



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

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



1-0052426

(51)^{2021.01} A61K 39/395; A61P 11/06; C07K 16/28; (13) B
A61K 47/26

-
- (21) 1-2022-05481 (22) 19/02/2021
(86) PCT/CN2021/076854 19/02/2021 (87) WO/2021/164728 26/08/2021
(30) 202010107765.0 21/02/2020 CN; 202110145455.2 02/02/2021 CN
(45) 27/10/2025 451 (43) 25/11/2022 416A
(73) 1. JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO., LTD. (CN)
No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone,
Lianyungang, Jiangsu 222047, China
2. SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)
No. 279 Wenjing Road, Minhang District, Shanghai, 200245, China
(72) WU, Tingting (CN); YAN, Zhen (CN); LIU, Xun (US).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyển (INVENCO.,LTD)
-

- (54) DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG IL-4R, CHẾ PHẨM ĐÔNG KHÔ
ĐƯỢC TẠO RA TỪ DƯỢC PHẨM NÀY, VÀ DUNG DỊCH HOÀN NGUYÊN
ĐƯỢC TẠO RA TỪ CHẾ PHẨM NÀY

(21) 1-2022-05481

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-4R. Dược phẩm này chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong chất đệm histidin-axit axetic, chất cải biến độ nhớt, chất hoạt động bề mặt, và chất làm ổn định.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực dược phẩm, và cụ thể là dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tuyên bố ở đây chỉ cung cấp thông tin cơ sở có liên quan đến phần mô tả sáng chế và không nhất thiết tạo nên giải pháp kỹ thuật đã biết.

Các bệnh dị ứng là các rối loạn y học nghiêm trọng, bao gồm các phản ứng dị ứng không đe dọa đến cuộc sống và các bệnh dị ứng đe dọa đến cuộc sống. Các phương pháp điều trị bệnh dị ứng hiện nay bao gồm tránh dị ứng nguyên, điều trị được lý chống các triệu chứng, và dự phòng bằng liệu pháp miễn dịch đặc hiệu dị ứng nguyên.

Intolokin-4 (IL-4, cũng được biết đến là yếu tố kích thích tế bào B hoặc BSF-1) được đặc trưng bởi khả năng kích thích sự tăng sinh của tế bào B khi đáp ứng với các kháng thể kháng globulin miễn dịch trên bề mặt ở nồng độ thấp. IL-4 đã được chứng minh là có hoạt tính sinh học rộng, bao gồm kích thích sự phát triển của tế bào T, tế bào mast, tế bào hạt, tế bào nhân khổng lồ, hồng cầu, v.v.. IL-4 kích thích sự biểu hiện MHC-II ở các tế bào B nghỉ và tăng cường tiết các globulin miễn dịch IgE và IgG1 bởi các tế bào B hoạt hóa.

Hoạt tính sinh học của IL-4 được gây ra bởi các thụ thể IL-4 đặc hiệu trên bề mặt tế bào (IL-4R). Thụ thể IL-4 (IL-4R) bao gồm 802 gốc axit amin, và IL-4R được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T, tế bào B, tế bào tuyến ức, tế bào tủy xương, đại thực bào và tế bào mast. Chuỗi α của IL-4R cũng là một phần của thụ thể IL-13 (IL-13R), và do đó IL-4R cũng có thể làm trung gian cho hoạt tính sinh học của IL-13. Giống như một liệu pháp mới, dược phẩm chứa chất đối kháng IL-4R và hỗn hợp của chúng có thể được sử dụng cho đối tượng trước, trong hoặc sau khi tiếp xúc với dị ứng nguyên hoặc sau khi biểu hiện các triệu chứng dị ứng.

Các chế phẩm có nồng độ protein cao đặt ra các thách thức về độ ổn định vật lý và hóa học của protein và gặp khó khăn trong quá trình bào chế, bảo quản và phân phối chế phẩm protein. Một vấn đề đó là protein có xu hướng tạo thành các hạt trong quá trình xử lý và/hoặc bảo quản khiến cho các hoạt động trong quá trình xử lý tiếp theo gặp khó khăn.

Hiện nay, các đơn yêu cầu cấp patent đề cập đến kháng thể kháng IL-4R và chế phẩm của nó bao gồm công bố đơn quốc tế số WO2010053751, WO2001092340, WO2008054606, WO2014031610, công bố đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN106604744A, v.v..

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do độ nhớt của chế phẩm protein tăng có tác động không tốt từ khâu bào chế chế phẩm đến khâu phân phối thuốc đến bệnh nhân, nên vẫn cần phát triển một chế phẩm protein có nồng độ tương đối cao và độ nhớt thấp thích hợp, trong đó độ nhớt thấp là thích hợp để bào chế, bảo quản và sử dụng chế phẩm protein.

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó và chất đệm, trong đó chất đệm này được chọn từ chất đệm histidin-axit axetic, và dược phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến 6,0, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến 5,5, tốt nhất là khoảng 5,0.

Theo một số phương án, trong dược phẩm được mô tả trên đây, chất đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,5, tốt hơn là khoảng 5,0.

Theo một vài phương án, chất đệm trong dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 4,5 đến 6,0, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 4,6 đến 5,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 4,7 đến 5,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 4,8 đến 5,5, từ 4,9 đến 5,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 đến 5,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 5,2 đến 5,5, hoặc tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 5,3 đến 5,5, tốt nhất là 5,0, và các ví dụ không giới hạn bao gồm khoảng 4,5, khoảng 4,6, khoảng 4,7, khoảng 4,8, khoảng 4,9, khoảng 5,0, khoảng 5,1, khoảng 5,2, khoảng 5,3, khoảng 5,4 và khoảng 5,5.

Theo một vài phương án, chất đệm histidin-axit axetic trong dược phẩm có

nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 60 mM, và các ví dụ không giới hạn bao gồm khoảng từ 10 mM đến 30 mM, từ 10 mM đến 40 mM, và từ 20 mM đến 50 mM.

Theo một vài phương án, chất đệm trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến 50 mM, tốt hơn là từ khoảng 10 mM đến 30 mM, và các ví dụ không giới hạn bao gồm 10 mM, 12 mM, 14 mM, 16 mM, 18 mM, 20 mM, 30 mM, 32 mM, 34 mM, 36 mM, 38 mM, 40 mM, 42 mM, 44 mM, 46 mM, 48 mM và 50 mM, và tốt nhất là, chất đệm có nồng độ bằng khoảng 20 mM hoặc 50 mM.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL, và các ví dụ không giới hạn bao gồm: 110 mg/mL, 120 mg/mL, 130 mg/mL, 140 mg/mL, 150 mg/mL, 160 mg/mL, 170 mg/mL, 180 mg/mL, 190 mg/mL, 200 mg/mL, và khoảng bất kỳ giữa chúng.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 180 mg/mL.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ bằng khoảng 150 mg/mL.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ bằng 100 mg/mL hoặc lớn hơn, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 150 mg/mL, và tốt nhất là 120 mg/mL.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 120 mg/mL, và các ví dụ không giới hạn bao gồm: 102 mg/mL, 104 mg/mL, 106 mg/mL, 108 mg/mL, 110 mg/mL, 112 mg/mL, 114 mg/mL, 116 mg/mL, 118 mg/mL và 120 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm còn chứa chất cải biến độ nhớt, trong đó chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm $MgCl_2$, $CaCl_2$, NaF, NaSCN, KCl, CH_3COONa , Na_2SO_4 , NaI, Arg-HCl, arginin, histidin và lysin, tốt hơn là được chọn từ

nhóm bao gồm MgCl_2 , histidin và arginin hydroclorua (Arg-HCl).

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa chất cải biến độ nhớt. Trong một vài trường hợp, chế phẩm kháng thể có độ nhớt cao do nồng độ kháng thể cao. Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt là lysin, arginin hoặc histidin. Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt là arginin. Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt bao gồm dạng muối, như muối của arginin, lysin hoặc histidin. Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt là axit amin, như axit amin dạng L, như L-arginin, L-lysin hoặc L-histidin. Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm MgCl_2 , CaCl_2 , NaF, NaSCN, KCl, CH_3COONa , Na_2SO_4 , NaI, Arg-HCl, histidin và lysin. Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm MgCl_2 , histidin và Arg-HCl.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 5 mM đến khoảng 220 mM. Các ví dụ không giới hạn bao gồm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 210 mM, hoặc 220 mM, và khoảng bất kỳ giữa chúng.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến khoảng 220 mM. Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mM đến khoảng 180 mM.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 5 mM đến khoảng 148 mM.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mM đến khoảng 120 mM.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 5 mM đến khoảng 50 mM. Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến khoảng 40 mM.

Theo một vài phương án, dược phẩm có độ nhớt dưới 40 mPa.s hoặc dưới 30 mPa.s.

Theo một vài phương án, dược phẩm có độ nhớt dưới 20 mPa.s.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt trong dược phẩm có nồng độ

nằm trong khoảng từ 50 mM đến 148 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 85 mM đến 120 mM.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt là:

- i) arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 220 mM;
- ii) histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 100 mM; hoặc
- iii) MgCl_2 có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 90 mM.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt là:

- i) arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 220 mM;
- ii) histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 100 mM; hoặc
- iii) MgCl_2 có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 90 mM.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt là arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 220 mM, và các ví dụ không giới hạn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 210 mM, hoặc 220 mM, và khoảng bất kỳ giữa chúng.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt là histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 100 mM, và các ví dụ không giới hạn bao gồm 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM hoặc 100 mM, và khoảng bất kỳ giữa chúng.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt là MgCl_2 có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 90 mM và các ví dụ không giới hạn bao gồm 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM hoặc 90 mM, hoặc khoảng bất kỳ giữa chúng.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL, và chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm MgCl_2 , histidin và arginin hydroclorua.

Theo một vài phương án, nếu kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL, chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm MgCl_2 , histidin và arginin

hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 200 mM.

Theo một vài phương án, nếu kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL, thì chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 90 mM, histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 100 mM và arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 200 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 mM đến 180 mM.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng 120 mg/mL đến 150 mg/mL, và chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 90 mM, histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 100 mM và arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 120 mM.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL, và chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm histidin, arginin hydroclorua và $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 50 mM và tốt hơn là histidin, arginin hydroclorua hoặc $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL, và chất cải biến độ nhớt là histidin, arginin hydroclorua hoặc $MgCl_2$ có nồng độ bằng 30 mM.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 120 mg/mL, và chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm histidin, arginin hydroclorua và $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 50 mM và tốt hơn là histidin, arginin hydroclorua hoặc $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt trong dược phẩm được chọn từ nhóm bao gồm $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 90 mM, histidin

có nồng độ nằm trong khoảng từ 85 mM đến 100 mM và arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 90 mM đến 120 mM.

Theo một vài phương án, chất cải biến độ nhớt trong dược phẩm được chọn từ nhóm bao gồm histidin, axit arginin clohydric và MgCl_2 có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 50 mM và tốt hơn là histidin, axit arginin clohydric hoặc MgCl_2 có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM.

Theo một vài phương án, dược phẩm còn chứa chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là polysorbat 80.

Theo một vài phương án, chất hoạt động bề mặt trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 mg/mL đến 1,2 mg/mL, tốt hơn là 0,8 mg/mL.

Theo một vài phương án, chất hoạt động bề mặt trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mg/mL đến 1,0 mg/mL, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,2 mg/mL đến 0,8 mg/mL, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 0,8 mg/mL, và các ví dụ không giới hạn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,45 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,55 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL, 1,0 mg/mL hoặc khoảng bất kỳ giữa chúng, và tốt nhất là chất hoạt động bề mặt có nồng độ bằng 0,8 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm được mô tả trên đây bao gồm:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–6,0; (c) chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 220 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL, trong đó chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm: MgCl_2 , CaCl_2 , NaF, NaSCN, KCl, CH_3COONa , Na_2SO_4 , NaI, arginin, arginin hydroclorua, histidin và lysin; tốt hơn là chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm MgCl_2 , histidin và arginin hydroclorua.

Theo một vài phương án, dược phẩm còn chứa chất làm ổn định, trong đó tốt hơn là chất làm ổn định được chọn từ nhóm bao gồm trehaloza và sucroza, và tốt hơn là sucroza.

Theo một vài phương án, chất làm ổn định trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 20 mg/mL đến 70 mg/mL, tốt hơn là từ 40 mg/mL đến 60 mg/mL, và

tốt nhất là 58 mg/mL.

Theo một vài phương án, chất làm ổn định trong dược phẩm có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mg/mL đến 70 mg/mL.

Theo một vài phương án, đường trong dược phẩm được mô tả trên đây có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mg/mL đến khoảng 60 mg/mL, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 55 mg/mL đến 60 mg/mL, và các ví dụ không giới hạn bao gồm 50 mg/mL, 51 mg/mL, 52 mg/mL, 53 mg/mL, 54 mg/mL, 55 mg/mL, 56 mg/mL, 57 mg/mL, 58 mg/mL, 59 mg/mL và 60 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 80 mM đến 148 mM, hoặc từ 5 mM đến 50 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mg/mL đến 60 mg/mL, trong đó dược phẩm có độ nhớt nhỏ hơn 20 mPa.s.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 80 mM đến 148 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 20 mM, pH 4,5–5,5; (c) histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,0 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mg/mL đến 60 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ

nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mg/mL đến 70 mg/mL;

hoặc,

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mM đến 220 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL;

trong đó chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm: $MgCl_2$, $CaCl_2$, NaF, NaSCN, KCl, CH_3COONa , Na_2SO_4 , NaI, arginin, arginin hydroclorua, histidin và lysin.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mg/mL đến 70 mg/mL, trong đó chất cải biến độ nhớt là histidin, arginin hydroclorua hoặc $MgCl_2$; hoặc

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 180 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mM đến 90 mM và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; hoặc

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 180 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 100 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong

khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; hoặc

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 180 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 200 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 30 mM, pH 4,5–5,5; (c) histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mg/mL đến 70 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 4,5–5,5; (c) histidin có nồng độ 30 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ 58 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) 120 mg/mL kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH bằng khoảng 5,0; (c) histidin có nồng độ 30 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (e) sucroza 58 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH bằng khoảng 5,0; (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ 58 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 100 mg/mL đến 180 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 mM đến 30 mM, pH nằm trong

khoảng từ khoảng 4,5 đến 5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (d) arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 90 mM đến 200 mM.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ khoảng 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH bằng khoảng 5,0; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,8 mg/mL; và (d) arginin hydroclorua có nồng độ khoảng 120 mM.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 20 mM đến 60 mM, pH 4,5 đến 5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mg/mL đến 70 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH 4,5–5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 40 mg/mL đến 70 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 20 mM đến 60 mM, pH 5,0–5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mg/mL đến 60 mg/mL; trong đó tốt hơn là, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH 5,0–5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ 58 mg/mL.

Theo một vài phương án, dược phẩm chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ

120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH bằng khoảng 5,0; (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ 58 mg/mL.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, tương ứng;

(ii) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16, tương ứng;

(iii) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 40, tương ứng; hoặc

(iv) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 8, tương ứng.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 40, tương ứng.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

(v) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc có ít

nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 2;

(vi) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 9, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 10;

(vii) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25, 26, 27, 43 hoặc 47 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 25, 26, 27, 43 hoặc 47, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 28, 29, 30, 37 hoặc 41 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 28, 29, 30, 37 hoặc 41; hoặc

(viii) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, 32 hoặc 33 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 31, 32 hoặc 33, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 34, 35 hoặc 36 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 34, 35 hoặc 36;

Tốt hơn là, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

(IX) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 43, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 37; hoặc

(X) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 43, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 41; hoặc

(XI) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 47, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 41.

Theo một vài phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong được phẩm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong được phẩm bao gồm vùng cố định. Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng cố định của các chuỗi κ và λ của người hoặc các biến thể của nó, và còn bao gồm vùng cố định

chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người hoặc các biến thể của nó, như IgG4-S228P hoặc thể đột biến IgG4-234A/235A.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 17 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 18;
hoặc

chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 19 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 20;
hoặc

chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 44 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 45;
hoặc

chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 44 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 46;
hoặc

chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 48 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 46.

Theo một vài phương án, kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm bao gồm chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 44 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 45.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng IL-4R, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của nó có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 47, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 41.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng IL-4R bao gồm chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 48 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 46.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 100 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 4,5–6,0; và (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 100 mg/mL; và (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 4,5.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 100 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 4,5; và (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 100 mg/mL; và (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 100 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 100 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 6,0; và (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 100 mg/mL; và (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,5.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 100 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,5; và (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 đến 150 mg/mL; và (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0–5,5.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) NaCl có nồng độ 122 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) MgCl₂ có nồng độ 85 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) CaCl₂ có nồng độ 148 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) KCl có nồng độ 124 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) CH₃COONa có nồng độ 86 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) Na_2SO_4 có nồng độ 96 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) NaI có nồng độ 113 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) NaF có nồng độ 74 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) NaSCN có nồng độ 112 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) Arg-HCl có nồng độ 120 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) lysin có nồng độ 118 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) histidin có nồng độ 93 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) prolin có nồng độ 207 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) MgCl_2 có nồng độ 85 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) CaCl_2 có nồng độ 148 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ

150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) histidin có nồng độ 93 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) $MgCl_2$ có nồng độ 50 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) $MgCl_2$ có nồng độ 90 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) $CaCl_2$ có nồng độ 90 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) $CaCl_2$ có nồng độ 148 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) histidin có nồng độ 90 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; và (c) Arg-HCl có nồng độ 120 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) $MgCl_2$ có nồng độ 90 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) $MgCl_2$ có nồng độ 90 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) NaCl có nồng độ 122 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) NaCl có

nồng độ 122 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) histidin có nồng độ 90 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) histidin có nồng độ 90 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) Arg-HCl có nồng độ 120 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) Arg-HCl có nồng độ 120 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 1 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 165 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ khoảng 20 mM, pH 5,0; và (c) MgCl₂ có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mM đến 90 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 165 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ khoảng 20 mM, pH 5,0; và (c) histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 mM đến 90 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 165 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ khoảng 20 mM, pH 5,0; và (c) Arg-HCl có nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 90 mM đến 200 mM.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) Arg-HCl có nồng độ 120 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 4,8; (c) histidin có nồng độ 87 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) histidin có nồng độ 100 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) histidin có nồng độ 30 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ 41,8 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) histidin có nồng độ 30 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,2; (c) histidin có nồng độ 30 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,4 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ 50 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 5,0; (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ nằm trong khoảng từ 120 mg/mL đến 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 30 mM đến 100 mM; (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ nằm trong khoảng từ 41,8 mg/mL đến 58 m/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM, pH 5,0; (c) arginin hydroclorua có nồng độ 120 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH 4,5–5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 140 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH 4,8–5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH 4,5–5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 132 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,4 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 100 mg/mL; (b) chất đệm axit histidin-axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 5,0; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 100 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 4,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,4 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 140 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 4,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 4,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 1,2 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 100 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 5; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 1,2 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 100 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,4 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ

khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 5,5; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 1,2 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Theo một phương án, dược phẩm chứa: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 5; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bào chế dược phẩm, phương pháp này bao gồm bước trao đổi đệm dung dịch gốc chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm đông khô chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó chế phẩm đông khô được tạo ra bằng cách đông khô dược phẩm được mô tả trên đây.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm đông khô chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó chế phẩm đông khô được tạo thành bằng cách pha loãng dược phẩm được mô tả trên đây và sau đó đông khô.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm đông khô chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó chế phẩm đông khô được tạo ra bằng cách pha loãng dược phẩm được mô tả trên đây 1 lần, 2 lần hoặc 3 lần, và sau đó đông khô.

Sáng chế cũng đề xuất dung dịch hoàn nguyên chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó dung dịch hoàn nguyên được tạo thành bằng cách hoàn nguyên chế phẩm đông khô được mô tả trên đây.

Theo một vài phương án, dung dịch hoàn nguyên bao gồm các thành phần sau:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó với lượng 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 50 mM, pH khoảng 5,0; (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,4 mg/mL; và (e) sucroza có nồng độ 50 mg/mL.

Theo một phương án, dung dịch hoàn nguyên bao gồm: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng

độ khoảng 50 mM; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,8 mg/mL; và (d) sucroza có nồng độ khoảng 58 mg/mL, và pH của dược phẩm là khoảng 5,3.

Theo một phương án, dung dịch hoàn nguyên bao gồm: (a) kháng thể hu25G7-A có nồng độ khoảng 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ khoảng 20 mM; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,8 mg/mL; và (d) arginin hydroclorua có nồng độ khoảng 120 mM, và pH của dược phẩm là khoảng 5,3.

Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm sản xuất chứa đồ chứa chứa dược phẩm hoặc chế phẩm đông khô hoặc dung dịch hoàn nguyên được mô tả trên đây.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn miễn dịch, mà bao gồm cho đối tượng sử dụng một lượng hữu hiệu để điều trị của dược phẩm, chế phẩm đông khô hoặc dung dịch hoàn nguyên được mô tả trên đây, trong đó tốt hơn là, bệnh miễn dịch là bệnh hoặc rối loạn qua trung gian IL-4R.

Theo một vài phương án, bệnh hoặc rối loạn miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm: hen, polyp mũi, viêm xoang mạn tính, rối loạn da dị ứng, viêm thực quản ưa eosin, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, viêm mũi dị ứng, viêm khớp, bệnh viêm, phản ứng dị ứng, hội chứng tăng sản lympho tự miễn, thiếu máu tan huyết tự miễn, Barrett thực quản, viêm màng mạch nho tự miễn, bệnh lao, và bệnh thận; tốt hơn là, bệnh hoặc rối loạn này là hen hoặc rối loạn da dị ứng.

Theo một vài phương án, bệnh hoặc rối loạn miễn dịch là hen.

Theo các phương án khác, bệnh hoặc rối loạn miễn dịch là rối loạn da dị ứng.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng dược phẩm, chế phẩm đông khô, dung dịch hoàn nguyên của chế phẩm đông khô, hoặc sản phẩm sản xuất được mô tả trên đây để bào chế thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn miễn dịch, trong đó tốt hơn là, bệnh hoặc rối loạn miễn dịch là bệnh hoặc rối loạn qua trung gian IL-4R.

Dược phẩm, chế phẩm đông khô, dung dịch hoàn nguyên của chế phẩm đông khô, hoặc sản phẩm sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc, tốt hơn là làm thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn miễn dịch, tốt hơn nữa là làm thuốc để điều trị bệnh hoặc rối loạn qua trung gian IL-4R.

Dược phẩm, chế phẩm đông khô, dung dịch hoàn nguyên của chế phẩm đông khô, hoặc sản phẩm sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc, tốt hơn là làm thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn miễn dịch trong đó tốt hơn

nữa là, bệnh hoặc rối loạn miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm: hen, polyp mũi, viêm xoang mạn tính, rối loạn da dị ứng, viêm thực quản ưa eosin, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, viêm mũi dị ứng, viêm khớp, bệnh viêm, phản ứng dị ứng, hội chứng tăng sản lympho tự miễn, thiếu máu tan huyết tự miễn, Barrett thực quản, viêm màng mạch nhỏ tự miễn, bệnh lao, và bệnh thận; tốt hơn là, bệnh hoặc rối loạn này là hen hoặc rối loạn da dị ứng.

Theo sáng chế, histidin có thể hoạt động dưới dạng cả chất đệm lẫn chất cải biến độ nhớt, và do đó, hàm lượng cuối của histidin trong được phẩm là tổng lượng của histidin trong chất đệm và lượng histidin mà được bổ sung thêm để làm giảm độ nhớt. Ví dụ, nếu histidin có nồng độ 90 mM được bổ sung thêm vào chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM pH 5,0 để làm tăng tác dụng làm giảm độ nhớt của nó, thì nồng độ cuối của histidin trong được phẩm là 110 mM, và pH của được phẩm là khoảng 5,0.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 thể hiện các kết quả của thử nghiệm tác dụng của kháng thể kháng IL-4R đến bệnh viêm da ở chuột. Ở các mẫu viêm da ở chuột, sau khi gây nhạy cảm bằng axeton, các kháng thể được làm tương thích với người hu25G7-A và hu25G7-B và kháng thể đối chứng dương tính dupilumab được sử dụng dưới da: tiến hành sử dụng hai lần một tuần, và đo độ dày tai của chuột vào ngày 27. Các kết quả chỉ ra rằng so với nhóm đối chứng, hu25G7-A, hu25G7-B và dupilumab đều có hiệu quả trong việc làm giảm độ dày tai của chuột, và hu25G7-B thể hiện hiệu quả tốt hơn so với dupilumab.

FIG.2 thể hiện các kết quả phù hợp của các công thức bào chế.

FIG.3 thể hiện biểu đồ đường đẳng trị về sự thay đổi độ ổn định của chế phẩm, trong đó các diện tích màu xám có nghĩa là vượt quá các giới hạn và diện tích màu trắng có nghĩa là trong các giới hạn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc hiểu sáng chế, một số thuật ngữ khoa học và

kỹ thuật được chỉ rõ dưới đây. Trừ khi được quy định rõ ràng theo cách khác ở đây, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đơn quốc tế số PCT/CN2019/102169 được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

"Chất đệm" được dùng để chỉ chất đệm mà chống lại sự thay đổi pH do tác động của các thành phần liên hợp axit-bazơ. Các ví dụ về chất đệm mà kiểm soát pH nằm trong khoảng thích hợp bao gồm axetat, succinat, gluconat, muối histidin, oxalat, lactat, phosphat, xitrat, tartrat, fumarat, glyxylglyxin và các chất đệm axit hữu cơ khác.

"Chất đệm muối histidin" là chất đệm chứa các ion histidin. Các ví dụ về chất đệm muối histidin bao gồm chất đệm histidin-hydroclorua, chất đệm histidin-axetat, chất đệm histidin-phosphat, chất đệm histidin-sulfat, và chất đệm tương tự, và chất đệm histidin-axetat được ưu tiên. Chất đệm histidin-axetat được bào chế với histidin và axit axetic, và cũng được biết đến là chất đệm histidin-axit axetic (His-AA).

Thuật ngữ "chất đệm xitrat" là chất đệm chứa các ion xitrat. Các ví dụ về chất đệm xitrat bao gồm chất đệm axit xitric-natri xitrat, chất đệm axit xitric-kali xitrat, chất đệm axit xitric-canxi xitrat, chất đệm axit xitric-magie xitrat, và chất đệm tương tự. Chất đệm xitrat được ưu tiên là chất đệm axit xitric-natri xitrat.

"Chất đệm succinat" là chất đệm chứa ion succinat. Ví dụ chất đệm succinat bao gồm chất đệm axit succinic-natri succinat, chất đệm axit succinic-kali succinat, chất đệm axit succinic-canxi succinat, và chất đệm tương tự. Chất đệm succinat được ưu tiên là chất đệm axit succinic-natri succinat.

Thuật ngữ "chất đệm phosphat" là chất đệm chứa ion phosphat. Ví dụ về chất đệm phosphat bao gồm chất đệm dinatri hydro phosphat-natri dihydro phosphat, chất đệm dinatri hydro phosphat-kali dihydro phosphat, chất đệm dinatri hydro phosphat-axit xitric, và chất đệm tương tự. Chất đệm phosphat được ưu tiên là chất đệm dinatri hydro phosphat-natri dihydro phosphat.

Thuật ngữ "chất đệm axetat" là chất đệm chứa ion axetat. Các ví dụ về chất đệm axetat bao gồm chất đệm axit axetic-natri axetat, chất đệm muối histidin axit axetic, chất đệm axit axetic-kali axetat, chất đệm axit axetic-canxi axetat, chất đệm axit axetic-magie axetat, và chất đệm tương tự. Chất đệm axetat được ưu tiên là chất đệm axit axetic-natri axetat.

"Dược phẩm" được dùng để chỉ hỗn hợp chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ ở đây và các thành phần hóa học khác, ví dụ, chất mang và tá dược được dung/chấp nhận được về mặt sinh lý. Mục đích của dược phẩm là duy trì độ ổn định của hoạt chất kháng thể và thúc đẩy việc sử dụng cho sinh vật, tạo điều kiện cho việc hấp thu hoạt chất, nhờ đó tạo ra hoạt tính sinh học.

Như được sử dụng ở đây, "dược phẩm" và "chế phẩm" không loại trừ lẫn nhau.

Trừ khi được quy định theo cách khác, dung môi của dược phẩm ở dạng dung dịch được mô tả ở đây là dung dịch chứa nước.

"Trao đổi" được dùng để chỉ việc trao đổi hệ dung môi mà hòa tan protein kháng thể. Ví dụ, hệ dung môi ưu trương hoặc có hàm lượng muối cao chứa kháng thể được trao đổi, bằng các thao tác vật lý, với hệ đệm của chế phẩm ổn định, sao cho protein kháng thể có mặt trong chế phẩm ổn định. Các thao tác vật lý bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, siêu lọc, thẩm tách hoặc hoàn nguyên sau khi ly tâm.

"Chế phẩm đông khô" được dùng để chỉ chế phẩm hoặc dược phẩm thu được bằng cách đông khô trong chân không dược phẩm hoặc chế phẩm ở dạng lỏng hoặc dạng dung dịch.

"Sacarit" theo sáng chế có công thức chung $(CH_2O)_n$ và dẫn xuất của nó, bao gồm monosacarit, disacarit, trisacarit, polysacarit, đường rượu, đường khử, đường không khử, v.v.. Sacarit có thể được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, sucroza, trehaloza, lactoza, fructoza, maltoza, dextran, glyxerin, erythritol, glyxerol, arabitol, xylitol, sorbitol, mannitol, mellibioza, melequitoza, raffinosa, mannotrioza, stachyoza, maltoza, lactuloza, maltuloza, glucitol, maltitol, lactitol, iso-maltuloza, v.v.. Sacarit được ưu tiên là disacarit không khử, sacarit được ưu tiên là trehaloza hoặc sucroza, và sacarit được ưu tiên nhất là sucroza.

Chất hoạt động bề mặt theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame, Triton, natri dodecyl sulfonat, natri lauryl sulfonat, natri octyl glycosit, lauryl-/myristyl-/linoleyl-/stearyl-sulfobetain, lauryl-/myristyl-/linoleyl-/stearyl-sarcosin, linoleyl-/myristyl-/xetyl-betain, lauramido propyl-/cocaramit propyl-/linoleinamit propyl-/myristylamit propyl-/palmitamit propyl-/isostearamit propyl-betain, myristylamit propyl-/palmitamit propyl-/isostearamit propyl-dimetylamin, natri metyl cocoyl, natri metyl oleyl taurat,

polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen và propylen glycol, và chất hoạt động bề mặt tương tự. Chất hoạt động bề mặt được ưu tiên là polysorbat 80 hoặc polysorbat 20, và chất hoạt động bề mặt được ưu tiên hơn nữa là polysorbat 80.

Thuật ngữ "độ nhớt" có thể là "độ nhớt động học" hoặc "độ nhớt tuyệt đối". "Độ nhớt động học" là số đo sức cản của chất lỏng chảy dưới tác động của trọng lực. Khi hai chất lỏng có thể tích bằng nhau được đặt trong các nhớt kế mao quản giống nhau và được để chảy theo trọng lực, thì chất lỏng có độ nhớt nhiều hơn cần nhiều thời gian hơn để chảy qua mao quản so với chất lỏng có độ nhớt ít hơn. Ví dụ, nếu một chất lỏng cần 200 giây để hoàn thành việc chảy của nó và chất lỏng khác cần 400 giây, thì độ nhớt động học của chất lỏng thứ hai là bằng hai lần so với chất lỏng thứ nhất. "Độ nhớt tuyệt đối", đôi khi gọi là độ nhớt động học hoặc độ nhớt đơn giản, là tích của độ nhớt động học và mật độ chất lỏng (độ nhớt tuyệt đối = độ nhớt động học $\times$ mật độ). Độ nhớt động học được biểu thị ở dạng L^2/T , trong đó L là chiều dài và T là thời gian. Độ nhớt động học thông thường được biểu thị ở dạng centistoke (cSt). Đơn vị SI của độ nhớt động học là mm^2/s , mà bằng 1 cSt. Độ nhớt tuyệt đối được biểu thị ở dạng centipoise (cP). Đơn vị SI của độ nhớt tuyệt đối là milliPascal-giây (mPa-s), trong đó 1 cP = 1 mPa-s.

Thuật ngữ "khoảng" và "xấp xỉ" như được sử dụng ở đây có nghĩa là giá trị bằng số nằm trong khoảng sai số chấp nhận được đối với giá trị cụ thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và giá trị bằng số tùy thuộc một phần vào cách đo giá trị hoặc xác định giá trị này (tức là giới hạn của hệ thống đo). Ví dụ, "khoảng" có nghĩa là trong khoảng độ lệch chuẩn bằng 1 hoặc lớn hơn 1 mỗi lần thực hiện trong lĩnh vực này. Theo cách khác, "khoảng" hoặc "về cơ bản bao gồm" có nghĩa là khoảng $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$ hoặc $\pm 5\%$ của các giá trị bằng số cụ thể nêu sau đó. Hơn nữa, riêng đối với hệ hoặc quy trình sinh học, thuật ngữ này có thể lên đến một bậc độ lớn hoặc gấp 5 lần của một giá trị bằng số. Khi một giá trị cụ thể được đề cập trong bản mô tả sáng chế và yêu cầu bảo hộ, trừ khi được chỉ ra rõ ràng theo cách khác, nghĩa của thuật ngữ "khoảng" hoặc "về cơ bản bao gồm" đối với giá trị cụ thể đó nên được giả định là nằm trong khoảng sai số chấp nhận được.

Dược phẩm được mô tả ở đây có thể có tác dụng ổn định: kháng thể trong đó hầu như vẫn giữ được độ ổn định vật lý của nó, và/hoặc độ ổn định hóa học và/hoặc

hoạt tính sinh học sau khi bảo quản. Tốt hơn là, dược phẩm về cơ bản vẫn giữ được độ ổn định vật lý và hóa học ủa nó và hoạt tính sinh học sau khi bảo quản. Giai đoạn bảo quản thường được chọn lọc dựa trên thời hạn sử dụng tiền định của dược phẩm. Hiện có rất nhiều kỹ thuật phân tích để đánh giá độ ổn định protein, và độ ổn định sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian đã chọn ở nhiệt độ đã chọn có thể được đo.

Dược phẩm ổn định chứa kháng thể là dược phẩm trong đó không quan sát thấy có sự thay đổi đáng kể trong các điều kiện sau: bảo quản ở nhiệt độ tủ lạnh ($2-8^{\circ}\text{C}$) trong ít nhất 3 tháng, tốt hơn là 6 tháng, tốt hơn nữa là 1 năm, và thậm chí tốt hơn nữa là tối đa 2 năm. Ngoài ra, các chế phẩm dạng lỏng ổn định bao gồm các chế phẩm lỏng mà có các đặc điểm ổn định sau khi bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong khoảng 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng. Tiêu chuẩn thông thường chấp nhận được về độ ổn định là như sau: thông thường, không quá khoảng 10%, tốt hơn là không quá khoảng 5%, kháng thể monome bị thoái biến khi được đo bằng SEC-HPLC. Dược phẩm chứa kháng thể là một chất lỏng màu hơi vàng, gần như không màu và trong suốt, hoặc không màu, hoặc trong suốt đến hơi đục, bằng phân tích trực quan. Nồng độ, độ pH và áp suất thẩm thấu của chế phẩm không thay đổi quá $\pm 10\%$. Thông thường, mức giảm quan sát được là không quá khoảng 10%, tốt hơn là không quá khoảng 5%. Thông thường, không quá khoảng 10%, tốt hơn là không quá khoảng 5%, kết tụ được tạo thành.

Kháng thể "vẫn giữ được độ ổn định vật lý của nó" trong dược phẩm nếu nó không có mức kết tụ, kết tủa và/hoặc biến tính tăng đáng kể khi kiểm tra bằng mắt thường về màu sắc và/hoặc độ trong, hoặc khi được đo bằng kỹ thuật tán xạ ánh sáng UV, sắc ký loại trừ theo kích thước (size exclusion chromatography-SEC) và kỹ thuật tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering-DLS). Các thay đổi về cấu hình protein có thể được đánh giá bằng kỹ thuật quang phổ huỳnh quang (mà xác định cấu trúc bậc ba của protein) và bằng quang phổ FTIR (mà xác định cấu trúc bậc hai của protein).

Kháng thể "vẫn giữ được độ ổn định hóa học" trong dược phẩm nếu nó không có sự thay đổi đáng kể nào về mặt hóa học. Độ ổn định hóa học có thể được đánh giá bằng cách phát hiện và định lượng các dạng thay đổi về mặt hóa học của protein. Các quá trình thoái biến mà thường làm thay đổi cấu trúc hóa học của protein bao gồm thủy phân hoặc phân cắt (được đánh giá bằng các phương pháp như sắc ký loại trừ kích thước và SDS-PAGE), oxy hóa (đánh giá bằng các phương pháp như lập bản đồ

peptit kết hợp với phương pháp đo khối phổ hoặc MALDI/TOF/MS), khử amit (được đánh giá bằng các phương pháp như sắc ký trao đổi ion, điện di mao quản hội tụ đẳng điện, lập bản đồ peptit, và đo lượng axit isoaspartic), và quá trình đồng phân hóa (được đánh giá bằng cách đo lượng axit isoaspartic, lập bản đồ peptit, v.v.).

Kháng thể "vẫn giữ được hoạt tính sinh học của nó" trong được phẩm nếu hoạt tính sinh học của kháng thể tại thời điểm nhất định là nằm trong khoảng hoạt tính sinh học tiền định được thể hiện ở thời điểm bào chế được phẩm. Hoạt tính sinh học của kháng thể có thể được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên.

"IL-4R của người" (hIL-4R) được dùng để chỉ thụ thể xytokin của người gắn kết đặc hiệu với interleukin-4 (IL-4) hoặc IL-4R α .

Mã ba chữ cái hoặc một chữ cái dùng cho axit amin được sử dụng ở đây được bộc lộ trong tài liệu *J. Biol. Chem*, 243, p3558 (1968).

Thuật ngữ "kháng thể (Ab)" bao gồm phân tử gắn kết với kháng nguyên hoặc phức hợp phân tử chứa ít nhất một vùng quyết định bổ sung (complementarity determining region-CDR) gắn kết đặc hiệu với hoặc tương tác với kháng nguyên cụ thể (hoặc epitop của nó, ví dụ, kháng nguyên IL-4R hoặc epitop của nó). Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm các phân tử globulin miễn dịch có bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, cũng như là các multimer của nó (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là HCVR hoặc VH) và vùng cố định chuỗi nặng (CH). Vùng cố định chuỗi nặng bao gồm ba vùng (miền), CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc VL) và vùng cố định chuỗi nhẹ (CL). Vùng cố định chuỗi nhẹ bao gồm một vùng (miền, CL). Các vùng VH và VL có thể còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, mà được gọi là vùng quyết định bổ sung (complementarity determining region-CDR) và xen giữa các vùng quyết định bổ sung là các vùng được bảo toàn hơn được gọi là vùng khung (framework region-FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Các FR của kháng thể kháng IL-4R (hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó) có thể là giống với các trình tự dòng mầm của người, hoặc có thể được cải biến tự nhiên hoặc nhân tạo. Các kháng thể có thể thuộc các lớp phụ khác nhau, ví dụ, kháng

thể IgG (ví dụ, lớp phụ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Các ví dụ không giới hạn về các đoạn gắn kết kháng nguyên bao gồm: (i) các đoạn Fab; (ii) các đoạn F(ab')₂; (iii) các đoạn Fd; (iv) các đoạn Fv; (v) các phân tử Fv chuỗi đơn (scFv); (vi) các phân đoạn dAb; và (vii) các đơn vị nhận diện tối thiểu bao gồm gốc axit amin mà bắt chước vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định bổ sung phân lập (CDR) như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 giới hạn. Các phân tử được thao tác di truyền khác, như các kháng thể đặc hiệu miễn, các kháng thể đơn miễn, các kháng thể đã loại miễn, các kháng thể khảm, các kháng thể được ghép CDR, các kháng thể dạng dime, các kháng thể dạng trime, các kháng thể dạng tetrame, kháng thể dạng mini, kháng thể dạng nano (như kháng thể dạng nano đơn giá và kháng thể nano hai giá), được phẩm miễn dịch modun nhỏ (small modular immunopharmaceutical-SMIP), và vùng IgNAR biến đổi của cá mập, và cũng được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn gắn kết kháng nguyên" như được sử dụng ở đây.

Đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể thường sẽ bao gồm ít nhất một vùng biến đổi. Vùng biến đổi có thể là vùng có kích thước bất kỳ hoặc bao gồm thành phần axit amin và thường bao gồm CDR mà nằm cạnh hoặc nằm trong khung của một hoặc nhiều trình tự khung. Trong các đoạn liên kết với kháng nguyên có vùng VH và vùng VL, các vùng VH và VL có thể được sắp đặt so với nhau theo cách sắp xếp thích hợp. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dạng dime và chứa dime VH-VL hoặc VL-VH.

Theo các phương án nhất định, trong cấu hình bất kỳ gồm vùng biến đổi và vùng cố định của đoạn gắn kết kháng nguyên, các vùng biến đổi và cố định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết nhờ toàn bộ hoặc một phần vùng bản lề hoặc vùng liên kết. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn 60) axit amin mà tạo nên liên kết linh động hoặc bán linh động giữa các vùng biến đổi và/hoặc cố định liền kề trong phân tử polypeptit đơn. Hơn nữa, đoạn gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể bao gồm homodime hoặc heterodime (hoặc các multime khác) có vùng biến đổi và vùng cố định mà được liên kết không cộng hóa trị với nhau và/hoặc liên kết với một hoặc nhiều vùng VH hoặc VL monome (ví dụ, bằng liên kết disulfua).

"Kháng thể chuột" như được sử dụng ở đây là kháng thể đơn dòng thu được từ

chuột nhất hoặc chuột cống được sản xuất theo hiểu biết và kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong quá trình sản xuất, đối tượng thử nghiệm được tiêm kháng nguyên, và sau đó tế bào lai biểu hiện kháng thể với trình tự hoặc các đặc tính chức năng mong muốn được phân lập. Nếu đối tượng tiêm thử nghiệm là chuột nhất, kháng thể tạo ra là kháng thể có nguồn gốc từ chuột nhất, và nếu đối tượng tiêm thử nghiệm là chuột cống, kháng thể được tạo ra là kháng thể có nguồn gốc từ chuột cống.

"Kháng thể khảm" là kháng thể được tạo thành bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể của loài thứ nhất (như chuột nhất) với vùng cố định của kháng thể của loài thứ hai (như người). Kháng thể khảm được tạo ra bằng cách đầu tiên tạo ra tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng của loài thứ nhất, sau đó tách dòng gen vùng biến đổi từ tế bào lai, tách dòng gen vùng cố định của kháng thể của loài thứ hai nếu cần, nối gen vùng biến đổi của loài thứ nhất và gen vùng cố định của loài thứ hai để tạo thành gen khảm, đưa gen khảm vào vectơ biểu hiện, và sau đó biểu hiện các phân tử kháng thể khảm trong hệ nhân chuẩn hoặc hệ nhân sơ. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, chuỗi nhẹ của kháng thể khảm còn bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ của các chuỗi κ và λ hoặc các biến thể của nó. Chuỗi nặng kháng thể của kháng thể khảm còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc biến thể của nó, tốt hơn là vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc biến thể vùng cố định chuỗi nặng IgG1, IgG2 hoặc IgG4 sử dụng đột biến axit amin (ví dụ, đột biến YTE, đột biến ngược, đột biến L234A và/hoặc L235A, hoặc đột biến S228P).

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người", bao gồm các kháng thể được ghép CDR, được dùng để chỉ kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR của kháng thể thu được từ động vật (ví dụ, kháng thể chuột) vào vùng khung của vùng biến đổi của kháng thể người. Kháng thể được làm tương thích với người có thể tránh được phản ứng khác loại được gây ra bởi kháng thể khảm vì nó mang một lượng lớn các thành phần protein khác loại. Các trình tự khung như vậy có thể thu được từ cơ sở dữ liệu ADN công cộng hoặc các nguồn tài liệu tham khảo đã công bố mà bao gồm các trình tự gen của kháng thể dòng mầm. Ví dụ, các trình tự ADN dòng mầm của các gen của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người có thể được tìm hiểu trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người "VBase" (sẵn có từ

<http://www.vbase2.org/>), cũng như là trong tài liệu Kabat, E. A. et al., 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. Để tránh làm giảm hoạt tính do giảm tính sinh miễn dịch, trình tự FR trong vùng biến đổi của kháng thể người có thể được gây đột biến ngược một lượng nhỏ để duy trì hoạt tính. Các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể được làm tương thích với người mà được làm trưởng thành ái lực CDR nhờ biểu hiện thể thực khuẩn.

Do các gốc tiếp xúc của kháng nguyên, việc ghép các CDR có thể dẫn đến kháng thể thu được hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có ái lực giảm với kháng nguyên do các gốc khung tiếp xúc với kháng nguyên. Các tương tác như vậy có thể là kết quả của sự siêu đột biến của các tế bào soma. Do đó, vẫn cần ghép axit amin khung cho như vậy với khung của kháng thể được làm tương thích với người. Các gốc axit amin từ kháng thể không phải của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà tham gia vào việc gắn kết với kháng nguyên có thể được xác định bằng cách kiểm tra trình tự và cấu trúc của vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng của động vật. Các gốc trong khung cho CDR mà khác với dòng mầm có thể được coi là có liên quan. Nếu dòng mầm gần nhất không thể được xác định, trình tự này có thể được so sánh với trình tự liên ứng của lớp phụ hoặc trình tự liên ứng của trình tự kháng thể động vật với tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự cao. Các gốc khung hiếm được cho là kết quả của quá trình siêu đột biến soma và do đó đóng một vai trò quan trọng trong việc gắn kết.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể còn bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ của người hoặc chuỗi κ và λ của chuột hoặc biến thể của nó, hoặc còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc của chuột hoặc biến thể của nó.

Thuật ngữ "biến thể thông thường" của vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể người và vùng cố định chuỗi nhẹ của kháng thể người được mô tả trong sáng chế được dùng để chỉ biến thể của vùng cố định chuỗi nặng hoặc vùng cố định chuỗi nhẹ thu được từ người mà đã được bộc lộ trong giải pháp đã biết và không làm thay đổi cấu trúc và chức năng của vùng biến đổi của kháng thể. Các biến thể được lấy làm ví dụ bao gồm các biến thể vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 với các cải biến trực tiếp vị trí và các thay thế axit amin của vùng cố định chuỗi nặng. Các thay thế cụ thể là, ví dụ, đột biến YTE, đột biến L234A và/hoặc L235A, đột biến

S228P, hoặc các đột biến để thu được cấu trúc núm trong lỗ (sao cho chuỗi nặng của kháng thể có dạng kết hợp núm-Fc và lỗ-Fc) đã biết trong giải pháp kỹ thuật có trước. Các đột biến này đã được khẳng định là làm cho kháng thể có các đặc tính mới, nhưng không làm thay đổi chức năng của vùng biến đổi của kháng thể.

"Kháng thể người" và "kháng thể thu được từ người" được sử dụng thay đổi cho nhau, và có thể là kháng thể thu được từ người hoặc kháng thể thu được từ sinh vật chuyển gen mà đã được "thao tác di truyền" để tạo ra kháng thể người đặc hiệu khi đáp ứng với sự kích thích kháng nguyên và có thể được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các kỹ thuật nhất định, các yếu tố gồm locut gen chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người được đưa vào các chủng tế bào trong đó locut gen chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nội sinh được phá hủy có mục tiêu. Sinh vật chuyển gen có thể tổng hợp các kháng thể người đặc hiệu với các kháng nguyên, và sinh vật này có thể được sử dụng để tổng hợp các tế bào lai tiết kháng thể người. Kháng thể người cũng có thể là kháng thể trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bằng các trình tự nucleotit có nguồn gốc từ một hoặc nhiều nguồn ADN của người. Kháng thể người đầy đủ cũng có thể được tạo thành bằng phương pháp chuyển nhiễm gen hoặc nhiễm sắc thể và công nghệ biểu hiện qua thể thực khuẩn, hoặc được tạo ra bởi các tế bào B được hoạt hóa *in-vitro*, toàn bộ các phương pháp này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

"Kháng thể đơn dòng" được dùng để chỉ kháng thể được tạo ra từ quần thể các kháng thể gần như tương đồng, tức là, các kháng thể tạo thành quần thể nhận diện cùng một epitop và/hoặc gắn kết với cùng một epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có (ví dụ, kháng thể bao gồm các đột biến có nguồn gốc trong tự nhiên hoặc các đột biến xuất hiện trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể như vậy thường có mặt với lượng nhỏ). Mỗi kháng thể đơn dòng trong chế phẩm kháng thể đơn dòng (công thức) được hướng kháng một quyết định trên kháng nguyên. Do đó, bổ ngữ "đơn dòng" chỉ đặc điểm của kháng thể khi thu được từ quần thể các kháng thể gần như tương đồng, và không được hiểu là đòi hỏi sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp sử dụng tế bào lai, phương pháp sử dụng ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện

trên thể thực khuẩn, và phương pháp sử dụng các động vật chuyển gen chứa toàn bộ hoặc một phần locut gen globulin miễn dịch của người, và các phương pháp như vậy và các phương pháp được lấy làm ví dụ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được mô tả ở đây.

Hơn nữa, mặc dù hai miền của đoạn Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, song chúng có thể được liên kết nhờ yếu tố liên kết tổng hợp bằng phương pháp tái tổ hợp, để nó có thể tạo ra chuỗi protein đơn trong đó các vùng VL và VH tạo cặp để tạo thành phân tử đơn giá (được dùng để chỉ là Fv chuỗi đơn (scFv); ví dụ, xem tài liệu, Bird et al., (1988) *Science*, 242: 423–426; và Huston et al., (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 85: 5879–5883). Các kháng thể chuỗi đơn như vậy cũng được dự định là được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Các đoạn kháng thể như vậy được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được sàng lọc tính hữu ích giống như kháng thể nguyên vẹn. Các phân gắn kết kháng nguyên có thể được tổng hợp bằng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách phân cắt hóa học hoặc bằng enzym các globulin miễn dịch nguyên vẹn.

Đoạn gắn kết kháng nguyên cũng có thể được kết hợp vào phân tử đơn chuỗi chứa một cặp đoạn Fv nối tiếp (VH-CH1-VH-CH1) mà cùng với polypeptit chuỗi nhẹ bổ sung tạo thành cặp vùng gắn kết với kháng nguyên (Zapata et al., 1995 *Protein Eng.* 8(10): 1057–1062; và patent Mỹ số US5641870).

Fab là một đoạn kháng thể có khối lượng phân tử bằng khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết với kháng nguyên, và được tạo ra bằng cách xử lý kháng thể IgG bằng papain proteaza (mà phân cắt gốc axit amin ở vị trí 224 của chuỗi H), trong đó khoảng một nửa chuỗi H ở phía đầu tận cùng N và toàn bộ chuỗi L được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua.

F(ab')₂ là một đoạn kháng thể có khối lượng phân tử khoảng 100.000 và có hoạt tính gắn kết với kháng nguyên và bao gồm hai vùng Fab được nối với nhau ở vị trí bản lề, và được tạo ra bằng cách phân cắt một phần dưới hai liên kết disulfua trong vùng bản lề IgG bằng pepsaza.

Fab' là đoạn kháng thể có khối lượng phân tử bằng khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, và được tạo ra bằng cách phân cắt liên kết disulfua trong

vùng bản lề của $F(ab')_2$ được mô tả trên đây. Fab' có thể được tạo ra bằng cách xử lý $F(ab')_2$ mà nhận diện đặc hiệu và gắn kết với kháng nguyên bằng chất khử như dithiothreitol.

Ngoài ra, Fab' có thể được biểu hiện bằng cách cài ADN mã hóa đoạn Fab' của kháng thể vào vector biểu hiện từ sinh vật nhân sơ hoặc vector biểu hiện từ sinh vật nhân chuẩn và đưa vector này vào tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn.

Thuật ngữ "kháng thể chuỗi đơn", "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" được dùng để chỉ phân tử chứa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (hoặc vùng, VH) và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc vùng, VL) được liên kết nhờ yếu tố liên kết. Các phân tử scFv như vậy có thể có công thức chung: NH_2 -VL-phân tử liên kết-VH-COOH hoặc NH_2 -VH-phân tử liên kết-VL-COOH. Các yếu tố liên kết thích hợp trong giải pháp kỹ thuật đã biết bao gồm các trình tự axit amin GGGGS lặp lại hoặc các biến thể của nó, ví dụ, 1-4 (bao gồm 1, 2, 3, hoặc 4) biến thể lặp (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444–6448). Các yếu tố liên kết khác có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong tài liệu: Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725–731; Choi et al. (2001), *Eur. J. Immuno.* 31:94–106; Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055–3061; Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41–56; và Roovers et al. (2001), *Cancer Immunother.* 50:51–59.

Kháng thể dạng dime là một đoạn kháng thể trong đó scFv được dime hóa, và là đoạn kháng thể có hoạt tính gắn kết với kháng nguyên hai giá. Ở hoạt tính gắn kết kháng nguyên hai giá, hai kháng nguyên có thể giống nhau hoặc khác nhau.

dsFv được tạo ra bằng cách liên kết các polypeptit, trong đó một gốc axit amin trong mỗi VH và VL được thay thế bằng gốc xystein thông qua các liên kết disulfua giữa các gốc xystein. Các gốc axit amin được thay thế bằng các gốc xystein có thể được chọn lọc theo các phương pháp đã biết (*Protein Engineering*, 7:697 (1994)) dựa trên dự đoán cấu trúc ba chiều của kháng thể.

Theo một vài phương án của sáng chế, đoạn gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng các bước sau: tạo ra cADN mã hóa VH và/hoặc VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận diện đặc hiệu và gắn kết với kháng nguyên và cADN mã hóa các miền mong muốn khác, tạo ra ADN mã hóa đoạn gắn kết kháng nguyên, cài ADN vào vector biểu hiện từ sinh vật nhân sơ hoặc vector biểu hiện sinh vật nhân

chuẩn, và sau đó đưa vector biểu hiện vào tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn để biểu hiện đoạn gắn kết kháng nguyên.

"Vùng Fc" có thể là vùng Fc có trình tự nguyên thể hoặc vùng Fc biến thể. Mặc dù ranh giới của vùng Fc của chuỗi nặng globulin miễn dịch có thể khác nhau, song vùng Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định là kéo dài từ gốc axit amin ở vị trí Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu carboxyl của nó. Việc đánh số các gốc trong vùng Fc là theo chỉ số EU như trong tài liệu Kabat. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. Vùng Fc của globulin miễn dịch thường có hai miền vùng cố định CH2 và CH3.

Thuật ngữ "khác biệt axit amin" hoặc "đột biến axit amin" được dùng để chỉ sự có mặt các thay đổi axit amin hoặc các đột biến axit amin trong protein hoặc polypeptit biến thể so với protein hoặc polypeptit ban đầu, bao gồm 1 hoặc nhiều hơn 1 axit amin thêm, mất hoặc thay thế trên cơ sở protein hoặc polypeptit ban đầu.

"Vùng biến đổi" của kháng thể được dùng để chỉ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) kháng thể hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) kháng thể, đơn lẻ hoặc kết hợp. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, vùng biến đổi của mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng gồm 4 vùng khung (FR) được nối với nhau bởi 3 vùng quyết định bổ sung (complementarity determining region-CDR), cũng được biết đến là vùng siêu biến. CDR trong mỗi chuỗi được giữ chặt với nhau bởi các FR và, cùng với các CDR tạo thành chuỗi khác, góp phần tạo nên vị trí gắn kết với kháng nguyên của kháng thể. Có ít nhất hai kỹ thuật để xác định các CDR: (1) phương pháp dựa trên độ biến đổi trình tự giữa các loài (tức là, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); và (2) phương pháp dựa trên các nghiên cứu tinh thể học của phức hợp kháng nguyên-kháng thể (Al-Lazikani et al., *J. Molec. Biol.* 273:927-948 (1997)). Như được sử dụng ở đây, CDR có thể được dùng để chỉ là các CDR được xác định bằng một trong hai phương pháp hoặc kết hợp cả hai phương pháp.

Thuật ngữ "khung kháng thể" hoặc FR được dùng để chỉ một phần của miền biến đổi VL hoặc VH, mà có chức năng như là khung cho các vòng gắn kết kháng nguyên (CDR) của miền biến đổi. Về cơ bản nó là miền biến đổi mà không có các

CDR.

Thuật ngữ "vùng quyết định bổ sung" hoặc CDR được dùng để chỉ một trong số 6 vùng siêu biến trong miền biến đổi của kháng thể mà chủ yếu góp phần vào việc gắn kết kháng nguyên. Nói chung, có ba CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng và ba CDR (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Các ranh giới trình tự axit amin của các CDR có thể được xác định bằng cách sử dụng sơ đồ bất kỳ trong số nhiều sơ đồ đã biết, bao gồm sơ đồ đánh số "Kabat" (tham khảo tài liệu Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), sơ đồ đánh số "Chothia" (Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001) và sơ đồ đánh số ImMunoGenTics (IMGT) (tham khảo tài liệu Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55–77(2003)), và sơ đồ tương tự. Ví dụ, đối với dạng cổ điển, theo sơ đồ đánh số Kabat, các gốc axit amin của CDR gốc axit amin trong miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được đánh số là 31-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) và 95-102(HCDR3); gốc axit amin của CDR trong miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được đánh số là 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) và 89-97(LCDR3). Theo sơ đồ Chothia, các axit amin CDR trong VH được đánh số là 26-32(HCDR1), 52-56(HCDR2) và 95-102(HCDR3); và gốc axit amin trong VL được đánh số là 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) và 89-97(LCDR3). Theo các định nghĩa về CDR bằng cách kết hợp cả sơ đồ Kabat và sơ đồ Chothia, CDR bao gồm gốc axit amin 26-35(HCDR1), 50-65(HCDR2) và 95-102(HCDR3) trong VH của người và gốc axit amin 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2) và 89-97(LCDR3) trong VL của người. Theo sơ đồ IMGT, các gốc axit amin của CDR trong VH được đánh số sơ bộ là 27-38(CDR1), 56-65(CDR2) và 105-117(CDR3), và các gốc axit amin của CDR trong VL được đánh số sơ bộ là 27-38(CDR1), 56-65(CDR2) và 105-117(CDR3). Theo sơ đồ IMGT, các CDR của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình phần mềm IMGT/DomainGap Align.

"Miền của vùng cố định của kháng thể" được dùng để chỉ miền thu được từ các vùng cố định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể, bao gồm CL và các miền CH1, CH2, CH3 và CH4 thu được từ các loại kháng thể khác nhau.

"Epitop" hoặc "quyết định kháng nguyên" được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể gắn kết đặc hiệu. Epitop thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp trong một cấu hình không gian duy nhất. Tham khảo tài liệu, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, volume 66, G.E. Morris, Ed. (1996).

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu", "gắn kết chọn lọc", "gắn kết chọn lọc với" và "gắn kết đặc hiệu với" được dùng để chỉ việc gắn kết của kháng thể với epitop trên kháng nguyên tiền định.

Thuật ngữ "ái lực" được dùng để chỉ cường độ tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên trong một epitop. Trong mỗi vị trí kháng nguyên, vùng biến đổi của "nhánh" kháng thể tương tác với kháng nguyên ở nhiều vị trí axit amin nhờ lực liên kết yếu không cộng hóa trị; tương tác càng nhiều thì ái lực càng mạnh. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái lực cao" đối với kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ, đoạn Fab) được dùng để chỉ kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có K_D nhỏ hơn hoặc bằng $1E^{-9}M$ (ví dụ, K_D nhỏ hơn hoặc bằng $1E^{-10}M$, K_D nhỏ hơn hoặc bằng $1E^{-11}M$, K_D nhỏ hơn hoặc bằng $1E^{-12}M$, K_D nhỏ hơn hoặc bằng $1E^{-13}M$ hoặc K_D nhỏ hơn hoặc bằng $1E^{-14}M$).

Thuật ngữ " K_D " hoặc " K_D " được dùng để chỉ hằng số phân ly cân bằng đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Thông thường, kháng thể gắn kết với kháng nguyên với hằng số phân ly cân bằng (K_D) nhỏ hơn khoảng $1E^{-8}M$ (ví dụ, nhỏ hơn khoảng $1E^{-9}M$, $1E^{-10}M$ hoặc $1E^{-11}M$ hoặc nhỏ hơn), ví dụ, như được xác định bằng thiết bị BIACORE nhờ kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance-SPR). Giá trị K_D càng nhỏ, ái lực càng lớn.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" được dùng để chỉ phân tử ADN và phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là phân tử ADN mạch đơn hoặc mạch kép hoặc phân tử ARN, ví dụ, ADN hoặc mARN mạch kép. Axit nucleic "được liên kết hoạt động" khi nó được đặt vào mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, trình tự khởi đầu hoặc trình tự tăng cường được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó tác động đến quá trình phiên mã của trình tự mã hóa.

Thuật ngữ "vector" có nghĩa là một cấu trúc có khả năng phân phối một hoặc

nhiều gen hoặc trình tự quan tâm và tốt hơn là biểu hiện gen hoặc trình tự này trong tế bào chủ. Ví dụ về các vector bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vector virus, vector biểu hiện ADN trần hoặc ARN, plasmid, vector cosmit hoặc thể thực khuẩn, vector biểu hiện ADN hoặc ARN kèm tác nhân ngưng tụ cation, vector biểu hiện ADN hoặc ARN được bao nang trong liposom, và các tế bào nhân chuẩn nhất định, như tế bào tổng hợp.

Các phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và các đoạn gắn kết kháng nguyên là đã biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong chương 5–8 và 15 của tài liệu *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Ví dụ, chuột có thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên hoặc đoạn của nó, và kháng thể thu được có thể được phục hồi đặc tính và tinh chế, và có thể tiến hành giải trình tự axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Các đoạn gắn kết kháng nguyên có thể được sản xuất bằng các phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên được mô tả trong sáng chế thường được thao tác di truyền để chứa một hoặc nhiều FR khác của người trong CDR không phải của người. Các trình tự dòng mầm FR của người có thể thu được bằng cách so sánh cơ sở dữ liệu gen dòng mầm của vùng biến đổi của kháng thể người IMGT bằng phần mềm MOE, hoặc có thể thu được từ tài liệu *Immunoglobulin Journal*, 2001 ISBN 012441351.

Thuật ngữ "tế bào chủ" được dùng để chỉ tế bào mà vector biểu hiện được đưa vào. Các tế bào chủ có thể bao gồm tế bào vi khuẩn, vi trùng, thực vật hoặc động vật. Vi khuẩn nhạy với sự biến nạp bao gồm các thành viên thuộc họ *Enterobacteriaceae*, như các chủng của *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; các thành viên của họ *Bacillaceae*, như *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* và *Haemophilus influenzae*. Các vi sinh vật thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. Các dòng tế bào chủ động vật thích hợp bao gồm CHO (dòng tế bào chuột hàng Trung Quốc), tế bào HEK293 (ví dụ không giới hạn bao gồm tế bào HEK293E) và tế bào NS0.

Kháng thể được thao tác di truyền hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có thể được tổng hợp và tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được tách dòng và tái tổ

hợp vào vector biểu hiện GS. Các vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định vào tế bào CHO. Theo giải pháp kỹ thuật tùy ý, hệ biểu hiện của động vật có vú có thể dẫn đến việc glycosyl hóa kháng thể, đặc biệt là ở vị trí đầu N được bảo toàn cao của vùng Fc. Các dòng ổn định được tạo ra bằng cách biểu hiện các kháng thể gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên. Các dòng dương tính có thể được nhân rộng trong môi trường không chứa huyết thanh chứa trong các bình phản ứng sinh học để sản xuất kháng thể. Môi trường nuôi cấy chứa kháng thể được tiết ra có thể được tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, ví dụ, sử dụng cột Sepharose FF protein A hoặc protein G chứa dung dịch đệm đã điều chỉnh. Các đoạn gắn kết không đặc hiệu được rửa trôi. Kháng thể gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng phương pháp gradien pH, và các đoạn kháng thể được phát hiện bằng cách sử dụng SDS-PAGE và thu gom. Kháng thể có thể được lọc và cô bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Các hỗn hợp hòa tan và các polyme cũng có thể được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường, như rây phân tử và trao đổi ion. Sản phẩm thu được cần được đông lạnh ngay, ví dụ, ở nhiệt độ -70°C , hoặc được đông khô.

Thuật ngữ "sử dụng", "việc sử dụng", "cung cấp" và "điều trị," nếu được áp dụng cho động vật, người, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, được dùng để chỉ việc cho thuốc ngoại sinh, chất điều trị, chất chẩn đoán, chế phẩm hoặc thủ thuật (ví dụ, "gây chết" trong phần ví dụ thực hiện sáng chế) tiếp xúc với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học. "Cung cấp" và "điều trị" có thể được dùng để chỉ các phương pháp điều trị, xác định được động học, chẩn đoán, nghiên cứu và thử nghiệm. Việc điều trị tế bào bao gồm cho chất phản ứng tiếp xúc với tế bào, và cho chất phản ứng tiếp xúc với dịch, trong đó dịch này được cho tiếp xúc với tế bào. "Cung cấp" và "sử dụng" cũng có nghĩa là điều trị tế bào chẳng hạn bằng chất phản ứng, chất chẩn đoán hoặc chất gắn kết, hoặc bằng tế bào khác *in vitro* hoặc *ex vivo*. "Điều trị", nếu được áp dụng cho người, thú y hoặc đối tượng nghiên cứu, được dùng để chỉ việc điều trị chữa bệnh, các biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn ngừa, các ứng dụng nghiên cứu và chẩn đoán.

"Điều trị" hoặc "việc điều trị" được dùng để chỉ việc sử dụng chất điều trị, như chế phẩm chứa hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu trong các ví dụ của sáng chế, bên trong hoặc bên ngoài bệnh nhân (hoặc đối tượng) có (hoặc nghi ngờ có hoặc nhạy

cảm với) một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh mà chất điều trị được biết đến là có tác dụng điều trị. Thông thường, chất điều trị được sử dụng với lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở bệnh nhân (hoặc đối tượng) hoặc nhóm bệnh nhân cần điều trị để làm thoái lui các triệu chứng như vậy hoặc ức chế sự tiến triển của các triệu chứng như vậy đến mức có thể đánh giá được trên lâm sàng. Lượng chất điều trị hữu hiệu để làm thuyên giảm triệu chứng cụ thể bất kỳ của bệnh (cũng được gọi là "lượng hữu hiệu để điều trị") có thể khác nhau tùy thuộc vào các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi và cân nặng của bệnh nhân (hoặc đối tượng), và khả năng được chất tạo ra tác dụng điều trị mong muốn ở bệnh nhân (hoặc đối tượng). Triệu chứng bệnh đã được làm thuyên giảm có thể được đánh giá bằng các phương pháp thử nghiệm lâm sàng bất kỳ thường được sử dụng bởi bác sĩ hoặc các chuyên gia chăm sóc sức khỏe khác để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng đó. Mặc dù các phương án theo sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc sản phẩm điều trị) có thể không có hiệu quả trong việc làm thuyên giảm toàn bộ các triệu chứng đích của bệnh, nhưng chúng cần làm giảm các triệu chứng đích của bệnh ở một số bệnh nhân có ý nghĩa thống kê, như được xác định theo các phương pháp kiểm định thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như kiểm định t Student, kiểm định chi bình phương, kiểm định U theo Mann và Whitney, kiểm định Kruskal-Wallis (kiểm định H), kiểm định Jonckheere-Terpstra và kiểm định Wilcoxon.

"Cải biến bảo toàn axit amin" hoặc "thay thế bảo toàn axit amin" có nghĩa là axit amin trong protein hoặc polypeptit được thay thế bằng các axit amin khác có các đặc điểm tương tự (như điện tích, kích thước chuỗi bên, độ kỵ nước/độ ưa nước, cấu hình khung và độ cứng), vì vậy các thay đổi có thể thường được tiến hành mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học hoặc các đặc điểm cần thiết khác (như ái lực và/hoặc tính đặc hiệu với kháng nguyên) của protein hoặc polypeptit. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng, nói chung, một thay thế axit amin đơn ở vùng không cần thiết của polypeptit hầu như không làm thay đổi hoạt tính sinh học (tham khảo tài liệu, ví dụ Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Ngoài ra, các thay thế axit amin tương tự về cấu trúc hoặc chức năng ít có khả năng phá hủy hoạt tính sinh học.

"Liên kết với IL-4R" được dùng để chỉ khả năng tương tác với IL-4R người.

Thuật ngữ "vị trí gắn kết với kháng nguyên" ở đây được dùng để chỉ vị trí không gian ba chiều được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên được mô tả ở đây.

Thuật ngữ "phản ứng chéo" được dùng để chỉ khả năng kháng thể được mô tả ở đây gắn kết với IL-4R từ các loài khác nhau. Ví dụ, kháng thể được mô tả ở đây mà gắn kết với IL-4R người cũng có thể gắn kết với IL-4R của loài khác. Mức phản ứng chéo được đo bằng cách phát hiện khả năng phản ứng đặc hiệu với các kháng nguyên đã tinh chế trong thử nghiệm gắn kết (ví dụ SPR và ELISA), hoặc bằng cách gắn kết hoặc tương tác chức năng với các tế bào mà biểu hiện sinh lý IL-4R. Các phương pháp xác định khả năng phản ứng chéo bao gồm các thử nghiệm gắn kết chuẩn như được mô tả ở đây, ví dụ phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) hoặc phép đo dòng chảy tế bào.

"Trung hòa" hoặc "phong bế" kháng thể được dùng để chỉ kháng thể gắn kết với hIL-4R dẫn đến ức chế hoạt tính sinh học của hIL-4 và/hoặc hIL-13. Ức chế hoạt tính sinh học của hIL-4 và/hoặc IL-13 như vậy có thể được đánh giá bằng cách đo một hoặc nhiều chỉ số hoạt tính sinh học của hIL-4 và/hoặc hIL-13 đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như hoạt hóa tế bào được cảm ứng bởi hIL-4 và/hoặc hIL-13 và gắn kết hIL-4 với hIL-4R (tham khảo tài liệu, CN103739711A). Thuật ngữ "ức chế sự phát triển" (ví dụ khi được dùng để chỉ các tế bào) được dự định là bao gồm việc làm giảm sự phát triển tế bào có thể đo được.

Thuật ngữ "gây đáp ứng miễn dịch" và "tăng cường đáp ứng miễn dịch" có thể được sử dụng thay đổi cho nhau và được dùng để chỉ sự kích thích (tức là, thể thụ động hoặc có khả năng thích nghi) của đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên cụ thể. Thuật ngữ "cảm ứng" đặc hiệu đối với việc cảm ứng CDC hoặc ADCC được dùng để chỉ việc kích thích cơ chế đặc hiệu tiêu diệt tế bào trực tiếp.

"Khả năng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-ADCC)" có nghĩa là tế bào biểu hiện thụ thể Fc tiêu diệt trực tiếp tế bào đích được phủ kháng thể nhờ sự nhận diện đoạn Fc của kháng thể. Chức năng tác động ADCC của kháng thể có thể được làm giảm hoặc được loại bỏ bằng cách cải biến đoạn Fc của IgG. Cải biến được dùng để chỉ đột biến trong vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể, như đột biến được chọn từ nhóm bao

gồm N297A, L234A và L235A của IgG1; thể khảm IgG2/4, F235E của IgG4, và đột biến L234A/E235A.

Kháng thể được thao tác di truyền hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có thể được tổng hợp và tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được tách dòng và tái tổ hợp vào vector biểu hiện GS. Các vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định vào tế bào CHO. Trình tự của kháng thể được làm tương thích với người được mô tả ở đây được cài vào vector biểu hiện tương ứng nhờ sử dụng kỹ thuật tách dòng phân tử, và kháng thể được làm tương thích với người tương ứng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng hệ biểu hiện tế bào HEK293 để biểu hiện và tổng hợp. Như được khuyến cáo nhiều hơn trong giải pháp kỹ thuật đã biết, hệ biểu hiện của động vật có vú có thể dẫn đến việc glycosyl hóa kháng thể, đặc biệt là ở vị trí đầu N được bảo toàn cao của vùng FC. Các dòng ổn định được tạo ra bằng cách biểu hiện các kháng thể gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên thu được từ người. Các dòng dương tính có thể được nhân rộng trong môi trường không chứa huyết thanh chứa trong các bình phản ứng sinh học để sản xuất kháng thể. Môi trường nuôi cấy có kháng thể tiết ra có thể được tinh chế và thu gom bằng các kỹ thuật thông thường. Kháng thể có thể được lọc và cô bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Các hỗn hợp hòa tan và các polyme cũng có thể được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường, như rây phân tử và trao đổi ion. Sản phẩm thu được cần được đông lạnh ngay, ví dụ, ở nhiệt độ -70°C , hoặc được đông khô.

"Lượng hữu hiệu" hoặc "liều hữu hiệu" được dùng để chỉ lượng thuốc, hợp chất hoặc được phẩm cần để thu được một hoặc nhiều kết quả điều trị có lợi hoặc mong muốn. Đối với các ứng dụng phòng ngừa, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm làm thuyên giảm hoặc làm giảm nguy cơ, làm giảm mức độ nặng, hoặc làm chậm sự khởi phát bệnh, bao gồm các dấu hiệu sinh hóa, mô học và/hoặc hành vi của bệnh, các biến chứng của nó, và các kiểu hình bệnh học trung gian mà xuất hiện trong quá trình tiến triển bệnh. Đối với các ứng dụng điều trị, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm các kết quả lâm sàng, như làm giảm tỷ lệ mắc các rối loạn khác nhau có liên quan đến kháng nguyên đích theo sáng chế hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn, làm giảm liều dùng của các chất khác cần để điều trị rối loạn, tăng

cường tác dụng điều trị của chất khác, và/hoặc làm chậm sự tiến triển của các rối loạn ở bệnh nhân (hoặc đối tượng) có liên quan đến kháng nguyên đích theo sáng chế.

"Ngoại sinh" được dùng để chỉ các chất được tổng hợp bên ngoài sinh vật, tế bào hoặc cơ thể người tùy theo các tình huống.

"Nội sinh" được dùng để chỉ các chất được tổng hợp trong tế bào, sinh vật, hoặc cơ thể người tùy theo các tình huống.

Thuật ngữ "phân lập" được dùng để chỉ một trạng thái đã tinh chế, và trong trường hợp này có nghĩa là một phân tử được chỉ rõ hầu như không có các phân tử sinh học khác, ví dụ axit nucleic, protein, lipid, cacbohydrat, hoặc các nguyên liệu khác, (như mảnh vỡ tế bào và môi trường nuôi cấy). Nói chung, thuật ngữ "phân lập" không có nghĩa là không có mặt hoàn toàn các chất này hoặc không có mặt nước, dung dịch đệm, hoặc muối, trừ phi chúng có mặt với lượng mà hầu như làm ảnh hưởng đến việc sử dụng hợp chất để thử nghiệm hoặc điều trị như được mô tả ở đây.

"Tính tương đồng" hoặc "tính đồng nhất" được dùng để chỉ tính tương đồng trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai trình tự polypeptit. Nếu các vị trí trong hai trình tự cần so sánh được chiếm giữ bởi cùng một tiểu đơn vị monome axit amin hoặc bazơ, ví dụ nếu mỗi vị trí của hai phân tử ADN bị chiếm giữ bởi adenin, thì các phân tử này là tương đồng ở vị trí đó. Tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự là một hàm số các vị trí bất cặp hoặc tương đồng có chung bởi hai trình tự chia cho số vị trí được so sánh nhân với 100%. Ví dụ, nếu 6 trong số 10 vị trí được bất cặp hoặc tương đồng khi hai trình tự được sắp thẳng hàng tối ưu, thì hai trình tự này tương đồng 60%. Nói chung, nếu hai trình tự được sắp thẳng hàng, tiến hành so sánh để thu được tỷ lệ phần trăm tương đồng tối đa. "Ít nhất 85% trình tự đồng nhất" được mô tả ở đây có nghĩa là nếu biến thể và trình tự gốc được sắp thẳng hàng, thì hai trình tự ít nhất tương đồng 85%; theo một số phương án, hai trình tự này tương đồng ít nhất 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%; theo một số phương án cụ thể, hai trình tự này tương đồng 90%, 95% hoặc 99% hoặc hơn 99%; theo các phương án cụ thể khác, hai trình tự tương đồng ít nhất 95%. Trình tự axit amin có ít nhất mức tương đồng trình tự ít nhất là 85% được tạo ra bằng cách bớt, thêm hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin trong trình tự gốc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào," "dòng tế bào," và "chủng nuôi cấy

tế bào" được sử dụng thay đổi cho nhau và tất cả các thuật ngữ này bao gồm cả thể hệ con. Do đó, các thuật ngữ "tế bào biến nạp" và "tế bào đã biến nạp" bao gồm các tế bào thử nghiệm và các chủng nuôi cấy sơ cấp thu được từ đó bất kể số lần cấy chuyển. Cần hiểu rằng toàn bộ các thể hệ con có thể không giống nhau hoàn toàn về lượng ADN do các đột biến chủ ý hoặc không chủ ý. Thể hệ con đột biến có cùng hoạt tính sinh học hoặc chức năng như được sàng lọc trong các tế bào đã biến nạp ban đầu được bao gồm.

Thuật ngữ "tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc tình huống được mô tả ngay sau đó có thể, nhưng không nhất thiết, xảy ra, và bản mô tả này bao gồm các trường hợp mà sự kiện hoặc tình huống này xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, "tùy ý bao gồm 1 đến 3 vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể" có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có trình tự cụ thể có thể có mặt nhưng không nhất thiết phải có mặt.

Quy trình bào chế được phẩm (chế phẩm) chứa kháng thể được lấy làm ví dụ:

Bước 1: Một lượng nhất định của dung dịch kháng thể kháng IL-4R đã tinh chế được trao đổi dung môi (tốt hơn là siêu lọc) bằng dung dịch không chứa kháng thể; ít nhất 6 lần thể tích được trao đổi bằng màng siêu lọc, và kháng thể được cô đến nồng độ nhất định. Một thể tích nhất định của dung dịch cái chứa các nguyên liệu bổ trợ khác được bổ sung, và hỗn hợp này được pha loãng bằng dung dịch đệm để thu được nồng độ cần thiết của kháng thể và mỗi nguyên liệu bổ trợ và được trộn kỹ. Dung dịch gốc được lọc và sau đó được lấy mẫu kiểm soát trung tâm và được thử độ vô trùng. Dung dịch gốc được cho đi qua màng lọc PVDF có kích thước lỗ lọc bằng 0,22 μm và dịch lọc được thu gom.

Bước 2: Điều chỉnh lượng nạp đến 2,15 mL, dịch lọc được nạp vào lọ có dung tích 2 mL, và đóng nút, và tiến hành lấy mẫu kiểm soát trung tâm lúc ban đầu, lúc giữa và khi kết thúc quá trình nạp để phát hiện sự chênh lệch của thể tích nạp.

Bước 3: Máy đóng nắp được khởi động để đóng nắp nhôm và tiến hành đóng nắp.

Bước 4: Tiến hành kiểm tra bằng mắt thường để khẳng định rằng sản phẩm không có khuyết tật, như nạp không chính xác. Các nhãn lọ được in và dán; các nhãn hộp các tông được in, hộp các tông được gấp, tiến hành đóng gói, và nhãn hộp các

tông được dán.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây minh họa thêm cho sáng chế, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này. Các phương pháp được lấy làm ví dụ trong các ví dụ thực hiện sáng chế trong đó các điều kiện cụ thể không được chỉ rõ thường được tiến hành trong các điều kiện thông thường như *Antibodies: A Laboratory Manual* and *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* by Cold Spring Harbor Laboratory, hoặc trong các điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất nguyên liệu thô hoặc nhà sản xuất hàng hóa. Các chất phản ứng mà không có nguồn gốc cụ thể được chỉ ra là các chất thông thường có nguồn gốc trên thị trường.

Các ví dụ về quy trình sản xuất kháng thể

Ví dụ 1: Gây miễn dịch chuột và phát hiện

Protein tái tổ hợp IL-4R người được gắn đuôi his (h-IL-4R-his), protein tái tổ hợp IL-4R chuột được gắn đuôi his (m-IL-4R-his) và protein tái tổ hợp IL-4R khỉ zerut được gắn đuôi his (IL-4R zerut-his) được tổng hợp bởi Acrobiosystems, được biểu hiện bởi tế bào HEK293 và được tinh chế.

Protein tái tổ hợp IL-4R người được gắn đuôi Fc được làm tương thích với người (h-IL-4R-Fc) được tự thiết kế, biểu hiện và tinh chế. Các protein đã tinh chế được sử dụng trong các thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ sau.

Các gốc axit amin CDR của các vùng VL và VH của các kháng thể hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên trong ví dụ này tương ứng với sơ đồ đánh số Kabat đã biết (LCDR 1–3, HCDR 2–3) và sơ đồ đánh số AbM (HCDR1) về số lượng và vị trí.

Bảng 1. Thông tin về chất sinh miễn dịch

Tên	Đầu và cuối trình tự axit amin	Số cơ sở dữ liệu/số Catalo
h-IL-4R-his	Met26-His232	NP_000409.1
m-IL-4R-his	Ile26-Arg233	NP_001008700
IL-4R zerut-his	Met26-Arg232	G7Q0S7
h-IL-4R-Fc	Met1-His232	NP_000409.1

Các kháng thể đơn dòng kháng IL-4R người được tạo ra bằng cách gây đột biến chuột. Chuột là chuột C57BL/6 thử nghiệm, cái, 6–8 tuần tuổi (Joinn Laboratories (Suzhou) New Drug Research Center Co., Ltd., số giấy phép sản xuất động vật: 201503052).

Môi trường nuôi: Loại SPF. Chuột sau khi được mua về được nuôi trong môi trường phòng thí nghiệm trong 1 tuần, với chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ 20-25°C, độ ẩm 40-60%. Chuột đã thích nghi với môi trường được chia vào 3 chuồng, mỗi chuồng 5 con. Kháng nguyên miễn dịch là protein tái tổ hợp IL-4R người được gắn đuôi Fc (h-IL4R-Fc ở nồng độ 0,73 mg/mL). Tá được Freund (Sigma, Cat#: F5881) được sử dụng để nhũ hóa, trong đó tá được đầy đủ Freund (CFA, Pierce, Cat# 77140) được sử dụng để gây miễn dịch sơ bộ, và tá được axit nucleic (CpG, Sangon Biotech (Shanghai)) và tá được nhôm (Alum, Thermo Cat# 77161) dùng cho các lần gây miễn dịch tăng cường còn lại.

Vào ngày 0, 70 µg kháng nguyên đã nhũ hóa được tiêm trong màng bụng (IP) ở mỗi con chuột. Vào các ngày 14, 28, 42, 56 và 77, việc tiêm kháng nguyên ở lưng và trong màng bụng (mỗi lần tiêm 0,1 mL) được tiến hành dựa trên khối u ở lưng và sung ở bụng. Máu được thu gom vào các ngày 21, 35, 49, 63 và 84 để xét nghiệm máu, và huyết thanh của chuột được xét nghiệm bằng phương pháp ELISA nêu trong ví dụ 2 để xác định hiệu giá kháng thể trong huyết thanh chuột. Sau khi gây miễn dịch lần thứ tư, tiến hành dung hợp tế bào lá lách ở chuột trong đó hiệu giá kháng thể là cao và có xu hướng ổn định trong huyết thanh. Tiến hành gây miễn dịch tăng cường 3 ngày trước khi dung hợp, và 10 µg dung dịch kháng nguyên được bào chế với dung dịch đệm phosphat được tiêm trong màng bụng (IP) ở mỗi chuột. Các tế bào lympho lách và tế bào u tủy, tế bào Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™), được dung hợp bằng quy trình dung hợp qua trung gian PEG được tối ưu hóa để tạo ra được các tế bào lai.

Ví dụ 2: Thử nghiệm ELISA và sàng lọc kháng thể

1. Thử nghiệm gắn kết ELISA:

Thử nghiệm ELISA được sử dụng để phát hiện các đặc tính gắn kết của kháng thể kháng IL-4R. Vi đĩa được phủ protein tái tổ hợp IL-4R được gắn đuôi his. Sau khi kháng thể được bổ sung vào mỗi lỗ, hoạt tính gắn kết kháng thể với kháng nguyên được phát hiện bằng cách bổ sung kháng thể thứ cấp (kháng thể Fc kháng kháng thể sơ

cấp được liên hợp với HRP) và cơ chất TMB cho HRP.

Protein IL-4R người hoặc khỉ zerut-his được phủ trên vi đĩa có 96 lỗ, 100 μ L mỗi lỗ ở nồng độ 0,5 μ g/mL, và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa ở nồng độ 250 μ L mỗi lỗ. Dung dịch phong bế được bổ sung ở nồng độ 200 μ L mỗi lỗ và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa ở nồng độ 250 μ L mỗi lỗ. Kháng thể kháng IL-4R cần thử nghiệm được pha loãng trong chất pha loãng được bổ sung ở nồng độ 100 μ L mỗi lỗ. Đĩa được ủ ở nhiệt độ trong 1 giờ. Đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa ở nồng độ 250 μ L mỗi lỗ. Kháng thể thứ cấp dê kháng IgG người được pha loãng ở nồng độ 1:20000 bằng chất pha loãng được bổ sung với lượng 100 μ L mỗi lỗ. Đĩa được ủ ở nhiệt độ trong 1 giờ. Đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa ở nồng độ 250 μ L mỗi lỗ. TMB được bổ sung với lượng 100 μ L mỗi lỗ, và hỗn hợp được cho phản ứng trong 15 phút trong bóng tối. Axit sulfuric 0,16 M/L được bổ sung với lượng 50 μ L mỗi lỗ. Giá trị OD được đọc ở bước sóng 450 nm bằng thiết bị đọc vi đĩa Thermo MultiSkanFc và giá trị EC₅₀ gắn kết của kháng thể kháng IL-4R với IL-4R được tính toán.

2. Thử nghiệm phong bế ELISA:

Trong thử nghiệm này, bằng thử nghiệm phong bế *in vitro*, đã phát hiện được sự phong bế gắn kết của IL-4R người với IL-4 người bằng kháng thể kháng IL-4R người. Cụ thể là, protein tái tổ hợp IL-4R được gắn đuôi Fc được phủ trên vi đĩa có 96 lỗ, kháng thể gắn kết với IL-4R người sau đó được bổ sung để gắn kết hoàn toàn và chiếm giữ epitop, và sau đó IL-4 (Biolegend, Cat# 574004) được bổ sung. Kháng thể kháng IL-4 được liên hợp với biotin và Neutravidin-HRP (Pierce, Cat# 31001) được sử dụng để phát hiện liệu IL-4 có thể vẫn gắn kết với IL-4R, và giá trị IC₅₀ của sự phong bế liên kết IL-4/IL-4R bằng kháng thể IL-4R được tính toán.

Protein IL-4R người-Fc được phủ trên vi đĩa có 96 lỗ, 100 μ L mỗi lỗ ở nồng độ 0,5 μ g/mL, và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa ở nồng độ 250 μ L mỗi lỗ. Dung dịch phong bế được bổ sung ở nồng độ 200 μ L mỗi lỗ và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa ở nồng độ 250 μ L mỗi lỗ. Kháng thể kháng IL-4R cần thử nghiệm được pha loãng trong chất pha loãng được bổ sung với lượng 100 μ L mỗi lỗ, và đĩa được ủ ở

nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa ở nồng độ 250 μL mỗi lỗ. IL-4 đã pha loãng được bổ sung với lượng 100 μL mỗi lỗ, và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó được rửa ba lần. Kháng thể kháng IL-4 được liên hợp với biotin đã pha loãng được bổ sung với lượng 100 μL mỗi lỗ, và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó rửa ba lần. Neutravidin được đánh dấu HRP được pha loãng trong chất pha loãng ở tỷ lệ 1:5000 được bổ sung, và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa ở nồng độ 250 μL mỗi lỗ. TMB được bổ sung với lượng 100 μL mỗi lỗ, và hỗn hợp được cho phản ứng trong 15 phút trong bóng tối. Axit sulfuric 0,16 M/L được bổ sung với lượng 50 μL mỗi lỗ. Giá trị OD được đọc ở bước sóng 450 nm bằng thiết bị đọc vi đĩa Thermo MultiSkanFc và giá trị IC_{50} phong bế sự gắn kết của IL-4R với IL-4 bằng kháng thể IL-4R được tính toán.

Ví dụ 3: Thử nghiệm hoạt tính gắn kết kháng thể với IL-4R người ở tế bào mang gen báo cáo

Các tế bào HEK-Blue IL-4 được mua từ Invivogen (Cat# hkb-stat6), và các tế bào được chuyển nhiễm ổn định gen IL-4R của người và bộ gen SEAP qua trung gian STAT6. Do đó, mức hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu IL-4R có thể được xác định bằng cách phát hiện lượng SEAP tiết ra trong dịch nuôi bằng QUANTI-Blue, cơ chất của SEAP.

Trong thử nghiệm này, hoạt tính tế bào *in vitro* của kháng thể IL-4R được đánh giá theo IC_{50} bằng cách phát hiện sự hoạt hóa của các tế bào HEK-Blue IL-4.

Các tế bào HEK-Blue IL-4 được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% FBS, 100 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin (Invivogen, Cat# ant-zn-05) và 10 $\mu\text{g/mL}$ Blasticidin (Invivogen, Cat # ant-bl-05), và cấy chuyển 2–3 lần một tuần với tỷ lệ cấy chuyển là 1:5 hoặc 1:10. Trong quá trình cấy chuyển, môi trường được loại bỏ bằng cách hút bằng pipet, và lớp tế bào được rửa bằng 5 mL trypsin 0,25%. Sau đó trypsin được loại bỏ bằng cách hút pipet, các tế bào được phân giải trong tủ ủ trong 3–5 phút, và sau đó môi trường mới được bổ sung để tái huyền phù tế bào. 100 μL huyền phù tế bào được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ ở mật độ 5×10^5 tế bào/mL, và môi trường nuôi cấy là DMEM chứa 10% FBS, 100 $\mu\text{g/mL}$ Zeoxin và 30 $\mu\text{g/mL}$ Blasticidin. Chỉ 100 μL nước vô trùng được bổ sung vào các lỗ ngoại biên của đĩa có 96 lỗ. Đĩa được ủ

trong tủ ủ trong 24 giờ (37°C, 5% CO₂). Sau khi tế bào bám vào thành, kháng thể đã pha loãng liên tiếp cần thử nghiệm được bổ sung với lượng 100 µL mỗi lỗ. Đĩa được ủ trong tủ ủ trong 20–24 giờ (37°C, 5% CO₂). Sau đó 20 µL dịch nổi tế bào được lấy ra từ mỗi lỗ cho vào đĩa đáy bằng mới 96 lỗ, 180 µL dung dịch cơ chất QUANTI-Blue được bổ sung, và đĩa được ủ trong tủ ủ trong 1–3 giờ trong bóng tối. Mức hấp thụ ở bước sóng 620 nm được đo bằng thiết bị đọc vi đĩa (Thermo MultiSkanFc).

Ví dụ 4: Ức chế sự tăng sinh của các tế bào TF-1 bằng các kháng thể gắn kết với IL-4R người

Các tế bào TF-1 (ATCC CRL-2003) là các tế bào u lympho biểu hiện IL-4R và nhạy với các xytokin như IL-4/IL-13. IL-4 có thể kích thích các tế bào TF-1 tăng sinh khi không có mặt GM-CSF. Trong thử nghiệm này, hoạt tính trung hòa của các kháng thể kháng IL-4R khác nhau được so sánh bằng cách bổ sung các kháng thể trung hòa để phong bế con đường hoạt động của IL-4 và ức chế sự tăng sinh của các tế bào TF-1.

Các tế bào TF-1 được nuôi cấy trong môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS và 2 ng/mL GM-CSF (R&D, Cat# 215-GM-010), và được cấy chuyển 2–3 lần một tuần với tỷ lệ cấy chuyển bằng 1:10. 100 µL huyền phù tế bào được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ ở mật độ 2×10^5 tế bào/mL, môi trường nuôi cấy là môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS. Chỉ 100 µL nước vô trùng được bổ sung vào các lỗ ngoại biên của đĩa có 96 lỗ. 50 µL kháng thể đã pha loãng liên tiếp cần thử nghiệm và 50 µL IL-4 (R&D, Cat# 204-IL-050) ở nồng độ cuối bằng 0,7 ng/mL được bổ sung vào mỗi lỗ, và đĩa nuôi cấy được ủ trong tủ ủ trong 72 giờ (37°C, 5% CO₂). Sau khi nuôi cấy xong, sự tăng sinh tế bào được phát hiện bằng cách sử dụng kit CTG (Promega, Cat# G7572).

Ví dụ 5: Ái lực gắn kết *in vitro* và thử nghiệm động học

Ái lực của kháng thể được làm tương thích với người kháng IL-4R cần thử nghiệm đối với IL-4R của người được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Biacore, GE.

Kháng thể bắt giữ kháng thể người được liên kết cộng hóa trị với chip cảm biến sinh học CM5 của thiết bị Biacore (Biacore X100, GE) theo phương pháp được mô tả trong hướng dẫn sử dụng kit bắt giữ kháng thể người (Cat# BR-1008-39, GE), và do đó một lượng nhất định kháng thể cần thử nghiệm được bắt giữ dựa trên ái lực. Sau đó

một dãy các gradien nồng độ của các kháng nguyên IL-4R (toàn bộ các kháng nguyên IL-4R được mua từ Acrobiosystems, Cat# ILR-H5221) được cho chảy qua bề mặt của chip, và thiết bị Biacore (Biacore X100, GE) được sử dụng để phát hiện các dấu hiệu phản ứng trong thời gian thực để thu được các đường cong gắn kết và phân ly. Sau mỗi chu kỳ phân ly được kết thúc, chip sinh học được rửa và tái tạo bằng dung dịch tái tạo được điều chế trong kit bắt giữ kháng thể người. Kit liên kết amino được sử dụng trong thử nghiệm này được mua từ tập đoàn GE (Cat# BR-1000-50, GE), và dung dịch đệm là dung dịch đệm HBS-EP+ 10× (Cat# BR-1006-69, GE) đã pha loãng đến nồng độ 1× (pH 7,4) bằng nước khử ion.

Số liệu thu được từ thử nghiệm này được khớp với phần mềm đánh giá BiacoreX100 phần mềm 2.0 GE với mô hình gắn kết (1:1) để thu được các giá trị ái lực.

Ví dụ 6: Các trình tự kháng thể và sản xuất kháng thể

Dựa trên thử nghiệm gắn kết ELISA (liên kết ELISA của IL-4R người-his) và thử nghiệm phong bế ELISA (phong bế ELISA IL-4 người/IL-4R) như được mô tả trên đây trong ví dụ 2, thử nghiệm ức chế hoạt hóa các tế bào HEK293-Blue IL-4 trong điều kiện kích thích IL-4 trong ví dụ 3 và thử nghiệm ức chế sự tăng sinh của các tế bào TF-1 trong điều kiện kích thích IL-4 trong ví dụ 4, hai chủng tế bào lai đơn dòng thể hiện hoạt tính *in vitro* tốt nhất được chọn. Các kết quả của thử nghiệm hoạt tính được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Các kết quả của thử nghiệm hoạt tính của các chủng tế bào lai

Tế bào lai	ELISA (EC ₅₀) (ng/mL)			ELISA IC ₅₀ để phong bế IL-4/IL-4R người (ng/mL)	IC ₅₀ để phong bế sự gắn kết của tế bào HEK293-Blue IL-4 (với IL-4) (ng/mL)	IC ₅₀ để ức chế sự tăng sinh có liên quan đến IL-4 của các tế bào TF-1 (ng/mL)
	IL-4R người-his	IL-4R khí-his	IL-4R chuột-his			
25G7	3,319	Không gắn kết	Không gắn kết	8,132	0,9749	51,26
7B10	45,78	Không gắn kết	Không gắn kết	29,86	79,76	418,1
Dupilumab	27,62	Không gắn kết	Không gắn kết	52,08	5,069	102,2

Các chủng tế bào lai đơn dòng 25G7 và 7B10 được chọn, và các trình tự kháng thể được tách dòng từ đó. Tách dòng trình tự từ tế bào lai là như sau.

Các tế bào lai ở pha phát triển logarit được thu gom, và ARN được chiết ra bằng cách sử dụng Trizol (Invitrogen, 15596-018) (theo các trình tự trong hướng dẫn sử dụng kit) và được phiên mã ngược (PrimeScript™ Reverse Transcriptase, Takara, cat# 2680A). cADN thu được bằng cách phiên mã ngược được khuếch đại bằng phản ứng PCR nhờ bộ môi-Ig chuột nhắt (Novagen, TB326 Rev.B 0503) và sau đó được gửi đến cơ quan giải trình tự để giải trình tự, và các trình tự kháng thể thu được được phân tích.

Các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 25G7 là như sau:

25G7 HCVR

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEW
VAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNANKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCTRGNKR
GFFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 1)

25G7 LCVR

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCNASSSVSYMYWYQRKPRSSPKPWIYL
TSNLAGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISSEMEAEADAATYYCQQWRSNPPMLTFGSGT
KLEVK (SEQ ID NO: 2)

Các trình tự CDR nằm trong kháng thể này được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Các trình tự CDR của kháng thể đơn dòng 25G7

Tên	Trình tự	Số
HCDR1	GFTFSDYGMH	SEQ ID NO: 3
HCDR2	FISSGSSIIYYADIVKG	SEQ ID NO: 4
HCDR3	GNKRGFFDY	SEQ ID NO: 5
LCDR1	NASSSVSYMY	SEQ ID NO: 6
LCDR2	LTSNLAG	SEQ ID NO: 7
LCDR3	QQWRSNPPMLT	SEQ ID NO: 8

Các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 7B10 là như sau:

7B10 HCVR

QVQLQQPGTELLKPGASVSLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEW
IGLIHPNSDITTKFSENFKTRATLTIDKSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYYCAKSKIITT
IVARHWYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 9)

7B10 LCVR

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCKASQSVDYGGDSYMNWYQQKLGQPPK
VLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDVATYYCQHSNENPPTFGG
GTKLEIK (SEQ ID NO: 10)

Các trình tự CDR nằm trong kháng thể này được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Các trình tự CDR của kháng thể đơn dòng 7B10

Tên	Trình tự	Số
HCDR1	GYTFTSYWMH	SEQ ID NO: 11
HCDR2	LIHPNSDITTKFSENFKT	SEQ ID NO: 12
HCDR3	SKIITTIVARHWYFDV	SEQ ID NO: 13
LCDR1	KASQSVDYGGDSYMN	SEQ ID NO: 14
LCDR2	AASNLES	SEQ ID NO: 15
LCDR3	QHSNENPPT	SEQ ID NO: 16

Các trình tự vùng biến đổi thu được được liên kết với trình tự vùng cố định của người để tạo ra trình tự kháng thể khảm người-chuột. Trình tự của kháng thể khảm được cài vào vector biểu hiện tương ứng nhờ các kỹ thuật tách dòng phân tử. Các kháng thể khảm người-chuột 25G7-C và 7B10-C được tạo ra nhờ hệ biểu hiện tế bào HEK293.

Các kháng thể khảm đã tinh chế được thử nghiệm hoạt tính *in vitro* của chúng bằng các phương pháp được mô tả trong các ví dụ 2–5 trên đây, và số liệu được thể hiện trong bảng 5. Các kết quả chỉ ra rằng kháng thể 25G7-C tốt hơn đáng kể so với kháng thể đối chứng dupilumab (được tổng hợp có dựa vào tài liệu WHO Drug Information, Vol. 26, No. 4, 2012) cả hai kháng thể đều phong bế sự gắn kết IL-4 và ức chế sự tăng sinh tế bào.

Bảng 5. Thử nghiệm hoạt tính *in vitro*

Các kháng thể	Gắn kết ELISA của IL-4R người-hi s (EC ₅₀)	Gắn kết ELISA của IL-4R khi-his (EC ₅₀)	Phong bế ELISA IL-4 người/IL-4R (IC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế sự liên kết của các tế bào HEK293-Blue IL-4	Ức chế sự tăng sinh có liên quan đến IL-4 của các tế bào	K _D (nM) (Biacore)
---------------	--	---	---	--	--	-------------------------------

	(ng/mL)	(ng/mL)		(với IL-4) (IC ₅₀) (ng/mL)	TF-1 (IC ₅₀) (ng/mL)	
25G7-C	9,094	Không gắn kết	39,69	2,025	20,27	0,725
7B10-C	11,83	Không gắn kết	162,3	9,034	46,43	0,278
Dupilum ab	55,84	Không gắn kết	209,4	3,235	207,2	0,126

Ví dụ 7: Thử nghiệm làm tương thích với người của kháng thể chuột

Các kháng thể chuột thu được 25G7 và 7B10 được làm tương thích với người. Trên cơ sở cấu trúc điển hình của kháng thể chuột VH/VLCADR thu được, các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được so sánh với cơ sở dữ liệu Germine của kháng thể người để thu được khuôn mẫu dòng mầm có tính tương đồng cao. Vùng khung chuỗi nhẹ dòng mầm của người thu được từ các gen chuỗi nhẹ κ của người, tốt hơn là các khuôn mẫu chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 22, đối với kháng thể 25G7) và IGKV2D-29*01 (SEQ ID NO: 24, đối với kháng thể 7B10). Vùng khung chuỗi nặng dòng mầm của người được thu từ chuỗi nặng của người, tốt hơn là các khuôn mẫu chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01 (SEQ ID NO: 21, đối với kháng thể 25G7) và IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 23, đối với kháng thể 7B10).

Các trình tự của các khuôn mẫu dòng mầm của người được thể hiện dưới đây.

Khuôn mẫu chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV3-48*01:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV
SYISSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ
ID NO: 21)

Khuôn mẫu chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV3-11*01:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYD
ASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWP (SEQ ID NO:
22)

Khuôn mẫu chuỗi nặng dòng mầm của người IGHV1-2*02:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLE
WMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR

(SEQ ID NO: 23)

Khuôn mẫu chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV2D-29*01:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQ
LLIYEVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLP (SEQ
ID NO: 24)

Các vùng CDR của kháng thể chuột được ghép vào khuôn mẫu được làm tương thích với người được chọn và sau đó được tái tổ hợp với các vùng cố định IgG, và sau đó tiến hành đột biến ngược để thu được loạt phân tử được làm tương thích với người.

hu7B10-VH-a, hu7B10-VH-b và hu7B10-VH-c được cải biến hiệu lực của thuốc, và vị trí thứ nhất của khuôn mẫu chuỗi nặng dòng mầm của người được thay đổi từ Q sang E. Các trình tự của các vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người của hai kháng thể nêu trong SEQ ID NO: 25-27 và SEQ ID NO: 31-33, tương ứng; các trình tự của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 28-30 và SEQ ID NO: 34-36, tương ứng.

hu25G7-VH-a:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDYGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSIIYYADIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNK
RGFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)

hu25G7-VH-b:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDYGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSIIYYADIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNK
RGFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)

hu25G7-VH-c:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDYGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNK
RGFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)

hu25G7-VL-a:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYLT
SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO: 28)

hu25G7-VL-b:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLIYLT
 SNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTK
 VEIK (SEQ ID NO: 29)

hu25G7-VL-c:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRPWIYLT
 SNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTK
 VEIK (SEQ ID NO: 30)

hu7B10-VH-a:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE
 WMGLIHPNSDTTKFSENFKTRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARS
 KIITTIVARHWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 31)

hu7B10-VH-b:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE
 WMGLIHPNSDTTKFSENFKTRVTMTIDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAKSK
 IITTIVARHWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 32)

hu7B10-VH-c:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE
 WMGLIHPNSDTTKFSENFKTRVTLIDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAKSK
 IITTIVARHWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 33)

hu7B10-VL-a:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYGGDSYMNWYLQKPGQPP
 QLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTF
 GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)

hu7B10-VL-b:

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYGGDSYMNWYLQKPGQPPQ
 LLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFG
 GGTKVEIK (SEQ ID NO: 35)

hu7B10-VL-c:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYGGDSYMNWYLQKPGQPP
 QLLIYAASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFG
 GGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)

Thiết kế đột biến ngược của dòng tế bào lai 25G7 được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Chọn lọc khuôn mẫu và thiết kế đột biến ngược

25G7-VL		25G7-VH	
hu25G7-VL-a	Được ghép	hu25G7-VH-a	S49A
hu25G7-VL-b	F71Y	hu25G7-VH-b	S49A, A93T
hu25G7-VL-c	L46P, L47W, F71Y	hu25G7-VH-c	S49A, F67S, A93T

Lưu ý: các vị trí axit amin để gây đột biến ngược được xác định bằng cách sử dụng sơ đồ đánh số Kabat.

Thiết kế đột biến ngược của dòng tế bào lai 7B10 được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7. Chọn lọc khuôn mẫu và thiết kế đột biến ngược

7B10-VL		7B10-VH	
hu7B10-VL-a	Được ghép	hu7B10-VH-a	Được ghép
hu7B10-VL-b	M4L	hu7B10-VH-b	R71I, R94K
hu7B10-VL-c	V58I	hu7B10-VH-c	M69L, R71I, T73K, R94K

Lưu ý: các vị trí axit amin để gây đột biến ngược được xác định bằng cách sử dụng sơ đồ đánh số Kabat.

Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đầy đủ tương ứng của kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ hu25G7 (sử dụng chuỗi nặng VH-c và chuỗi nhẹ VL-a) và phân tử kháng thể hu7B10 (sử dụng chuỗi nặng VH-b và chuỗi nhẹ VL-b) được nêu trong SEQ ID NO: 17-20.

hu25G7 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEW
 VAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR
 GFFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
 KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
 CSVNHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 17)

hu25G7 LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCNASSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYLT
 SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
 NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC (SEQ ID NO: 18)

hu7B10 HC

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE
 WMGLIHPNSDTTKFSENFKTRVTMTIDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAKSK
 IITTIVARHWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)

hu7B10 LC

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDDYGGDSYMNWYLQKPGQPPQ
 LLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSNENPPTFG
 GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)

Trình tự của kháng thể được làm tương thích với người được cài vào vectơ biểu hiện tương ứng bằng cách sử dụng kỹ thuật tách dòng phân tử, và kháng thể được làm tương thích với người tương ứng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng hệ biểu hiện tế bào HEK293 để biểu hiện và tổng hợp.

Ví dụ 8: Số liệu hoạt tính của các kháng thể được làm tương thích với người

Các kháng thể được làm tương thích với người hu25G7 và hu7B10 được tiến hành thử nghiệm hoạt tính *in vitro* được mô tả trong các ví dụ 2–5, và các kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Các kết quả cho thấy rằng cả kháng thể hu25G7 và kháng thể hu7B10 chỉ gắn kết với IL-4R người và không gắn kết với IL-4R khỉ rezut, chứng tỏ là cả hai kháng

thể đều gắn kết với epitop người mà không tương đồng với epitop khi rezut và gắn kết đặc hiệu với IL-4R người. Cả hai kháng thể đều có thể phong bế sự gắn kết IL-4/IL-4R và các con đường truyền tín hiệu nội bào, dẫn đến trung hòa sự hoạt hóa IL-4 và ức chế sự tăng sinh của các tế bào TF-1, trong đó hoạt tính ức chế và phong bế của hu25G7 vẫn tốt hơn đáng kể so với hoạt tính ức chế và phong bế của kháng thể đối chứng dupilumab.

Bảng 8. Thử nghiệm hoạt tính *in vitro*

Các kháng thể	Gắn kết ELISA của IL-4R người-his (EC ₅₀) (ng/mL)	Gắn kết ELISA của IL-4R khi-his (EC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế ELISA IL-4 người/IL-4R (IC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế sự gắn kết của các tế bào HEK293 -Blue IL-4 (với IL-4) (IC ₅₀) (ng/mL)	Ức chế sự tăng sinh có liên quan đến IL-4 của các tế bào TF-1 (IC ₅₀) (ng/mL)	K _D (nM) (Biacore)
hu25G7	3,413	Không gắn kết	23,6	0,9431	29,56	1,07
hu7B10	12,010	Không gắn kết	75,3	6,8700	112,4	0,284
Dupilumab	42,560	Không gắn kết	178,7	0,6668	491,2	0,126

Ví dụ 9: Thử nghiệm làm trưởng thành ái lực đối với kháng thể được làm tương thích với người hu25G7

Kháng thể hu25G7 được làm trưởng thành ái lực thông qua công nghệ nền tảng biểu hiện nấm men, thư viện nấm men trưởng thành ái lực nhằm vào 6 CDR được thiết kế và tạo ra dựa trên kháng thể hu25G7, các đoạn môi thoái hóa được thiết kế, và các axit amin đột biến được thiết kế được đưa vào thư viện kháng thể hu25G7-scFv bằng PCR và tái tổ hợp tương đồng. Kích thước của mỗi thư viện là khoảng 10⁹, và thư viện nấm men được tạo thành được kiểm tra độ đa dạng của nó bằng phương pháp giải trình tự thế hệ thứ hai (GENEWIZ).

IL-4R người được đánh dấu biotin được sử dụng để chọn lọc các kháng thể ái lực cao từ thư viện nấm men hu25G7-scFv. Sau hai vòng sàng lọc MACS (các hạt từ streptomycin, Invitrogen) và hai vòng sàng lọc FACS (BD FACSAria™ FUSION),

dòng nấm men đơn được chọn để nuôi cấy và kích thích sự biểu hiện. FACS (BD FACSCanto II) được sử dụng để phát hiện sự gắn kết của dòng nấm men đơn với IL-4R của người, và dòng nấm men đơn với ái lực cao hơn ái lực của kháng thể 25G7 kiểu đại được chọn để kiểm tra việc giải trình tự. Sau khi sắp thẳng hàng và phân tích các dòng giải trình tự, trình tự dư thừa được loại bỏ, và trình tự không dư thừa được chuyển hóa thành phân tử kháng thể người có chiều dài đầy đủ để biểu hiện trong tế bào của động vật có vú. Việc xác định ái lực của kháng thể có chiều dài đầy đủ sau khi tinh chế ái lực được tiến hành bằng cách sử dụng BIAcore X-100 (GE Life Sciences), và các phân tử kháng thể dự tuyển với ái lực cao hơn với IL-4R người được chọn. Ái lực của các phân tử kháng thể với IL-4R người là cao hơn ái lực của kháng thể hu25G7 kiểu đại, trong đó ái lực của phân tử kháng thể hu25G7-A là tương đương với ái lực của dupilumab, và ái lực của phân tử hu25G7-B là tốt hơn đáng kể so với ái lực của dupilumab.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu25G7-A thu được từ việc làm trưởng thành ái lực là như sau:

hu25G7-A LCVR

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVPYMYWYQQKPGQAPRLLIYLT
SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWRAYPPMLTFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO: 37)

Các trình tự CDR nằm trong kháng thể này được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9. Các trình tự LCDR của hu25G7-A

Tên	Trình tự	Số
LCDR1	RASSSVPYMY	SEQ ID NO: 38
LCDR2	LTSNLAS	SEQ ID NO: 7
LCDR3	QQWRAYPPMLT	SEQ ID NO: 40

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hu25G7-B là như sau:

hu25G7-B LCVR

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASPGVPPLAWYQQKPGQAPRLLIYLAS
SRPSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTKVE
IK (SEQ ID NO: 41)

Các trình tự CDR nằm trong kháng thể này được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10. Các trình tự CDR

Tên	Trình tự	Số
LCDR1	RASPGVPPLA	SEQ ID NO: 42
LCDR2	LASSRPS	SEQ ID NO: 39
LCDR3	QQWRSNPPMLT	SEQ ID NO: 8

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu25G7-A LCVR được bộc lộ trên đây được tái tổ hợp với vùng cố định chuỗi nhẹ hu25G7 để thu được chuỗi nhẹ kháng thể hu25G7-A; vùng biến đổi chuỗi nhẹ hu25G7-B LCVR được mô tả trên đây được tái tổ hợp với vùng cố định chuỗi nhẹ hu25G7 để thu được chuỗi nhẹ kháng thể hu25G7-B.

Các gốc axit amin của hu25G7-VH-c được làm tối ưu để thu được các vùng biến đổi chuỗi nặng hu25G7-A/B VH và hu25G7-C VH.

hu25G7-A/B VH:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEW
 VAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR
 GFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 43)

hu25G7-C VH:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEW
 VAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCTRGNKR
 GFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 47)

Các vùng biến đổi chuỗi nặng được mô tả trên đây có thể được tái tổ hợp với vùng cố định chuỗi nặng hu25G7 để thu được các chuỗi nặng kháng thể hu25G7-A/hu25G7-B và hu25G7-C.

Các trình tự chuỗi nặng đầy đủ của hu25G7-A và hu25G7-B được nêu trong SEQ ID NO: 44.

hu25G7 HC (tức là, chuỗi nặng kháng thể hu25G7-A/hu25G7-B)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEW
 VAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGNKR
 GFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
 KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 44)

Chuỗi nặng kháng thể hu25G7-C:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS₂DYGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSIIYYADIVKGRSTISRDN₂AKNTLYLQM₂SSLRAEDTAVYYCTRGNKR
GFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 48)

Các trình tự chuỗi nhẹ đầy đủ tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 45-46.

hu25G7-A LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVPYMYWYQQKPGQAPRLLIYLT
SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWRAYPPMLTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO: 45)

hu25G7-B/hu25G7-C LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASPGVPPLAWYQQKPGQAPRLLIYLAS
SRPSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWRSNPPMLTFGGGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO: 46)

Ví dụ 10: Số liệu về hoạt tính làm trưởng thành ái lực của các kháng thể được
làm tương thích với người

Các kháng thể hu25G7-A và hu25G7-B được phát hiện theo ví dụ 3 và ví dụ 4;
cả hai kháng thể hu25G7-A và hu25G7-B có thể phong bế việc gắn kết với IL-4/IL-4R
và các con đường truyền tín hiệu nội bào, dẫn đến trung hòa sự hoạt hóa IL-4 và IL-13
và ức chế sự tăng sinh của các tế bào TF-1. Số liệu hoạt tính được thể hiện trong bảng

11.

Bảng 11. So sánh số liệu hoạt tính

Các kháng thể	Phong bế ELISA IL-4 người/IL-4R (IC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế sự gắn kết của các tế bào HEK293-Blue (với IL-4) (IC ₅₀) (ng/mL)	Phong bế sự gắn kết của các tế bào HEK293-Blue (với IL-13) (IC ₅₀) (ng/mL)	Ức chế sự tăng sinh có liên quan đến IL-4 của các tế bào TF-1 (IC ₅₀) (ng/mL)	Ức chế sự tăng sinh có liên quan đến IL-13 của các tế bào TF-1 (IC ₅₀) (ng/mL)
hu25G7-A	144,2	6,49	10,02	83,72	13,24
hu25G7-B	108,4	6,598	8,38	50,95	13,71
Dupilumab	156,3	12,48	14,75	100,9	18,10

Trong thử nghiệm ức chế sự tăng sinh của các tế bào TF-1 do sự kích thích IL-13 gây ra, cả hu25G7-A và hu25G7-B đều thể hiện các tác dụng có lợi. So với dupilumab, hu25G7-A và hu25G7-B đều có tác dụng tốt hơn đáng kể trong việc phong bế sự gắn kết của IL-4 và IL-13 với IL-4R và sự tăng sinh tế bào do sự gắn kết gây ra.

Ví dụ 11: Nghiên cứu về tác dụng của kháng thể được làm tương thích với người trên chứng viêm da ở chuột

Thiết lập các mẫu viêm da ở chuột: Chuột chuyển gen IL-4/IL-4R α (được mua từ Cyagen Bioscience Biological Research Center (Taicang) Co., Ltd.) được sử dụng, 100 μ L dung dịch dầu oliu axeton OXZ 1,5% (axeton:dầu oliu = 4:1) được bôi đều lên bụng (diện tích 3 cm $\times$ 3 cm) của mỗi con chuột để gây nhạy cảm, và ngày gây nhạy cảm là D0 (ngày 0). Vào ngày thứ 7, 20 μ L dung dịch dầu oliu axeton OXZ 1% được bôi đều cho cả hai tai (cả hai bên) của mỗi con chuột để thử, và tiến hành thử mỗi 72 giờ.

Trong thử nghiệm này, 5 nhóm được lập lên, đó là nhóm đối chứng thông thường (chỉ bôi dung dịch dầu oliu axeton để gây nhạy cảm và kích ứng), nhóm đối chứng mẫu, nhóm hu25G7-A, nhóm hu25G7-B và nhóm dupilumab, trong đó mỗi nhóm gồm 3–5 con chuột. Liều dùng của các nhóm sử dụng là 50 mg/kg, đường dùng là dưới da, và tiến hành sử dụng hai lần một tuần (xem bảng 12 để biết thông tin cụ

thể). Độ dày của tai được đo bằng thước kẹp vào ngày 27, và các kết quả được thể hiện trên FIG.1.

Bảng 12. Phác đồ dùng của mỗi nhóm

Nhóm	Số con chuột	Đường dùng	Liều dùng	Tần suất dùng
Nhóm đối chứng thông thường	3 (con đực)	Dưới da	-	Hai lần một tuần
Nhóm đối chứng mẫu	5 (3 con cái + 2 con đực)	Dưới da	-	Hai lần một tuần
hu25G7-A	5 (3 con cái + 2 con đực)	Dưới da	50 mg/kg	Hai lần một tuần
hu25G7-B	3 (2 con cái + 1 con đực)	Dưới da	50 mg/kg	Hai lần một tuần
Dupilumab	4 (2 con cái + 2 con đực)	Dưới da	50 mg/kg	Hai lần một tuần

Các kết quả thu được cho thấy rằng tai của chuột ở nhóm đối chứng mẫu có tổn thương bệnh lý rõ rệt, và độ dày của tai là lớn hơn đáng kể so với độ dày của tai ở nhóm đối chứng thông thường. Độ dày tai của chuột ở các nhóm hu25G7-A, hu25G7-B và dupilumab là nhỏ hơn đáng kể so với nhóm đối chứng mẫu vào ngày 27. Tức là, hu25G7-A, hu25G7-B và dupilumab có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm da, và hu25G7-B có tác dụng tốt hơn so với dupilumab.

Các ví dụ bào chế chế phẩm

Thiết bị được sử dụng để bào chế và các phương pháp tính toán các kết quả là như sau:

Sắc ký loại trừ phân tử SEC:

Đây là phương pháp để phân tích sự phân tách chất tan theo mối quan hệ tương đối giữa cỡ lỗ của lỗ gel và kích thước của cuộn phân tử mẫu polyme.

Tỷ lệ phần trăm lượng monome SEC = $\text{Monome} / \text{tổng số A} \times 100\%$ (monome là diện tích đỉnh của monome đỉnh chính trong mẫu, và tổng số A là tổng của các diện

tích đỉnh).

Thiết bị để đo SEC: Agilent 1260; cột: waters, XBrige BEH200Å SEC (300 × 7,8 mm 3,5 μm).

Điện di gel mao dẫn CE:

Đây là phương pháp di chuyển gel vào ống mao dẫn như là môi trường hỗ trợ cho quá trình điện di và phân tách theo khối lượng phân tử của mẫu dưới một điện thế nhất định.

Tỷ lệ phần trăm độ tinh khiết CE không khử = đỉnh chính/tổng số A × 100% (đỉnh chính là diện tích đỉnh của đỉnh chính trong mẫu, và tổng số A là tổng của tất cả các diện tích đỉnh).

Thiết bị đo CE: Beckman model plus800

Điện di mao quản hội tụ đẳng điện có hiện ảnh iCIEF:

Đây là kỹ thuật phân tách theo sự chênh lệch về các điểm đẳng điện pI của các protein.

Tỷ lệ phần trăm lượng đỉnh trung tính iCIEF = diện tích đỉnh trung tính/tổng diện tích × 100% (tổng diện tích là tổng số diện tích của các đỉnh axit, trung tính và bazơ).

Nhà sản xuất thiết bị xác định iCIEF: protein đơn giản, loại: muarice.

Đo độ nhớt: độ nhớt được đo bằng cách sử dụng lưu tốc kế (nhà sản xuất: Anton Paar, loại: MCR xx2) ở nhiệt độ đo bằng 25°C, và các mẫu được đặt trực tiếp trên đĩa đo để kiểm tra.

Áp suất thẩm thấu: phương pháp điểm đóng băng được sử dụng để đo áp suất thẩm thấu. Điểm đóng băng của dung dịch được đo bằng cách sử dụng phân tử cảm biến nhiệt độ có độ nhạy cao dựa trên mối quan hệ tỷ lệ giữa giá trị giảm điểm đóng băng và nồng độ mol của dung dịch, và sau đó chuyển thành áp suất thẩm thấu thông qua điện lượng. Nhà sản xuất thiết bị: Loser, loại: OM815.

Ví dụ 1: Sàng lọc hệ đệm

Chế phẩm chứa 100 mg/mL kháng thể hu25G7-A và 0,1 mg/mL (PS80) polysorbat 80 được điều chế trong các hệ đệm khác nhau với pH bằng 4,5–6,5, và độ ổn định của kháng thể trong các hệ đệm khác nhau được kiểm tra. Thiết kế cụ thể các công thức được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 13. Thành phần của các mẫu chế phẩm

Mẫu số	Hệ đệm
1	20 mM axit histidin-axetic (His-AA) pH4,5
2	20mM His-AA pH5,0
3	20 mM axit axetic-natri axetat (AA) pH 5,5
4	20 mM axit succinic-natri succinat (SA) pH 5,5
5	20 mM axit xitric-natri xitrat (CA) pH 5,5
6	20mM His-AA pH 5,5
7	20mM His-AA pH 6,0
8	20mM His-AA pH 6,5

Mỗi mẫu được lọc vô trùng, nạp vào các lọ, và sau đó kiểm tra hình thức bên ngoài và SEC trong điều kiện nhiệt độ cao bằng 40°C. Số liệu được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 14. Các kết quả về độ ổn định của các mẫu chế phẩm

Mẫu	Điều kiện	Hình thức bên ngoài	% Monome SEC	% Sự thay đổi tương đối theo SEC
1	T0	Trong	99,2	
	40°C D15	Trong	96,6	2,5
	40°C M1	Trong	94,5	4,7
2	T0	Trong	99,4	
	40°C D15	Trong	96,9	2,5
	40°C M1	Trong	94,9	4,5
3	T0	Trong	99,3	
	40°C D15	Trong và trắng đục	96,5	2,7
	40°C M1	Trắng đục, với số lượng hạt giống sương mù nhỏ	94,2	5,0
4	T0	Trong và trắng đục	99,4	
	40°C D15	Số hạt lớn	96,2	3,2
	40°C M1	Trắng đục, với số lượng hạt giống sương mù lớn	93,9	5,4
5	T0	Trong và trắng đục	99,3	
	40°C D15	Số hạt lớn	96,6	2,8
	40°C M1	Trắng đục, với số lượng hạt giống sương mù lớn	94,9	4,4
6	T0	Trong	99,4	

	40°C D15	Trong	96,3	3,1
	40°C M1	Trong	94,5	4,9
7	T0	Trong	99,1	
	40°C D15	Trong	96,8	2,3
	40°C M1	Trong và trắng đục	95,1	4,0
8	T0	N/A	99,0	
	40°C D15	N/A	94,3	4,8
	40°C M1	Đục	N/A	N/A

Lưu ý: D15 là phát hiện vào ngày 15, M là tháng, T0 là phát hiện ngay sau khi chuẩn bị mẫu, và N/A là không phát hiện.

Các kết quả chỉ ra rằng hình thức bên ngoài của dung dịch đệm SA/CA/AA là tương đối kém, và do đó His-AA được chọn làm hệ đệm. Trong hệ His-AA, độ pH bằng 4,5–5,5 làm cho hình thức bên ngoài tốt hơn; ngoại trừ His-AA pH 6,5, SEC của mỗi hệ đệm không có sự khác biệt đáng kể, và pH 5,0 và 6,0 là tốt hơn một chút. Do đó, hệ đệm của kháng thể là His-AA, pH 4,5–6,0.

Ví dụ 2: Sàng lọc các nồng độ kháng thể

Các chế phẩm chứa hu25G7-A ở các nồng độ khác nhau được bào chế trong các hệ đệm 20 mM His-AA pH 5,0, 5,5, và các thành phần của chế phẩm là như sau:

- 1) 20 mM His-AA pH5,0, 100 mg/mL hu25G7-A
- 2) 20 mM His-AA pH5,5, 100 mg/mL hu25G7-A
- 3) 20 mM His-AA pH5,0, 150 mg/mL hu25G7-A
- 4) 20 mM His-AA pH5,5, 150 mg/mL hu25G7-A
- 5) 20 mM His-AA pH5,0, 139 mg/mL hu25G7-A
- 6) 20 mM His-AA pH5,0, 127 mg/mL hu25G7-A
- 7) 20 mM His-AA pH5,0, 120 mg/mL hu25G7-A
- 8) 20 mM His-AA pH5,5, 138 mg/mL hu25G7-A
- 9) 20 mM His-AA pH5,5, 122 mg/mL hu25G7-A

Sau khi mỗi chế phẩm trong số các chế phẩm được bào chế, đầu tiên một phần mẫu chế phẩm được lấy ra để phát hiện độ nhớt của chế phẩm. Sau đó mỗi mẫu trong số các mẫu được lọc vô trùng, nạp vào các lọ, và sau đó kiểm tra hình thức bên ngoài, SEC, CE-SDS không khử và iCIEF trong điều kiện nhiệt độ cao bằng 40°C để kiểm tra ảnh hưởng của các nồng độ kháng thể khác nhau đến độ nhớt và độ ổn định của các

chế phẩm hu25G7-A. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng dưới đây:

Bảng 15. Các kết quả đánh giá độ nhớt của chế phẩm

Mẫu	Độ nhớt mPa.s
1	13,7
2	25,5
3	90,0
4	140,5
5	34,6
6	26,5
7	21,8
8	93,2
9	52,6

Bảng 16. Các kết quả đánh giá độ ổn định của chế phẩm

Mẫu	Điều kiện	Hình thức bên ngoài	% Monome theo SEC		% đỉnh trung tính theo iCIEF		% CE-SDS không khử	
				% thay đổi		% thay đổi		% thay đổi
1	T0	Trong	99,4		65,0		96,12	
	40°C D15	Trong	96,9	2,5	57,5	7,5	92,37	3,75
2	T0	Trong	99,4		65,3		95,93	
	40°C D15	Trong	96,3	3,1	55,0	10,3	92,09	3,84
3	T0	Trong	99,3		63,9		96,10	
	40°C D15	Trong	96,4	2,9	54,8	9,1	92,85	3,25
4	T0	Trong	99,4		65,0		96,22	
	40°C D15	N/A ¹	96,5	2,9	53,1	11,9	91,29	4,93

Các kết quả chỉ ra rằng: hình thức bên ngoài, SEC, CE và iCIEF của các nồng độ kháng thể khác nhau không có sự khác biệt đáng kể; cụ thể là trong các dung dịch đệm His-AA với pH 5,0 hoặc 5,5, nồng độ kháng thể có ảnh hưởng nhẹ đến độ ổn định của chế phẩm; tuy nhiên, nồng độ kháng thể càng cao, độ nhớt của chế phẩm càng lớn, và trong dung dịch đệm có pH 5,0, độ nhớt bằng khoảng 14 mPa.s, khi nồng độ kháng thể bằng 100 mg/mL, trong khi đó độ nhớt bằng khoảng 22 mPa.s khi nồng độ kháng thể bằng 120 mg/mL.

Ví dụ 3: Sàng lọc các chất cải biến độ nhớt

Các chế phẩm hu25G7-A chứa các chất cải biến độ nhớt khác nhau ở nồng độ kháng thể bằng 120 mg/mL được bào chế trong dung dịch đệm 20 mM His-AA (pH 5,0). Ảnh hưởng của các chất cải biến độ nhớt khác nhau đến độ nhớt của chế phẩm được kiểm tra với độ nhớt là chỉ số đánh giá. Để đáp ứng các yêu cầu đăng trương của các chế phẩm dùng dưới da, mỗi chất cải biến độ nhớt được bổ sung vào chế phẩm ở áp suất thẩm thấu tổng chất cải biến độ nhớt bằng 270 mosm/kg để kiểm tra tác dụng của nó. Các kết quả cụ thể được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 17. Kết quả độ nhớt

Chất cải biến độ nhớt	Nồng độ (mM)	Độ nhớt trung bình mPa.s
Không được bổ sung (trống)	N/A	16
NaCl	122	8
MgCl ₂	85	5,3
CaCl ₂	148	5,6
KCl	124	7,7
CH ₃ COONa	86	8,8
Na ₂ SO ₄	96	9,5
NaI	113	8,3
NaF	74	6,3
NaSCN	112	6,6
Arg-HCl	120	7,2
Lys	118	8,7
His	93	6,6
Pro	207	12,9

Các kết quả chỉ ra rằng, NaCl, MgCl₂, CaCl₂, KCl, CH₃COONa, Na₂SO₄, NaI, NaF, NaSCN, Arg-HCl, Lys (lysin) và His (histidin), ngoại trừ prolin, đều có tác dụng đáng kể trong việc làm giảm độ nhớt của chế phẩm ở nồng độ tối đa tương ứng. Trong số các chất cải biến này, Arg-HCl, MgCl₂, CaCl₂, NaF, NaSCN và histidin có tác dụng tốt hơn, và do đó Arg-HCl, MgCl₂, CaCl₂ và histidin được ưu tiên làm chất cải biến độ nhớt.

Ví dụ 4: Tác dụng của chất cải biến độ nhớt đến độ nhớt của các chế phẩm có nồng độ cao

Để kiểm tra tác dụng của chất cải biến độ nhớt, các chế phẩm hu25G7-A ở nồng

độ kháng thể bằng 150 mg/mL hu25G7-A được bào chế trong dung dịch đệm 20 mM His-AA, pH5,0, và các thành phần cụ thể là như sau:

- 1) không có chất cải biến độ nhớt (N/A)
- 2) 85 mM MgCl₂
- 3) 148 mM CaCl₂
- 4) 93 mM histidin

Tác động của các nguyên liệu bổ trợ khác nhau đến độ nhớt của chế phẩm có nồng độ cao được kiểm tra với độ nhớt là chỉ số đánh giá.

Bảng 18. Kết quả độ nhớt

Mẫu	Độ nhớt mPa.s
1	88,80
2	16,86
3	17,22
4	19,00

Các kết quả chỉ ra rằng khi nồng độ của kháng thể là 150 mg/mL, độ nhớt của chế phẩm có thể được làm giảm là dưới 20 mPa.s nhờ MgCl₂, CaCl₂ và histidin, và tác dụng làm giảm độ nhớt là tương đối tốt.

Ví dụ 5: Ảnh hưởng của chất cải biến độ nhớt đến độ ổn định của chế phẩm

Trong hệ đệm 20 mM His-AA pH 5,0, các chế phẩm Hu25G7-A, ở nồng độ kháng thể bằng 150 mg/mL và chứa các nguyên liệu bổ trợ ở các nồng độ khác nhau, được bào chế, và ảnh hưởng của các nguyên liệu bổ trợ ở các nồng độ khác nhau đến độ ổn định nhiệt (được bảo quản trong 17 ngày ở nhiệt độ 40°C) của chế phẩm được kiểm tra. Thiết kế thử nghiệm và các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 19. Các mẫu chế phẩm

Mẫu	Chất cải biến độ nhớt
1	Trống (không được bổ sung)
2	50mM MgCl ₂
3	90mM MgCl ₂
4	90mM CaCl ₂
5	148mM CaCl ₂
6	90 mM histidin
7	122mM NaCl
8	120mM Arg-HCl

Bảng 20. Ảnh hưởng của lượng các nguyên liệu bổ trợ đến độ ổn định của mẫu

Mẫu	Điều kiện	% Monome theo SEC	% Sự thay đổi tương đối theo SEC	% CE-SDS không khử	% Sự thay đổi tương đối theo CE
1	T0	99,0		95,7	
	40°C D17	94,7	4,3	93,5	2,2
2	T0	99,0		95,6	
	40°C D17	94,3	4,7	91,9	3,7
3	T0	99,0		95,7	
	40°C D17	93,8	5,2	91,4	4,3
4	T0	99,0		95,1	
	40°C D17	93,4	5,6	88,9	6,2
5	T0	98,8		95,7	
	40°C D17	92,9	5,9	87,9	7,8
6	T0	99,0		95,3	
	40°C D17	95,7	3,3	90,8	4,5
7	T0	99,0		95,3	
	40°C D17	94,3	4,7	90,3	5
8	T0	98,9		95,2	
	40°C D17	94,8	4,1	91,0	4,2

Các kết quả cho thấy rằng: $MgCl_2$, Arg-HCl, NaCl và histidin có ảnh hưởng nhẹ đến độ ổn định của chế phẩm, trong đó độ ổn định của các chế phẩm chứa $MgCl_2$, Arg-HCl, NaCl và histidin là tốt hơn so với chế phẩm chứa $CaCl_2$, mức khử CE của nhóm $CaCl_2$ trong điều kiện nhiệt độ cao là tốt hơn so với mức khử của các mẫu chế phẩm khác, và độ ổn định của chế phẩm chứa $MgCl_2$, Arg-HCl và histidin là tốt hơn, và do đó $MgCl_2$, Arg-HCl và histidin được ưu tiên.

Ví dụ 6: Đánh giá tổng thể về ảnh hưởng của chất cải biến độ nhớt đến độ ổn định của chế phẩm

Trong dung dịch đậm 20 mM His-AA pH 5,0, các chế phẩm chứa 0,1 mg/mL PS80, 150 mg/mL Hu25G7-A và chất cải biến độ nhớt được bào chế, trong đó nồng độ của PS80 trong mẫu được lắc trong 15 ngày là 1 mg/mL. Ảnh hưởng của các nguyên

liệu bổ trợ khác đến độ nhớt và độ ổn định của chế phẩm Hu25G7-A được kiểm tra. Thiết kế thử nghiệm là như sau.

- 1) N/A (không có chất cải biến độ nhớt)
- 2) 90 mM MgCl₂
- 3) 120 mM Arg-HCl
- 4) 90 mM histidin

Sau khi mỗi chế phẩm trong số các chế phẩm được bào chế, đầu tiên một phần mẫu chế phẩm được lấy ra để phát hiện độ nhớt của chế phẩm. Sau đó mỗi mẫu được lọc vô trùng, nạp vào các lọ, và sau đó được kiểm tra hình thức bên ngoài, SEC, CE không khử trong các điều kiện nhiệt độ cao bằng 40°C, lặp lại bước đông lạnh và rã đông (-35°C đến 4°C) và lắng (tốc độ lắng 300 vòng/phút ở nhiệt độ 25°C) để đánh giá ảnh hưởng của các nguyên liệu bổ trợ khác nhau đến độ nhớt và độ ổn định của chế phẩm. Các kết quả thu được được thể hiện trong các bảng dưới đây.

Bảng 21. Các kết quả đánh giá độ nhớt

Mẫu	Độ nhớt mPa.s
1	82,2
2	12,1
3	15,8
4	17,7

Bảng 22. Các kết quả về độ ổn định

Mẫu	Điều kiện	Hình thức bên ngoài	Monom e theo SEC	% Sự thay đổi tương đối theo SEC	CE không khử	% Sự thay đổi tương đối theo CE
1	T0	Trong	99,2		96,5	
	40°C M1	Trong	93,9	5,3	90,3	6,2
	Đông lạnh và rã đông 5 lần	Trong	98,7	0,5	95,7	0,8
	Lắc D1	Trong	98,8	0,4	95,9	0,6
	Lắc D15	Trong	98,7	0,5	95,0	1,5
2	T0	Trong và trắng đục nhẹ	99,4		95,9	
	40°C M1	Trắng đục, với số lượng hạt giống sương mù lớn	92,2	7,2	88,3	7,6

	Đông lạnh và rã đông 5 lần	Trong và trắng đục	98,5	0,9	95,3	0,6
	Lắc D1	Xuất hiện các hạt	98,5	0,9	95,5	0,4
	Lắc D15	Trong	98,5	0,9	94,2	1,7
3	T0	Trong và trắng đục nhẹ	99,3		95,8	
	40°C M1	Trắng đục, với số lượng hạt giống sương mù lớn	93,0	6,3	88,8	7
	Đông lạnh và rã đông 5 lần	Trong và trắng đục	98,5	0,8	95,6	0,2
	Lắc D1	Xuất hiện các hạt	98,4	0,9	95,7	0,1
	Lắc D15	Trong	98,4	0,9	95,1	0,7
4	T0	Trong và trắng đục nhẹ	99,5		96,1	
	40°C M1	Trắng đục, với số lượng hạt giống sương mù lớn	94,1	5,4	89,0	7,1
	Đông lạnh và rã đông 5 lần	Trong và trắng đục	98,6	0,9	95,3	0,8
	Lắc D1	Xuất hiện các hạt	98,3	1,2	95,8	0,3
	Lắc D15	Trong	98,6	0,9	95,0	1,1

Lưu ý: Lắc D1 là phát hiện sau khi lắc trong 1 ngày, và lắc D15 là phát hiện sau khi lắc trong 15 ngày.

Các kết quả cho thấy rằng:

Sau khi nguyên liệu bổ trợ là chất cải biến độ nhớt được bổ sung, hình thức bên ngoài cho thấy trắng đục, nhưng không có sự khác biệt giữa các nguyên liệu bổ trợ; khi chế phẩm chứa 0,1 mg/mL PS80, nhóm chứa chất cải biến độ nhớt được lắc trong 1 ngày và các hạt bắt đầu xuất hiện. Tuy nhiên, khi PS80 là 1 mg/mL, hình thức bên ngoài vẫn trong sau khi lắc trong 15 ngày.

Các kết quả SEC ở nhiệt độ 40°C đã cho thấy rằng lượng monome SEC bị giảm nhẹ sau khi bổ sung chất cải biến độ nhớt, nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các mẫu của mỗi nhóm, nếu nhóm mẫu Arg-HCl và nhóm mẫu histidin là tốt hơn, và mẫu histidin có độ ổn định tốt nhất. Các kết quả CE ở nhiệt độ 40°C đã cho thấy rằng CE bị giảm nhẹ sau khi bổ sung chất cải biến độ nhớt, nhưng vẫn có sự khác biệt nhỏ giữa các nguyên liệu bổ trợ.

Ví dụ 7: Sàng lọc các nồng độ chất cải biến độ nhớt

Trong hệ đệm 20 mM His-AA pH 5,0, các chế phẩm chứa kháng thể Hu25G7-A với các nồng độ khác nhau và chất cải biến độ nhớt được bào chế để kiểm tra độ nhớt của các chế phẩm. Thiết kế thử nghiệm và các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 23. Các kết quả đánh giá độ nhớt

Chất cải biến độ nhớt	Nồng độ chất cải biến độ nhớt (mM)	Nồng độ protein (mg/mL)	Độ nhớt mPa.s
MgCl ₂	10	163,1	37,9
	50	163,8	18,6
	90	165,1	18,0
	90	190	31,2
His	10	162,6	49,1
	50	163,9	27,0
	90	164,2	19,1
Arg-HCl	10	160,7	54,4
	50	163,0	31,5
	90	163,4	21,6
	120	166,0	19,9
	150	152	18,9
	180	149	16,5
	200	147	14,8

Các kết quả đã cho thấy rằng việc tăng nồng độ của chất cải biến độ nhớt His, MgCl₂ và Arg-HCl có thể làm giảm đáng kể độ nhớt của chế phẩm.

Ví dụ 8: Thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm

Để cải thiện hình thức bên ngoài của chế phẩm, lượng axit amin có tính bazơ (chất cải biến độ nhớt) được bổ sung vào chế phẩm được coi là giảm, và các mẫu chế phẩm được bào chế như sau:

1. 20 mM His-AA pH 5,0, 30 mM histidin, 0,8 mg/mL PS80, 41,8 mg/mL sucroza, 120 mg/mL kháng thể Hu25G7-A, hàm lượng cuối của histidin trong mẫu là 50 mM;

2. 20 mM His-AA pH 4,8, 87 mM histidin, 0,8 mg/mL PS80, 150 mg/mL kháng thể Hu25G7-A;

3. 20 mM His-AA pH 5,0, 100 mM histidin, 0,8 mg/mL PS80, 150 mg/mL kháng thể Hu25G7-A;

4. 20 mM His-AA pH 5,0, 120 mM arginin hydroclorua, 0,8 mg/mL PS80, 150 mg/mL kháng thể Hu25G7-A;

Sau khi mỗi chế phẩm trong số các chế phẩm được bào chế, đầu tiên một phần mẫu chế phẩm được lấy ra để phát hiện độ nhớt của chế phẩm. Sau đó mỗi mẫu được lọc vô trùng, nạp vào các lọ, và tiếp đó được kiểm tra độ ổn định ở nhiệt độ 4°C và 25°C. Hình thức bên ngoài, áp suất thẩm thấu, độ pH, SEC, CE đã khử và iCIEF của các mẫu được phát hiện để đánh giá độ nhớt và độ ổn định của các mẫu chế phẩm khác nhau, và các kết quả được thể hiện trong bảng.

Bảng 24. Các kết quả về độ nhớt, pH và áp suất thẩm thấu

Mẫu	pH	Áp suất thẩm thấu mosm/kg	Độ nhớt mPa.s		
			Lần phát hiện 1	Lần phát hiện 2	Trung bình
1	5,03	284	13,33	12,26	12,8
2	4,91	306	16,28	14,84	15,5
3	5,01	310	14,99	16,16	15,6
4	5,09	292	14,02	16,63	15,3

Bảng 25. Các kết quả về độ ổn định ở nhiệt độ 4°C và 25°C

Mẫu	Điều kiện	Hình thức bên ngoài	% Monome theo SEC	% Sự thay đổi tương đối theo SEC	% đỉnh trung tính theo iCIEF	% Mức thay đổi tương đối theo iCIEF	% CE-SDS không khử	% Mức thay đổi tương đối theo CE-SDS
1	T0	Trong	98,7		69,1		95,3	
	25°C M1	Trong	97,8	0,9	65,3	3,8	95,4	-0,1
	25°C M3	Trong	97,2	1,5	58,7	10,4	92,8	2,5
	4°C M3	Trong	97,5	1,2	65,9	3,2	95,6	-0,2
	4°C M11	Trong	98,2	0,5	64,9	4,2	97,0	-1,7
2	T0	Trong	98,5		68,7		94,8	
	25°C M1	Trong	97,7	0,8	60,2	8,5	94,6	0,2

	4°C M11	Trong	98,7	-0,2	63,9	4,8	96,9	-2,1
3	T0	Trong	98,5		69,2		95,0	
	25°C M1	Trong	97,8	0,7	60,7	8,5	94,8	0,2
	4°C M11	Trong	98,7	-0,2	64,3	4,9	96,5	-1,5
4	T0	Trong	98,6		69,0		95,0	
	25°C M1	Trong	97,7	0,9	62,4	6,6	95,1	-0,1
	4°C M11	Trong	98,7	-0,1	64,2	4,8	96,7	-1,7

Các kết quả đã cho thấy rằng: mức thay đổi pH của các mẫu chế phẩm số 1–4 đều nằm trong khoảng 0,1, và dung lượng của dung dịch đậm là tương đối tốt; áp suất thẩm thấu là nằm trong khoảng đẳng trương, và độ nhớt đều bằng khoảng 20 mPa.s; sau khi mẫu số 1 được bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong 3 tháng, mức CE/iCIEF giảm nhẹ, và sau khi được bảo quản trong 3 tháng ở nhiệt độ 4°C, hình thức bên ngoài vẫn trong, và độ ổn định hóa học không bị thay đổi đáng kể. Các mẫu số 1–4 có hình thức bên ngoài trong sau khi được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong 11 tháng, và các kết quả phát hiện của SEC, iCIEF và CE-SDS là ổn định, vì thế các chế phẩm số 1–4 mô tả trên đây đều tương đối ổn định.

Ví dụ 9: Sàng lọc nồng độ đường

Để phát triển chế phẩm dùng dưới da và làm giảm kích ứng khi tiêm, tốt nhất là kiểm soát áp suất thẩm thấu để đẳng trương, và do đó nồng độ đường được sàng lọc để xác định nồng độ đường đẳng trương. Chế phẩm chứa 50 mM His-AA pH 5,0, 58 mg/mL sucroza, 0,8 mg/mL PS80 và 120 mg/mL kháng thể hu25G7-A được bào chế, và áp suất thẩm thấu được đo 3 lần bằng cách sử dụng phương pháp điểm đông lạnh.

Bảng 26. Áp suất thẩm thấu của chế phẩm (mosm/kg)

Lần phát hiện 1	Lần phát hiện 2	Lần phát hiện 3	Giá trị trung bình
290	298	304	297

Các kết quả đã cho thấy rằng áp suất thẩm thấu là khoảng 297 mosm/kg, tức là, đẳng trương, ở nồng độ đường bằng 58 mg/mL.

Ví dụ 10: Sàng lọc các quy trình đông lạnh

Chế phẩm chứa 25 mM His-AA pH 4,9, 60 mg/mL hu25G7-A, 25 mg/mL sucroza và 0,2 mg/mL PS80 được bào chế, được lọc vô trùng, được nạp vào lọ với lượng 3,4 mL/lọ, và được đông khô theo quy trình sau.

Bảng 27. Quy trình đông khô

Các thông số quy trình	Nhiệt độ cài đặt (°C)	Thời gian cài đặt (phút)	Thời gian lưu giữ (giờ)	Mức chân không (Pa)
Mức cấp	5	N/A	N/A	N/A
Trước đông lạnh	5	10	1	N/A
Trước đông lạnh	-45	50	2,5	N/A
Sấy sơ cấp	-5	60	30	20
Sấy thứ cấp	25	60	1	10
Sấy thứ cấp	25	1	7,5	1

Sau khi được đông khô, mẫu được lấy ra khỏi hộp, trong đó hình thức bên ngoài của mẫu là như sau: bột được nén màu trắng với hình thức bên ngoài đầy đủ và không bị đổ. Gần 1,5 mL nước để tiêm được sử dụng để hoàn nguyên, và các thành phần của mẫu đã hoàn nguyên là như sau: 50 mM His-AA, 120 mg/mL hu25G7-A, 50 mg/mL sucroza, 0,4 mg/mL PS80, pH 5,3. Mẫu đã hoàn nguyên được tiến hành các lần phát hiện khác nhau. Các kết quả đã cho thấy rằng các chỉ số của dung dịch hoàn nguyên sau khi đông lạnh chất pha loãng và hòa tan chất cô đều tốt.

Bảng 28. Các kết quả về độ ổn định trước và sau khi đông lạnh

Thời gian	Hình thức bên ngoài	% Monome theo SEC	% Đỉnh trung tính theo iCIEF	% CE-SDS không khử
Trước khi đông lạnh	N/A	99,1	62,1	96,4
Sau khi đông khô	Trong và trắng đục, màu vàng nhạt	98,9	62,0	95,8

Ví dụ 11: Tối ưu hóa các công thức của chế phẩm

Thiết kế thử nghiệm DOE được tiến hành với 50 mM dung dịch đệm His-AA pH, nồng độ kháng thể Hu25G7-A và nồng độ PS80 là các biến số (các biến số là: pH 4,5–5,5, PS80 0,4–1,2 mg/mL và nồng độ protein kháng thể Hu25G7-A 100–140 mg/mL), và phần mềm JMP được sử dụng để tạo ra một loạt công thức cho chế phẩm Hu25G7-A, trong đó toàn bộ các công thức đều chứa sucroza có nồng độ 58 mg/mL, và thông tin cụ thể được thể hiện trong bảng 29. Độ ổn định của chế phẩm được thử nghiệm bằng cách làm thoái biến cưỡng bức, bao gồm nhiệt độ cao 40°C, lắc (300 vòng/phút) và các thử nghiệm đông lạnh-rã đông (-35°C đến 4°C). Hình thức bên ngoài, độ nhớt, SEC, CE và iCIEF được sử dụng làm các chỉ số đánh giá, và các kết quả được thể hiện trong bảng 30. Phương pháp bình phương nhỏ nhất được sử dụng để phân tích thống kê các kết quả.

Bảng 29. Các thành phần và độ nhớt của các chế phẩm thử nghiệm trong quá trình sàng lọc công thức DOE

Mẫu	Nồng độ kháng thể (mg/mL)	pH	PS80(mg/mL)	Nồng độ kháng thể thực tế (mg/mL)	Độ nhớt (mPa.s)
01	132,6	5	0,4	132,9	21,9
02	100	5	0,8	97,2	9,8
03	140	5	1,2	143,6	32,7
04	100	4,5	0,4	104,4	6,5
05	140	4,5	0,8	143,0	14,9
06	120	4,5	1,2	123,7	8,9
07	100	5	1,2	97,3	9,2
08	100	5,5	0,4	97,1	13,7
09	120	5,5	1,2	122,2	25,1
10	120	5	0,8	121,6	16,3
11	120	5	0,8	122,4	14,4

Bảng 30. Các kết quả của thử nghiệm sàng lọc công thức DOE

Mẫu	Điều kiện	Hình thức bên ngoài	% Monome theo SEC	% đỉnh trung tính theo iCIEF	% CE-SDS không khử
01	D0	Trong	99,7	66,5	97,3
	40°C-M1.6	Trong	96,6	37,9	96,7
	Lắc-D14	Trong	99,5	N/A	N/A

02	D0	Trong	99,6	66	97,2
	40°C-M1.6	Trong	96,7	37,5	96,2
	Lắc-D14	Trong	99,6	N/A	N/A
03	D0	Trong	99,8	66,5	97,5
	40°C-M1.6	Trong	96,1	37,4	96,6
	Lắc-D14	Trong	99,5	N/A	N/A
04	D0	Trong	99,7	67,8	97,7
	40°C-M1.6	Trong	96,1	33,4	95,4
	Lắc-D14	Trong	99,5	N/A	N/A
05	D0	Trong	99,7	66,8	97,9
	40°C-M1.6	Trong	95,8	32,3	95,6
	Lắc-D14	Trong	99,6	N/A	N/A
06	D0	Trong	99,7	66,9	97,2
	40°C-M1.6	Trong	95,6	33	92,6
	Lắc-D14	Trong	99,5	N/A	N/A
07	D0	Trong	99,9	66,4	98,1
	40°C-M1.6	Trong	95,8	35,4	96,1
	Lắc-D14	Trong	99,7	N/A	N/A
08	D0	Trong	99,6	66,2	97,9
	40°C-M1.6	Trong	96,4	38	95,6
	Lắc-D14	Trong	99,7	N/A	N/A
09	D0	Trong	99,4	67,6	96,7
	40°C-M1.6	Trong	95,7	36,7	94,4
	Lắc-D14	Trong	99,5	N/A	N/A
10	D0	Trong	99,8	66,1	97,2
	40°C-M1.6	Trong	96,2	38,2	95,1
	Lắc-D14	Trong	99,7	N/A	N/A
11	D0	Trong	99,6	67,4	97,1
	40°C-M1.6	Trong	96,2	37,6	95,1
	Lắc-D14	Trong	99,7	N/A	N/A

Lưu ý: M1.6 là 1,6 tháng; D14 là ngày 14, và D0 là ngày bắt đầu thử nghiệm.

Các kết quả đã cho thấy rằng sau 5 chu kỳ đông lạnh-rã đông, mỗi chế phẩm vẫn có hình thức bên ngoài trong.

Số liệu thoái biến cường bức được khớp, và các giá trị chênh lệch về độ nhớt do thoái biến và 40°C CE và iCIEF được khớp tốt và mô hình này là có hiệu quả. Các kết quả được thể hiện trên FIG.2. Khi nồng độ PS bằng 0,8 mg/mL, biểu đồ đường đẳng trị được vẽ bằng cách lấy nồng độ kháng thể và độ pH làm các trục tung và trục hoành,

tương ứng, và độ nhớt và giá trị chênh lệch thoái biến CE/iCIEF ở 40°C làm các chỉ số, và biểu đồ đường đẳng trị thể hiện mức thay đổi độ ổn định của các chế phẩm được vẽ bằng cách lấy độ nhớt < 30 cP, mức giảm CE < 3% và mức giảm iCIEF < 30% làm các giới hạn, và các kết quả được thể hiện trên FIG.3.

Các kết quả đã cho thấy rằng: nồng độ protein càng thấp, giá trị pH càng giảm, và độ nhớt của chế phẩm càng giảm; các giá trị CE là tối ưu khi pH bằng 5,0, và đỉnh trung hòa iCIEF là tối ưu khi pH bằng 5,1. Dựa vào biểu đồ đường đẳng trị và các kết quả độ nhớt, chế phẩm ổn định là như sau: nồng độ kháng thể là 100–140 mg/mL, PS80 là 0,4–1,2 mg/mL, và pH là 4,5–5,5. Hơn nữa, chế phẩm ổn định hơn khi nồng độ kháng thể là 110–130 mg/mL và độ pH là 4,85–5,45.

Ví dụ 12: Thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm

Chế phẩm chứa 50 mM His-AA pH 5,0, 120 mg/mL kháng thể hu25G7-A, 58 mg/mL sucroza và 0,8 mg/mL PS80 được bào chế, được lọc vô trùng và nạp vào các lọ. Thử nghiệm độ ổn định ở 4°C sau đó được tiến hành và các kết quả được thể hiện trong bảng 31.

Bảng 31. Các kết quả của thử nghiệm độ ổn định 4°C

Thời gian	Hình thức bên ngoài	% Monome theo SEC	% đỉnh trung tính theo iCIEF	% CE-SDS không khử
T0	Trong	99,1	61,5	97,2
4°C M4	Trong	98,8	66,8	98,1

Các kết quả đã cho thấy rằng: chế phẩm được mô tả trên đây vẫn ổn định sau khi được bảo quản trong 4 tháng ở nhiệt độ 4°C.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm, trong đó dược phẩm này chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó và chất đệm, trong đó chất đệm này là chất đệm histidin-axit axetic, và chất đệm này có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0, trong đó chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 60 mM;

dược phẩm còn chứa polysorbat 80, trong đó polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 mg/mL đến 1,2 mg/mL;

dược phẩm còn chứa chất cải biến độ nhớt, trong đó chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm $MgCl_2$, histidin và arginin hydroclorua, trong đó chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 148 mM;

trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 40, tương ứng.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó chất đệm histidin-axit axetic có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5.

3. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 50 mM.

4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM.

5. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ không dưới 100 mg/mL.

6. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết

kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL.

7. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 180 mg/mL.

8. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 150 mg/mL.

9. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó chất cải biến độ nhớt là:

- i) arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 148 mM;
- ii) histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 100 mM; hoặc
- iii) $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 90 mM.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL; và chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm $MgCl_2$ có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 90 mM, histidin có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 100 mM, và arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 148 mM.

11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 120 mg/mL đến 150 mg/mL.

12. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó chất cải biến độ nhớt là arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 148 mM.

13. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,0 mg/mL.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL.

15. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM, độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5; (c) chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 80 mM đến 148 mM, trong đó chất cải biến độ nhớt là $MgCl_2$, histidin hoặc arginin hydroclorua; và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL;

trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 40, tương ứng.

16. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 200 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 50 mM, độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5; (c) chất cải biến độ nhớt có nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 148 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL;

trong đó chất cải biến độ nhớt được chọn từ nhóm bao gồm $MgCl_2$, arginin hydroclorua, và histidin;

trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 40, tương ứng.

17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó dược phẩm này chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ

nằm trong khoảng từ 100 mg/mL đến 180 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ nằm trong khoảng từ 10 mM đến 40 mM, độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5; (c) arginin hydroclorua có nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 148 mM; và (d) polysorbat 80 có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4 mg/mL đến 1,2 mg/mL;

trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 40, tương ứng.

18. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ khoảng 150 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ khoảng 20 mM, độ pH khoảng 5,0; (c) polysorbat 80 có nồng độ khoảng 0,8 mg/mL; và (d) arginin hydroclorua có nồng độ khoảng 120 mM;

trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, tương ứng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 40, tương ứng.

19. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó:

kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 hoặc 47 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 43 hoặc 47, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 37.

20. Dược phẩm theo điểm 19, trong đó kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn

kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 43, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37 hoặc có ít nhất 90% đồng nhất với SEQ ID NO: 37.

21. Dược phẩm theo điểm 19 hoặc 20, trong đó kháng thể kháng IL-4R bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây:

kháng thể kháng IL-4R bao gồm chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 44 và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 45.

22. Chế phẩm đông khô chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó chế phẩm đông khô được tạo ra bằng cách đông khô dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21.

23. Dung dịch hoàn nguyên chứa kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó dung dịch hoàn nguyên này được tạo ra bằng cách hoàn nguyên chế phẩm đông khô theo điểm 22.

24. Dung dịch hoàn nguyên theo điểm 23, trong đó dung dịch hoàn nguyên chứa các thành phần sau:

(a) kháng thể kháng IL-4R hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nồng độ 120 mg/mL; (b) chất đệm histidin-axit axetic có nồng độ 20 mM; (c) polysorbat 80 có nồng độ 0,8 mg/mL; và (d) arginin hydroclorua có nồng độ 120 mM, dung dịch hoàn nguyên này có độ pH bằng khoảng 5,3.

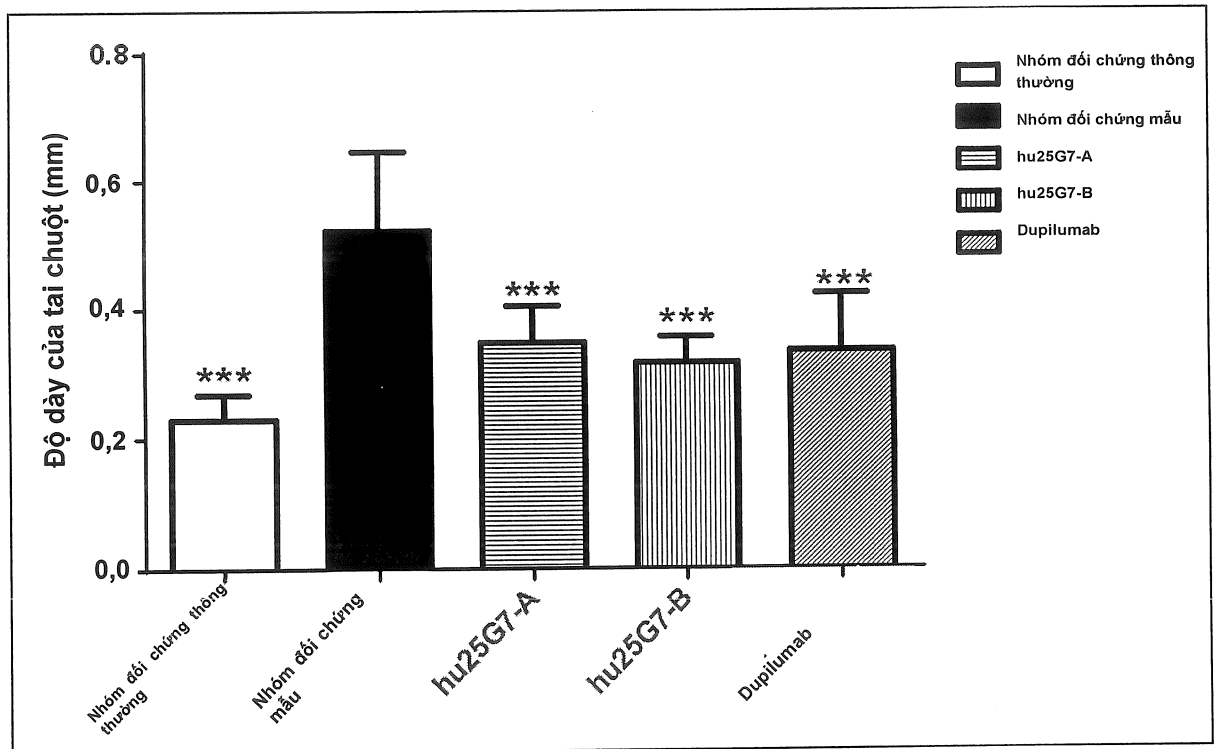


FIG.1

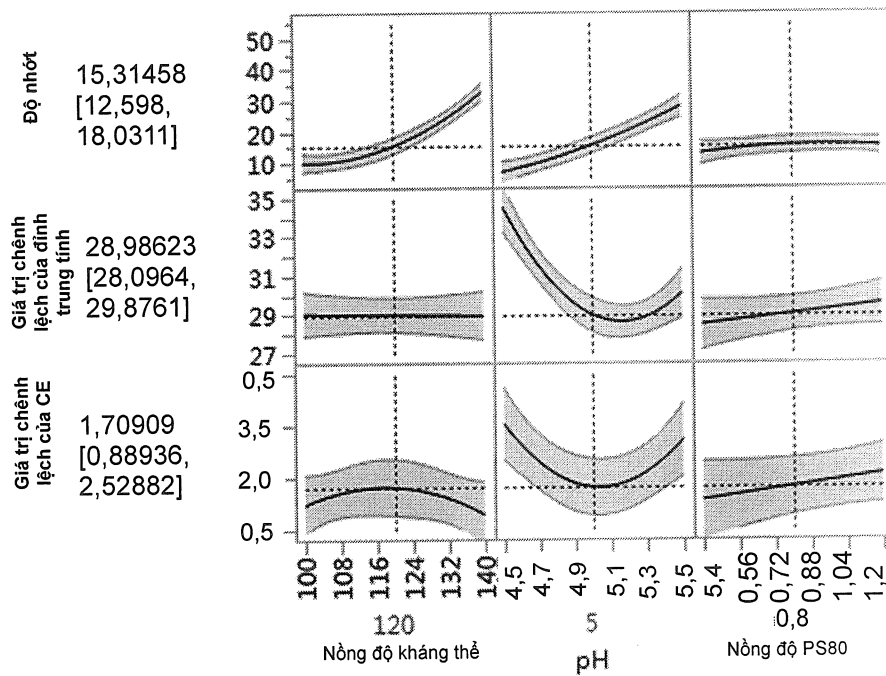
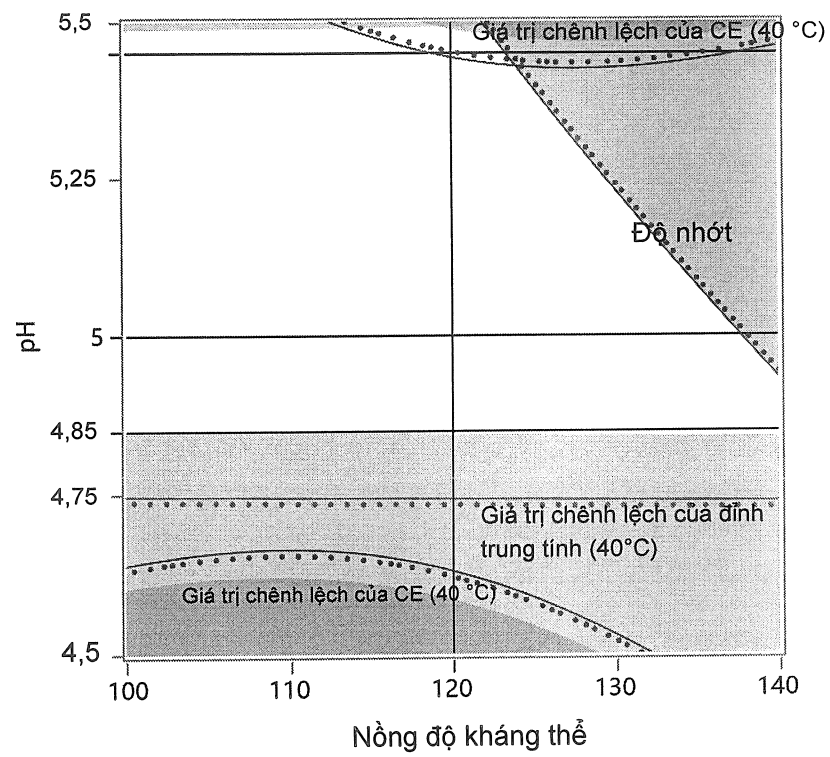


FIG.2

**FIG.3**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd.; Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> DUỐC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG IL-4R, CHẾ PHẨM ĐÔNG KHÔ ĐƯỢC TẠO RA TỪ DUỐC PHẨM NÀY VÀ DUNG DỊCH HOÀN NGUYÊN ĐƯỢC TẠO RA TỪ CHẾ PHẨM NÀY

<130> 721013CPCT

<150> CN202010107765.0

<151> 2020-02-21

<160> 48

<170> Danh mục trình tự SIPO 1.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(118)

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuột đơn dòng 25G7

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(108)

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột đơn dòng 25G7

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(10)
 <223> HCDR1 của kháng thể chuột đơn dòng 25G7

<400> 3
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His
 1 5 10

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(17)
 <223> HCDR2 của kháng thể chuột đơn dòng 25G7

<400> 4
 Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(9)
 <223> HCDR3 của kháng thể chuột đơn dòng 25G7

<400> 5

Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr

1

5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(10)

<223> LCDR1 của kháng thể chuột đơn dòng 25G7

<400> 6

Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1

5

10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(7)

<223> LCDR2 của kháng thể chuột đơn dòng 25G7

<400> 7

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1

5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(11)

<223> LCDR3 của kháng thể chuột đơn dòng 25G7

<400> 8

Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met Leu Thr

1

5

10

<210> 9

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(125)

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuột đơn dòng 7B10

```

<400> 9
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Leu Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Ser Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
          50          55          60
Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
          100          105          110
Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

```

<210> 10
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(111)
<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột đơn dòng 7B10

```

```

<400> 10
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1          5          10          15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
          20          25          30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Pro Pro
          35          40          45
Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
          50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65          70          75          80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
          85          90          95
Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

```

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

```

```

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(10)
<223> HCDR1 của kháng thể chuột đơn dòng 7B10

```

<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(17)

<223> HCDR2 của kháng thể chuột đơn dòng 7B10

<400> 12

Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

Thr

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(16)

<223> HCDR3 của kháng thể chuột đơn dòng 7B10

<400> 13

Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(14)

<223> LCDR1 của kháng thể chuột đơn dòng 7B10

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(7)

<223> LCDR2 của kháng thể chuột đơn dòng 7B10

<400> 15

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(9)

<223> LCDR3 của kháng thể chuột đơn dòng 7B10

<400> 16

Gln His Ser Asn Glu Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 17

<211> 445

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (1)..(445)

<223> Chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu25G7

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val

50 55 60

Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

```

      180      185      190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
      195      200      205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
      210      215      220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
      225      230      235      240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
      245      250      255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
      260      265      270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
      275      280      285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
      290      295      300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
      305      310      315      320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      325      330      335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
      340      345      350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
      355      360      365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
      370      375      380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
      385      390      395      400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      405      410      415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
      420      425      430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      435      440      445

```

<210> 18

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (1)..(215)

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hu25G7

<400> 18

```

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

```

```

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
      100              105              110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
      115              120              125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
      130              135              140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145              150              155              160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
      165              170              175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
      180              185              190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
      195              200              205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210              215

```

<210> 19

<211> 455

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (1)..(455)

<223> Chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu7B10

<400> 19

```

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

```

```

225          230          235          240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
          245          250          255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
          260          265          270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
          275          280          285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
          290          295          300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305          310          315          320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
          325          330          335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
          340          345          350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
          355          360          365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
          370          375          380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385          390          395          400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
          405          410          415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
          420          425          430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
          435          440          445
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          450          455

```

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (1)..(218)

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người hu7B10

<400> 20

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
          20          25          30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35          40          45
Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
          50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65          70          75          80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
          85          90          95
Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125

```

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 21
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(98)
 <223> Khuôn mẫu của chuỗi nặng đồng mầm của người IGHV3-48*01

<400> 21
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 22
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(95)
 <223> Khuôn mẫu của chuỗi nhẹ đồng mầm của người IGKV3-11*01

<400> 22
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 23
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(98)
 <223> Khuôn mẫu của chuỗi nặng đồng mầm của người IGHV1-2*02

<400> 23
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 24
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(100)
 <223> Khuôn mẫu của chuỗi nhẹ đồng mầm của người IGKV2D-29*01

<400> 24
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95

Ile Gln Leu Pro
100

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(118)
<223> hu25G7-VH-a

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(118)
<223> hu25G7-VH-b

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(118)
<223> hu25G7-VH-c

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
50 55 60
Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<222> (1)..(108)
<223> hu25G7-VL-a

<400> 28
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 29
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(108)
 <223> hu25G7-VL-b

<400> 29
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(108)
 <223> hu25G7-VL-c

<400> 30
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Asn Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 31
 <211> 125
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(125)

<223> hu7B10-VH-a

<400> 31

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35          40          45
Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
       50          55          60
Lys Thr Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
        100         105         110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
       115         120         125

```

<210> 32

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(125)

<223> hu7B10-VH-b

<400> 32

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35          40          45
Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
       50          55          60
Lys Thr Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
        100         105         110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
       115         120         125

```

<210> 33

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(125)

<223> hu7B10-VH-c

<400> 33

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20          25          30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Asp Thr Thr Lys Phe Ser Glu Asn Phe
50          55          60
Lys Thr Arg Val Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Lys Ser Lys Ile Ile Thr Thr Ile Val Ala Arg His Trp Tyr Phe
100         105         110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

```

<210> 34

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(111)

<223> hu7B10-VL-a

<400> 34

```

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

```

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(111)
 <223> hu7B10-VL-b

<400> 35
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 36
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(111)
 <223> hu7B10-VL-c

<400> 36
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 37
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(108)
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của hu25G7-A

<400> 37

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

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(10)

<223> LCDR1 của hu25G7-A

<400> 38

Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met Tyr
 1 5 10

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(7)

<223> LCDR2 của hu25G7-B

<400> 39

Leu Ala Ser Ser Arg Pro Ser
 1 5

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<222> (1)..(11)

<223> LCDR3 của hu25G7-A

<400> 40
 Gln Gln Trp Arg Ala Tyr Pro Pro Met Leu Thr
 1 5 10

<210> 41
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(108)
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của hu25G7-B

<400> 41
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Pro Gly Val Pro Pro Leu
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Leu Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(10)
 <223> LCDR1 của hu25G7-B

<400> 42
 Arg Ala Ser Pro Gly Val Pro Pro Leu Ala
 1 5 10

<210> 43
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <222> (1)..(118)
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nặng sau khi tối ưu hóa hu25G7-A/B VH

<400> 43

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

<210> 44

<211> 445

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<222> (1)..(445)

<223> Chuỗi nặng của hu25G7-A và hu25G7-B

<400> 44

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

```

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                230                235                240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                250                255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
                260                265                270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
                275                280                285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                290                295                300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                310                315                320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                330                335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
                340                345                350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
                355                360                365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                370                375                380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385                390                395                400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                405                410                415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
                420                425                430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                435                440                445

```

```

<210> 45
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<222> (1)..(215)
<223> Chuỗi nhẹ của hu25G7-A

```

```

<400> 45
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1                5                10                15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
                20                25                30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
                35                40                45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
                50                55                60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65                70                75                80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ala Tyr Pro Pro Met
                85                90                95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
                100                105                110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
                115                120                125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

```

```

      130              135              140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145              150              155              160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
      165              170              175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
      180              185              190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
      195              200              205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210              215

```

```

<210> 46
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<222> (1)..(215)
<223> Chuỗi nhẹ của hu25G7-B

```

```

<400> 46
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Pro Gly Val Pro Pro Leu
      20      25      30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
      35      40      45
Leu Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
      50      55      60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65      70      75      80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Pro Met
      85      90      95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
      100     105     110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
      115     120     125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
      130     135     140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145     150     155     160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
      165     170     175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
      180     185     190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
      195     200     205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210     215

```

```

<210> 47
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

<220>
 <221> MIỀN
 <223> hu25G7-C VH

<400> 47
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 48
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> Chuỗi nặng của kháng thể hu25G7-C

<400> 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Ile Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Asn Lys Arg Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

```

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
  195                      200                      205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
  210                      215                      220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
  225                      230                      235                      240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
  245                      250                      255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
  260                      265                      270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
  275                      280                      285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
  290                      295                      300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
  305                      310                      315                      320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
  325                      330                      335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
  340                      345                      350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
  355                      360                      365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
  370                      375                      380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
  385                      390                      395                      400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
  405                      410                      415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
  420                      425                      430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
  435                      440                      445

```