} = độ hấp thụ ở 350 nm

Sản phẩm được thử nghiệm trong các nghiên cứu sử dụng được tái tạo như mô tả trên đây và ổn định về mặt hóa học trong các điều kiện thử nghiệm. Các túi truyền, bộ truyền, bộ lọc, và/hoặc bộ hỗ trợ sử dụng IV bao gồm các vật liệu tiếp xúc với sản phẩm khác nhau và được bổ sung sau khi kiểm tra chất lượng thành công.

Ngoài độ ổn định tĩnh, nghiên cứu lắc túi IV được thực hiện với α -PDL1 được bảo chế trong 20mM histidin axetat, 120mM sacaroza, độ pH =5,8 với 0,02% PS20, mà có khả năng là mức PS20 thấp nhất mà có thể quan sát được trong dược phẩm trong thời hạn bảo quản. Tiến hành lắc ở 2-8°C bằng máy lắc theo quỹ đạo ở tốc độ 100 vòng/phút. Dữ liệu cho thấy rằng với 0,02% PS20 trong dược phẩm, α -PDL1 ổn định khi lắc ở 5°C sau khi pha loãng trong các túi IV (Bảng 16).

Trình tự của kháng thể được sử dụng trong các ví dụ

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ α -PDL1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO:7)

Vùng biến đổi của chuỗi nặng α -PDL1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAW
ISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGG
FDYWGQGTLLTVSSASTK (SEQ ID NO:8)

Chuỗi nhẹ đầy đủ α -PDL1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:9)

Chuỗi nặng đầy đủ α -PDL1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAW
ISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGG

FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:10)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm dạng nước ổn định, trong đó dược phẩm này chứa kháng thể đơn dòng kháng PDL1 với nồng độ từ 40 mg/ml đến 125 mg/ml, histidin axetat hoặc natri axetat với nồng độ từ 15 mM đến 25 mM, sacaroza với nồng độ từ 60 mM đến 240 mM, polysorbat với nồng độ từ 0,005% (khối lượng/thể tích) đến 0,06% (khối lượng/thể tích), và độ pH từ 5,0 đến 6,3; trong đó kháng thể đơn dòng này chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:7, và vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:32; và trong đó kháng thể đơn dòng này là kháng thể IgG1 được làm tương thích với người.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng có trong dược phẩm với lượng từ 40 mg/ml đến 80 mg/ml, từ 54 mg/ml đến 66 mg/ml, từ 60 mg/ml đến 125 mg/ml, 60 mg/ml hoặc 125 mg/ml.
3. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó histidin axetat hoặc natri axetat có mặt với nồng độ từ 17 mM đến 22 mM hoặc 20mM.
4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó sacaroza có trong dược phẩm với lượng từ 60 mM đến 180 mM hoặc 120 mM.
5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dược phẩm này có độ pH từ 5,5 đến 6,1, độ pH = 5,5 hoặc độ pH = 5,8.
6. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó polysorbat trong dược phẩm này là polysorbat 20.
7. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polysorbat có trong dược phẩm này với lượng từ 0,02% đến 0,04%.
8. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể đơn dòng có trong dược phẩm này với lượng 60 mg/ml, sacaroza có trong dược phẩm với lượng 120 mM, và độ pH = 5,8;
kháng thể đơn dòng có trong dược phẩm này với lượng 125 mg/ml, sacaroza có trong dược phẩm này với lượng 240 mM, và độ pH = 5,5;

kháng thể đơn dòng có mặt với lượng 60 mg/mL, histidin axetat có mặt với nồng độ 20 mM, sacaroza có mặt với nồng độ 120 mM, và polysorbat là polysorbat 20 với nồng độ 0,04% (khối lượng/thể tích), và dược phẩm này có độ pH = 5,8; hoặc

kháng thể đơn dòng có mặt với lượng 125 mg/mL, histidin axetat có mặt với nồng độ 20 mM, sacaroza có mặt với nồng độ 240 mM, và polysorbat là polysorbat 20 với nồng độ 0,02%, và dược phẩm này có độ pH = 5,5.

9. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể đơn dòng không được đông khô trước.

10. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó kháng thể đơn dòng chứa:

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:9, và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:10.

11. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể đơn dòng được bảo quản trong lọ thủy tinh hoặc đồ chứa bằng hợp kim, tùy ý trong đó hợp kim là thép không gỉ 316L hoặc hợp kim hastelloy.

12. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó dược phẩm này ổn định ở 2-8°C trong ít nhất 6 tháng, ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng hoặc ít nhất 24 tháng.

13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó kháng thể trong dược phẩm này giữ được ít nhất 80% hoạt tính sinh học của nó sau khi bảo quản.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó hoạt tính sinh học được đo bằng khả năng liên kết của kháng thể với PD-L1.

15. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó dược phẩm này vô trùng.

16. Vật phẩm sản xuất bao gồm đồ chứa đựng dược phẩm dạng nước ổn định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

17. Vật phẩm theo điểm 16, trong đó đồ chứa là lọ thủy tinh hoặc đồ chứa bằng hợp kim, tùy ý trong đó hợp kim là thép không gỉ 316L hoặc hợp kim hastelloy.

18. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm phép thế N297A hoặc D265A/N297A trong vùng hằng định, việc đánh số gốc là theo chỉ số EU như trong Kabat.

FIG. 1A

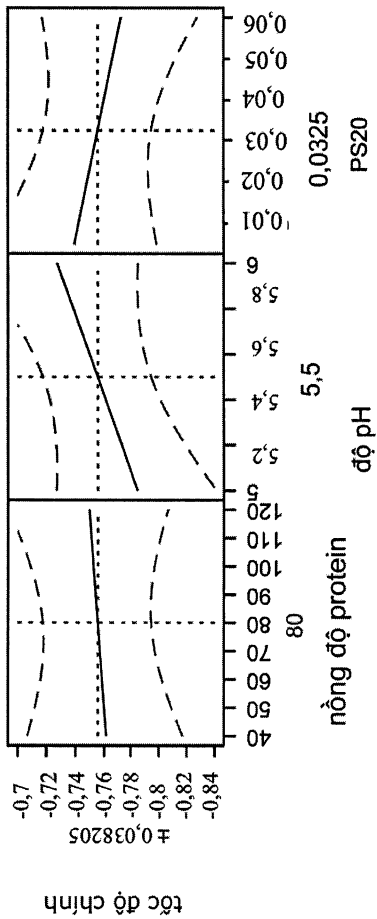


FIG. 1B

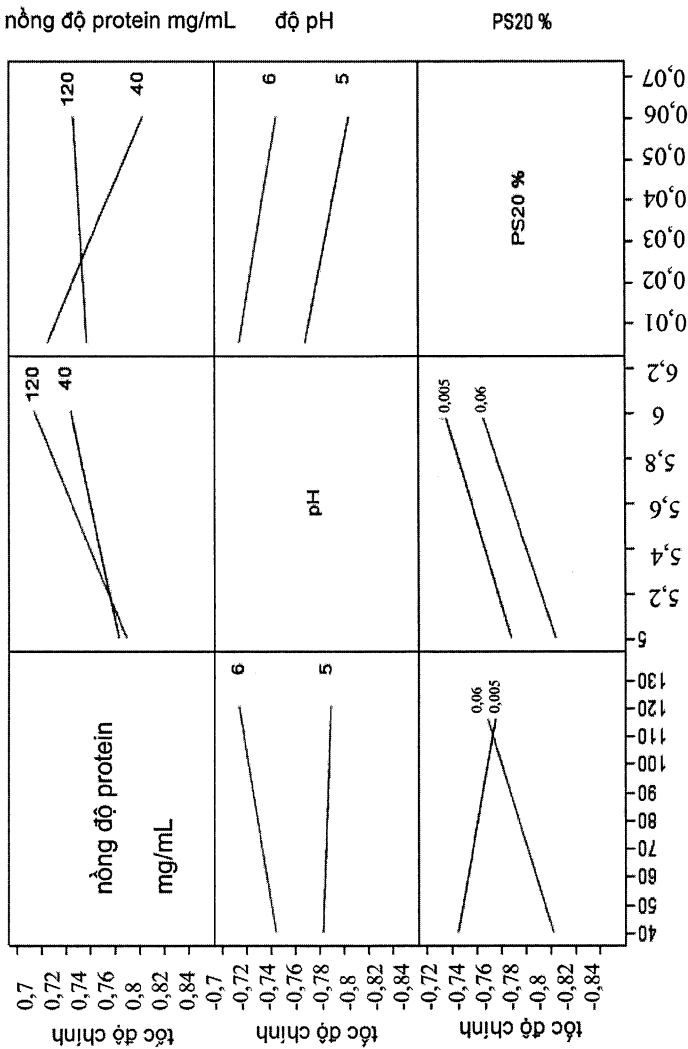


FIG. 2A

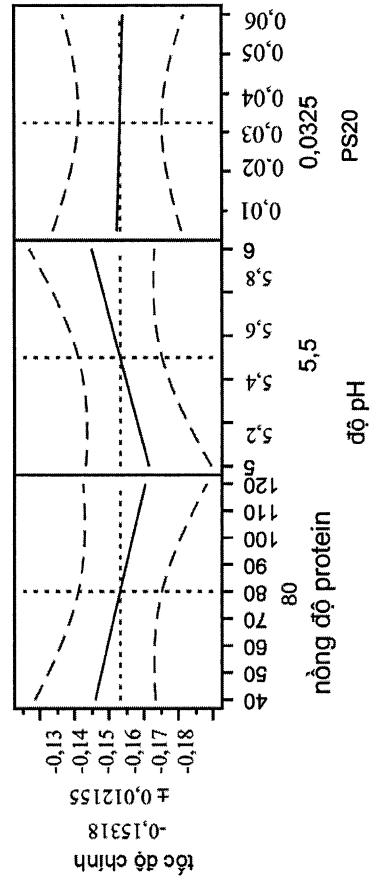


FIG. 2B

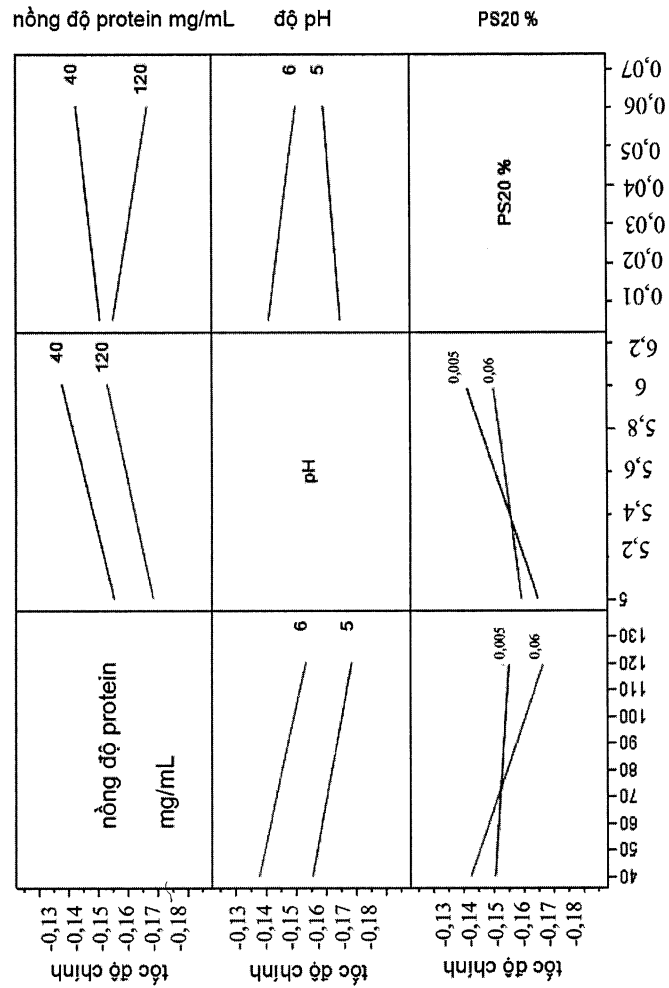


FIG. 3A

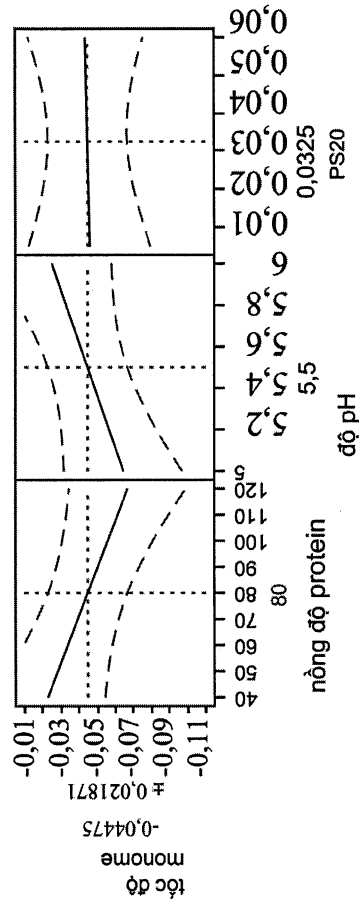


FIG. 3B

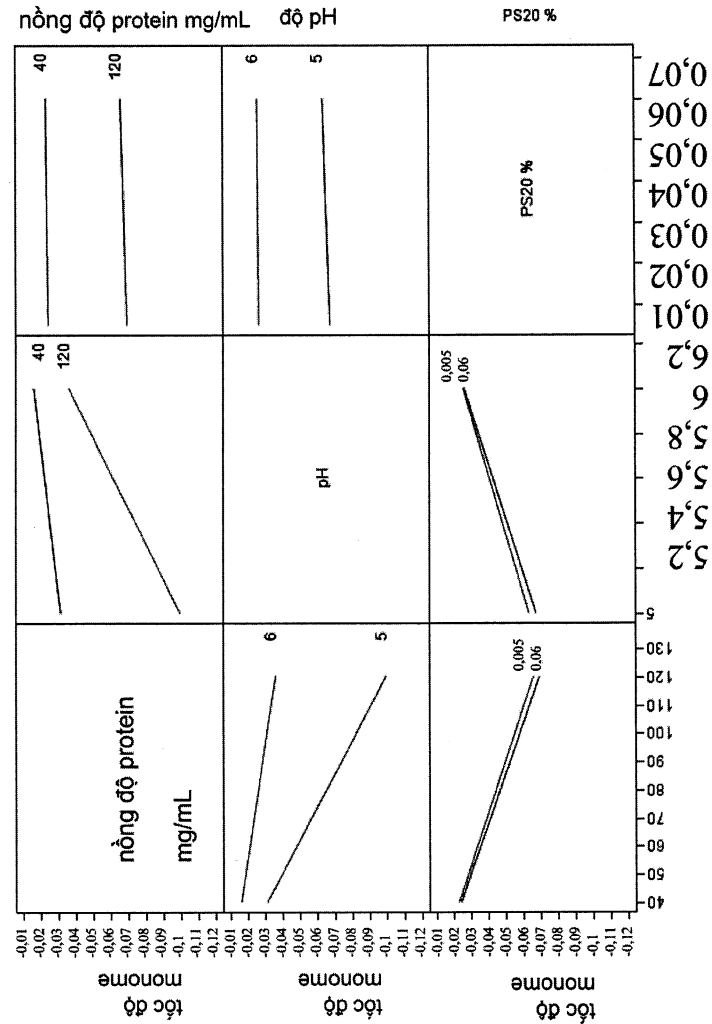


FIG. 4A

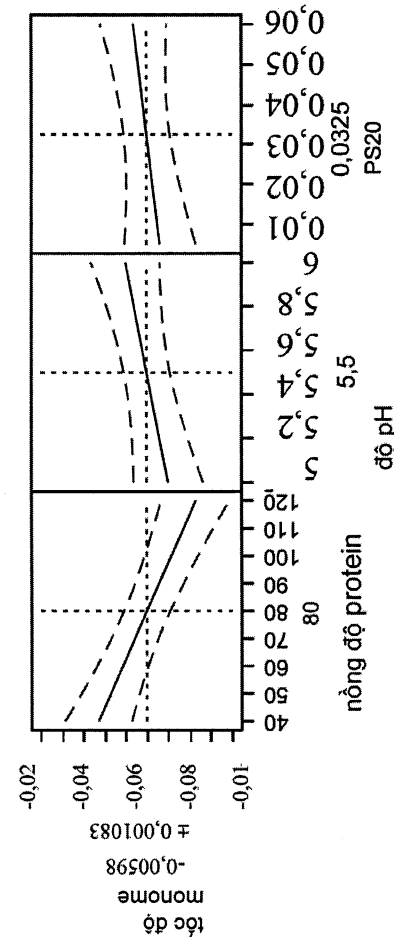


FIG. 4B

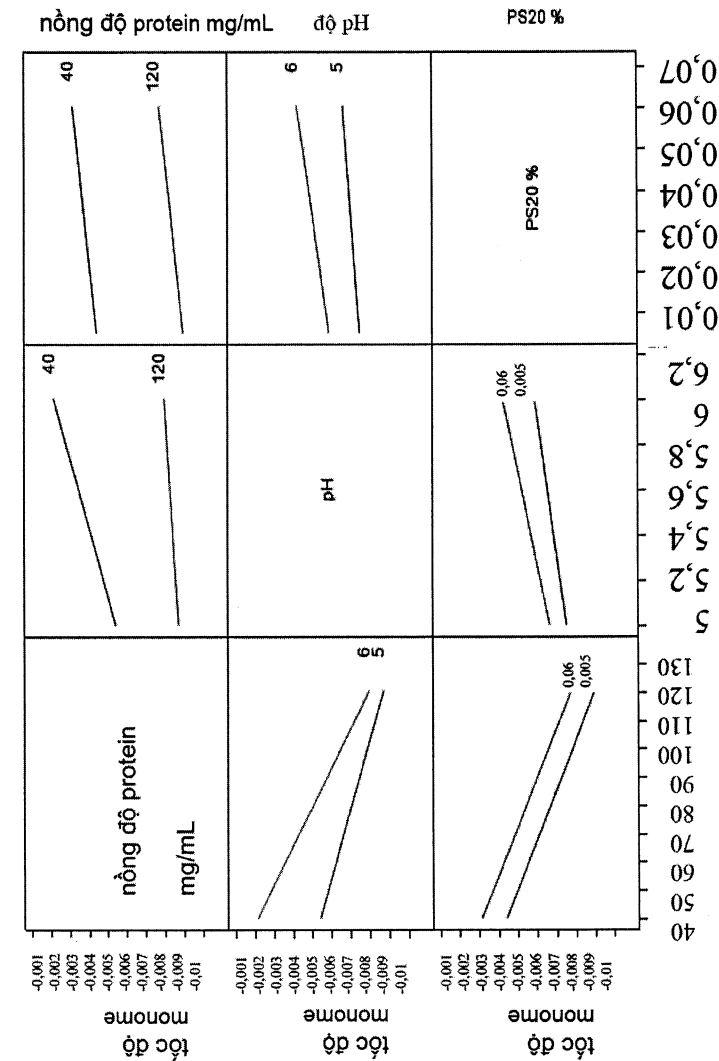


FIG. 5

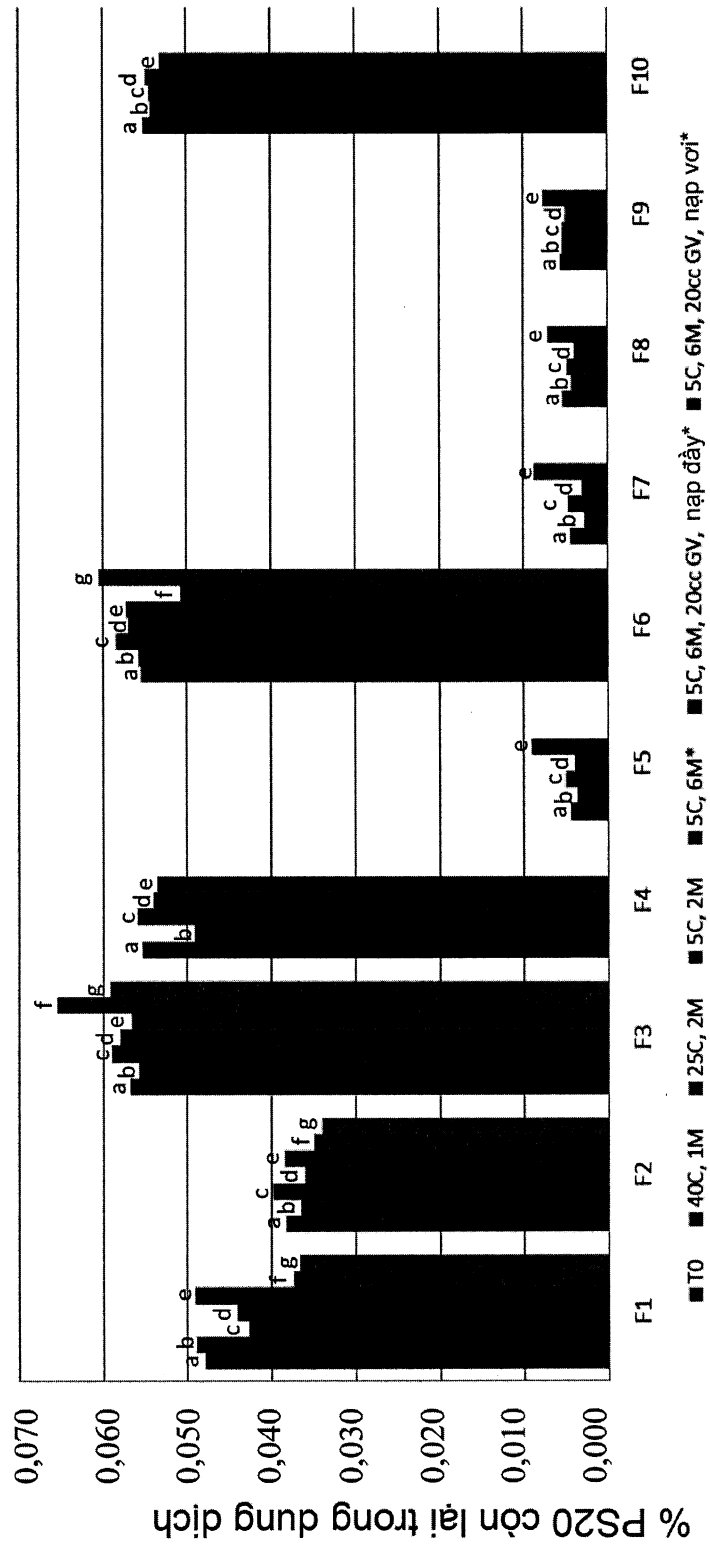


FIG. 6A

% monome ở -20oC (trong GV)

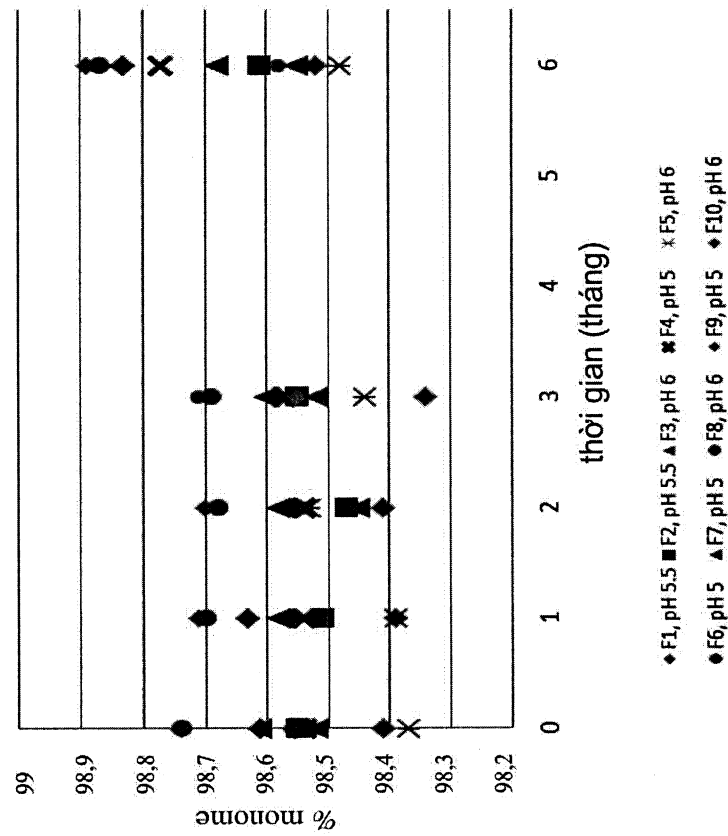


FIG. 6B

% monome ở 5oC (trong GV)

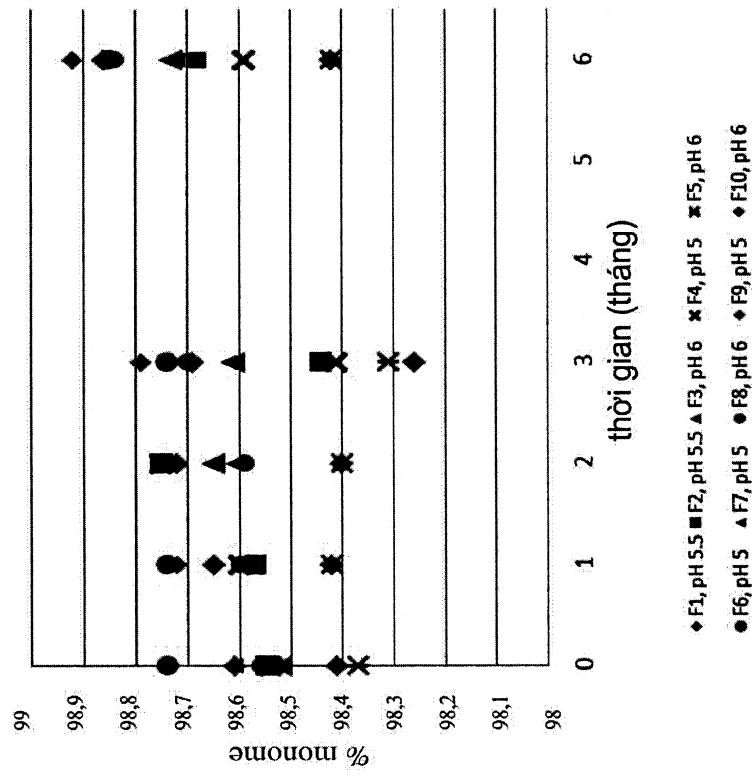


FIG. 6C

% đỉnh chính ở -20oC (trong GV)

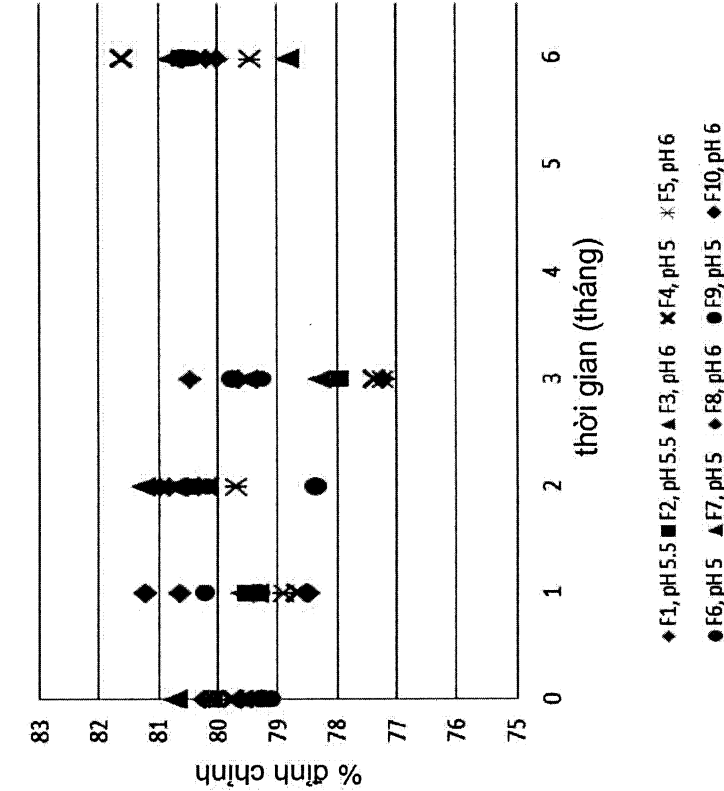


FIG. 6D

% đỉnh chính ở 5oC (trong GV)

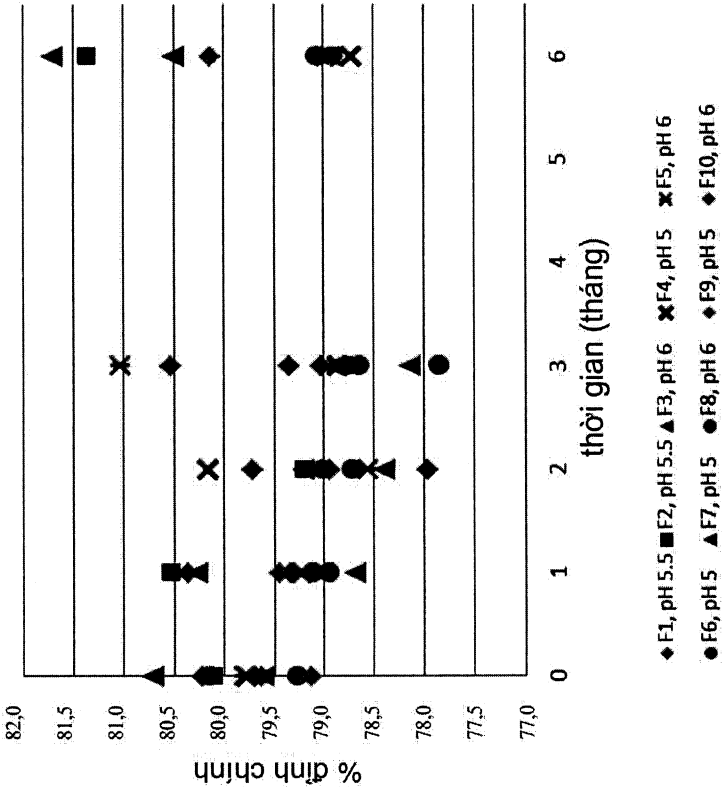


FIG. 7A

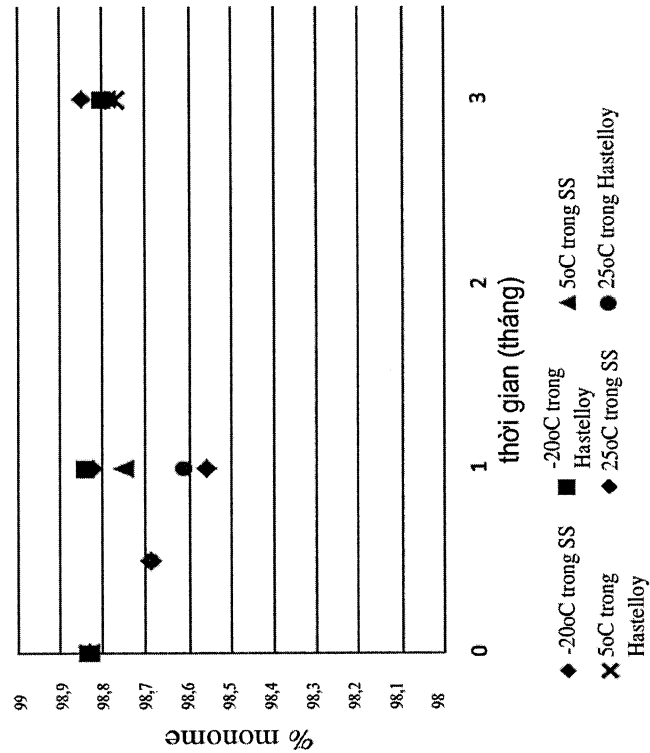


FIG. 7B

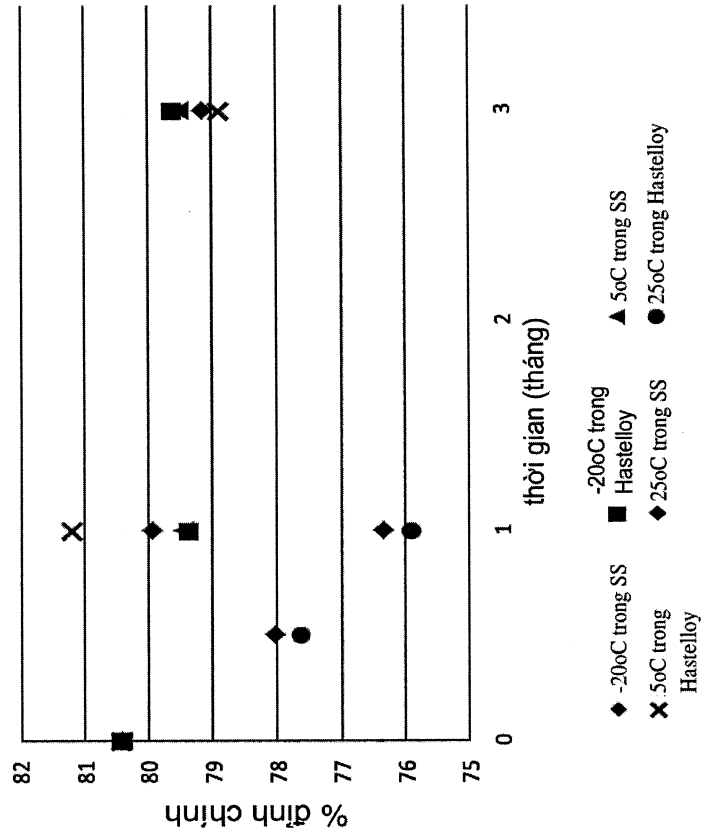


FIG. 8A

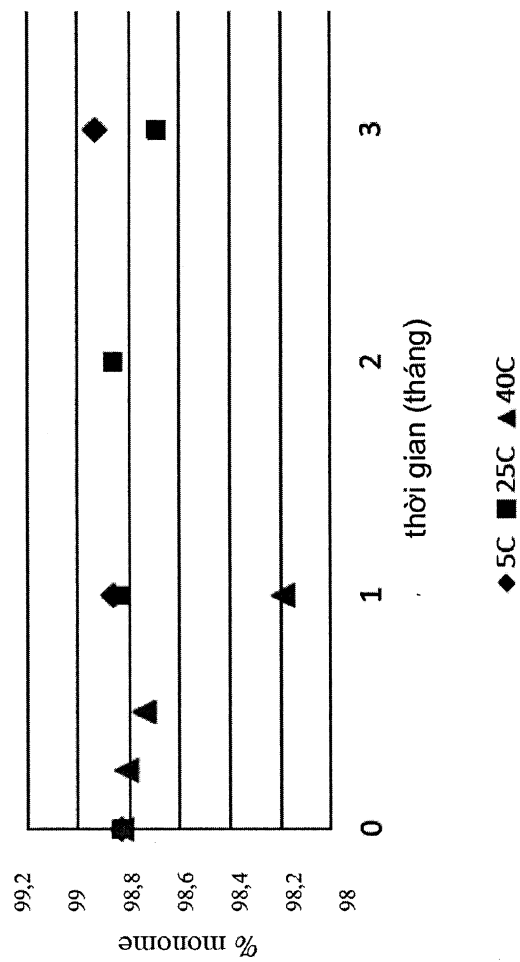


FIG. 8B

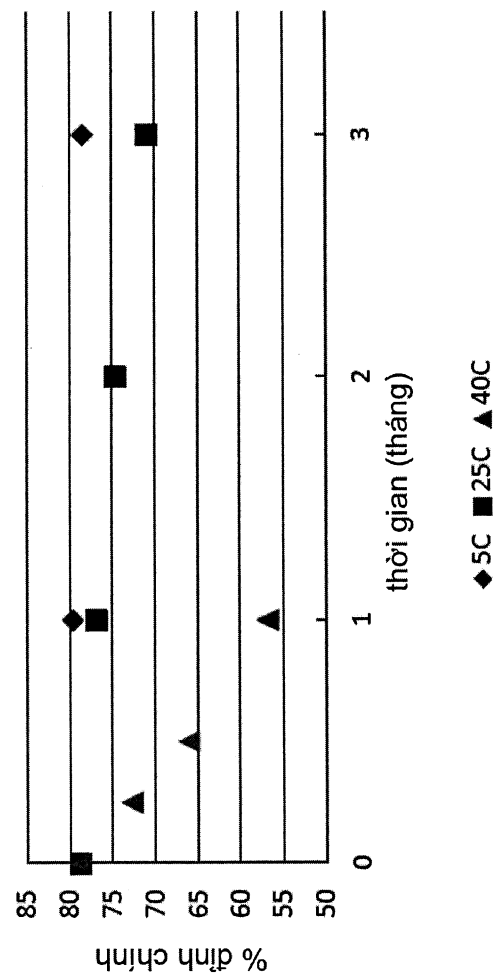


FIG. 9A

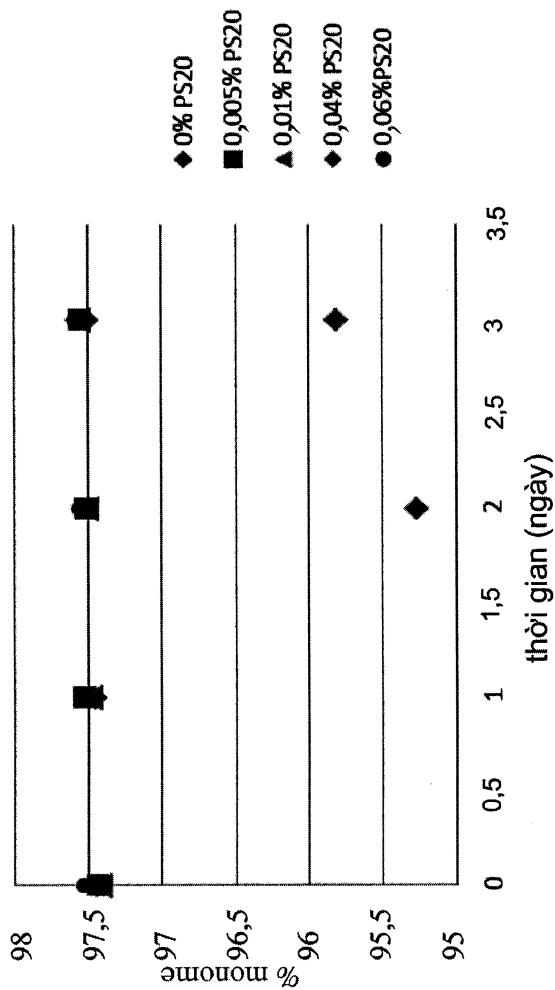


FIG. 9B

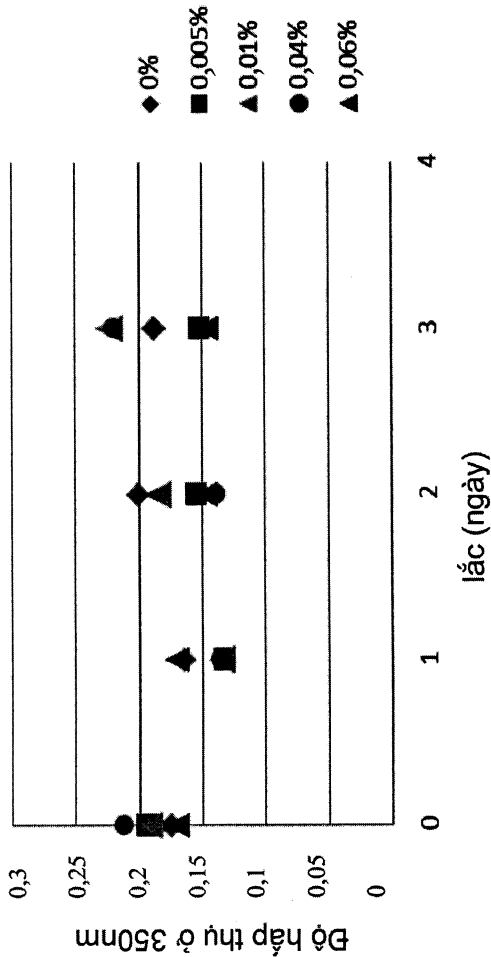


FIG. 10

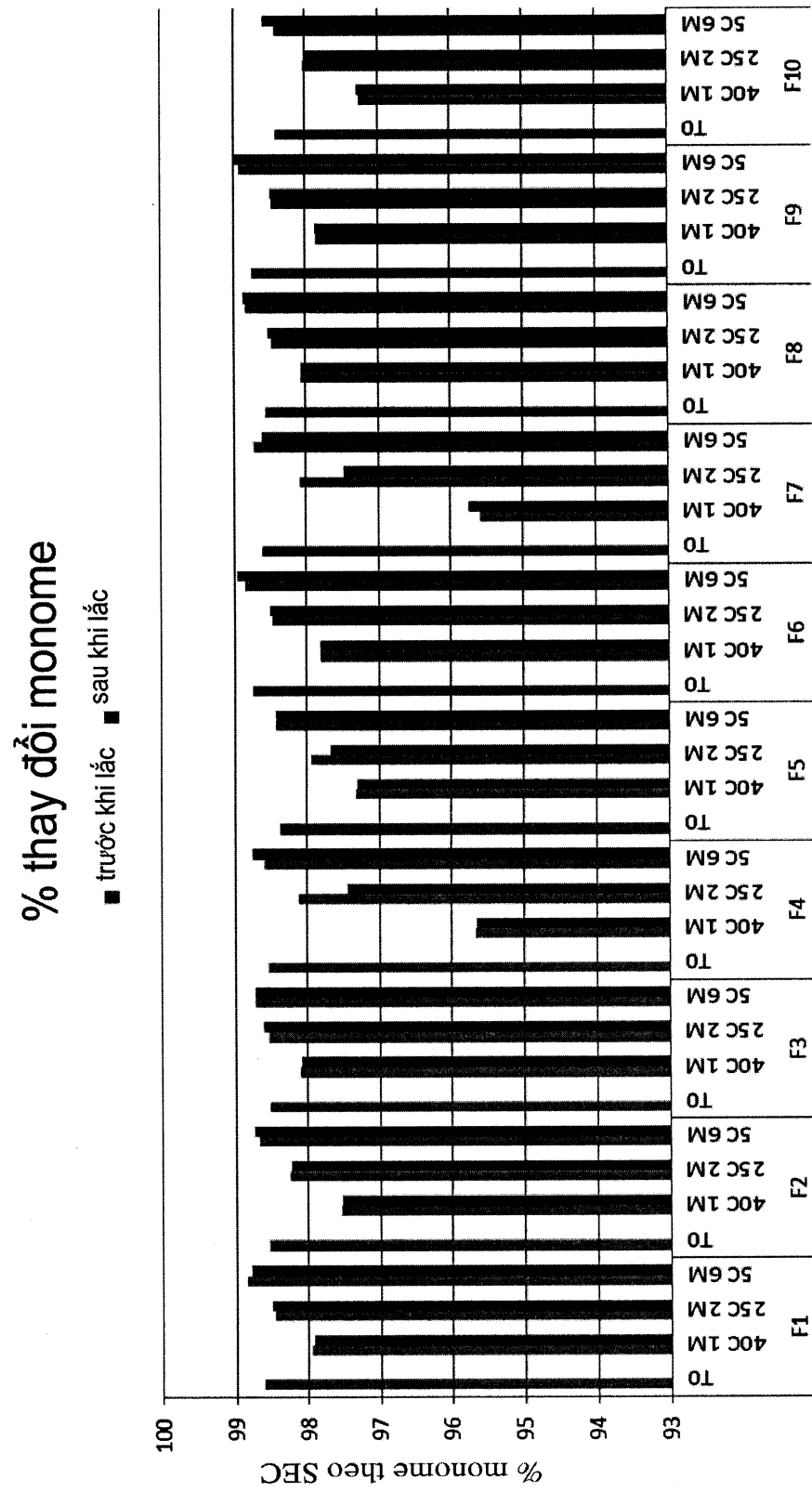


FIG. 11A

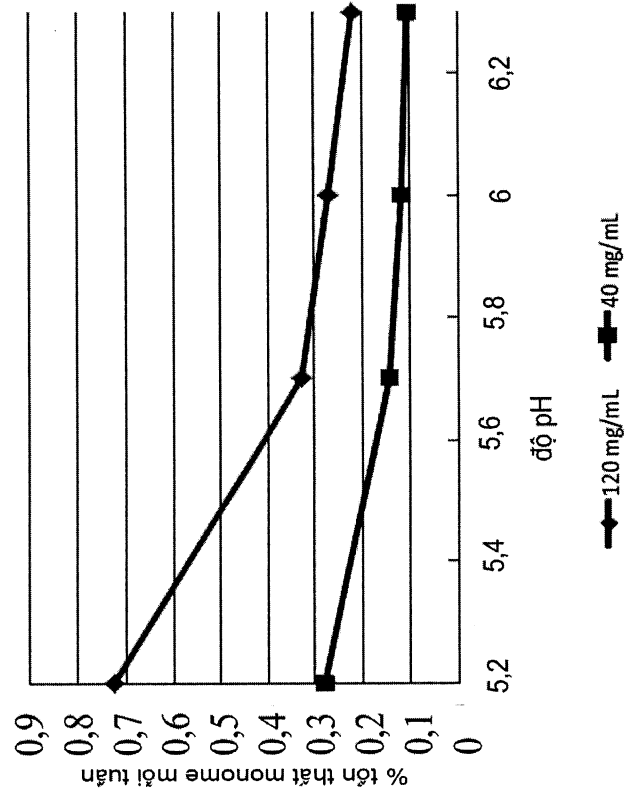
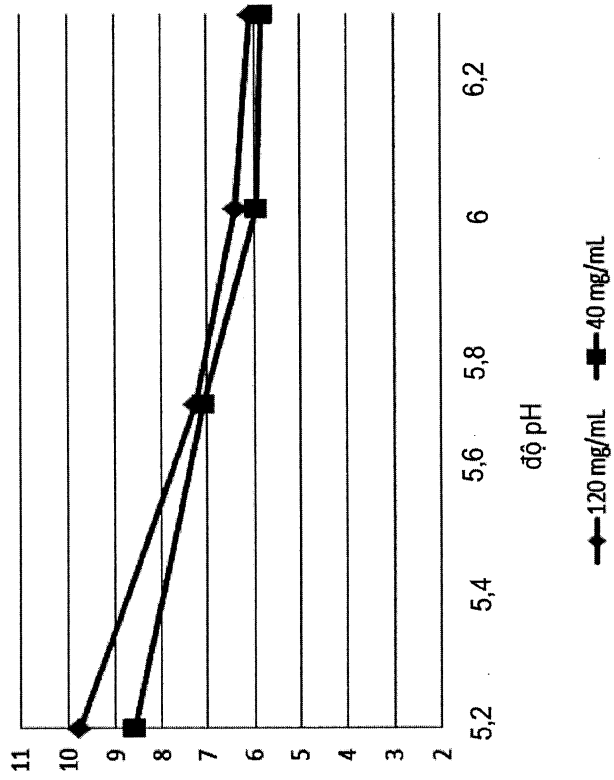


FIG. 11B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Genentech, Inc.

<120> DUỐC PHẨM DẠNG NƯỚC CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG PHỐI TỬ CHẾT THEO CHƯƠNG TRÌNH 1 (PDL1) VÀ VẬT PHẨM SẢN XUẤT CHỨA DUỐC PHẨM NÀY

<130> 146392022040

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 61/883,953

<151> 2013-09-27

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
1				5		

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala	Thr
1				5				

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8
 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 Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120

<210> 9
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9
 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 Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 10
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

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

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 6
 <223> Xaa = D hoặc G

<400> 11
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
 1 5 10

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 4
 <223> Xaa = S hoặc L

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 10
 <223> Xaa = T hoặc S

<400> 12
 Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

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
20 25

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

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

<210> 16

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 5
 <223> Xaa = D hoặc V

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 6
 <223> Xaa = V hoặc I

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 7
 <223> Xaa = S hoặc N

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 9
 <223> Xaa = A hoặc F

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 10
 <223> Xaa = V hoặc L

<400> 18
 Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
 1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 4
 <223> Xaa = F hoặc T

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 6
 <223> Xaa = Y hoặc A

<400> 19
 Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 3
 <223> Xaa = Y, G, F, hoặc S

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 4
 <223> Xaa = L, Y, F hoặc W

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 5
 <223> Xaa = Y, N, A, T, G, F hoặc I

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 6
 <223> Xaa = H, V, P, T hoặc I

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> 8
 <223> Xaa = A, W, R, P hoặc T

<400> 20
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21
 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> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 23

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	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> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

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

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 25

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ser	Trp	Ile	His
1				5					10

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26

Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5					10					15	
Lys	Gly														

<210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 27
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 28
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 29
 Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 30
 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 Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 31
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 31
 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 Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 32
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 32
 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 Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 33

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

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 34

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> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 35

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

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36

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