



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

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

(11)



1-0049988

(51)^{2020.01} C07K 16/24

(13) B

(21) 1-2020-02009

(22) 11/09/2018

(86) PCT/EP2018/074522 11/09/2018

(87) WO2019/057564 28/03/2019

(30) 17191989.7 19/09/2017 EP

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/12/2020 393A

(73) TILLOTTS PHARMA AG (CH)

Baslerstrasse 15, 4310 Rheinfelden, Switzerland

(72) FURRER, Esther Maria (CH); Jan Terje Andersen (NO); Inger Sandlie (NO); Stian Foss (NO).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) KHÁNG THỂ CHỨA MIỀN LIÊN KẾT TNFA VÀ VỊ TRÍ LIÊN KẾT FCRN VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2020-02009

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết với $\text{TNF}\alpha$ và có sự liên kết với FcRn được cải biến và được phẩm chứa kháng thể này. Kháng thể theo sáng chế có chức năng hiệu ứng và/hoặc các đặc tính dược động học tốt. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp cải thiện sự vận chuyển xuyên bào của kháng thể kháng lại $\text{TNF}\alpha$ và phương pháp kéo dài thời gian bán hủy trong huyết tương của kháng thể kháng lại $\text{TNF}\alpha$.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể được cải biến có chức năng hiệu ứng được biến đổi và/hoặc các đặc tính được động học được biến đổi. Các kháng thể này hữu ích trong việc điều trị triệu chứng các rối loạn khác nhau, cụ thể là các tình trạng viêm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng thể đơn dòng có tầm quan trọng ngày càng gia tăng làm chất phản ứng điều trị trong y học lâm sàng trong 20 năm qua. Trong nhiều năm, nỗ lực để cải thiện kháng thể tập trung vào việc làm giảm tính sinh miễn dịch tiềm năng của chúng, tạo ra các kháng thể được làm giống người hoặc thậm chí hoàn toàn là kháng thể của người. Phương pháp khác nhằm tối ưu hóa kháng thể bằng cách cải thiện chức năng hiệu ứng của chúng. Trong khi các hiệu quả trực tiếp được trung gian bởi vùng liên kết kháng nguyên biến đổi của kháng thể, các hiệu quả gián tiếp được trung gian bởi vùng Fc ổn định. Các nỗ lực để cải thiện chức năng hiệu ứng chủ yếu tập trung vào việc điều biến vùng Fc. Ngoài ra, sự cải thiện thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể điều trị là điều mong muốn để có thể làm giảm lượng kháng thể cần thiết, và có thể làm tăng tính thuận tiện của chúng cho các bệnh nhân bằng cách kéo dài khoảng cách thời gian điều trị.

Đối với các ứng dụng điều trị, globulin miễn dịch G (IgG) thuộc về nhóm lựa chọn được ưu tiên do các lý do sau; các IgG dễ tinh sạch, tương đối ổn định khi bảo quản, có thể được dùng trong tĩnh mạch, có thời gian bán hủy sinh học *in vivo* kéo dài và có thể tham gia vào nhiều chức năng hiệu ứng sinh học như sự hoạt hóa tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity: CDC) và sự huy động tế bào hiệu ứng bằng các tương tác Fc-thụ thể khác nhau (tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)). Trong số năm nhóm globulin miễn dịch, IgG có thời gian bán hủy sinh học dài nhất do sự tương tác đặc biệt có nó với thụ thể tái sử dụng IgG, thụ thể Fc sơ sinh (FcRn). Một trong số các chức năng đã biết của thụ thể này là để giải cứu IgG khỏi sự thoái biến có xúc tác. Cấu trúc đồng tinh thể FcRn-Fc được giải quyết đã chỉ ra rằng sự tương tác với Fc xuất

hiện ở vùng bản lề- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ của IgG. Sự tương tác này xuất hiện theo cách phụ thuộc chặt chẽ vào pH ở độ pH có tính axit từ 6,0 đến 6,5 trong các nội thể. Các phân tử IgG đã liên kết được tái sử dụng trở lại bề mặt tế bào, ở đó chúng được giải phóng ở pH sinh lý là 7,4 vào hệ tuần hoàn, trong khi các phân tử IgG không tạo phức được định sẵn để thoái biến trong tiêu thể. Sự tái sử dụng này là cơ chế làm cho thời gian bán hủy của IgG được kéo dài; do đó sự điều biến tương tác FcRn-IgG sẽ cho phép kiểm soát đặc hiệu thời gian bán hủy trong huyết thanh của globulin miễn dịch gama và protein dung hợp Fc.

Tùy thuộc vào lĩnh vực sử dụng, có thể cần làm tăng hoặc giảm thời gian lưu trú trong huyết thanh của IgG. Để sử dụng trong điều trị, cần có thời gian bán hủy dài hơn với liều nhỏ hơn và số lần tiêm cần thiết ít hơn. Một số phương pháp làm tăng thời gian bán hủy đã được đánh giá bao gồm sử dụng polyetylen glycol (PEG), sự tạo ra protein albumin hoặc protein dung hợp Fc và tăng cường sự tương tác FcRn-IgG. Các được phẩm PEGyl hóa đã được sử dụng trong lâm sàng từ năm 1990 và sự PEGyl hóa là công nghệ được thiết lập để kéo dài thời gian duy trì của được chất trong máu. Do albumin trong huyết thanh của người (human serum albumin: HSA) cũng được tái sử dụng bởi FcRn nhờ sự tương tác phụ thuộc độ pH, một vài protein dung hợp albumin làm gia tăng tính ổn định và thời gian bán hủy cũng đã được tạo ra. Ngoài ra, các mảnh kháng thể dung hợp với albumin hoặc các miền liên kết albumin đã được chứng minh là kéo dài thời gian lưu trú trong huyết thanh trong các nghiên cứu tiền lâm sàng. Việc tạo ra các protein dung hợp Fc là chiến lược khác để làm cho các protein hoặc peptit có đặc tính tương tự với kháng thể nguyên vẹn.

Sự cải biến vùng Fc đã nghiên cứu được tóm tắt trong tài liệu Saxena (2016) *Frontiers in Immunology*, Vol. 7, Article 580.

Vẫn có nhu cầu liên tục về kháng thể có chức năng hiệu ứng và/hoặc đặc tính được động học được cải thiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng một số đột biến đặc hiệu trong vùng Fc của kháng thể làm tăng đáng kể ái lực của kháng thể này với FcRn ở pH 6, trong khi ái lực ở pH 7,4 vẫn thấp. Các kháng thể có các đột biến này được mong đợi là có đặc tính được động học được cải thiện. Ngoài ra, các kháng thể này có chức năng hiệu ứng vượt trội so với các kháng thể đã biết như infliximab (IFX).

Do đó, sáng chế đề cập đến đối tượng được xác định trong các mục từ [1] đến [88] sau đây:

[1] Kháng thể chứa miền liên kết $\text{TNF}\alpha$ và vị trí liên kết FcRn, có ái lực cao với FcRn của người ở pH 6, ái lực cao này được đặc trưng bởi hằng số cân bằng phân ly (K_D) nhỏ hơn 100nM, và còn có ái lực thấp với FcRn của người ở pH 7,4, ái lực thấp này được đặc trưng bởi giá trị K_D lớn hơn 1 μ M, trong đó trình tự axit amin của kháng thể này chứa axit amin 434W.

[2] Kháng thể theo mục [1], trong đó trình tự axit amin của kháng thể này còn chứa axit amin 428E và/hoặc axit amin 311R.

[3] Kháng thể theo mục [1] hoặc [2], trong đó trình tự axit amin của kháng thể này chứa các axit amin 311R, 428E và 434W.

[4] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này thu được bằng cách thế tryptophan cho asparagin ở vị trí 434 (N434W), tùy ý thế axit glutamic cho methionin ở vị trí 428 (M428E), và tùy ý thế arginin cho glutamin ở vị trí 311 (Q311R).

[5] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này thu được bằng cách thế axit glutamic cho methionin ở vị trí 428 (M428E).

[6] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này thu được bằng cách thế arginin cho glutamin ở vị trí 311 (Q311R).

[7] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:13.

[8] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này có ái lực với FcRn của người ở pH 6 lớn hơn ái lực của infliximab.

[9] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó ái lực cao với FcRn của người ở pH 6 nêu trên được đặc trưng bởi hằng số phân ly K_D nhỏ hơn 50 nM.

[10] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó ái lực cao với FcRn của người ở pH 6 nêu trên được đặc trưng bởi hằng số phân ly K_D nhỏ hơn 25 nM.

[11] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó ái lực cao với FcRn của người ở pH 6 được đặc trưng bởi hằng số phân ly K_D nhỏ hơn 10 nM.

[12] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, có ái lực với FcRn của

người ở pH 6 được đặc trưng bởi hằng số phân ly K_D nằm trong khoảng từ 1 nM đến 500 nM, hoặc từ 2 nM đến 100 nM, hoặc từ 3 nM đến 50 nM, hoặc từ 4 nM đến 25 nM, hoặc từ 5 nM đến 10 nM.

[13] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó ái lực cao nêu trên, hoặc giá trị K_D nêu trên đặc trưng cho ái lực cao, được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance: SPR).

[14] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó ái lực thấp với FcRn của người ở pH 7,4 nêu trên được đặc trưng bởi giá trị K_D lớn hơn 10 μ M.

[15] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó giá trị K_D nêu trên đặc trưng cho ái lực với FcRn của người ở pH 7,4 được xác định bằng phương pháp SPR.

[16] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [15], trong đó ái lực với FcRn của người ở pH 7,4 ở mức quá thấp đến mức không thể xác định được giá trị K_D bằng phương pháp SPR.

[17] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với TNF α của người với K_D nhỏ hơn 200 pM.

[18] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với TNF α của người với K_D nhỏ hơn 100 pM.

[19] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với TNF α của người với K_D nhỏ hơn 50 pM.

[20] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với TNF α của người với K_D nhỏ hơn 25 pM.

[21] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với TNF α của người với K_D nhỏ hơn 10 pM.

[22] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên.

[23] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên với lượng lớn hơn kháng thể đối chứng chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:1 và chuỗi nặng có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:2.

[24] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên với lượng lớn hơn infliximab.

[25] Kháng thể theo mục [24], trong đó lượng kháng thể được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực lớn hơn gấp đôi lượng infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực.

[26] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [23] đến [25], trong đó lượng nêu trên dùng để chỉ khối lượng kháng thể được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực trong vòng bốn giờ.

[27] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [22] đến [26], trong đó lượng kháng thể được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực lớn hơn gấp hai lần lượng globulin miễn dịch bố mẹ được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực, trong đó globulin miễn dịch bố mẹ này khác với kháng thể nêu trên chỉ ở chỗ vùng Fc của nó chỉ có các axit amin kiểu đại.

[28] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó tỷ lệ phần trăm của kháng thể lớn hơn tỷ lệ phần trăm của infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên khi có mặt globulin miễn dịch cạnh tranh với lượng dư gấp mười lần, trong đó tỷ lệ phần trăm dùng để chỉ tổng khối lượng của các globulin miễn dịch được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực.

[29] Kháng thể theo mục [28], trong đó tỷ lệ phần trăm kháng thể được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực lớn hơn gấp ba lần tỷ lệ phần trăm globulin miễn dịch bố mẹ được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực, trong đó globulin miễn dịch bố mẹ này khác với kháng thể nêu trên chỉ ở chỗ vùng Fc của nó chỉ có các axit amin kiểu đại.

[30] Kháng thể theo mục [28] hoặc [29], trong đó tỷ lệ phần trăm kháng thể được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực lớn hơn gấp ba lần tỷ lệ phần trăm infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực.

[31] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [22] đến [30], trong đó lớp đơn tế bào phân cực nêu trên là lớp đơn của tế bào T84 phân cực.

[32] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với CD64 với K_D nhỏ hơn 100 nM, tốt hơn là nhỏ hơn 10 nM.

[33] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với CD32a(H) với K_D nhỏ hơn 10 μ M.

[34] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với CD32a(R) với K_D nhỏ hơn 10 μ M.

- [35] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với CD32b với K_D nhỏ hơn 10 μM .
- [36] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với CD16a(V) với K_D nhỏ hơn 500 nM, tốt hơn là nhỏ hơn 100 nM.
- [37] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với CD16a(F) với K_D nhỏ hơn 10 μM , tốt hơn là nhỏ hơn 1 μM .
- [38] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với CD16b(NA2) với K_D nhỏ hơn 10 μM , tốt hơn là nhỏ hơn 1 μM .
- [39] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với C1q của người với cường độ cao hơn so với infliximab.
- [40] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, có tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể của bổ thể ở thấp hơn của infliximab, tính theo nồng độ EC_{50} tương đối và/hoặc tỷ lệ chết tối đa tương đối.
- [41] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, có khả năng cảm ứng đại thực bào CD14+CD206+ ở mức bằng hoặc lớn hơn infliximab.
- [42] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào T ở mức bằng hoặc lớn hơn infliximab.
- [43] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, là kháng thể không được fucosyl hóa hoặc kháng thể có mức độ fucosyl hóa giảm.
- [44] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, bao gồm (i) miền V_L chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:3, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:4, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:5, và (ii) miền V_H chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:6, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:7, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:8.
- [45] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, chứa miền V_H có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:9 và miền V_L có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:10.
- [46] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:1 và chuỗi nặng có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:11.

[47] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [43], trong đó kháng thể này bao gồm (i) miền V_L chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:14, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:15, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:16, và (ii) miền V_H chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:17, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:18, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:19.

[48] Kháng thể theo mục [47], chứa miền V_H có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:20 và miền V_L có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:22.

[49] Kháng thể theo mục [47] hoặc [48], chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24 và chuỗi nặng có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:12.

[50] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này liên kết đặc hiệu với $TNF\alpha$ của người.

[51] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này không liên kết đặc hiệu với $TNF\beta$.

[52] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này

- (i) liên kết với $TNF\alpha$ của người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 125 pM;
- (ii) phản ứng chéo với $TNF\alpha$ của *Macaca mulatta* và với $TNF\alpha$ của *Macaca fascicularis*;
- (iii) có hiệu lực lớn hơn infliximab, như được xác định bằng thử nghiệm L929; và/hoặc
- (iv) có khả năng liên kết với $TNF\alpha_{Trime}$ của người theo hệ số tỉ lượng (kháng thể : $TNF\alpha_{Trime}$) ít nhất là 2.

[53] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với $TNF\alpha$ từ *Macaca mulatta* với K_D nhỏ hơn 1 nM.

[54] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, liên kết với $TNF\alpha$ từ *Macaca fascicularis* với K_D nhỏ hơn 1 nM.

[55] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó hiệu lực của kháng thể để ức chế sự chết tế bào theo chương trình do $TNF\alpha$ gây ra so với hiệu lực của infliximab (hiệu lực tương đối), được xác định trong thử nghiệm L929, là lớn hơn

3,5, và trong đó hiệu lực tương đối này là tỷ lệ của giá trị IC_{50} tính theo ng/ml của infliximab trong thử nghiệm L929 với giá trị IC_{50} tính theo ng/ml của kháng thể trong thử nghiệm L929.

[56] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó nhiệt độ nóng chảy của miền biến đổi của kháng thể ở dạng scFv, được xác định bằng phương pháp đo huỳnh quang quét vi sai, ít nhất là 65°C.

[57] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó nhiệt độ nóng chảy của miền biến đổi của kháng thể ở dạng scFv, được xác định bằng phương pháp đo huỳnh quang quét vi sai, ít nhất là 68°C.

[58] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó nhiệt độ nóng chảy, được xác định bằng phương pháp đo huỳnh quang quét vi sai, ít nhất là 70°C.

[59] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này có khả năng phong bế sự tương tác giữa $TNF\alpha$ của người và thụ thể TNF I (TNFRI).

[60] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này có khả năng phong bế sự tương tác giữa $TNF\alpha$ của người và thụ thể TNF II (TNFRII).

[61] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào của các tế bào đơn nhân máu ngoại vi trong phản ứng của tế bào lympho hỗn hợp.

[62] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó kháng thể này có khả năng ức chế sự tiết interleukin-1 β do LPS gây ra từ các bạch cầu đơn nhân CD14⁺.

[63] Kháng thể theo mục [62], trong đó giá trị IC_{50} để ức chế sự tiết interleukin-1 β do LPS gây ra là nhỏ hơn 1 nM.

[64] Kháng thể theo mục [63], trong đó giá trị IC_{50} để ức chế sự tiết interleukin-1 β do LPS gây ra nêu trên, tính theo mol, thấp hơn của adalimumab.

[65] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, có khả năng ức chế sự tiết $TNF\alpha$ do LPS gây ra từ các bạch cầu đơn nhân CD14⁺.

[66] Kháng thể theo mục [65], trong đó giá trị IC_{50} để ức chế sự tiết $TNF\alpha$ do LPS gây ra là nhỏ hơn 1 nM.

[67] Kháng thể theo mục [66], trong đó giá trị IC_{50} để ức chế sự tiết $TNF\alpha$ do LPS gây ra nêu trên, tính theo mol, thấp hơn của adalimumab.

[68] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, là globulin miễn dịch G

(IgG), tốt hơn là IgG1.

[69] Axit nucleic mã hóa kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên.

[70] Vector hoặc plasmit chứa axit nucleic theo mục [69].

[71] Tế bào chứa axit nucleic theo mục [69] hoặc vector hoặc plasmit theo mục [70].

[72] Phương pháp tạo ra kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [68], bao gồm bước nuôi cấy tế bào theo mục [71] trong môi trường trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa kháng thể, và thu hồi kháng thể từ các tế bào hoặc từ môi trường.

[73] Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [68] để sử dụng trong việc điều trị tình trạng viêm hoặc rối loạn liên quan đến TNF α .

[74] Kháng thể để sử dụng theo mục [73], trong đó rối loạn viêm nêu trên được chọn từ danh sách các bệnh và rối loạn được liệt kê trong phần “*Rối loạn cần được điều trị*” dưới đây.

[75] Kháng thể để sử dụng theo mục [73], trong đó rối loạn viêm nêu trên là rối loạn viêm của đường dạ dày-ruột.

[76] Kháng thể để sử dụng theo mục [75], trong đó rối loạn viêm của đường dạ dày-ruột nêu trên là bệnh viêm ruột.

[77] Kháng thể để sử dụng theo mục [75] hoặc [76], trong đó rối loạn viêm của đường dạ dày-ruột nêu trên là bệnh Crohn.

[78] Kháng thể để sử dụng theo mục [77], trong đó bệnh Crohn nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm có bệnh Crohn ở hồi tràng, ruột kết, hồi-kết tràng, và/hoặc ở phần trên riêng biệt (dạ dày, tá tràng và/hoặc hỗng tràng) và bao gồm cả đặc tính bệnh không hẹp/không co thắt, hẹp, co thắt và quanh hậu môn, cho phép sự kết hợp bất kỳ của vị trí và đặc tính bệnh của bệnh bất kỳ trong số các bệnh được đề cập trên đây.

[79] Kháng thể để sử dụng theo mục [75] hoặc [76], trong đó rối loạn viêm của đường dạ dày-ruột nêu trên là bệnh viêm loét ruột kết.

[80] Kháng thể để sử dụng theo mục [79], trong đó bệnh viêm loét ruột kết nêu trên được chọn từ nhóm gồm có bệnh viêm loét trực tràng, bệnh viêm kết trực tràng xích ma, viêm ruột kết bên trái, bệnh viêm loét ruột kết toàn bộ, và bệnh viêm túi thừa.

[81] Kháng thể để sử dụng theo mục [75] hoặc [76], trong đó rối loạn viêm của đường dạ dày-ruột nêu trên là bệnh viêm ruột kết vi thể.

[82] Kháng thể để sử dụng theo mục [73], trong đó rối loạn viêm nêu trên là bệnh

viêm khớp.

[83] Kháng thể để sử dụng theo mục [73] hoặc [82], trong đó rối loạn viêm nêu trên là bệnh viêm khớp dạng thấp.

[84] Kháng thể để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ [73] đến [83], trong đó phương pháp nêu trên bao gồm bước cho đối tượng dùng kháng thể qua đường miệng.

[85] Kháng thể để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ [73] đến [84], trong đó phương pháp nêu trên bao gồm bước sử dụng kháng thể tại chỗ.

[86] Dược phẩm chứa kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [68].

[87] Phương pháp cải thiện sự vận chuyển xuyên bào của kháng thể kháng lại TNF α , bao gồm bước đưa các đột biến thế Q311R, M428E và N434W vào trình tự axit amin của kháng thể này.

[88] Phương pháp kéo dài thời gian bán hủy trong huyết tương của kháng thể kháng lại TNF α , bao gồm bước đưa các đột biến thế Q311R, M428E và N434W vào trình tự axit amin của kháng thể này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hiệu lực của các biến thể kháng thể kháng TNF α để làm trung hòa TNF α của người trong thử nghiệm L929. Các đường cong đáp ứng liều của các biến thể kháng thể kháng TNF α và infliximab tham chiếu được thể hiện.

Fig.2 thể hiện sự vận chuyển các biến thể IgG kháng TNF α qua các tế bào T84 phân cực. Lượng biến thể kháng thể kháng TNF α và Infliximab (IFX) từ phía đỉnh đến nguồn phía đáy bên ở thời điểm 4 giờ sau khi cho thêm. Được thể hiện theo ng/cm². Thanh sai số thể hiện giá trị độ lệch chuẩn SD của từ hai đến bốn lớp đơn riêng biệt.

Fig.3 thể hiện sự vận chuyển các biến thể IgG kháng TNF α qua các tế bào T84 phân cực với sự có mặt của lượng dư IgG bệnh u tủy. Lượng các biến thể Ab kháng TNF α và IFX được vận chuyển từ phía đỉnh đến nguồn phía đáy bên với sự có mặt của IgG bệnh u tủy ở người với lượng dư gấp 10 lần ở thời điểm 4 giờ sau khi cho thêm. Được thể hiện theo ng/cm². Thanh sai số thể hiện giá trị SD của ba đến bốn lớp đơn riêng biệt.

Fig.4 thể hiện hoạt tính ADCC. Sự cảm ứng ADCC bởi các biến thể kháng thể kháng TNF α , kháng thể kiểu đại và IFX.

Fig.5 thể hiện sự liên kết với C1q của người. Sự liên kết của IFX và các biến

thể kháng thể kháng TNF α với C1q của người. Mỗi nồng độ được thử nghiệm hai lần. Thanh sai số thể hiện giá trị SD.

Fig.6 thể hiện hoạt tính CDC. Tỷ lệ phần trăm tế bào chết đối với các biến thể kháng TNF α khác nhau được so sánh với IFX. Mỗi điểm của mẫu là giá trị trung bình của 6 lần lặp lại độc lập.

Fig.7 thể hiện mức độ cảm ứng đại thực bào CD14⁺CD206⁺ bởi mỗi hợp chất so với sự cảm ứng bởi IFX. Số liệu tóm tắt là của 4 thử nghiệm độc lập. Các cột thể hiện giá trị trung bình, các thanh sai số thể hiện giá trị SEM.

Fig.8 thể hiện mức độ ức chế sự tăng sinh tế bào T bởi mỗi hợp chất so với IFX. Số liệu tóm tắt là của 3 thử nghiệm độc lập. Các cột thể hiện giá trị trung bình, các thanh sai số thể hiện giá trị SEM.

Fig.9 thể hiện dưới dạng sơ đồ quá trình tạo đột biến định hướng điểm.

Fig.10 là hình vẽ minh họa bằng sơ đồ của các dạng N-glycan chiếm ưu thế được gắn với N297 của các biến thể kháng thể kháng TNF α . Hai cấu hình N-glycan chiếm ưu thế trong nhóm các biến thể kháng thể kháng TNF α được thử nghiệm là 4GlcNac-1Fuc-3Man và 4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal trong khi đó các biến thể IgG được tạo ra với sự có mặt của 2FF, các cấu trúc có hai râu giống nhau xuất hiện ngoại trừ việc các cấu trúc này không chứa fucoza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể có khả năng liên kết với TNF α và chứa vị trí liên kết FcRn. Theo sáng chế, kháng thể chứa vị trí liên kết FcRn nếu nó có khả năng liên kết với FcRn, tốt hơn là với FcRn của người, ở pH 6. Sự liên kết với FcRn ở pH 6 có thể được xác định bằng phương pháp SPR, ví dụ, như được mô tả trong Ví dụ 4 của sáng chế. Nếu sự liên kết của kháng thể với FcRn ở pH 6 có thể được phát hiện bằng phương pháp SPR, kháng thể này có vị trí liên kết với FcRn. Kháng thể theo sáng chế có ái lực cao với FcRn của người ở pH 6, được đặc trưng bởi hằng số cân bằng phân ly (K_D) nhỏ hơn 100 nM. Kháng thể này còn có ái lực thấp với FcRn của người ở pH 7,4, được đặc trưng bởi giá trị K_D lớn hơn 1 μ M. Trình tự axit amin của kháng thể này chứa axit amin tryptophan ở vị trí 434 (theo cách đánh số EU).

Trong toàn bộ phần mô tả và bộ yêu cầu bảo hộ này, hệ thống đánh số Kabat thường được sử dụng khi đề cập đến gốc trong miền biến đổi (khoảng các gốc từ 1 đến 107 của chuỗi nhẹ và các gốc từ 1 đến 113 của chuỗi nặng) (Kabat et al., *Sequences of*

Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Các thuật ngữ “hệ thống đánh số EU” hoặc “chỉ số EU” thường được sử dụng khi đề cập đến gốc trong vùng ổn định chuỗi nặng của globulin miễn dịch (ví dụ, chỉ số EU được thông báo trong tài liệu của Kabat và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) chỉ được đưa vào ở đây để tham khảo). Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác ở đây, sự viện dẫn đến chữ số của các gốc trong miền biến đổi của kháng thể có nghĩa là việc đánh số gốc bằng hệ thống đánh số Kabat. Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác ở đây, sự viện dẫn đến chữ số của gốc trong miền ổn định của kháng thể có nghĩa là việc đánh số gốc bằng hệ thống đánh số EU (ví dụ, xem Công bố đơn quốc tế số WO 2006/073941).

Kháng thể

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng làm từ đồng nghĩa cho “globulin miễn dịch” (Ig), thuật ngữ này được định nghĩa là protein thuộc về nhóm IgG, IgM, IgE, IgA, hoặc IgD (hoặc phân lớp bất kỳ của nó), và bao gồm tất cả các kháng thể và mảnh chức năng của nó đã biết theo cách thông thường. Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ “mảnh chức năng” của kháng thể/globulin miễn dịch được định nghĩa là mảnh liên kết kháng nguyên hoặc dẫn xuất khác của kháng thể bố mẹ gần như duy trì được một hoặc nhiều đặc tính của kháng thể bố mẹ này. Thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” hoặc “miền liên kết kháng nguyên” của kháng thể/globulin miễn dịch được định nghĩa là mảnh (ví dụ, vùng biến đổi của IgG) duy trì được vùng liên kết kháng nguyên. Thuật ngữ “vùng liên kết kháng” của kháng thể thường được tìm thấy trong một hoặc nhiều vùng siêu biến của kháng thể, nghĩa là vùng CDR-1, -2, và/hoặc -3. Kháng thể theo sáng chế có thể là một phần của cấu trúc có hai hoặc nhiều chức năng.

Tốt hơn nếu kháng thể là kháng thể đơn dòng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” không chỉ giới hạn ở kháng thể được tạo ra bằng công nghệ tế bào lai. Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” để chỉ kháng thể có nguồn gốc từ một dòng vô tính, bao gồm cả dòng có nhân điển hình, có nhân nguyên thủy, hoặc thể thực khuẩn bất kỳ, và không phải phương pháp mà nó được tạo ra. Các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều loại kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này bao gồm sử dụng kỹ thuật tế bào lai, tái tổ hợp, và hiển thị phago, hoặc sự

kết hợp của chúng. (Harlow and Lane, " Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.).

Theo các phương án khác, bao gồm cả các phương án liên quan đến việc sử dụng *in vivo* của kháng thể kháng TNF α ở người, các kháng thể khảm, kháng thể được làm giống linh trưởng, kháng thể được làm giống người, hoặc kháng thể của người có thể được sử dụng. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể là kháng thể của người hoặc kháng thể được làm giống người, tốt hơn nữa là kháng thể đơn dòng của người hoặc kháng thể đơn dòng được làm giống người.

Theo phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế là globulin miễn dịch, tốt hơn là globulin miễn dịch G (IgG). Phân lớp của IgG theo sáng chế không bị giới hạn và bao gồm IgG₁, IgG₂, IgG₃, và IgG₄. Tốt hơn là IgG theo sáng chế là của phân lớp 1, 2 hoặc 4, nghĩa là nó lần lượt là phân tử IgG₁, IgG₂, hoặc IgG₄. Tốt nhất là IgG theo sáng chế là của phân lớp 1, nghĩa là nó là phân tử IgG₁.

Miễn liên kết TNF α

Không có giới hạn cụ thể về miễn liên kết TNF α của kháng thể theo sáng chế. Nó có thể có nguồn gốc từ kháng thể bất kỳ có khả năng liên kết với TNF α .

Tốt hơn là kháng thể theo sáng chế liên kết đặc hiệu với TNF α . Khi được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể "nhận biết đặc hiệu", hoặc "liên kết đặc hiệu với" TNF α của người, khi kháng thể này có thể phân biệt giữa TNF α của người và một hoặc nhiều phân tử tham chiếu. Tốt hơn là giá trị IC₅₀ để liên kết với mỗi trong số các phân tử tham chiếu lớn hơn ít nhất 1000 lần giá trị IC₅₀ để liên kết với TNF α . Ở dạng chung nhất của nó (và khi không có sự tham chiếu xác định nào được đề cập), "sự liên kết đặc hiệu" dùng để chỉ khả năng của kháng thể phân biệt giữa TNF α của người và phân tử sinh học không liên quan, như được xác định, ví dụ, theo các phương pháp thử nghiệm tính đặc hiệu đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp thẩm tách Western và thử nghiệm ELISA. Ví dụ, thử nghiệm ELISA tiêu chuẩn có thể được tiến hành. Thông thường, việc xác định tính đặc hiệu liên kết được thực hiện bằng cách sử dụng phân tử không phải phân tử sinh học tham chiếu đơn lẻ, mà là tập hợp của khoảng từ ba đến năm phân tử sinh học không liên quan, như bột sữa, BSA, transferrin hoặc phân tử tương tự. Theo một phương án, sự liên kết đặc hiệu dùng để chỉ khả năng của kháng thể phân biệt giữa TNF α của người và TNF β của người.

Kháng thể theo sáng chế bao gồm miền V_L và miền V_H . Miền V_L chứa vùng CDR1 (CDRL1), vùng CDR2 (CDRL2), vùng CDR3 (CDRL3) và vùng khung. Miền V_H chứa vùng CDR1 (CDRH1), vùng CDR2 (CDRH2), vùng CDR3 (CDRH3) và vùng khung.

Thuật ngữ “CDR” dùng để chỉ một trong sáu vùng siêu biến trong các miền biến đổi của kháng thể góp phần đáng kể vào sự liên kết kháng nguyên. Một trong số các định nghĩa được sử dụng phổ biến nhất cho sáu vùng CDR này được đề xuất bởi Kabat E. A. và các đồng tác giả (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, định nghĩa của Kabat về các vùng CDR chỉ áp dụng cho các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của miền biến đổi chuỗi nhẹ (CDR L1, CDR L2, CDR L3, hoặc L1, L2, L3), cũng như cho các vùng CDR2 và CDR3 của miền biến đổi chuỗi nặng (CDR H2, CDR H3, hoặc H2, H3). Tuy nhiên, khi được sử dụng trong bản mô tả này, vùng CDR1 của miền biến đổi chuỗi nặng (CDR H1 hoặc H1) được xác định bởi các gốc sau (theo cách đánh số Kabat): Nó bắt đầu ở vị trí 26 và kết thúc trước vị trí 36.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể theo sáng chế là kháng thể kháng $TNF\alpha$ như được bộc lộ trong tài liệu bất kỳ trong số các đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056218, PCT/EP2017/056246, PCT/EP2017/056237 và PCT/EP2017/056227 như đã nộp ban đầu. Theo phương án khác nữa của sáng chế, kháng thể là kháng thể kháng $TNF\alpha$ có miền biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc miền biến đổi chuỗi nặng chứa vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) có các trình tự axit amin như được bộc lộ trong các đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056218, PCT/EP2017/056246, PCT/EP2017/056237 và PCT/EP2017/056227 như đã nộp ban đầu.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể là kháng thể kháng $TNF\alpha$ có miền biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc miền biến đổi chuỗi nặng chứa một hoặc nhiều vùng CDR có các trình tự axit amin như được bộc lộ trong các đơn sáng chế quốc tế số: PCT/EP2017/056218, PCT/EP2017/056246, PCT/EP2017/056237, hoặc PCT/EP2017/056227. Theo phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, kháng thể là kháng thể kháng $TNF\alpha$ có miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng chứa vùng CDR có các trình tự axit amin như được bộc lộ trong điểm 2 yêu cầu bảo hộ của đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056218, trong điểm 2 yêu cầu bảo hộ của đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056246, trong điểm 2 yêu cầu bảo hộ của đơn

sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056237 hoặc trong điểm 2 yêu cầu bảo hộ của đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056227, như đã nộp ban đầu. Theo phương án được ưu tiên khác nữa của sáng chế, kháng thể kháng TNF α được chọn từ nhóm gồm có các kháng thể kháng TNF α chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ theo điểm 4 yêu cầu bảo hộ của đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056218, điểm 5 và 6 yêu cầu bảo hộ của đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056246, điểm 5 và 6 yêu cầu bảo hộ của đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056237, điểm 4 yêu cầu bảo hộ của đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056227, và sự kết hợp của chúng. Sự bộc lộ của mỗi tài liệu trong số các đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2017/056218, PCT/EP2017/056246, PCT/EP2017/056237 và PCT/EP2017/056227 được viện dẫn toàn bộ ở đây. Chúng tạo thành một phần của bản mô tả của sáng chế này.

Theo phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế bao gồm (i) miền V_L chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:3, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:4, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:5, và (ii) miền V_H chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:6, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:7, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:8.

Theo phương án được ưu tiên hơn, kháng thể theo sáng chế chứa miền V_H có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:9. Theo phương án khác được ưu tiên hơn, kháng thể chứa miền V_L có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:10. Tốt nhất là kháng thể theo sáng chế chứa (i) miền V_H có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:9, và (ii) miền V_L có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:10.

Theo phương án cụ thể khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm (i) miền V_L chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:14, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:15, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:16, và (ii) miền V_H chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:17, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:18, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:19.

Theo phương án được ưu tiên hơn, kháng thể theo sáng chế chứa miền V_H có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:20. Theo phương án khác được ưu tiên hơn nữa, kháng thể chứa miền V_L có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:22. Tốt nhất là kháng thể theo sáng chế chứa (i) miền V_H có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:20, và (ii) miền V_L có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:22.

Kháng thể theo sáng chế có ái lực cao với TNF α của người. Thuật ngữ “ K_D ” dùng để chỉ hằng số cân bằng phân ly của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Thông thường, kháng thể theo sáng chế liên kết với TNF α của người với hằng số cân bằng phân ly (K_D) nhỏ hơn khoảng 2×10^{-10} M, tốt hơn là nhỏ hơn $1,5 \times 10^{-10}$ M, tốt hơn là nhỏ hơn $1,25 \times 10^{-10}$ M, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1×10^{-10} M, tốt nhất là nhỏ hơn $7,5 \times 10^{-11}$ M hoặc thậm chí nhỏ hơn 5×10^{-11} M, như được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trong thiết bị BIACORE. Cụ thể, việc xác định giá trị K_D được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 1.

Cải biến ảnh hưởng đến ái lực với FcRn

Kháng thể theo sáng chế chứa trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của trình tự tự nhiên của kháng thể kiểu đại do ít nhất một “cải biến axit amin” như được xác định ở đây. Ít nhất một cải biến axit amin này ảnh hưởng đến ái lực của kháng thể với FcRn của người. Thông thường, ít nhất một cải biến axit amin làm tăng ái lực của kháng thể với FcRn của người ở pH 6. Theo một phương án, ít nhất một cải biến axit amin làm tăng ái lực của kháng thể với FcRn của người ở pH 6, trong đó nó không làm thay đổi đáng kể ái lực với FcRn của người ở pH 7,4. Tốt hơn là kháng thể được cải biến có ít nhất một đột biến thể axit amin so với trình tự axit amin của kháng thể kiểu đại hoặc của kháng thể bố mẹ, ví dụ, từ khoảng một đến mười đột biến thể axit amin, và tốt hơn là từ khoảng một đến năm đột biến thể axit amin. Tốt hơn là ít nhất một cải biến axit amin nằm trong vị trí liên kết FcRn của kháng thể. Kháng thể này có thể có một hoặc nhiều sự cải biến axit amin nằm ngoài vị trí liên kết FcRn của kháng thể làm ảnh hưởng đến sự liên kết FcRn, ví dụ, bởi sự thay đổi cấu trúc. (Các) cải biến axit amin này có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết rõ về bản chất, ví dụ, bằng cách tạo ra sự đột biến định hướng điểm như được mô tả trong tài liệu “Antibody Engineering – Methods and Protocols”, được hiệu chỉnh bởi Patrick Chames, 2nd ed., 2012, Chapter 31 (ISBN 978-1-61779-973-0).

Kháng thể theo sáng chế chứa axit amin tryptophan ở vị trí 434 (theo cách đánh số EU). Axit amin này được gọi ở đây là "434W". Axit amin tự nhiên ở vị trí 434 của kháng thể IgG của người không được cải biến là asparagin (N). Do đó, có thể thu được kháng thể theo sáng chế bằng cách đưa sự đột biến N434W vào kháng thể. Tốt hơn là kháng thể theo sáng chế có thể thu được hoặc thu được bằng cách thay thế tryptophan cho asparagin ở vị trí 434.

Kháng thể theo sáng chế chứa axit amin là axit glutamic ở vị trí 428 (theo cách đánh số EU). Axit amin này được gọi ở đây là "428E". Axit amin tự nhiên ở vị trí 428 của kháng thể IgG của người không được cải biến là methionin (M). Do đó, có thể thu được kháng thể theo sáng chế bằng cách đưa sự đột biến M428E vào kháng thể. Tốt hơn là kháng thể theo sáng chế có thể thu được hoặc thu được bằng cách thay thế axit glutamic cho methionin ở vị trí 428.

Tốt hơn là kháng thể theo sáng chế còn chứa axit amin arginin ở vị trí 311 (theo cách đánh số EU). Axit amin này được gọi ở đây là "311R". Axit amin tự nhiên ở vị trí 311 của kháng thể IgG của người không được cải biến là glutamin (Q). Do đó, có thể thu được kháng thể theo sáng chế bằng cách đưa sự đột biến Q311R vào kháng thể. Tốt hơn là kháng thể theo sáng chế có thể thu được hoặc thu được bằng cách thay thế glutamin cho arginin ở vị trí 311.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa axit amin 434W và axit amin 428E. Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa axit amin 434W và axit amin 311R. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể chứa các axit amin 434W, 428E và 311R. Kháng thể này có thể thu được bằng cách đưa các đột biến Q311R, M428E và N434W vào kháng thể.

Trình tự axit amin còn lại của miền ổn định có thể giống với trình tự axit amin tự nhiên của IgG của người điển hình. Tuy nhiên, nếu trình tự axit amin của kháng thể có thể chứa một hoặc nhiều đột biến thế hoặc cải biến thêm cho trình tự axit amin tự nhiên của vùng Fc của kháng thể tự nhiên, miễn là kháng thể này vẫn có hoạt tính liên kết TNF α và các chức năng hiệu ứng.

Theo phương án được ưu tiên, vùng Fc của kháng thể theo sáng chế, bao gồm vùng bản lề, bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:13.

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có trình tự axit

amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:11. Tốt hơn là kháng thể này còn chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:1.

Theo phương án khác, chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:12. Tốt hơn là kháng thể này còn chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24.

Theo khía cạnh được ưu tiên của sáng chế, kháng thể theo sáng chế là kháng thể không được fucosyl hóa hoặc kháng thể có mức độ fucosyl hóa giảm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể có mức độ fucosyl hóa giảm”, dùng để chỉ kháng thể trong đó ít hơn 90% N-glycan của kháng thể này được fucosyl hóa. Các phương pháp để xác định tỷ lệ phần trăm fucosyl hóa là đã biết trong lĩnh vực này. Tốt hơn là tỷ lệ phần trăm fucosyl hóa được xác định như được mô tả trong Ví dụ 11 của sáng chế.

Theo một phương án, ít hơn 75%, hoặc ít hơn 50%, hoặc ít hơn 25% N-glycan của kháng thể được fucosyl hóa. Tốt nhất là ít hơn 15% N-glycan của kháng thể được fucosyl hóa. Theo phương án cụ thể, N-glycan của kháng thể theo sáng chế không chứa bất kỳ fucoza nào.

Tốt hơn là ít hơn 90% N-glycans ở vị trí N297 (theo cách đánh số EU) của kháng thể được fucosyl hóa. Theo phương án khác, ít hơn 75%, hoặc ít hơn 50%, hoặc ít hơn 25% N-glycan ở vị trí N297 (theo cách đánh số EU) của kháng thể được fucosyl hóa. Tốt nhất là ít hơn 15% N-glycan ở vị trí N297 (theo cách đánh số EU) của kháng thể được fucosyl hóa.

Theo phương án khác, N-glycan ở vị trí N297 của kháng thể không chứa bất kỳ fucoza nào.

Kháng thể không được fucosyl hóa, đôi khi còn được gọi là kháng thể được afucosyl hóa, có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp khác nhau. Ví dụ, phương pháp làm bất hoạt hiệp đồng các gen đối với α 1,6-fucosyltransferaza (*FUT8*) và GDP-manoza 4,6-dehydrataza (*GMD*) trong các tế bào CHO có thể được sử dụng để tạo ra các biến thể của kháng thể đơn dòng được afucosyl hóa hoàn toàn và tăng cường ADCC (ví dụ, xem tài liệu Imai-Nishiya et al. (2007) BMC Biotechnol. 7, 84). Phương pháp sử dụng nucleaza ngón tay kẽm (zinc-finger nuclease: ZFN) phân cắt gen *FUT8* trong vùng mã hóa lõi xúc tác của α 1,6-fucosyltransferaza và do đó phá vỡ chức năng

enzym tương ứng trong các tế bào CHO có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng hoàn toàn không có fucose trong lõi (ví dụ, xem tài liệu: Malphettes et al. (2010) *Biotechnol. Bioeng.* 106, 774–783).

Kháng thể có mức độ fucosyl hóa giảm có thể được tạo ra bằng cách thêm cơ chất môi như 2-deoxy-2-fluoro-2-fucose vào môi trường nuôi cấy (ví dụ, xem tài liệu Dekker et al. (2016) *Sci Rep* 6:36964), dẫn đến làm giảm sự kết hợp fucose vào IgG-Fc glycan.

Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế có hàm lượng axit sialic cao. Để có thể đạt được sự gia tăng mức độ sialyl hóa, ví dụ, bằng cách chuyển nhiễm đồng thời xytydin monophosphat–axit sialic synthaza (CMP–SAS), chất vận chuyển xytydin monophosphat–axit sialic (CMP–SAT), và α 2,3-sialyltransferaza (ví dụ, xem tài liệu Son et al. (2011) *Glycobiology* 21, 1019–1028).

Ái lực với FcRn

Ái lực với FcRn của người ở pH 6 của kháng thể theo sáng chế cao. Sự liên kết của kháng thể với FcRn của người ở độ pH 6 với ái lực cao được đặc trưng bởi giá trị K_D nhỏ hơn 100 nM. Tốt hơn là giá trị K_D sự liên kết với ái lực cao ở pH 6 là nhỏ hơn 75 nM, hoặc nhỏ hơn 50 nM, hoặc nhỏ hơn 25 nM, hoặc thậm chí nhỏ hơn 10 nM. Ví dụ, giá trị K_D đặc trưng cho ái lực với FcRn của người ở pH 6 có thể nằm trong khoảng từ 1 nM đến 500 nM, hoặc từ 2 nM đến 100 nM, hoặc từ 3 nM đến 50 nM, hoặc từ 4 nM đến 25 nM, hoặc từ 5 nM đến 10 nM.

Theo phương án được ưu tiên, ái lực của kháng thể theo sáng chế với FcRn của người ở pH 6 lớn hơn ái lực của infliximab với FcRn của người ở pH 6,0.

Tốt hơn nếu ái lực của kháng thể theo sáng chế với FcRn của người được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasma bề mặt (SPR), ví dụ, như được mô tả trong Ví dụ 4 của sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế thường có ái lực thấp với FcRn của người ở pH 7,4. Ái lực thấp này được đặc trưng bởi giá trị K_D lớn hơn 1 μ M. Tốt hơn là ái lực thấp với FcRn của người ở pH 7,4 được đặc trưng bởi giá trị K_D lớn hơn 2 μ M, hoặc lớn hơn 5 μ M, hoặc lớn hơn 10 μ M.

Theo phương án cụ thể, ái lực ở mức quá thấp đến mức không thể xác định được giá trị K_D bằng phương pháp SPR.

Theo phương án cụ thể, tỷ lệ của (i) giá trị K_D đối với sự liên kết kháng thể theo

sáng chế với FcRn của người ở pH 7,4 với (ii) giá trị K_D đối với sự liên kết với FcRn của người ở pH 6,0, ít nhất là 100. Tốt hơn là tỷ lệ này ít nhất là 200, hoặc ít nhất là 300, hoặc ít nhất là 400, hoặc ít nhất là 500, hoặc ít nhất là 600, hoặc ít nhất là 700, hoặc ít nhất là 800, hoặc ít nhất là 900, hoặc ít nhất là 1000.

Đặc tính chức năng của kháng thể

Kháng thể theo sáng chế được vận chuyển hiệu quả qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên. Thông thường, sự vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực với lượng lớn hơn lượng infliximab, trong đó lượng kháng thể trong infliximab dùng để chỉ khối lượng/cm² của lớp đơn tế bào phân cực. Lượng kháng thể được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực, so với lượng infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực, ít nhất là 110%, tốt hơn là ít nhất là 125%, tốt hơn nữa là ít nhất là 150%, hoặc ít nhất là 175%, hoặc ít nhất là 200% (trong đó lượng infliximab được vận chuyển được thiết lập bằng 100%).

Ngoài ra, kháng thể được vận chuyển đặc hiệu qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên với sự có mặt của lượng dư globulin miễn dịch cạnh tranh. Quá trình này được gọi ở đây là sự vận chuyển đặc hiệu.

Tỷ lệ phần trăm của tổng khối lượng globulin miễn dịch được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực lớn hơn tỷ lệ phần trăm infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên với sự có mặt của globulin miễn dịch cạnh tranh với lượng dư gấp 10 lần. Tỷ lệ phần trăm kháng thể theo sáng chế được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực với sự có mặt của các globulin miễn dịch không liên quan với lượng dư gấp 10 lần, so với tỷ lệ phần trăm infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực với sự có mặt của kháng thể không liên quan với lượng dư gấp 10 lần, ít nhất là 150%, hoặc ít nhất là 200%, hoặc ít nhất là 250%, hoặc ít nhất là 300% (lượng infliximab được thiết lập bằng 100%).

Tốt hơn là lớp đơn tế bào phân cực là lớp đơn của các tế bào T84 phân cực. Thử nghiệm vận chuyển bất chước quá trình vận chuyển xuyên bào có thể được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 5 của sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế liên kết với CD64, CD32a(H), CD32a(R), CD32b, CD16a(V), CD16a(F) và CD16b(NA2).

Kháng thể theo sáng chế thường liên kết với CD64 với giá trị K_D nhỏ hơn 100 nM, tốt hơn là nhỏ hơn 10 nM.

Kháng thể theo sáng chế thường liên kết với CD32a(H) với giá trị K_D nhỏ hơn 10 μM .

Kháng thể theo sáng chế thường liên kết với CD32a(R) với giá trị K_D nhỏ hơn 10 μM .

Kháng thể theo sáng chế thường liên kết với CD32b với giá trị K_D nhỏ hơn 10 μM .

Kháng thể theo sáng chế thường liên kết với CD16a(V), ví dụ, với giá trị K_D nhỏ hơn 500 nM, tốt hơn là nhỏ hơn 100 nM.

Kháng thể theo sáng chế thường liên kết với CD16a(F), ví dụ, với giá trị K_D nhỏ hơn 10 μM , tốt hơn là nhỏ hơn 1 μM .

Kháng thể theo sáng chế thường liên kết với CD16b(NA2), ví dụ, với giá trị K_D nhỏ hơn 10 μM , tốt hơn là nhỏ hơn 1 μM .

Kháng thể theo sáng chế còn liên kết với C1q của người. Tốt hơn là sự liên kết này mạnh hơn sự liên kết của infliximab với C1q của người.

Kháng thể theo sáng chế còn có tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) của bổ thể ở thỏ. Tốt hơn nếu CDC của kháng thể theo sáng chế lớn hơn của infliximab, tính theo giá trị EC_{50} tương đối và/hoặc tỷ lệ chết tối đa tương đối.

Kháng thể theo sáng chế còn có khả năng cảm ứng các đại thực bào $CD14^+CD206^+$. Tốt hơn là mức độ cảm ứng tương đương, bằng, hoặc lớn hơn mức độ cảm ứng của infliximab.

Kháng thể theo sáng chế còn có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào T. Tốt hơn là mức độ ức chế sự tăng sinh của tế bào T tương đương, bằng, hoặc lớn hơn mức độ ức chế của infliximab.

Được phẩm và điều trị

Việc điều trị bệnh bao gồm điều trị cho bệnh nhân đã được chẩn đoán là mắc dạng bệnh bất kỳ ở giai đoạn hoặc sự biểu hiện lâm sàng bất kỳ; việc làm chậm sự khởi phát hoặc tiến triển hoặc tăng nặng hoặc làm suy giảm các triệu chứng hoặc dấu hiệu của bệnh; và/hoặc phòng ngừa và/hoặc làm giảm mức độ nặng của bệnh.

"Đối tượng" hoặc "bệnh nhân" mà được dùng kháng thể kháng $\text{TNF}\alpha$ có thể là động vật có vú, như động vật không phải linh trưởng (ví dụ, bò, lợn, ngựa, mèo, chó, chuột, v.v.) hoặc động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ hoặc người). Theo một số khía cạnh, người là bệnh nhân trẻ em. Theo các khía cạnh khác, người là bệnh nhân ở tuổi trưởng

thành.

Chế phẩm chứa kháng thể kháng TNF α và, tùy ý một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, như chất điều trị thứ hai được mô tả dưới đây, được mô tả ở đây. Các chế phẩm này thường được cung cấp dưới dạng một phần của dược phẩm vô khuẩn chứa chất mang dược dụng. Chế phẩm này có thể ở dạng thích hợp bất kỳ (tùy thuộc vào phương pháp mong muốn để dùng nó cho bệnh nhân).

Kháng thể kháng TNF α có thể được dùng cho bệnh nhân bằng nhiều đường khác nhau như đường miệng, qua da, dưới da, trong mũi, trong tĩnh mạch, trong cơ, nội tủy mạc, tại chỗ hoặc cục bộ, ví dụ, niêm mạc. Đường dùng thích hợp nhất trong trường hợp cho trước bất kỳ sẽ phụ thuộc vào kháng thể cụ thể, đối tượng, và tính chất và mức độ nặng của bệnh và tình trạng thể chất của đối tượng. Thông thường, kháng thể kháng TNF α sẽ được dùng trong tĩnh mạch.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, kháng thể theo sáng chế được dùng qua đường miệng. Nếu dùng qua đường miệng, tốt hơn nếu kháng thể là IgG, tốt nhất là IgG₁.

Theo các phương án điển hình, kháng thể kháng TNF α có mặt trong dược phẩm với nồng độ đủ để cho phép dùng trong tĩnh mạch với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 mg/kg thể trọng đến 20 mg/kg thể trọng. Theo một số phương án, nồng độ của kháng thể thích hợp để sử dụng trong chế phẩm và các phương pháp được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, hoặc nồng độ nằm trong khoảng giữa giá trị bất kỳ của các giá trị nêu trên, ví dụ, từ 1 mg/kg đến 10 mg/kg, từ 5 mg/kg đến 15 mg/kg, hoặc từ 10 mg/kg đến 18 mg/kg.

Liều hữu hiệu của kháng thể kháng TNF α có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến khoảng 750 mg/kg cho một lần dùng (ví dụ, bolus), nhiều lần dùng hoặc dùng liên tục, hoặc để đạt được nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5000 μ g/ml cho một lần sử dụng (ví dụ, bolus), nhiều lần dùng hoặc dùng liên tục, hoặc khoảng hoặc giá trị hữu hiệu bất kỳ trong đó tùy thuộc vào tình trạng bệnh được điều trị, đường dùng và độ tuổi, trọng lượng và tình trạng bệnh của đối tượng. Trong trường hợp dùng qua đường miệng, nồng độ trong huyết thanh có thể rất thấp hoặc

thậm chí thấp hơn giới hạn phát hiện. Theo một số phương án, mỗi liều có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 mg đến khoảng 50 mg/kg thể trọng hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 3 mg đến khoảng 30 mg/kg thể trọng. Kháng thể có thể được bào chế dưới dạng dung dịch nước.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, kháng thể theo sáng chế được dùng qua đường miệng. Nếu dùng qua đường miệng, tốt hơn nếu kháng thể là IgG, tốt nhất là IgG₁. Nếu kháng thể được dùng qua đường miệng, liều dùng hàng ngày của kháng thể thường nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 100 mg/kg thể trọng, hoặc từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 50 mg/kg thể trọng, hoặc từ khoảng 0,1 mg/kg đến khoảng 25 mg/kg thể trọng, hoặc từ khoảng 0,15 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg thể trọng, hoặc từ khoảng 0,16 mg/kg đến khoảng 5 mg/kg thể trọng, hoặc từ khoảng 0,2 mg/kg đến khoảng 2 mg/kg thể trọng, hoặc từ khoảng 0,2 mg/kg đến khoảng 1 mg/kg thể trọng. Nói chung, các liều có lợi là liều nằm trong khoảng từ 1 đến 200 mg mỗi ngày, tốt hơn là từ 5 đến 100 hoặc từ 10 đến 50 mg mỗi ngày.

Các dược phẩm có thể được trình bày theo cách thuận tiện ở các dạng liều đơn vị chứa lượng định trước của kháng thể kháng TNF α trong mỗi liều. Đơn vị này có thể chứa từ 0,5 mg đến 5 g, ví dụ, nhưng không làm giới hạn ở, 1 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 750 mg, 1000 mg, hoặc khoảng bất kỳ nằm giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên, ví dụ, từ 10 mg đến 1000 mg, từ 20 mg đến 50 mg, hoặc từ 30 mg đến 300 mg. Các chất mang dược dụng có thể ở nhiều dạng khác nhau, tùy thuộc vào, ví dụ, tình trạng bệnh cần được điều trị hoặc đường dùng.

Việc xác định liều dùng hữu hiệu, tổng lượng liều dùng, và thời gian điều trị bằng kháng thể kháng TNF α của nó là đã được biết rõ trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và có thể được xác định bằng cách sử dụng nghiên cứu tăng liều dùng chuẩn.

Các chế phẩm điều trị chứa kháng thể kháng TNF α thích hợp trong các phương pháp được mô tả ở đây có thể được bào chế để bảo quản dưới dạng chế phẩm đông khô nhanh hoặc dung dịch nước bằng cách trộn lẫn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với các chất mang, tá dược hoặc chất ổn định dược dụng tùy ý thường được sử dụng trong lĩnh vực này (tất cả các chất này được gọi ở đây là "chất mang"), nghĩa là các đệm, chất ổn định, chất bảo quản, chất tạo đẳng trương, chất tẩy rửa không ion,

chất chống oxy hóa, và các chất phụ gia hỗn hợp khác. Xem tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980). Các chất phụ gia này phải là chất không độc đối với người được cho sử dụng với liều dùng và nồng độ được sử dụng.

Các đệm giúp duy trì độ pH nằm trong khoảng gần bằng điều kiện sinh lý. Chúng có thể có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 2mM đến khoảng 50mM. Các đệm thích hợp bao gồm cả các axit hữu cơ và axit vô cơ và các muối của chúng như các đệm xitrat (ví dụ, hỗn hợp mononatri xitrat-dinatri xitrat, hỗn hợp axit xitric-trinatri xitrat, hỗn hợp axit xitric-mononatri xitrat, v.v.), các đệm xitrat-phosphat, các đệm succinat (ví dụ, hỗn hợp axit succinic- mononatri succinat, hỗn hợp axit succinic-natri hydroxit, hỗn hợp axit succinic- dinatri succinat, v.v.), các đệm tartrat (ví dụ, hỗn hợp axit tartric-natri tartrat, hỗn hợp axit tartric-kali tartrat, hỗn hợp axit tartric-natri hydroxit, v.v.), các đệm fumarat (ví dụ, hỗn hợp axit fumaric-mononatri fumarat, hỗn hợp axit fumaric-dinatri fumarat, hỗn hợp mononatri fumarat-dinatri fumarat, v.v.), các đệm gluconat (ví dụ, hỗn hợp axit gluconic-natri glyconat, hỗn hợp axit gluconic-natri hydroxit, hỗn hợp axit gluconic-kali glyuconat, v.v.), đệm oxalat (ví dụ, hỗn hợp axit oxalic-natri oxalat, hỗn hợp axit oxalic-natri hydroxit, hỗn hợp axit oxalic-kali oxalat, v.v.), các đệm lactat (ví dụ, hỗn hợp axit lactic-natri lactat, hỗn hợp axit lactic-natri hydroxit, hỗn hợp axit lactic-kali lactat, v.v.) và các đệm axetat (ví dụ, hỗn hợp axit axetic-natri axetat, hỗn hợp axit axetic-natri hydroxit, v.v.). Ngoài ra, các đệm phosphat, đệm histidin và các muối trimetylamin như Tris có thể được sử dụng.

Dược phẩm của sáng chế có thể còn chứa ít nhất một muối, ví dụ, natri clorua. Tốt hơn là nồng độ muối nằm trong khoảng từ 100 mM đến 200 mM, ví dụ, khoảng 150 mM.

Các chất bảo quản có thể được thêm vào để làm chậm sự phát triển của vi sinh vật, và có thể được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 0,2% đến 1% (trọng lượng/thể tích). Các chất bảo quản thích hợp bao gồm phenol, rượu benzyl, meta-cresol, methyl paraben, propyl paraben, octadexyldimetylbenzyl amoni clorua, benzalconi halogenua (ví dụ, clorua, bromua, và iodua), hexametoni clorua, và các hợp chất alkyl paraben như methyl hoặc propyl paraben, catechol, resorxinol, xyclohexanol, và 3-pentanol. Các chất tạo đẳng trương đôi khi được gọi là "chất ổn định" có thể được

thêm vào để đảm bảo tính đẳng trương của các chế phẩm dạng lỏng và bao gồm các rượu đường polyhydric, tốt hơn là rượu ba trihydric hoặc rượu đường bậc cao hơn, như glyxerin, erythritol, arabitol, xylitol, sorbitol và manitol. Các chất ổn định để chỉ loại các tá dược có thể nằm trong phạm vi chức năng từ chất độn đến chất phụ gia để hòa tan chất điều trị hoặc giúp ngăn ngừa sự biến tính hoặc bám dính vào thành đồ chứa. Các chất ổn định điển hình có thể là các rượu đường polyhydric (đã liệt kê trên đây); các axit amin như arginin, lysin, glyxin, glutamin, asparagin, histidin, alanin, ornithin, L-leuxin, 2-phenylalanin, axit glutamic, threonin, v.v., các đường hữu cơ hoặc rượu đường, như lactoza, trehaloza, stachyoza, manitol, sorbitol, xylitol, ribitol, myoinositol, galactitol, glyxerol và chất tương tự, bao gồm cả các hợp chất xylitol như inositol; polyetylen glycol; các polyme axit amin; các chất khử chứa lưu huỳnh, như ure, glutathion, axit thioctic, natri thioglycolat, thioglyxerol, α -monothioglyxerol và natri thio sulfat; các polypeptit có trọng lượng phân tử thấp (ví dụ, các peptit có 10 gốc hoặc ít hơn); các protein như albumin huyết thanh của người, albumin huyết thanh của bò, gelatin hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước, như polyvinylpyrrolidon monosacarit, như xyloza, mannoza, fructoza, glucoza; các disacarit như lactoza, maltoza, sucroza và trisacacarit như rafinoza; và các polysacarit như dextran. Các chất ổn định có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10000 phần trọng lượng theo phần trọng lượng của protein hoạt tính.

Các chất hoạt động bề mặt hoặc chất tẩy rửa không ion (còn được gọi là "chất thấm ướt") có thể được thêm vào để giúp hòa tan chất điều trị cũng như bảo vệ protein điều trị chống lại sự kết tụ do khuấy, điều này cũng cho phép chế phẩm được cho tiếp xúc với bề mặt cắt chịu ứng suất mà không làm biến tính protein. Các chất hoạt động bề mặt không ion thích hợp bao gồm các polysorbat (20, 80, v.v.), các polyoxame (184, 188 v.v.), các polyol pluronic, các monoete polyoxyetylen sorbitan (TWEEN®-20, TWEEN®-80, v.v.). Các chất hoạt động bề mặt không ion có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,05 mg/ml đến khoảng 1,0 mg/ml, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 0,07 mg/ml đến khoảng 0,2 mg/ml.

Các tá dược hỗn hợp khác bao gồm các chất độn (ví dụ, tinh bột), chất chelat hóa (ví dụ, EDTA), chất chống oxy hóa (ví dụ, axit ascorbic, methionin, vitamin E), chất ức chế proteaza và đồng dung môi.

Chế phẩm ở đây cũng có thể chứa chất điều trị thứ hai, ngoài kháng thể kháng

TNF α của nó. Ví dụ về các chất điều trị thứ hai thích hợp được đưa ra dưới đây.

Chế độ dùng liều có thể thay đổi từ một lần mỗi tháng đến hàng ngày phụ thuộc vào nhiều yếu tố lâm sàng, bao gồm loại bệnh, mức độ nặng của bệnh, và tính miễn cảm của bệnh nhân với kháng thể kháng TNF α . Theo các phương án cụ thể, kháng thể kháng TNF α được dùng hàng ngày, hai lần mỗi tuần, ba lần mỗi tuần, hai ngày một lần, 5 ngày một lần, mỗi tuần một lần, 10 ngày một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, bốn tuần một lần hoặc mỗi tháng một lần, hoặc trong khoảng bất kỳ giữa hai giá trị nêu trên bất kỳ, ví dụ, từ bốn ngày một lần đến mỗi tháng một lần, từ 10 ngày một lần đến hai tuần một lần, hoặc từ hai đến ba lần một tuần, v.v..

Liều dùng của kháng thể kháng TNF α cần được dùng sẽ thay đổi theo kháng thể cụ thể, đối tượng, và tính chất và mức độ nặng của bệnh, tình trạng thể chất của đối tượng, chế độ điều trị (ví dụ, chất điều trị thứ hai có được sử dụng hay không), và đường dùng được chọn; liều dùng thích hợp có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng lượng và khoảng cách tối ưu của các liều dùng riêng biệt của kháng thể kháng TNF α sẽ được xác định theo tính chất và mức độ của tình trạng bệnh được điều trị, dạng, đường và vị trí dùng, và độ tuổi và tình trạng bệnh của đối tượng cụ thể được điều trị, và cuối cùng bác sĩ sẽ xác định liều dùng thích hợp cần được sử dụng. Liều dùng này có thể được lặp lại thường xuyên, khi thích hợp. Nếu xuất hiện tác dụng phụ, lượng và/hoặc tần suất của liều dùng có thể được thay đổi hoặc giảm đi, theo thực tế lâm sàng thông thường.

Rối loạn cần được điều trị

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến TNF α của người ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này dùng kháng thể như được xác định ở đây. Thuật ngữ “rối loạn liên quan đến TNF α ” hoặc “bệnh liên quan đến TNF α ” để chỉ rối loạn bất kỳ, sự khởi phát, sự tiến triển hoặc tình trạng dai dẳng của các triệu chứng hoặc tình trạng bệnh cần có sự tham gia của TNF α . Các rối loạn liên quan đến TNF α làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tình trạng mạn tính và/hoặc tự miễn của tình trạng viêm nói chung, các rối loạn viêm trung gian bởi sự miễn dịch nói chung, các bệnh ở hệ thần kinh trung ương (central nervous system: CNS) do viêm, các bệnh viêm ảnh hưởng đến mắt, khớp, da, niêm mạc, hệ thần kinh trung ương, đường dạ dày-ruột, đường tiết niệu hoặc phổi, các tình trạng

viêm màng mạch nhỏ nói chung, bệnh viêm võng mạc, bệnh viêm màng mạch nhỏ HLA-B27+, bệnh Behçet, hội chứng khô mắt, chứng tăng nhãn áp, hội chứng Sjögren, bệnh đái tháo đường (bao gồm cả bệnh thần kinh do đái tháo đường), tình trạng kháng insulin, các tình trạng của bệnh viêm khớp nói chung, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương-khớp, bệnh viêm khớp phản ứng và hội chứng Reiter, bệnh viêm khớp tuổi thiếu niên, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh xơ cứng rải rác, hội chứng Guillain-Barré, bệnh nhược cơ, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh sarcoit, bệnh viêm thận-tiểu cầu, bệnh thận mãn tính, bệnh viêm bàng quang, bệnh vẩy nến (bao gồm cả bệnh viêm khớp vẩy nến), bệnh viêm tuyến mồ hôi có mũ, bệnh viêm mô mỡ dưới da, bệnh mụn da hoại thư, hội chứng SAPHO (bệnh viêm màng hoạt dịch, bệnh trứng cá, bệnh mụn mủ, chứng phì đại xương và viêm xương), bệnh trứng cá, hội chứng Sweet, bệnh pemphigut, bệnh Crohn (bao gồm cả sự biểu hiện ngoài ruột), bệnh viêm loét ruột kết, bệnh hen phế quản, bệnh viêm phổi quá mẫn, các bệnh dị ứng nói chung, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm xoang dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính (COPD), bệnh xơ hóa phổi, bệnh u hạt Wegene, hội chứng Kawasaki, bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ, bệnh viêm mạch Churg-Strauss, bệnh viêm nút quanh động mạch, bong, bệnh mô ghép chống tức chủ, phản ứng tức chủ chống lại mô ghép, các giai đoạn thải bỏ sau khi ghép cơ quan hoặc tủy xương, các tình trạng mang tính cục bộ và toàn thân của bệnh viêm mạch nói chung, bệnh lupút ban đỏ toàn thân và dưới da, bệnh viêm đa cơ và viêm da cơ, bệnh cứng bì, bệnh tiền sản giật, bệnh cấp tính và mãn tính, bệnh viêm gan virus, bệnh viêm gan do rượu, tình trạng viêm sau phẫu thuật như sau khi phẫu thuật mắt (ví dụ, bệnh đục thủy tinh thể (thay thủy tinh thể mắt) hoặc phẫu thuật do chứng tăng nhãn áp), phẫu thuật khớp (bao gồm cả phẫu thuật nội soi khớp), phẫu thuật ở các cấu trúc liên quan đến khớp (ví dụ, dây chằng), phẫu thuật răng và/hoặc ở miệng, các thủ thuật tim mạch xâm lấn tối thiểu (ví dụ, PTCA, cắt nạo mảng xơ vữa, đặt stent), các thủ thuật soi ổ bụng và/hoặc nội soi trong bụng và phụ khoa, các thủ thuật nội soi đường tiết niệu (ví dụ, phẫu thuật tuyến tiền liệt, soi niệu quản, soi bàng quang, bệnh viêm bàng quang kẽ), hoặc tình trạng viêm quanh vị trí phẫu thuật (ngăn ngừa) nói chung, bệnh viêm da bong nước, bệnh viêm da ura bệnh cầu trung tính, bệnh hoại tử thượng bì nhiễm độc, bệnh viêm da mụn mủ, bệnh sốt rét thể não, hội chứng tan huyết tăng ure-huyết, tình trạng thải bỏ mô ghép khác gen cùng loài, bệnh viêm tai giữa, tình trạng bị rấn cắn, bệnh ban đỏ nút, các hội chứng loạn sản

tủy, bệnh viêm đường mật xơ cứng nguyên phát, bệnh khớp đốt sống huyết thanh âm tính, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn, bệnh u hạt miệng-mặt, bệnh viêm miệng mủ dạng sùi, bệnh viêm miệng ecpet, bệnh lưỡi hình bản đồ, bệnh viêm miệng di chuyển, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh liệt Bella, bệnh Creutzfeld-Jakob và các tình trạng thoái hóa thần kinh nói chung.

Sự tiêu xương liên quan đến bệnh ung thư, tình trạng viêm liên quan đến bệnh ung thư, chứng đau liên quan đến bệnh ung thư, chứng suy mòn liên quan đến bệnh ung thư, sự di căn xương, các dạng đau cấp tính và mạn tính, bất kể các dạng này do hiệu ứng trung tâm hoặc ngoại biên của $\text{TNF}\alpha$ hay không và bất kể các dạng này được phân loại theo dạng đau do viêm, nhận cảm đau hoặc do bệnh thần kinh hay không, bệnh đau dây thần kinh hông, đau lưng dưới, hội chứng ống cổ tay, hội chứng đau vùng phức hợp (complex regional pain syndrome: CRPS), bệnh gút, bệnh đau dây thần kinh sau viêm gan, bệnh đau cơ xơ hóa, trạng thái đau cục bộ, các hội chứng đau mãn tính do khối u di căn, chứng đau bụng kinh.

Các rối loạn cụ thể cần được điều trị bao gồm các tình trạng của bệnh viêm khớp nói chung, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương-khớp, bệnh viêm khớp phản ứng, bệnh viêm khớp tuổi thiếu niên; bệnh vẩy nến bao gồm cả bệnh viêm khớp vẩy nến; bệnh viêm ruột, bao gồm cả bệnh Crohn, bệnh viêm loét ruột kết bao gồm cả bệnh viêm trực tràng, bệnh viêm kết tràng xích ma, bệnh viêm kết-trực tràng xích ma, bệnh viêm ruột kết bên trái, bệnh viêm ruột kết diện rộng và bệnh viêm toàn bộ ruột kết, bệnh viêm ruột kết không xác định, bệnh viêm ruột kết vi thể bao gồm cả bệnh viêm ruột kết collagen và tế bào lympho, bệnh viêm ruột kết ở mô liên kết, bệnh viêm ruột kết chuyển hướng, bệnh viêm ruột kết ở túi thừa, bệnh viêm ruột kết ưa eosin và bệnh viêm túi thừa.

Tốt nhất là kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh viêm ruột, cụ thể là bệnh Crohn, bệnh viêm loét ruột kết hoặc bệnh viêm ruột kết vi thể. Bệnh Crohn có thể là bệnh Crohn ở hồi tràng, ruột kết, hồi-kết tràng hoặc phần trên riêng biệt (dạ dày, tá tràng và/hoặc hỗng tràng) bao gồm cả đặc tính bệnh không hẹp/không co thắt, hẹp, co thắt và quanh hậu môn, cho phép sự kết hợp bất kỳ của vị trí và đặc tính bệnh của bệnh bất kỳ trong số các bệnh nêu trên. Bệnh viêm loét ruột kết có thể là bệnh viêm loét trực tràng, bệnh viêm kết trực tràng xích ma, bệnh viêm ruột kết bên trái, bệnh viêm toàn bộ ruột kết mạn loét và bệnh viêm túi thừa.

Liệu pháp kết hợp và các khía cạnh khác

Tốt hơn là bệnh nhân đang được điều trị bằng kháng thể TNF α cũng được điều trị bằng thuốc thông thường khác. Ví dụ, bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột, đặc biệt là bệnh có mức độ từ trung bình đến nặng cũng thường được điều trị bằng mesalazine hoặc các dẫn xuất hoặc tiền dược chất của nó, các chất corticosteroid, ví dụ, budesonide hoặc prednisolone (qua đường miệng hoặc trong tĩnh mạch (i.v.)), các chất ức chế miễn dịch, ví dụ, azathioprin/6-mercaptopurin (6-MP) hoặc metotrexat, cyclosporin hoặc tacrolimus. Các thuốc khác có thể được dùng đồng thời cho bệnh nhân bao gồm các kháng thể kháng TNF α khác (ví dụ, infliximab, adalimumab, etanercept, certolizumab pegol, golimumab), các chất đối kháng integrin (ví dụ, natalizumab, vedolizumab), các kháng thể kháng IL-23 (ví dụ, MEDI2070), các kháng thể kháng β 7 (ví dụ, etrolizumab), các chất ức chế JAK trong con đường JAK/STAT (ví dụ, tofacitinib), và các chất khác. Các thuốc khác có thể được dùng đồng thời cho bệnh nhân bao gồm các chất ức chế miễn dịch (ví dụ, azathioprin/6-MP hoặc metotrexat hoặc cyclosporin dùng qua đường miệng) để duy trì sự thuyên giảm bệnh ổn định và lâu hơn. Khía cạnh khác nữa của sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng TNF α như được xác định trên đây để làm giảm mức độ viêm.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là kháng thể kháng TNF α như được xác định trên đây để sử dụng trong việc làm giảm mức độ viêm ở bệnh nhân mắc bệnh viêm.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả phương pháp điều trị tình trạng viêm, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng TNF α như được xác định trên đây. Tốt hơn nếu tình trạng viêm là một trong số các tình trạng bệnh đã mô tả trên đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là mô tả phương pháp phòng ngừa tình trạng viêm, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng TNF α như được xác định trên đây. Tốt hơn nếu tình trạng viêm này một trong số các tình trạng bệnh đã mô tả trên đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế phương pháp cải thiện sự vận chuyển xuyên bào của kháng thể kháng lại TNF α , bao gồm bước đưa đột biến thế Q311R, M428E và N434W vào trình tự axit amin của kháng thể để thu được kháng thể được cải biến có sự vận chuyển xuyên bào được cải thiện. Tốt hơn là kháng thể được cải biến là kháng thể như đã mô tả trên đây.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là phương pháp kéo dài thời gian bán hủy trong huyết tương của kháng thể kháng lại TNF α , bao gồm bước đưa đột biến thế Q311R, M428E và N434W vào trình tự axit amin của kháng thể để thu được kháng thể được cải biến có thời gian bán hủy trong huyết tương kéo dài. Tốt hơn là kháng thể được cải biến là kháng thể như đã mô tả trên đây. Thời gian bán hủy trong huyết tương có thể tăng ít nhất 10%, hoặc ít nhất 20%, hoặc ít nhất 30%, hoặc ít nhất 40%, hoặc ít nhất 50%, so với thời gian bán hủy trong huyết tương của kháng thể không được cải biến (nghĩa là kháng thể bố mẹ không có đột biến thế các axit amin Q311R, M428E và N434W).

Bảng 1. Tổng quan về các trình tự của danh mục trình tự.

SEQ ID NO:	Mô tả trình tự axit amin
1	Chuỗi nhẹ của kháng thể kiểu đại (Ab-wt), kháng thể bố mẹ của kháng thể cải biến được sử dụng trong các ví dụ
2	Chuỗi nặng của Ab-wt, kháng thể bố mẹ của kháng thể cải biến được sử dụng trong các ví dụ
3	CDR L1 của dòng 16-22-H05
4	CDR L2 của dòng 16-22-H05
5	CDR L3 của dòng 16-22-H05
6	CDR H1 của dòng 16-22-H05
7	CDR H2 của dòng 16-22-H05
8	CDR H3 của dòng 16-22-H05
9	V _H của IgG được làm giống người của dòng 16-22-H05
10	V _L của IgG được làm giống người của dòng 16-22-H05
11	Chuỗi nặng của Ab-REW (dựa trên dòng 16-22-H05)
12	Chuỗi nặng của Ab-REW (dựa trên dòng 17-22-B03)
13	Vùng Fc của Ab-REW (bao gồm vùng bản lề)
14	CDR L1 của dòng 17-22-B03
15	CDR L2 của dòng 17-22-B03
16	CDR L3 của dòng 17-22-B03
17	CDR H1 của dòng 17-22-B03
18	CDR H2 của dòng 17-22-B03

SEQ ID NO:	Mô tả trình tự axit amin
19	CDR H3 của dòng 17-22-B03
20	V _H của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03
21	V _L của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03 (sc08)
22	V _L của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03 (sc02)
23	Chuỗi nhẹ của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03 (sc08)
24	Chuỗi nhẹ của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03 (sc02)

Ví dụ thực hiện sáng chế

Biến thể của kháng thể

Một số biến thể của kháng thể kháng TNF α (sau đây được gọi là “kháng thể bố mẹ” hoặc “Ab-wt”) được tạo ra bằng cách đưa đột biến thể vào vùng Fc của trình tự axit amin của kháng thể. Chuỗi nhẹ của Ab-wt có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:1, và chuỗi nặng của Ab-wt có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:2. Các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến định hướng điểm theo các phương pháp đã thiết lập. Tóm lại, các đột biến được đưa vào bằng phương pháp PCR. Đoạn mỗi xuôi được thiết kế để chứa đột biến dự định trong khi đoạn mỗi ngược được thiết kế sao cho các đầu 5' của hai đoạn mỗi này được ghép theo kiểu kê lưng (nhưng không chồng lên nhau) (Fig.9). PCR được thực hiện trong 25 chu trình (98°C trong 10 giây, 64°C trong 30 giây, 72°C trong 3 phút). Trước khi cho sản phẩm PCR chạy trên gel agarosa, khuôn PCR không đột biến được loại bỏ ra khỏi hỗn hợp của các sản phẩm PCR bằng cách sử dụng enzym giới hạn DpnI. Sau khi tinh sạch gel của sản phẩm PCR, các đầu bằng được gắn để thu được plasmid dạng vòng được biến nạp vào tế bào *E.coli* khả biến. Sau khi ủ qua đêm, một số khuẩn lạc được thu hoạch, ADN plasmid được phân lập và giải trình tự để xác nhận rằng đột biến đã được đưa vào.

Các biến thể không được fucosyl hóa được tạo ra bằng cách cho thêm 0,15 mM cơ chất môi 2-deoxy-2-flo-2-fucoza vào môi trường nuôi cấy (Dekkers et al. (2016) Sci Rep 6:36964). Quá trình này làm giảm đáng kể sự kết hợp fucoza vào IgG-Fc glycan, như được thể hiện trong Ví dụ 11 dưới đây.

Bảng 2: Các biến thể kháng thể được tạo ra của kháng thể kháng TNF α (theo cách đánh số EU)

Ký hiệu	Sự đột biến so với kháng thể bố mẹ
Ab-wt*	Không (= kháng thể bố mẹ)
Ab-REW**	Q311R/M428E/N434W
Ab-REW-2FF**	biến thể không được fucosyl hóa của Ab-REW

* kháng thể không phải của sáng chế; **kháng thể theo sáng chế

Kháng thể Ab-REW và Ab-REW-2FF là các kháng thể theo sáng chế.

Ví dụ 1. Ái lực với TNF α

Phương pháp:

Ái lực với TNF α được xác định bằng thiết bị Biacore. Chip CM5 được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình Biacore cố định amin chuẩn. Khi chèn chip CM5 vào, hệ thống này được gắn môi và sau đó được chuẩn hóa bằng dung dịch chuẩn hóa BIA (Biacore Preventative Maintenance Kit 2). Chip được cho thêm vào hệ này cùng với đệm chạy trên PBS-T; trước khi cố định, bề mặt chip được gắn môi bằng ba lần bơm NaOH 50mM. Protein A được cố định trên bề mặt chip. Nhằm mục đích này, protein được pha loãng đến nồng độ 5 μ g/ml vào đệm axetat 10mM ở pH 4,5 và được bơm vào để tạo ra sự đáp ứng liên kết ở mức $\sim$ 1000 RU trong cả 4 dòng tế bào. Để loại bỏ chất không được liên kết cộng hóa trị ra khỏi tất cả các dòng tế bào trên chip, tiến hành rửa ba lần trong 15 giây bằng NaOH 50mM. Trên chip protein A, kháng thể bị bắt giữ trong các dòng tế bào 2 và 4, với các dòng tế bào 1 và 3 được sử dụng để trừ chất tham chiếu. Kháng thể thử nghiệm được pha loãng trong PBS-T đến nồng độ 10nM và 2,5-7,5ul được bơm vào để thu được 120 RU của kháng thể bắt giữ. Chất phân tích TNF α được điều chế với nồng độ 500 μ g/ml trong nước theo hướng dẫn của nhà cung cấp và được pha loãng thêm vào đệm chạy PBS-T. Động học của một chu trình được sử dụng để đánh giá ái lực ở trạng thái ổn định. Đối với mỗi chu trình phân tích là chu trình đơn, chuẩn độ của 5 nồng độ chất phân tích được bơm lên phối tử và sau đó sự phân ly của phức chất được xác định. Bề mặt được tái tạo bằng cách sử dụng glyxin ở pH 1,7. Phương pháp tham chiếu kép được sử dụng trong đó số liệu từ bề mặt bắt giữ đã liên kết phối tử (fc 2 và 4) được trừ ra khỏi các bề mặt tham chiếu trong đó không có phối tử bị bắt giữ (fc 1 và 3 tương ứng). Các lần bơm mẫu trống của đệm được thực hiện

mỗi 3 đến 4 chu trình và sau đó được trừ ra khỏi các chu trình bơm chất phân tích để hiệu chỉnh đối với sự thay đổi nhỏ trong cấu trúc bắt giữ phối tử. Các lần bơm lặp lại chất phân tích khi bắt đầu và kết thúc của mỗi lần phân tích được sử dụng để kiểm tra sự thoái biến của mẫu, hoặc sự thay đổi theo tính năng của thiết bị. Tất cả các phép phân tích được thực hiện ở nhiệt độ 25°C và giá mẫu được ủ ở nhiệt độ 10°C trong suốt các lần thử nghiệm. Mỗi thử nghiệm được thực hiện ít nhất ba lần. Mô hình liên kết 1:1 được sử dụng để khớp số liệu động học thu được.

Kết quả:

Tất cả các kháng thể đều có động học liên kết tương tự với TNF α , điều này cho thấy rằng sự cải biến bất kỳ được đưa vào không làm thay đổi đáng kể vùng liên kết kháng nguyên. Đối với kháng thể Ab-REW-2FF, có thể không xác định được tỷ lệ phân ly, do đó, có thể không xác định được ái lực (K_D). Tuy nhiên, tỷ lệ kết hợp với kháng thể khác là tương đương, điều này cho thấy rằng việc đưa sự đột biến vào không làm ảnh hưởng đáng kể đến sự liên kết.

Bảng 3: Động học liên kết của các biến thể IgG1 của người với TNF α như được xác định bằng phương pháp SPR

	k_a ($10^6/Ms$)	k_d ($10^{-5}/s$)	K_D (pM)
Ab-wt	$8,37 \pm 0,11$	$3,45 \pm 0,20$	$4,13 \pm 0,19$
Ab-REW	$6,22 \pm 0,91$	$2,04 \pm 0,52$	$3,30 \pm 0,74$
Ab-REW-2FF	$5,80 \pm 0,58$	nd*	nd*

*Không thể xác định được tỷ lệ phân ly (k_d).

Ví dụ 2. Hiệu lực

Phương pháp:

Các tế bào L929 được ủ với TNF α 0,25 ng/ml và actinomycin D 1 μg /giếng với sự có mặt của các hệ pha loãng theo bậc của các biến thể kháng thể kháng TNF α . Sau khi ủ trong 20 giờ ở nhiệt độ 37°C/CO $_2$ 5%, mức độ đáp ứng tăng sinh được xác định bằng cách sử dụng MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxymethylphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli và chất phản ứng kết hợp electron (phenazin etosulfat, PES). MTS được chuyển hóa thành sản phẩm formazan bằng các enzym dehydrogenaza có mặt trong các tế bào có hoạt tính chuyển hóa. Lượng sản phẩm formazan khi được xác định theo mức độ hấp thụ ở bước sóng 492 nm trực tiếp tỷ lệ

thuận với số lượng tế bào còn sống trong môi trường nuôi cấy.

Kết quả:

Các kết quả được thể hiện trên Fig.1. Việc đưa các đột biến vào vùng Fc của kháng thể kháng TNF α không làm ảnh hưởng đến hiệu lực.

Ví dụ 3. Ái lực với các thụ thể Fc γ (CD64, CD32a, CD32b, CD16a, CD16b)

Phương pháp:

Ái lực với Fc γ R được xác định bằng thiết bị Biacore. Chip CM5 được chuẩn bị bằng cách sử dụng quy trình Biacore cố định amin chuẩn. Khi chèn chip CM5 vào, hệ thống này được gắn môi và sau đó được chuẩn hóa bằng dung dịch chuẩn hóa BIA (Biacore Preventative Maintenance Kit 2). Chip này được bổ sung vào hệ thống cùng với đệm chạy là nước muối đệm phosphat Tween-20 (PBS-T); trước khi cố định, bề mặt chip được gắn môi bằng ba lần bơm NaOH 50mM. Fc γ R được cố định trên bề mặt chip bằng cách sử dụng hệ bắt giữ đuôi His. Chip kháng đuôi His được chuẩn bị theo hướng dẫn kit của Biacore, với kháng thể ở mức ~12000 RU được lắng phủ trên cả 4 dòng tế bào. Để loại bỏ chất không liên kết cộng hóa trị ra khỏi tất cả các dòng tế bào trên chip, tiến hành rửa ba lần trong 30 giây bằng glyxin 10 mM ở pH 1,5. Các thụ thể Fc γ được pha loãng trong PBS-T đến nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2 μ g/ml, với 2,5-5,0 μ l được bơm lên chip tạo ra mức độ bắt giữ nằm trong khoảng từ 60 đến 200 RU. Kháng thể được pha loãng vào PBS-T trước khi phân tích. Động học của chu trình đơn được sử dụng để đánh giá ái lực ở trạng thái ổn định. Đối với mỗi chu trình phân tích là chu trình đơn, chuẩn độ của 5 nồng độ kháng thể được bơm lên phối tử Fc γ R và sau đó sự phân ly của phức chất được xác định. Bề mặt được tái tạo bằng cách sử dụng dung dịch đã khuyến cáo, glyxin 10 mM ở pH 1,5 đối với bề mặt bắt giữ kháng đuôi His. Phương pháp tham chiếu kép được sử dụng trong đó số liệu từ bề mặt bắt giữ đã liên kết phối tử (fc 2 và 4) được trừ ra khỏi bề mặt tham chiếu không có phối tử bị bắt giữ (fc 1 và 3 tương ứng). Các lần bơm mẫu trống của đệm được thực hiện đối với mỗi chu trình chuẩn độ của kháng thể và sau đó trừ đi chu trình bơm chất phân tích, để hiệu chỉnh đối với các thay đổi nhỏ trong bề mặt bắt giữ phối tử. Tất cả các phân tích được thực hiện ở nhiệt độ 25°C và giá mẫu được ủ ở nhiệt độ 10°C trong suốt các lần thử nghiệm. Mỗi thử nghiệm được thực hiện ít nhất ba lần.

Kết quả:

Sự liên kết với CD64 không bị ảnh hưởng bởi kháng thể kháng TNF α được thiết kế. Việc đưa các đột biến vào không làm ảnh hưởng đến ái lực với CD32a(H), CD32a(R) và CD32b. Tuy nhiên, Ab-REW-2FF có sự tăng ái lực với CD16a(V) gấp 5,5 lần. Kháng thể không được fucosyl hóa Ab-REW-2FF cũng cải thiện sự liên kết với thụ thể CD16a ái lực thấp và với CD16b.

Bảng 4: Ái lực với các thụ thể Fc γ CD64, CD32a(H), CD32a(R) và CD32b khi được xác định bằng phương pháp SPR. Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của ái lực được tính từ hai hoặc nhiều thử nghiệm độc lập được thể hiện.

	Ái lực (K _D)			
	CD64	CD32a(H)	CD32a(R)	CD32b
	(nM)	(μ M)	(μ M)	(μ M)
Ab-wt	2,92 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,04	không xác định	3,14 $\pm$ 0,80
Ab-REW	2,80 $\pm$ 0,24	0,78 $\pm$ 0,05	1,60 $\pm$ 0,01	1,21 $\pm$ 0,32
Ab-REW-2FF	2,93 $\pm$ 0,16	1,87 $\pm$ 0,37	1,45 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,25

Bảng 5: Ái lực với các thụ thể Fc γ CD16a(V), CD16a(F) và CD16b như được xác định bằng phương pháp SPR. Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của ái lực được tính từ hai hoặc nhiều thử nghiệm độc lập được thể hiện.

	Ái lực (K _D)		
	CD16a(V)	CD16a(F)	CD16b(NA2)
	(nM)	(μ M)	(μ M)
Ab-wt	184 $\pm$ 31,9	không xác định	> 3,00
Ab-REW	280 $\pm$ 36,1	2,41 $\pm$ 0,68	1,65 $\pm$ 0,36
Ab-REW-2FF	33,5 $\pm$ 0,99	0,15 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,07

Ví dụ 4. Ái lực với FcRn

Phương pháp:

Phương pháp SPR được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị Biacore 3000 có các chip cảm biến CM5 được kết hợp với kháng thể IgG1 kháng TNF α (~500 đơn vị cộng hưởng (resonance unit: RU)) bằng cách sử dụng phương pháp hóa học kết hợp

amin như được mô tả bởi nhà sản xuất. Sự kết hợp được thực hiện bằng cách bơm 2,0 ug/ml của mỗi protein trong natri axetat 10mM, ở pH 4,5, bằng cách sử dụng kit kết hợp amin (GE Healthcare). Đệm HBS-P ở pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) hoặc đệm phosphat ở pH 6,0 (đệm phosphat 67 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,005%) được sử dụng làm đệm chạy và đệm pha loãng. Động học liên kết được xác định bằng cách bơm lượng chuẩn độ (1000 – 31,2 nM) của FcRn của người (human FcRn: hFcRn) có đuôi His dạng monome trên kháng thể đã cố định ở pH 7,4 hoặc pH 6,0. Tất cả các thử nghiệm SPR được tiến hành ở nhiệt độ 25°C với tốc độ dòng 40 ul/phút. Số liệu liên kết được điều chỉnh về 0, và giá trị của tế bào tham chiếu được trừ đi. Mô hình liên kết phối tử 1:1 Langmuir được cung cấp bằng phần mềm đánh giá BIA (phiên bản 4.1) được sử dụng để xác định động học liên kết.

Kết quả:

Các kết quả cho thấy rằng sự liên kết của kháng thể kiểu đại Ab-wt với hFcRn phụ thuộc chặt chẽ vào độ pH. Tất cả các biến thể kháng thể được thiết kế đều có ái lực cao với FcRn ở pH 6,0, nhưng vẫn duy trì sự phụ thuộc vào độ pH của chúng và không liên kết với thụ thể ở pH 7,4. Bất ngờ là biến thể chứa REW có mức độ liên kết mạnh hơn > 160 lần ở độ pH có tính axit và vẫn không phát hiện được sự liên kết trong các điều kiện được thử nghiệm ở độ pH trung tính. Các biến thể kháng thể có sự liên kết với FcRn được cải thiện so với infliximab chứa vùng Fc của IgG1 kiểu đại.

Bảng 6: Ái lực của các biến thể kháng thể kháng TNF α với FcRn ở pH 6,0 và pH 7,4 như được xác định bằng phương pháp SPR

	pH 6,0			pH 7,4
	K _D (nM)	Sự thay đổi so với wt (gấp số lần)	Sự thay đổi so với IFX (gấp số lần)	K _D (nM)
Ab-wt	1000			NA
Ab-REW	5,61	178	75,8	NA
Ab-REW-2FF	6,24	160	68,1	NA
IFX	425			NA

NA: không thu được số liệu do sự liên kết yếu.

Ví dụ 5. Sự vận chuyển xuyên bào

Phương pháp:

Các màng lọc Transwell (1,12 cm²) có màng polytetrafluetylen (polytetrafluoroethylene: PTFE) được phủ collagen với cỡ lỗ 0,4 µm được ủ qua đêm trong môi trường phát triển hoàn toàn, sau đó gieo 1,0 x 10⁶ tế bào T84 cho mỗi giếng. Điện trở qua biểu mô (transepithelial electrical resistance: TEER) được theo dõi hàng ngày bằng cách sử dụng ôm kế MILLICELL-ERS-2. Các môi trường nuôi cấy được phát triển trong thời gian từ 4 đến 5 ngày trước khi đạt đến mức nhập dòng với giá trị TEER nằm trong khoảng từ 1000 đến 1300 Ω x cm². Trước khi tiến hành các thử nghiệm, các lớp đơn được bỏ đói trong 1 giờ trong dung dịch muối cân bằng của Hank (Hank's Balanced Salt Solution: HBSS). Sau đó, 400 nM biến thể kháng thể hoặc IFX một mình hoặc cùng với 4000nM IgG bệnh u tủy của người với tính đặc hiệu không liên quan được cho thêm vào khoang Transwell ở phía đỉnh. Các mẫu được thu thập từ nguồn phía đáy bên ở thời điểm 0 giờ và 4 giờ sau khi cho thêm. Nồng độ kháng thể trong nguồn phía đáy bên được xác định bằng phương pháp ELISA. Tóm lại, các đĩa Maxisorp có 96 giếng được phủ qua đêm bằng TNFα tái tổ hợp hoặc kháng thể đặc hiệu từ dê kháng Fc của người, cả hai mẫu này được pha loãng đến nồng độ 1 µg/ml trong PBS. Sau đó, các đĩa được phong bế bằng PBS chứa sữa tách béo 4% trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, tiếp đó rửa 4 lần bằng PBS chứa Tween 20 0,05%. Các mẫu được lấy trong khi thử nghiệm sự vận chuyển xuyên bào được cho vào các giếng và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trước khi rửa như trên đây. Các biến thể kháng thể đã bắt giữ, IFX hoặc IgG tổng số được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu từ dê kháng Fc của người liên hợp với phosphatase kiềm (alkaline phosphatase: ALP). Mức độ liên kết được quan sát bằng mắt thường bằng cách cho thêm 100 µl cơ chất ALP và phổ hấp thụ ở bước sóng 405nm được ghi lại. Lượng biến thể kháng thể, IFX và IgG tổng số đã vận chuyển được tính từ đường cong chuẩn của mỗi trong số các biến thể kháng thể riêng biệt.

Sự vận chuyển xuyên bào của các biến thể kháng thể qua các tế bào phân cực biểu mô của người

Kết quả:

Các biến thể kháng thể kháng TNFα được thiết kế được thử nghiệm về sự vận

chuyển xuyên bào qua lớp đơn tế bào và so sánh với kháng thể kiểu đại hoặc IFX là kháng thể khác kháng TNF α IgG1 của người. Các kết quả được thể hiện trên Fig.2. Kháng thể kháng TNF α kiểu đại được vận chuyển từ phía đỉnh đến nguồn phía đáy bên. So với IFX, kháng thể IgG1 khác có vùng Fc kiểu đại, Ab-REW được vận chuyển nhiều hơn gấp 2,8 lần cũng như đối với trường hợp kháng thể Ab-REW-2FF.

Sự vận chuyển xuyên bào của các biến thể kháng thể qua các tế bào phân cực biểu mô của người với sự có mặt của IgG cạnh tranh

Kết quả:

Tổng lượng globulin miễn dịch được vận chuyển qua lớp đơn tế bào T84 phân cực từ phía đỉnh đến nguồn phía đáy bên khi các biến thể kháng thể kháng TNF α được ủ với IgG bệnh u tủy của người với lượng dư gấp 10 lần ở thời điểm 4 giờ sau khi cho thêm là tương đương đối với tất cả các kháng thể. Tuy nhiên, ái lực với FcRn ở pH 6,0 tăng lên làm cho sự vận chuyển kháng thể kháng TNF α đặc hiệu qua lớp đơn tế bào cũng cao hơn đáng kể với sự có mặt của lượng dư IgG cạnh tranh của người với tính đặc hiệu không liên quan. Các kết quả được thể hiện trên Fig.3.

Ví dụ 6. ADCC

Phương pháp:

Kit lõi thử nghiệm sinh học chứa gen thông báo ADCC từ Promega được sử dụng. Tóm lại, các tế bào đích mTNF α CHO-K1 với nồng độ 1×10^5 /ml được cấy lên các đĩa nuôi cấy mô (đáy tròn) màu trắng, 100 μ l/giếng. Các đĩa này được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5%. Vào ngày thứ 2, 95 μ l môi trường thử nghiệm được loại bỏ và được thay thế bằng 25 μ l tế bào hiệu ứng Jurkat được thiết kế với nồng độ 3×10^6 /ml. Sau đó, các đĩa này được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5%. Chất phản ứng BioGlo™ được chuẩn khi kết thúc quá trình ủ. Các đĩa được để cân bằng đến nhiệt độ môi trường trong thời gian từ 10 đến 20 phút trước khi cho thêm 75 μ l chất phản ứng BioGlo™ vào mỗi giếng. Sau khi ủ trong thời gian từ 5 đến 10 phút trong môi trường tối, mức độ phát quang được xác định. Mô hình 4-PL được sử dụng để khớp số liệu.

Kết quả:

Các kết quả (xem Fig.4) cho thấy rằng tất cả các kháng thể kháng TNF α đều gây ra ADCC nhưng với mức độ khác biệt. So với kháng thể kiểu đại Ab-wt, các biến thể kháng thể cho thấy mức độ ADCC tăng lên. Cụ thể là, biến thể kháng thể không

được fucosyl hóa Ab-REW-2FF có mức độ ADCC được cải thiện đáng kể.

Ví dụ 7. Sự liên kết với C1q

Phương pháp:

Thử nghiệm ELISA được thực hiện bằng cách sử dụng các đĩa MaxiSorp có 96 giếng trong đó các giếng được phủ TNF α của người được pha loãng đến nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$ trong PBS. Sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C, các đĩa này được phong bế bằng PBS chứa sữa tách béo 4% trong 1 giờ và được rửa bốn lần bằng PBS chứa Tween-20 0,05% (PBS-T). Sau đó, các lượng đã chuẩn độ của kháng thể IgG kháng TNF α được pha loãng trong PBS-T, được thêm vào và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng cách sử dụng PBS-T, C1q của người (0,5 $\mu\text{g/ml}$) được pha loãng trong đệm Veronal 0,1 M (CaCl₂ 0,25 mM và MgCl₂ 0,8 mM ở pH 7,2), được cho thêm vào các giếng và được ủ trong 1 giờ. Sau đó, các giếng được rửa như trên đã mô tả trên đây trước khi kháng thể của thỏ kháng C1q của người được pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 trong PBS-T được cho thêm vào các giếng và được ủ trong 1 giờ. Sau khi rửa, kháng thể từ lừa kháng IgG của thỏ đã liên hợp với HRP được pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 trong PBS-T được thêm vào. Sau đó, các giếng được rửa và 100 μl cơ chất 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin được cho thêm vào mỗi giếng. Mức độ hấp thụ được đo ở bước sóng 620nm bằng cách sử dụng quang phổ kế Sunrise.

Kết quả:

Các biến thể kháng thể kháng TNF α được bắt giữ trên TNF α của người trước khi C1q của người được thêm vào. Các kết quả (xem Fig.5) cho thấy rằng kháng thể liên kết với C1q nhưng với cường độ liên kết khác biệt. Cụ thể là, Ab-REW và Ab-REW-2FF liên kết mạnh hơn một chút so với IFX. Sự có mặt của fucoza ở N-glucan hai râu được gắn với N297 không có hoặc chỉ có ảnh hưởng rất nhỏ đối với sự liên kết. Thứ bậc mức độ liên kết từ mạnh nhất đến yếu nhất là như sau: Ab-REW > Ab-REW-2FF > IFX.

Ví dụ 8. CDC

Phương pháp:

Thử nghiệm CDC kháng TNF α đo tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể của bỏ thể ở thỏ. Các tế bào đích biểu hiện mTNF α được cấy vào các vi đĩa với sự có mặt

của kháng thể kháng TNF α để kích thích khả năng gây độc tế bào của bỏ thể. Sáu mẫu lặp lại độc lập (các biến thể kháng thể kháng TNF α) và 4 mẫu lặp của chất chuẩn tham chiếu (IFX) được chuẩn bị với nồng độ 60 $\mu\text{g/ml}$, được pha loãng nối tiếp (các bước pha loãng là 1,3 lần) và các đĩa pha loãng được bịt kín cho đến khi sử dụng. Các tế bào đích chứa gen thông báo khả năng sống LUC được chuẩn bị với nồng độ $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ và được bảo quản trong bể nước ở nhiệt độ 37°C. Bỏ thể của thử được pha loãng gấp 3 lần đến nồng độ thử nghiệm cuối trong DMEM có nồng độ glucoza cao. Ngay sau khi chuẩn bị xong, bỏ thể được kết hợp với các tế bào đích theo tỷ lệ 1:1 (theo thể tích). 40 μl của hỗn hợp bỏ thể/tế bào đích được chuyển vào mỗi giếng của đĩa thử nghiệm. Kháng thể được tạo ra trong đĩa pha loãng được chuyển vào các tế bào (20 μl /giếng) và sau đó đĩa này được ủ ở nhiệt độ 36°C/CO $_2$ 1% trong 3,5 giờ. Các đĩa thử nghiệm được để cân bằng đến nhiệt độ trong phòng trong môi trường tối trong 35 phút. Glo ở trạng thái ổn định được làm cân bằng đến nhiệt độ môi trường trong 120 phút trước khi sử dụng, được cho thêm vào đĩa thử nghiệm (20 μl /giếng) và được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường tối trong 35 phút trước khi mức độ phát quang được xác định. Sau đó, tỷ lệ phần trăm tế bào chết được tính toán đối với mỗi nồng độ của mỗi mẫu và mô hình 4-PL được sử dụng để khớp số liệu.

Kết quả:

Các kết quả được thể hiện trên Fig.6 và trong Bảng 7. Kết quả về nồng độ EC $_{50}$ tương đối và % chết tối đa tương đối đối với hiệu suất của mẫu thử nghiệm trong thử nghiệm CDC cho thấy thứ hạng hoạt tính rõ ràng phù hợp với cả hai kết quả xác định hoạt tính. Ab-REW cho thấy hoạt tính CDC cao hơn so với IFX, bất kể hàm lượng fucoza. Khi so sánh trực tiếp giữa các mẫu biến thể fucoza để hiểu rõ hơn tác động của hàm lượng fucoza đối với hoạt tính CDC, Ab-REW-2FF so với Ab-REW, cho thấy rằng mức độ đáp ứng hoạt tính CDC là tương đương. Sự so sánh này cho thấy mức độ đáp ứng EC $_{50}$ tương đối là 97,1% và mức độ đáp ứng của % chết tối đa tương đối là 100,4%.

Bảng 7: Hoạt tính CDC của các biến thể kháng thể kháng TNF α về giá trị EC $_{50}$ tương đối và % chết tương đối so với IFX

Số ID của mẫu	EC $_{50}$ tương đối (phần trăm)	Tỷ lệ chết tối đa tương đối (phần trăm)
---------------	-------------------------------------	--

IFX	100	100
Ab-REW	123,7	113,8
Ab-REW-2FF	120,1	114,2

Ví dụ 9. Sự cảm ứng các đại thực bào điều hòa

Phương pháp:

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được phân lập từ các lớp buffy khỏe mạnh. Các tế bào được phân lập thông qua ly tâm gradien Ficoll. Các tế bào của hai đối tượng cho riêng biệt được trộn lẫn với số lượng bằng nhau và 2×10^5 tế bào của hỗn hợp này được trải trong các đĩa 96 giếng với tổng thể tích 100 μ l/giếng. Các tế bào được ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5%. Sau 48 giờ, các biến thể kháng thể kháng TNF α hoặc IFX được thêm vào để đạt nồng độ cuối bằng 10 μ g/mL. Mỗi hợp chất được cho thêm lặp lại 5 hoặc 6 lần. Thể tích cuối bằng 150 μ l/giếng. IgG1 trong huyết thanh của người (Sigma #I5154) được sử dụng làm đối chứng. Sau khi cho thêm các hợp chất, các phản ứng của tế bào lympho hỗn hợp (mixed lymphocyte reaction: MLR) được nuôi cấy trong 4 ngày nữa ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5%. Sau đó, các đĩa được rửa bằng cách sử dụng PBS/5mM EDTA (PBS/EDTA) và ủ với PBS/EDTA với lượng 50 μ l/giếng trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được ly tâm và chất lỏng được tách ra. Kháng thể được pha loãng trong PBS/EDTA (kháng CD14-PE, kháng CD206-APC, cả hai kháng thể này được pha loãng với tỷ lệ 1:10). Các tế bào được tái tạo huyền phù trong 50 μ l dung dịch kháng thể và được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được rửa bằng PBS/EDTA và được tái tạo huyền phù trong 50 μ l PBS/EDTA. Các mẫu đã nhuộm được phân tích trên thiết bị FACS Fortessa bằng cách sử dụng phần mềm FACSDiva. Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo.

Kết quả:

Sự cảm ứng các đại thực bào điều hòa được phân tích trong 4 phản ứng MLR độc lập và đều thành công trong tất cả các thử nghiệm (so sánh IFX với đối chứng IgG). Các kết quả được thể hiện trên Fig.7. Mức độ cảm ứng bởi IFX có thể khác nhau giữa các thử nghiệm do thực tế rằng mỗi thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng đối tượng cho khác nhau có sự thay đổi giữa các đối tượng. Tất cả các biến thể kháng thể kháng TNF α được thử nghiệm đều cảm ứng đại thực bào điều hòa

CD14⁺CD206⁺ với mức độ thay đổi nhỏ giữa các hợp chất. Ab-REW và Ab-REW-2FF cảm ứng nhiều đại thực bào điều hòa hơn một chút so với IFX, tuy nhiên, chỉ trong trường hợp Ab-REW-2FF, mức độ tăng lên là đáng kể.

Ví dụ 10. Ức chế sự tăng sinh của tế bào T

Phương pháp:

Tế bào PBMC được phân lập từ các lớp buffy khỏe mạnh. Các tế bào được phân lập thông qua ly tâm gradien Ficoll. Các tế bào của hai đối tượng cho riêng biệt được trộn lẫn với số lượng bằng nhau và 2×10^5 tế bào của hỗn hợp này được trải trong các đĩa 96 giếng với tổng thể tích là 100 μ l/giếng. Các tế bào được ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5%. Sau 48 giờ, các biến thể kháng thể TNF α hoặc IFX được thêm vào để đạt nồng độ cuối là 10 μ g/ml. Mỗi hợp chất được cho thêm lặp lại năm hoặc sáu lần. Thể tích cuối là 150 μ l/giếng. IgG1 trong huyết thanh của người (Sigma #I5154) được sử dụng làm đối chứng. Sau khi cho thêm các hợp chất, các phản ứng của tế bào lympho hỗn hợp (MLR) được nuôi cấy trong 2 ngày nữa ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5%. Sau đó, thymidin đã triti hóa (³H thymidin, 0,5 microCurie/giếng) được cho thêm vào sản phẩm nuôi cấy. Các sản phẩm nuôi cấy được ủ tiếp trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5%. Các mẫu được thu hoạch bằng cách sử dụng thiết bị thu hoạch Microbeta Filtermat 96 ô và được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị đếm vi đĩa Microbeta được trang bị thiết bị phát hiện riêng rẽ. Các mẫu được đếm trong 10 giây/giếng và được chuyển đổi thành số đếm/giây (counts per minute: cpm).

Kết quả:

Sự ức chế sự tăng sinh của tế bào T được đo trong ba phản ứng MLR độc lập và được xác định là thành công nếu IFX làm đối chứng dương gây ra sự ức chế. Mức độ ức chế bởi IFX trong các thử nghiệm riêng biệt có thể khác nhau, điều này có thể là do sự khác biệt trong việc cảm ứng đại thực bào điều hòa. Trong mỗi thử nghiệm, khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào T của các biến thể kháng thể kháng TNF α được tính toán so với đối chứng dương IFX. Kháng thể Ab-REW-2FF cho thấy mức độ ức chế tăng cường đáng kể so với IFX trong khi mức độ ức chế bởi Ab-REW là tương đương so với IFX (xem Fig.8).

Ví dụ 11. Phân tích N-glycan Phương pháp:

50 μ l mỗi biến thể IgG (1 mg/ml) được quay ly tâm xuống trong 10 phút ở tốc độ 13.000 $\times$ g trước khi 1 μ g trypsin đã hòa tan trong 100 μ l amoni bicarbonat 50 mM (pH 7,8) được thêm vào và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Thiết bị ly tâm được quay ly tâm xuống với tốc độ 13.000 $\times$ g trong 10 phút, và dòng chảy qua được chuyển vào ống Eppendorf và được làm khô trong thiết bị SpeedVac (Heto Maxi dry). Các mẫu đã làm khô được hòa tan trong 20 μ l axit formic 1%, được nghiền bằng sóng âm trong 30 giây, và được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 16.100 $\times$ g. Sau đó, mỗi mẫu được chuyển vào lọ mới, và tiến hành phân tích bằng cách sắc ký lỏng-khối phổ nối tiếp (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) pha ngược (C18) nano trực tuyến đối với peptit phân giải protein được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). 5 μ l dung dịch peptit được bơm vào cột chiết và peptit được rửa giải theo kiểu rửa ngược từ cột chiết vào cột phân tích. Pha động gồm có axetonitril và nước loại dùng để khối phổ, cả hai chất này chứa axit formic 0,1%. Việc tách bằng cách sắc ký đạt được bằng cách sử dụng gradien nhị phân từ 3 đến 50 % axetonitril trong nước trong 60 phút với tốc độ dòng là 0,3 μ l/phút. Hệ thống sắc ký LC được nối với phổ kế khối Q có tứ cực lai chính xác orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) bằng nguồn ion hóa phun điện tử nano. Các mẫu peptit được phân tích bằng phương pháp phân mảnh phân ly do va chạm năng lượng cao (high energy collisional dissociation: HCD) với năng lượng va chạm được chuẩn hóa ở mức 20, thu được một lần quét đánh giá Orbitrap trong khoảng khối lượng của m/z là 300 - 2000, sau đó là kết quả MS/MS của mười ion có cường độ cao nhất trong thiết bị Orbitrap.

Việc phân tích số liệu được thực hiện trên thiết bị Xcalibur v2.0. Phổ MS/MS của tất cả các mẫu N-glyco-peptit được chiết bằng cách tìm kiếm ion oxoni; 204,086 (N-axetylhexosamin) và 366,1388 (N-axetylhexosamin-hexoza). Bằng cách sử dụng phương pháp phân mảnh HCD với năng lượng va chạm được chuẩn hóa ở mức 20, cấu trúc của glycan và khối lượng peptit đối với IgG được phát hiện. Các sắc phổ ion chiết được đối với glycol-peptit đích (EEQYNSTYR đối với IgG1) được chiết với độ chính xác 10 phần triệu (ppm) và phổ MS/MS tương ứng được kiểm tra bằng phương pháp thủ công. Phương pháp phân mảnh HCD với năng lượng va chạm được chuẩn hóa ở mức 35 được sử dụng để phát hiện trình tự peptit và xác nhận rằng khối lượng của

peptit tương ứng với trình tự của peptit đúng. Diện tích dưới đường cong của tất cả các glycol-peptit chiết được được tính toán và tỷ lệ phần trăm của mỗi dạng glyco được xác định.

Kết quả:

Đối với kháng thể Ab-REW, hai dạng N-glycan chiếm ưu thế và tương ứng với > 90% tổng lượng hỗn hợp N-glycan, cụ thể là 4GlcNac-1Fuc-3Man và 4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal. Cả hai dạng N-glycan chiếm ưu thế này đều chứa fucoza trong lõi. Để tạo ra phiên bản “không được fucosyl hóa” của Ab-REW (Ab-REW-2FF), cơ chất mồi 2-deoxy-2-fluoro-1-fucoza (2FF) được sử dụng. Lập bản đồ MS của kháng thể này cho thấy rằng phương pháp này thành công trong việc làm cho sự kết hợp của fucoza giảm đáng kể, do phát hiện được sự giảm từ > 90% xuống 13%. Các dạng N-glycan chiếm ưu thế sau khi xử lý là giống như các biến thể được tạo ra khi không có mặt 2FF, ngoại trừ việc các cấu trúc này không có fucoza (xem thêm Fig.10).

Bảng 8: Tỷ lệ dạng N-glycan được gắn với N297 của kháng thể IgG kháng TNF α

Cấu trúc N-glycan	Ab-REW (%)	Ab-REW-2FF (%)
4GlcNac-1Fuc-3Man	69,1	8,5
4GlcNac-1Fuc-3Man-1Gal	21,7	4,5
4GlcNac-3Man	0,7	64,3
4GlcNac-3Man-1Gal	0	17,3
Các dạng glycosyl hóa khác	8,5	5,4

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể chứa miền liên kết TNF α và vị trí liên kết FcRn, có ái lực cao với FcRn của người ở pH 6, ái lực cao này được đặc trưng bởi hằng số cân bằng phân ly (K_D) nhỏ hơn 100 nM, và còn không có ái lực hoặc có ái lực thấp với FcRn của người ở pH 7,4, ái lực thấp này được đặc trưng bởi K_D lớn hơn 10 μ M, trong đó trình tự axit amin của kháng thể này chứa axit amin 311R, 428E, 434W, và trong đó kháng thể này bao gồm (i) miền V_L chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:3, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:4, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:5, và (ii) miền V_H chứa vùng CDR1 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:6, vùng CDR2 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:7, và vùng CDR3 có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:8.
2. Kháng thể theo điểm 1, có ái lực với FcRn của người ở pH 6 lớn hơn ái lực của infliximab.
3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ái lực cao với FcRn của người ở pH 6 nêu trên được đặc trưng bởi hằng số phân ly K_D nhỏ hơn 10 nM.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, liên kết với TNF α của người với K_D nhỏ hơn 100 pM.
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên với lượng lớn hơn lượng infliximab.
6. Kháng thể theo điểm 5, trong đó lượng kháng thể được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực lớn hơn gấp hai lần lượng infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực.
7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tỷ lệ phần trăm kháng thể lớn hơn tỷ lệ phần trăm infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực từ phía đỉnh đến phía đáy bên với sự có mặt của globulin miễn dịch cạnh

tranh với lượng dư gấp mười lần, trong đó tỷ lệ phần trăm này dùng để chỉ tổng khối lượng globulin miễn dịch được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực.

8. Kháng thể theo điểm 7, trong đó tỷ lệ phần trăm kháng thể được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực lớn hơn gấp ba lần tỷ lệ phần trăm infliximab được vận chuyển qua lớp đơn tế bào phân cực.
9. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, là kháng thể không được fucosyl hóa hoặc kháng thể có mức độ fucosyl hóa giảm.
10. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.
11. Phương pháp cải thiện sự vận chuyển xuyên bào của kháng thể kháng lại $\text{TNF}\alpha$, bao gồm bước đưa đột biến thế Q311R, M428E và N434W vào trình tự axit amin của kháng thể này để thu được kháng thể nêu trong điểm 1 đến 9.
12. Phương pháp kéo dài thời gian bán hủy trong huyết tương của kháng thể kháng lại $\text{TNF}\alpha$, bao gồm bước đưa đột biến thế Q311R, M428E và N434W vào trình tự axit amin của kháng thể này để thu được kháng thể nêu trong điểm 1 đến 9.

1/5

Fig.1

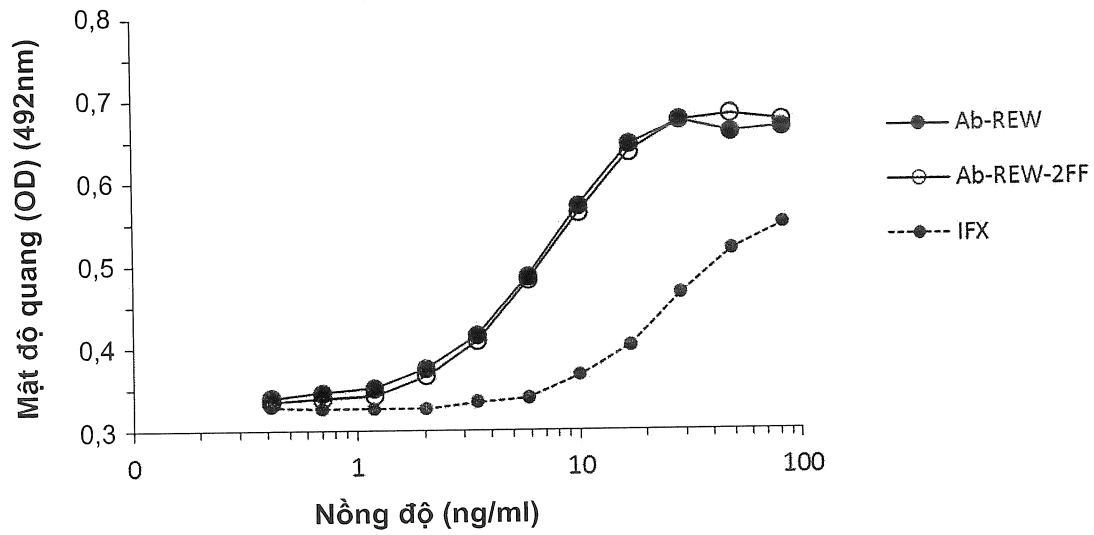
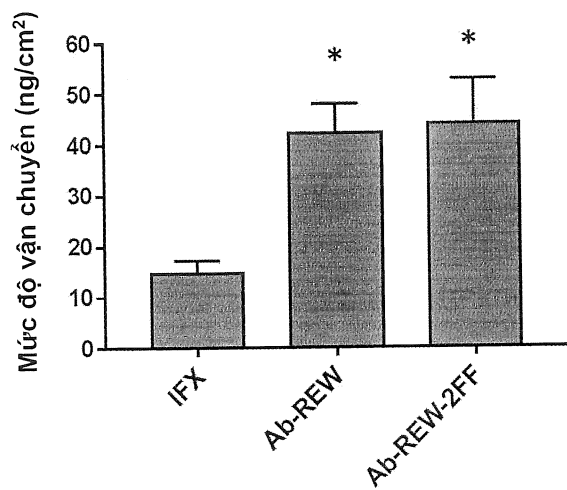


Fig.2



2/5

Fig.3

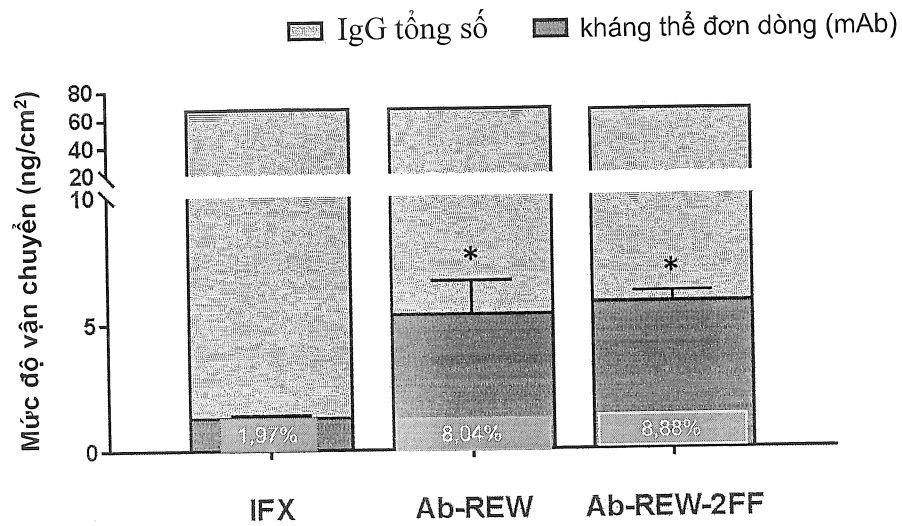
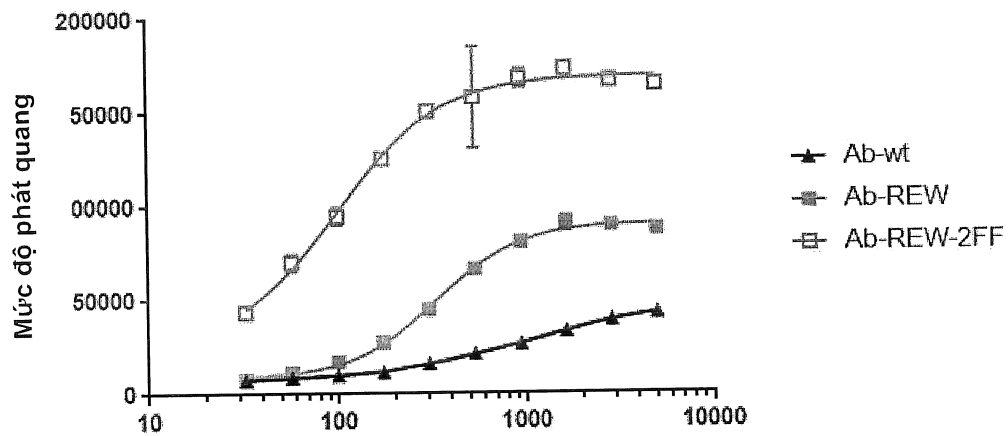


Fig.4



3/5

Fig.5

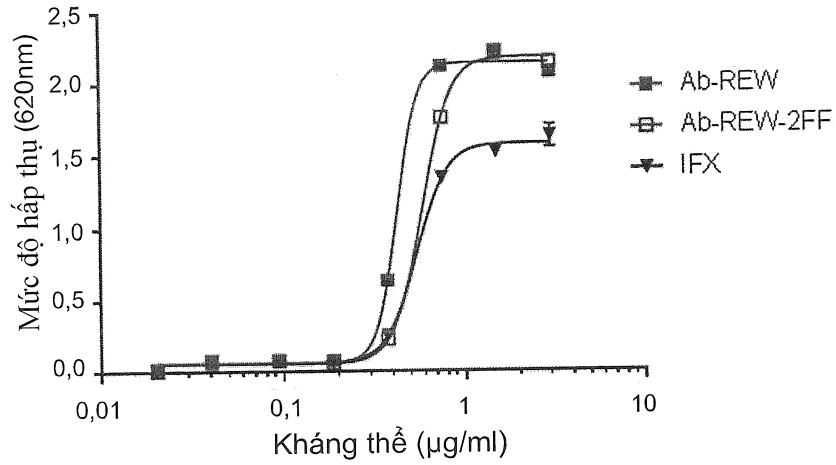
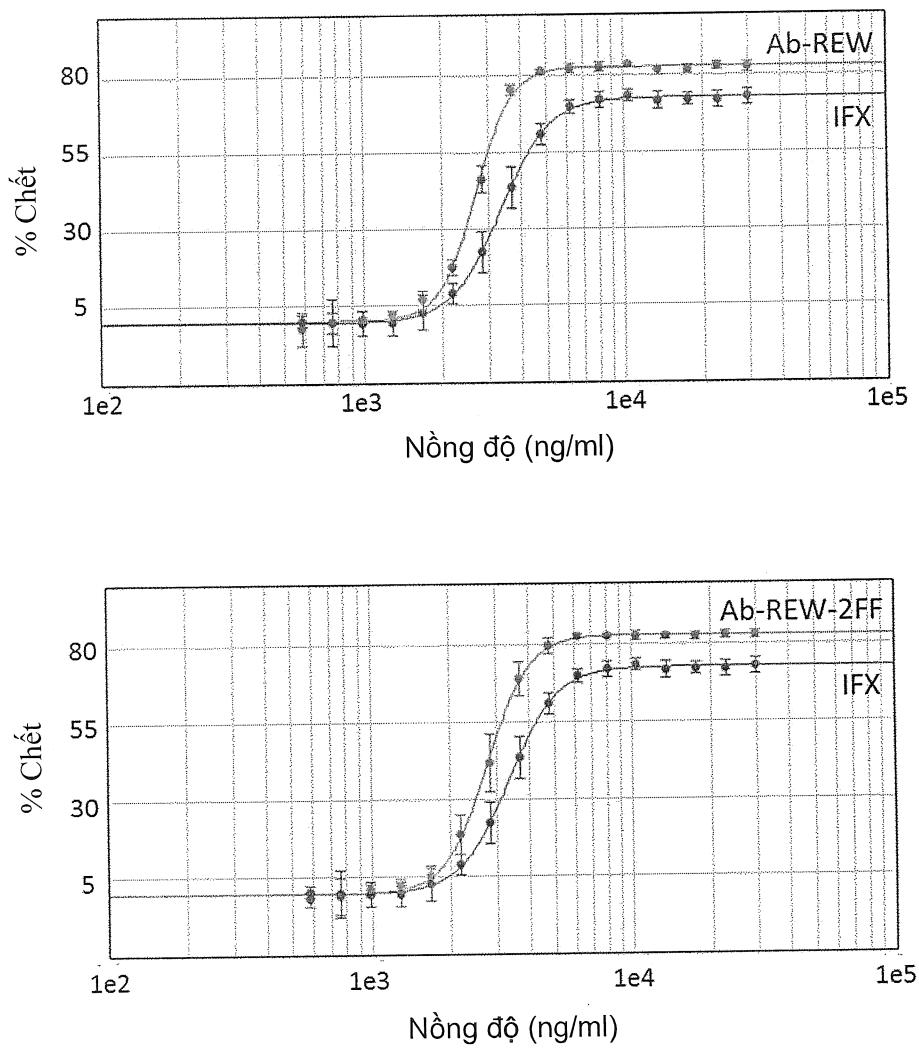


Fig.6



4/5

Fig.7

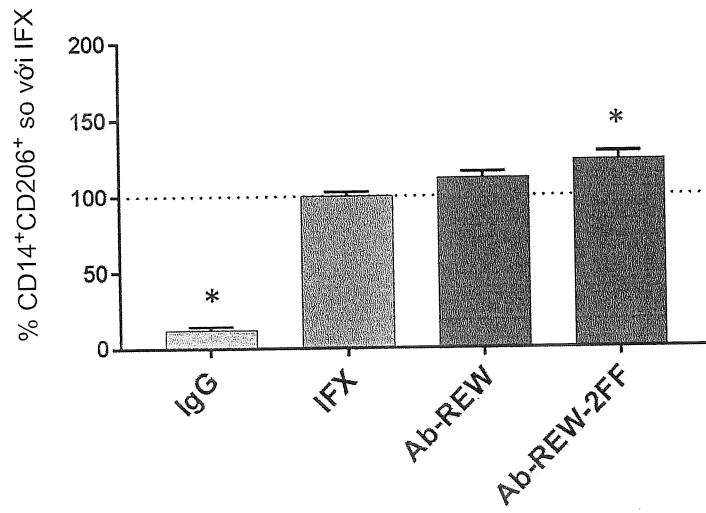
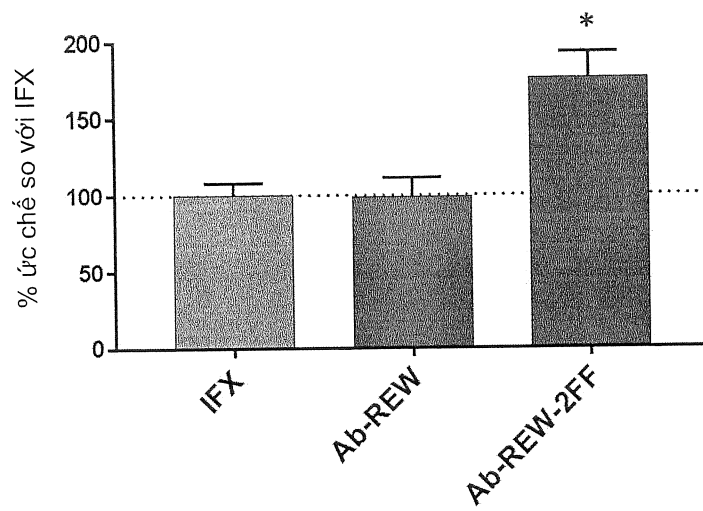


Fig.8



5/5

Fig.9

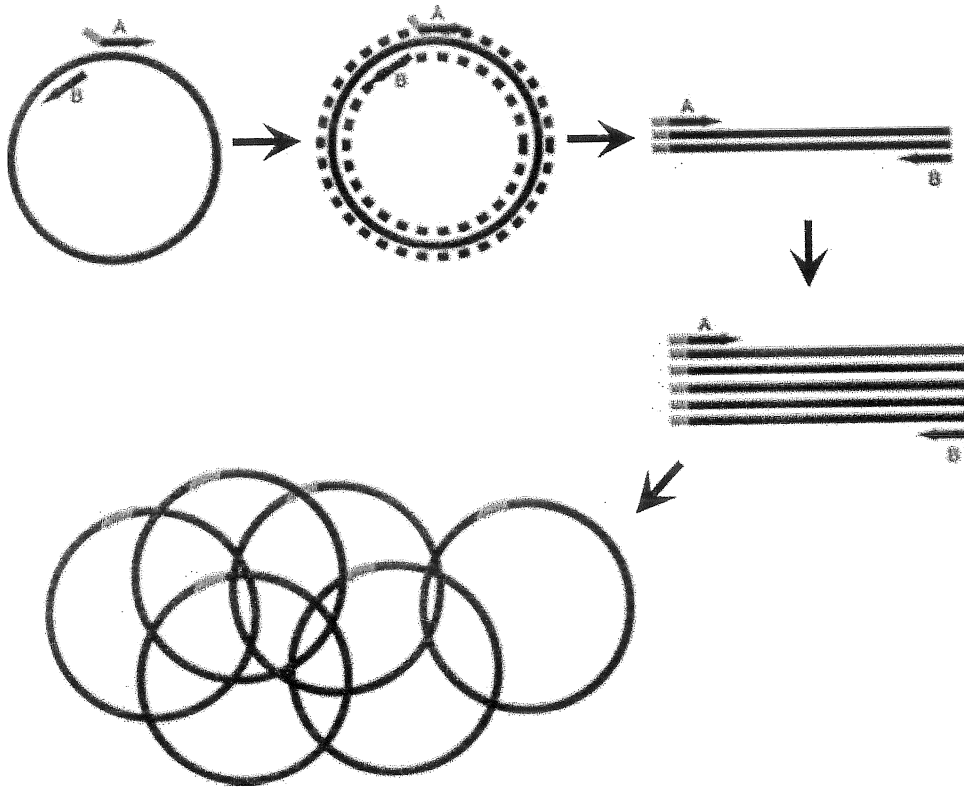
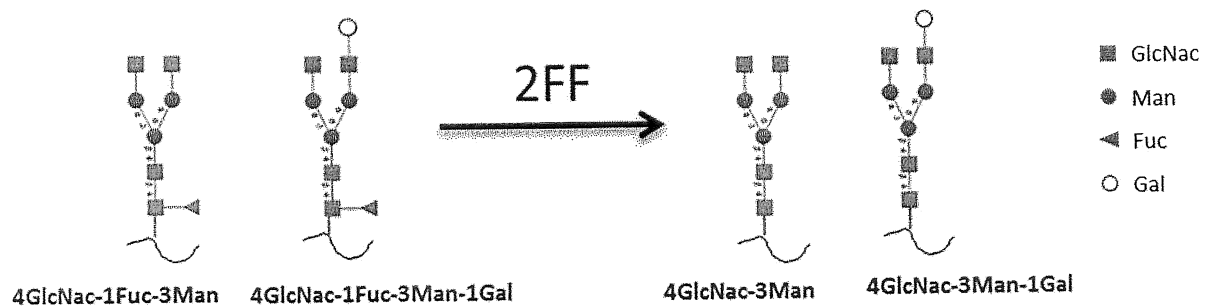


Fig.10



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Tillotts Pharma AG

<120> Kháng thể chứa miền liên kết TNF α và vị trí liên kết liên kết FcRn và được phẩm chứa kháng thể này

<130> PWO00309TIL

<150> EP17191989.7

<151> 2017-09-19

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 221

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể kiểu đại (Ab-wt), kháng thể bố mẹ của kháng thể cải biến được sử dụng trong các ví dụ (dòng 16-22-H05)

<400> 1

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Lys	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Phe	Ser	Gly
			20				25						30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Gly	Ala	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ser
				85					90					95	

Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val
			100					105					110		

Leu	Gly	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
			115				120					125			

Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn
						130		135				140			

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
145 150 155 160

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
165 170 175

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
180 185 190

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
195 200 205

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 2
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của Ab-wt, kháng thể bố mẹ của kháng thể cải biến
được sử dụng trong các ví dụ (dòng 16-22-H05)

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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 Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR L1 của dòng 16-22-H05

<400> 3

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly Leu Ala
 1 5 10

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR L2 của dòng 16-22-H05

<400> 4

Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR L3 của dòng 16-22-H05

<400> 5

Gln	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ala
1				5					10					15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR H1 của dòng 16-22-H05

<400> 6

Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	Asn	Tyr	Gly	Ile	Gly
1				5					10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR H2 của dòng 16-22-H05

<400> 7

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

Gly

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR H3 của dòng 16-22-H05

<400> 8

Asp	Pro	Val	Tyr	Ala	Thr	Ser	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp	Leu
1				5					10			

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của IgG được làm giống người của dòng 16-22-H05

<400> 9

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 Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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 Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của IgG được làm giống người của dòng 16-22-H05

<400> 10

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 Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
100 105 110

Leu Gly

<210> 11

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng của Ab-REW (dựa trên dòng 16-22-H05)

<400> 11

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 Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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 Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Glu His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 12
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của Ab-REW (dựa trên dòng 17-22-B03)

<400> 12

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 Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Ala Cys Ile Asp Ser Arg Arg Glu Glu Ser Asp Tyr Ala Ser Trp
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Asp Gly Val Asp Gly Ala Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg Asp Trp
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Glu His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13
<211> 232
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng Fc của Ab-REW (bao gồm vùng bản lề)

<400> 13

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Arg
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Glu His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR L1 của dòng 17-22-B03

<400> 14

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR L2 của dòng 17-22-B03

<400> 15

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR L3 của dòng 17-22-B03

<400> 16

Gln Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser Tyr Val Phe Arg Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR H1 của dòng 17-22-B03

<400> 17

Gly Ile Asp Phe Ser Ala Gly Tyr Asp Met Cys
 1 5 10

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR H2 của dòng 17-22-B03

<400> 18

Cys Ile Asp Ser Arg Arg Glu Glu Ser Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR H3 của dòng 17-22-B03

<400> 19

Gly Gly Tyr Gly Gly Asp Gly Val Asp Gly Ala Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 20

<211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03

<400> 20

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 Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Ala Cys Ile Asp Ser Arg Arg Glu Glu Ser Asp Tyr Ala Ser Trp
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Asp Gly Val Asp Gly Ala Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03 -(sc08)

<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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala 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 Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser
85 90 95

Tyr Val Phe Arg Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03 -(sc02)

<400> 22

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 Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Pro
65 70 75 80

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser
85 90 95

Tyr Val Phe Arg Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 23

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03 -
(sc08)

<400> 23

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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala 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 Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser
85 90 95

Tyr Val Phe Arg Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 24
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ của IgG được làm giống người của dòng 17-22-B03 -
 (sc02)

<400> 24

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 Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Tyr Glu Pro Ser
 85 90 95

Tyr Val Phe Arg Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195

200

205

Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
210						215				