



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

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

(11)



1-0026192

(51)⁷ A61P 1/00; C07K 16/28; A61K 39/395 (13) B

(21) 1-2013-03794

(22) 02/05/2012

(86) PCT/US2012/036072 02/05/2012

(87) WO/2012/151248 08/11/2012

(30) 61/481,533 02/05/2011 US; 61/550,545 24/10/2011 US; 61/585,859 12/01/2012 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/04/2014 313A

(73) Millennium Pharmaceuticals, Inc. (US)

40 Landsdowne Street, Cambridge, MA 02139, United States of America

(72) DILUZIO, Willow (US); TRUONG, Nobel T. (US); VARGA, Csanad M. (US);
PALANIAPPAN, Vaithianathan (US); BROWN, Jason (US); FOX, Irving H. (US);
SCHOLZ, Catherine (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) DƯỢC PHẨM VÀ CHẾ PHẨM KHÁNG THỂ KHÁNG $\alpha 4\beta 7$

(57) Sáng chế đề xuất dược phẩm và chế phẩm kháng thể chứa hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và ít nhất một axit amin. Chế phẩm theo sáng chế có độ ổn định cải thiện, mức hình thành kết tụ giảm, và có thể làm chậm quá trình thoái hóa của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong đó hoặc kết hợp chúng theo cách bất kỳ. Sáng chế còn mô tả phác đồ liều an toàn của các chế phẩm kháng thể này, phác đồ liều này để tuân theo, và tạo ra lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ in vivo.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm và chế phẩm chứa kháng thể kháng $\alpha\beta 7$. Chế phẩm này có thể là hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ và một hoặc nhiều axit amin tự do, và tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1. Chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng rắn hoặc dạng lỏng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tiến bộ trong công nghệ sinh học khiến cho có thể tạo ra một loạt các protein để dùng trong dược phẩm bằng cách áp dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Do các protein lớn và phức tạp hơn nhiều so với các dược chất hữu cơ và vô cơ truyền thống (tức là, ngoài việc có cấu trúc ba chiều phức tạp còn có nhiều nhóm chức), việc điều chế các protein như vậy gặp các khó khăn riêng. Để một protein giữ được hoạt tính sinh học, việc điều chế cần phải duy trì được tính toàn vẹn về mặt cấu hình của ít nhất một trình tự lõi của axit amin của protein, trong khi đồng thời bảo vệ nhiều nhóm chức của protein khỏi quá trình thoái hóa. Các protein có thể kém ổn định, và đặc biệt các kháng thể đơn dòng và đa dòng có thể tương đối không ổn định (Xem tài liệu: Wang, et al., J. Pharm Sci. 96:1-26 (2007) chẳng hạn). Sẵn có một số lượng lớn các lựa chọn điều chế, và không phương pháp hoặc hệ thống nào là thích hợp cho tất cả các protein. Một số yếu tố cần được xem xét đã được thông báo (Xem tài liệu của Wang và các đồng tác giả, chẳng hạn).

Nhiều đặc tính có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của protein. Trên thực tế, ngay cả trong trường hợp các kháng thể tinh khiết, cấu trúc kháng thể có thể không đồng nhất, điều này làm phức tạp thêm quá trình điều chế hệ này. Ngoài ra, tốt hơn là tá dược chứa trong chế phẩm kháng thể giúp giảm thiểu hóa các đáp ứng miễn dịch tiềm năng.

Trong trường hợp kháng thể, việc duy trì được tính toàn vẹn về mặt cấu hình thậm chí còn quan trọng hơn. Các chu trình thoái hóa đối với các protein có thể liên quan đến sự mất ổn định hóa học (nghĩa là, quy trình bất kỳ bao gồm bước cải biến protein bằng cách hình thành liên kết hoặc phân cắt để tạo ra một thực thể hóa học

mới) hoặc sự mất ổn định vật lý (nghĩa là, các thay đổi trong cấu trúc bậc cao hơn của protein). Sự mất ổn định hóa học được thể hiện, ví dụ, ở hiện tượng khử amit, đồng phân hoá, thủy phân, oxy hoá, phân đoạn, loại beta glycan hoặc trao đổi disulfit. Sự mất ổn định vật lý có thể là do hiện tượng biến tính, kết tụ, kết tủa hoặc hấp phụ, chẳng hạn. Bốn chu trình thoái hóa protein phổ biến nhất là phân đoạn, kết tụ, khử amit, và oxy hoá protein. Hệ quả của sự mất ổn định hóa học hoặc vật lý của protein trị liệu bao gồm làm giảm liều lượng được sử dụng hữu hiệu, làm giảm độ an toàn của quá trình điều trị do, ví dụ sự kích ứng hoặc khả năng phản ứng miễn dịch, và cần phải sản xuất thường xuyên hơn do thời hạn sử dụng ngắn.

Sấy khô ở nhiệt độ thấp là kỹ thuật thường được áp dụng để bảo quản protein; sấy khô ở nhiệt độ thấp giúp loại nước ra khỏi chế phẩm protein được quan tâm. Sấy khô ở nhiệt độ thấp, hay đông khô nhanh, là quá trình mà nhờ đó nguyên liệu cần làm khô trước hết được làm lạnh, và sau đó nước đá hoặc dung môi đã làm lạnh được loại bỏ bằng cách thăng hoa trong điều kiện chân không. Chế phẩm đã được sấy khô sơ bộ ở nhiệt độ thấp có thể chứa tá dược để làm ổn định protein trong quá trình sấy khô ở nhiệt độ thấp và/hoặc cải thiện độ ổn định của chế phẩm protein được làm sấy khô ở nhiệt độ thấp (Pikal M., Biopharm. 3(9)26-30 (1990) và Arakawa et al. Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991)).

Một số công bố đã bộc lộ nhiều phương pháp chung để điều trị bệnh viêm ruột, và đưa ra các phác đồ liều lượng để sử dụng các tác nhân được thiết kế để điều trị bệnh viêm ruột. Ví dụ, WO 96/24673 bộc lộ addressin mạch niêm mạc và điều trị bệnh liên quan đến sự phục hồi bạch cầu cho hệ tiêu hoá nhờ việc gắn kết bạch cầu với tế bào biểu hiện MAdCAM. U.S. 2005/0095238 mô tả phương pháp điều trị bệnh liên quan đến hiện tượng thâm nhập bạch cầu của mô niêm mạc và sử dụng lượng hữu hiệu globulin miễn dịch của người hoặc globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết với $\alpha 4\beta 7$ integrin. U.S. 2005/0095238 cũng mô tả các liều dùng khác nhau (ví dụ như 0,15mg, khoảng 0,5mg, khoảng 1,0mg, khoảng 1,5mg hoặc khoảng 2,0mg globulin miễn dịch hoặc đoạn cho mỗi kg thể trọng) và khoảng cách thời gian khác nhau giữa các liều dùng (7 ngày, 14 ngày, 21 ngày, 28 ngày, hoặc 30 ngày). Tuy nhiên, các patent và công bố nêu trên không bộc lộ các chế phẩm cụ thể của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ hoặc các liều dùng cụ thể

và phác đồ liều được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong sáng chế này. Quan trọng là, các patent nêu trên không bộc lộ chế phẩm, liều dùng, và phác đồ liều mà được đưa ra trong các phương pháp điều trị (được minh họa bởi các dữ liệu thử nghiệm lâm sàng) được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong sáng chế này.

Cleland J L và các đồng tác giả mô tả tỷ lệ mol cụ thể của chất ổn định protein cần thiết cho việc ổn định khi lưu trữ của kháng thể đơn dòng đông khô.

WO 0178779 A2 mô tả phương pháp điều trị cho người mắc bệnh liên quan đến sự rỉ bạch cầu qua mô niêm mạc, bao gồm việc dùng cho người lượng hữu hiệu của globulin miễn dịch đã được làm cho giống của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có ái lực liên kết với alpha 4 beta 7 integrin. Tốt hơn là, không nhiều hơn khoảng 8 mg trên kg thể trọng globulin miễn dịch hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó được dùng trong giai đoạn khoảng một tháng.

US2007122404 A1 mô tả globulin miễn dịch đã được làm giống của người có ái lực liên kết với alpha4beta7 integrin và chứa các vùng quyết định bổ cứu (CDRs) của kháng thể Act-1 của chuột. Các globulin miễn dịch đã được làm giống của người có thể được sử dụng trong các ứng dụng điều trị, ví dụ để kiểm soát sự rò rỉ tế bào lympho tới mô niêm mạc hoặc để điều trị bệnh viêm ruột.

WO 9806248 A2 cũng bộc lộ việc dùng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ để điều trị bệnh viêm ruột (điểm 50).

Chế phẩm kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế bạch cầu gắn kết với tế bào biểu hiện MAdCAM và vì vậy trợ giúp cho quá trình điều trị bệnh viêm ruột ở các bệnh nhân. Vì vậy, cần nhanh chóng tìm ra các liều lượng và phác đồ liều thích hợp đối với các hợp chất này, và phát triển các chế phẩm, tốt hơn là chế phẩm tiêm tĩnh mạch, ở dạng ổn định và thuận tiện mà tạo ra lượng chế phẩm kháng thể trong máu ổn định, hữu hiệu để điều trị trong khoảng thời gian kéo dài.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất đến việc xác định một đường không khử và ít nhất một axit amin, làm tá được hữu ích để bào chế chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ mà sự mất ổn định của chúng khiến cho chúng dễ bị khử amit,

oxy hoá, đồng phân hoá và/hoặc kết tụ. Chế phẩm này giúp cải thiện độ ổn định, làm giảm sự hình thành kết tụ và làm chậm quá trình thoái hóa của kháng thể có trong chế phẩm.

Do vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm ổn định chứa hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và ít nhất một axit amin tự do, và tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1. Chế phẩm này có thể là chế phẩm lỏng hoặc chế phẩm khô (chẳng hạn, đã được đông khô). Chế phẩm còn có thể chứa chất đệm. Theo một số phương án, đường không khử là manitol, sorbitol, sucroza, trehaloza, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, axit amin tự do trong chế phẩm là histidin, alanin, arginin, glyxin, axit glutamic, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng. Chế phẩm có thể chứa từ 50mM đến 175mM axit amin tự do. Chế phẩm có thể chứa từ 100mM đến 175mM axit amin tự do. Tỷ lệ mol giữa axit amin tự do và kháng thể có thể thấp nhất là 250:1.

Chế phẩm còn có thể chứa chất hoạt động bề mặt. Chất hoạt động bề mặt có thể là polysorbat 20, polysorbat 80, poloxame, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số khía cạnh, chế phẩm có thể làm giảm thiểu tính sinh miễn dịch của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Chế phẩm, chẳng hạn, ở trạng thái khô, có thể ổn định trong khoảng thời gian ngắn nhất là ba tháng ở 40°C, độ ẩm tương đối (relative humidity - RH) 75%.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm được làm khô ở nhiệt độ thấp và chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với lượng nằm trong khoảng ít nhất từ khoảng 5% đến 10% trước khi sấy khô ở nhiệt độ thấp. Chế phẩm có thể chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với lượng ít nhất khoảng 6% trước khi sấy khô ở nhiệt độ thấp. Chế phẩm có thể được hoàn nguyên từ chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp (chẳng hạn, được hoàn nguyên để thành chế phẩm lỏng ổn định).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm ổn định chứa hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và ít nhất một axit amin tự do, và tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1 và tỷ lệ giữa axit amin tự do và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 250:1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm lỏng ổn định chứa dung dịch nước chứa đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và ít nhất một axit amin tự do, trong đó tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1. Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế liên quan đến chế phẩm lỏng chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với lượng ít nhất nằm trong khoảng từ 40mg/ml đến 80mg/ml, một hoặc nhiều axit amin với lượng ít nhất nằm trong khoảng từ 50mM đến 175mM, và đường với lượng nằm trong khoảng từ ít nhất 6% đến ít nhất 10% (khối lượng/thể tích). Chế phẩm lỏng còn có thể chứa chất đệm. Theo một số phương án, chế phẩm lỏng còn chứa chất tạo chelat kim loại. Theo một số phương án, chế phẩm lỏng còn chứa chất chống oxy hoá.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm lỏng chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với lượng ít nhất khoảng 60mg/ml, đường không khử với lượng ít nhất khoảng 10% (khối lượng/thể tích), và ít nhất một hoặc nhiều axit amin tự do với lượng khoảng 125mM.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm lỏng chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với lượng ít nhất khoảng 60mg/ml, đường không khử với lượng ít nhất khoảng 10% (khối lượng/thể tích), và một hoặc nhiều axit amin tự do với lượng ít nhất khoảng 175mM.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm khô, chẳng hạn chế phẩm đã được đông khô, chứa hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, histidin, arginin, và polysorbat 80, trong đó chế phẩm này ở dạng rắn, và tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp chứa hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, histidin, arginin, và polysorbat 80. Theo khía cạnh này, tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1. Hơn nữa, tỷ lệ mol giữa arginin và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) trong chế phẩm lớn hơn 250:1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm nêu trong bản mô tả, phương pháp này bao gồm bước duy trì nhiệt độ sản phẩm thấp hơn

hiệt độ làm xẹp trong quá trình làm khô sơ bộ. Phương pháp còn có thể bao gồm bước ủ.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho người mắc bệnh viêm ruột, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột dùng một globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ của người, trong đó globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên không có nguồn gốc từ người và ít nhất một phần của kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liều sau đây: (a) liều ban đầu là 300mg globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền trong tĩnh mạch; (b) sau đó là liều thứ hai tiếp theo 300mg globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền trong tĩnh mạch khoảng hai tuần sau khi dùng liều ban đầu; (c) sau đó là liều thứ ba 300mg globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng tiêm truyền tĩnh mạch khoảng sáu tuần sau khi dùng liều thứ nhất; (d) tiếp theo là liều thứ tư và các liều tiếp theo 300mg globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền tĩnh mạch bốn tuần một lần hoặc tám tuần một lần sau khi dùng liều kháng thể được làm giống của người thứ ba nếu cần thiết; trong đó phác đồ liều gây ra đáp ứng lâm sàng và/hoặc làm thuyên giảm về mặt lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết với phức $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi của chuỗi nặng của trình tự axit amin được nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:11, CDR2 SEQ ID NO:12, CDR3 SEQ ID NO:13; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:8, CDR2 SEQ ID NO:9, CDR3 SEQ ID NO:10.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phác đồ liều để điều trị bệnh viêm ruột, trong đó phác đồ liều này bao gồm các bước: cho bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột dùng globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của

nó có tính đặc hiệu gắn kết với integrin $\alpha 4\beta 7$ của người, trong đó globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa vùng gắn kết kháng nguyên không có nguồn gốc từ người và ít nhất một phần của kháng thể có nguồn gốc từ người, trong đó globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ liều sau đây: (a) liều ban đầu 300mg globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền qua đường tĩnh mạch; (b) sau đó là liều thứ hai tiếp theo 300mg globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền qua đường tĩnh mạch khoảng hai tuần sau liều đầu tiên; (c) sau đó là liều thứ ba tiếp theo 300mg globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền qua đường tĩnh mạch khoảng sáu tuần sau liều đầu tiên; (d) sau đó là liều thứ tư và các liều tiếp theo 300mg globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng truyền qua đường tĩnh mạch bốn tuần một lần hoặc tám tuần một lần sau khi dùng liều thứ ba tiếp theo kháng thể đã được làm giống của người nếu cần thiết; trong đó phác đồ liều gây ra đáp ứng lâm sàng và/hoặc thuyên giảm lâm sàng ở bệnh viêm ruột của bệnh nhân; và ngoài ra trong đó globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu gắn kết với phức $\alpha 4\beta 7$, trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và ba vùng xác định bổ trợ (CDR1, CDR2, và CDR3) của vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu dưới đây: chuỗi nhẹ: CDR1 SEQ ID NO:11, CDR2 SEQ ID NO:12, CDR3 SEQ ID NO:13; chuỗi nặng: CDR1 SEQ ID NO:8, CDR2 SEQ ID NO:9, CDR3 SEQ ID NO:10.

Theo một số khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, liều lượng, hoặc phác đồ liều có thể làm giảm thiểu tính sinh miễn dịch của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Bệnh nhân có thể không có đáp ứng thỏa đáng với, mất đáp ứng với, hoặc không chịu được việc điều trị bằng ít nhất một trong số các chất điều biến miễn dịch, chất đối kháng yếu tố hoại tử khối u- α (TNF- α) hoặc hỗn hợp của chúng.

Bệnh viêm ruột có thể là bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét đại tràng. Bệnh viêm ruột có thể là bệnh viêm loét đại tràng ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng.

Phác đồ liệu có thể làm lành niêm mạc ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng.

Bệnh nhân có thể đã được điều trị trước đó bằng ít nhất một corticosteroid dùng cho bệnh viêm ruột. Phác đồ liệu có thể làm cho bệnh nhân giảm, loại bỏ hoặc giảm và loại bỏ việc sử dụng corticosteroid.

Theo một số khía cạnh, globulin miễn dịch được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng ở dạng liều cuối cùng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,4mg/ml. Globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể được dùng ở dạng liều cuối cùng bằng khoảng 1,2mg/ml. Globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên có thể được dùng cho bệnh nhân trong khoảng 30 phút.

Globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể được hoàn nguyên từ chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp.

Globulin miễn dịch đã được làm giống của người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể được hoàn nguyên thành chế phẩm lỏng ổn định.

Theo một số khía cạnh, phác đồ liệu không làm thay đổi tỷ lệ giữa CD4 và CD8 trong dịch não tủy của các bệnh nhân nhận phác đồ điều trị này.

Bệnh nhân có thể là người 65 tuổi hoặc già hơn và không đòi hỏi sự điều chỉnh bất kỳ về phác đồ liệu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 minh họa trình tự nucleotit (SEQ ID NO:1) mã hoá chuỗi nặng của globulin miễn dịch kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người, và trình tự axit amin được suy ra của chuỗi nặng này (SEQ ID NO:2). Trình tự nucleotit chứa các vị trí tách dòng (chữ thường), trình tự Kozak (chữ hoa, nucleotit 18-23 của SEQ ID NO:1) và trình tự dẫn đầu (chữ thường, nucleotit 24-86 của SEQ ID NO:1) ở đầu 5' của chuỗi nặng. Khung đọc mở của trình tự nucleotit này là nucleotit 24-1433 của SEQ ID NO:1.

Hình 2 minh họa trình tự nucleotit (SEQ ID NO:3) mã hoá chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch được làm giống của người dưới đây gọi là vedolizumab, và axit amin suy ra (SEQ ID NO: 4) của chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit này chứa các vị trí tách dòng (chữ thường), trình tự Kozak (chữ hoa, nucleotit 18-23 của SEQ ID NO:3) và trình tự dẫn đầu (chữ thường, nucleotit 24-80 của SEQ ID NO:3) ở đầu 5' của chuỗi nặng. Khung đọc mở của trình tự nucleotit này là nucleotit 24-737 của SEQ ID NO:3.

Hình 3 là so sánh trình tự axit amin của (A) chuỗi nhẹ trưởng thành được làm giống của người (axit amin 20-238 của SEQ ID NO:4) của globulin miễn dịch được làm giống của người, dưới đây gọi là vedolizumab và (B) chuỗi nhẹ trưởng thành được làm giống của người của globulin miễn dịch được làm giống của người dưới đây được gọi là LDP-02 (SEQ ID NO:5). (Liên quan đến LDP-02, xem tài liệu: WO 98/06248 và Feagan et al., N. Eng. J. Med. 352:2499-2507 (2005)). Feagan và đồng tác giả mô tả nghiên cứu lâm sàng về LDP-02, nhưng trong bài báo này họ gọi LDP-02 là MLN02.). Việc so sánh cho thấy các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ vedolizumab và LDP-02 khác nhau ở các vị trí 114 và 115 của các chuỗi nhẹ trưởng thành này.

Hình 4 là so sánh trình tự axit amin của (A) vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa ở loài người (SEQ ID NO:6) và (B) vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa ở loài gặm nhấm (SEQ ID NO:7). Gốc axit amin Thr và Val (có mặt ở các vị trí 114 và 115 của chuỗi nhẹ vedolizumab trưởng thành (các axit amin 133 và 134 của SEQ ID NO:4)) có mặt trong vùng ổn định của chuỗi nhẹ kappa ở người, trong đó các gốc axit amin Ala và Asp (có mặt ở các vị trí 114 và 115 của chuỗi nhẹ LDP-02 trưởng thành (SEQ ID NO:5)) có mặt trong vùng ổn định của chuỗi nhẹ kappa ở chuột nhắt.

Hình 5 là bản đồ vật truyền pLKTOK38D (còn được gọi là pTOK38MLN02-TV), mã hoá chuỗi nặng được làm giống của người và chuỗi nhẹ được làm giống của người của MLN02, và thích hợp để sản sinh vedolizumab trong tế bào CHO. (Xem Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/0033561 A1, bậc lộ pLKTOK38. pLKTOK38D là biến thể của pLKTOK38, trong đó các vị trí cắt giới hạn được chỉ ra trên bản đồ nằm ở hai bên trình tự mã hoá vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.)

Hình 6A là mô hình dự đoán về mức độ thay đổi monome theo phần trăm, mức độ thay đổi kết tụ theo phần trăm, và mức độ thay đổi dạng đồng chức năng chính

theo phần trăm của chế phẩm kháng $\alpha 4\beta 7$ đã được làm sấy khô ở nhiệt độ thấp. Các mô hình này dựa trên phân tích thống kê các dữ liệu nêu trong Ví dụ 1. Dòng ở giữa cho biết kết quả của mô hình dự đoán và các dòng phía ngoài hiển thị giới hạn tin cậy 95% đối với các mô hình dự đoán này. Hình 6B là các mô hình thay thế dựa trên phân tích thống kê dữ liệu ở 40°C từ các Bảng 1 đến 3 khi các hệ số đầu vào là độ pH, tỷ lệ mol đường:protein, và tỷ lệ mol arginin:protein. Dòng ở giữa thể hiện kết quả của các mô hình dự đoán và các dòng phía ngoài hiển thị giới hạn độ tin cậy 95% đối với các mô hình dự đoán này.

Hình 7 là các trình tự axit amin của (A) vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ kappa của kháng thể GM607'CL trưởng thành của người và (B) vùng biến đổi trên chuỗi nặng 21/28'CL của người.

Hình 8 là đồ thị thể hiện hàm lượng chất rắn và tải lượng ảnh hưởng đến thời gian làm khô (số trên các đường thể hiện thời gian làm khô tính theo phút).

Hình 9 là đồ thị cho thấy vedolizumab không làm chậm sự khởi phát các triệu chứng lâm sàng của bệnh viêm não tự miễn thử nghiệm (experimental autoimmune encephalomyelitis - EAE) so với mẫu đối chứng giả dược. Natalizumab làm chậm đáng kể ($p < 0,05$) sự khởi phát các triệu chứng lâm sàng của EAE so với mẫu đối chứng giả dược.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Chế phẩm này có thể là hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ và một hoặc nhiều axit amin tự do, và tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ lớn hơn 600mol đường không khử:1mol kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Chế phẩm có thể ở dạng rắn hoặc dạng lỏng.

Định nghĩa

Thuật ngữ “dược phẩm” được dùng để chỉ chế phẩm chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của kháng thể có hiệu quả, và không chứa các hợp phần khác có tính độc không chấp nhận được đối với đối tượng dùng chế phẩm này.

Chế phẩm “ổn định” là chế phẩm mà trong đó kháng thể trong nó về cơ bản vẫn giữ được tính ổn định vật lý của nó và/hoặc tính ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Theo một khía cạnh, chế phẩm về cơ bản vẫn giữ được độ ổn định vật lý và hóa học của nó, cũng như hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Khoảng thời gian bảo quản thường được chọn dựa trên thời hạn sử dụng dự định của chế phẩm. Các kỹ thuật phân tích khác nhau để xác định độ ổn định protein là sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này và được xem xét trong tài liệu: Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) và Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993) chẳng hạn.

Kháng thể đơn dòng “được khử amit” là kháng thể trong đó một hoặc nhiều gốc asparagin hoặc glutamin của nó được tạo dẫn xuất, ví dụ như thành axit aspartic hoặc axit iso-aspartic.

Kháng thể “dễ bị khử amit” là kháng thể chứa một hoặc nhiều gốc được thấy là dễ bị khử amit.

Kháng thể “dễ bị oxy hoá” là kháng thể chứa một hoặc nhiều gốc được thấy là dễ bị oxy hoá.

Kháng thể “dễ bị kết tụ” là kháng thể được thấy là dễ bị kết tụ với các phân tử kháng thể khác, đặc biệt là khi làm lạnh, gia nhiệt, làm khô, hoàn nguyên và/hoặc khuấy.

Kháng thể “dễ bị phân đoạn” là kháng thể được thấy là dễ bị chia thành hai hoặc nhiều đoạn, ví dụ ở vùng bản lề của nó.

Thuật ngữ “làm giảm mức độ khử amit, oxy hoá, kết tụ, hoặc phân đoạn” được dùng để chỉ việc ngăn ngừa hoặc làm giảm (ví dụ, đến 80%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% hoặc 10%) lượng kháng thể bị khử amit, kết tụ, hoặc phân đoạn so với kháng thể đơn dòng được bào chế ở độ pH khác hoặc trong dung dịch đệm khác.

“Khối kết tụ”, “khối kết tụ SEC”, hoặc “khối kết tụ hòa tan” là nhiều hơn một và ít hơn hoặc bằng mười protein và/hoặc đoạn kháng thể được liên kết với nhau nhờ các tương tác đồng hóa trị, ion, hoặc kỵ nước để tạo thành thể protein lớn hơn.

“Khối kết tụ không hòa tan” hoặc “hạt” là nhiều hơn mười protein và/hoặc đoạn kháng thể liên kết với nhau nhờ các tương tác đồng hóa trị, ion, hoặc kỵ nước để tạo thành thể protein lớn hơn.

Thuật ngữ “hoạt tính sinh học” của kháng thể đơn dòng được dùng để chỉ khả năng của kháng thể gắn kết với kháng nguyên và tạo ra đáp ứng sinh học ở mức độ đo được mà có thể đo được in vitro hoặc in vivo. Hoạt tính này có thể là hoạt tính đối kháng hoặc hoạt tính chủ vận.

Phân tử trên bề mặt tế bào, “integrin $\alpha_4\beta_7$ ” hay “ $\alpha_4\beta_7$ ” là heterodime của mạch α_4 (CD49D, ITGA4) và mạch β_7 (ITGB7). Mỗi mạch có thể tạo thành một heterodime với một mạch integrin khác, để tạo thành $\alpha_4\beta_1$ hoặc $\alpha_E\beta_7$. Các gen α_4 và β_7 của người (Ngân hàng gen (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) với số truy cập RefSeq là NM_000885 và NM_000889, tương ứng) được biểu hiện bởi các tế bào lympho B và T, đặc biệt là các tế bào lympho CD4+ mang trí nhớ miễn dịch. Tiêu biểu trong số các integrin, $\alpha_4\beta_7$ có thể tồn tại ở trạng thái nghỉ hoặc trạng thái hoạt hóa. Các phối tử của $\alpha_4\beta_7$ bao gồm phân tử bám dính tế bào mạch (vascular cell adhesion molecule - VCAM), fibronectin và addressin niêm mạc (MAdCAM, (ví dụ, MAdCAM-1)).

Được sử dụng theo bản mô tả này, globulin miễn dịch ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà có “tính đặc hiệu gắn kết với phức $\alpha_4\beta_7$ ” gắn kết với $\alpha_4\beta_7$, nhưng không gắn kết với $\alpha_4\beta_1$ hoặc $\alpha_E\beta_7$.

Thuật ngữ chế phẩm “đẳng trương” được sử dụng trong bản mô tả này về cơ bản có cùng áp suất thẩm thấu như máu của người. Chế phẩm đẳng trương sẽ thường có áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng từ 250mOsm đến 350mOsm. Mức độ đẳng trương có thể được đo bằng cách sử dụng thẩm thấu kế kiểu áp suất hơi hoặc làm lạnh bằng đá chẳng hạn.

Thuật ngữ “chất đệm” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ chất đệm mà kháng lại sự thay đổi về độ pH nhờ tác động của các thành phần tiếp hợp axit-bazơ của nó. Chất đệm có thể có mặt trong chế phẩm lỏng hoặc rắn theo sáng chế. Chất đệm này điều chỉnh độ pH của chế phẩm đến trị số nằm trong khoảng 5,0 đến 7,5, đến trị số nằm trong khoảng 5,5 đến 7,5, đến trị số nằm trong khoảng 6,0 đến 6,5, hoặc đến độ

pH khoảng 6,3. Theo một khía cạnh, ví dụ về các chất đệm sẽ điều chỉnh độ pH trong khoảng từ 5,0 đến 7,5 bao gồm axetat, suxinat, gluconat, histidin, xitrat, phosphat, maleat, cacodylat, axit 2-[N-morpholino]etan sulfonic (MES), bis(2-hydroxyetyl)iminotris[hydroxymetyl]metan (Bis-Tris), axit N-[2-axetamido]-2-iminodixetic (ADA), glyxylglyxin và các chất đệm axit hữu cơ khác. Theo khía cạnh khác, chất đệm trong bản mô tả là histidin hoặc xitrat.

“Đệm histidin” là đệm chứa ion histidin. Ví dụ về chất đệm histidin bao gồm dung dịch histidin clorua, histidin axetat, histidin phosphat, histidin sulfat. Đệm histidin hoặc đệm histidin-HCl có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, độ pH nằm trong khoảng từ 6,1 đến 6,5, hoặc độ pH bằng khoảng 6,3.

Trong bản mô tả này, “sacarit” là hợp chất có công thức chung $(CH_2O)_n$ và các chất dẫn xuất của nó, bao gồm monosacarit, disacarit, trisacarit, polysacarit, các rượu đường, đường khử, đường không khử, và các hợp chất tương tự. Theo một khía cạnh, ví dụ về các sacarit trong bản mô tả này bao gồm glucoza, sucroza, trehaloza, lactoza, fructoza, maltoza, đextran, erythritol, glyxerol, arabitol, sylitol, sorbitol, manitol, melibioza, meleziotoza, rafinoza, manotrioza, stachyoza, maltoza, lactuloza, maltuloza, glucitol, maltitol, lactitol, iso-maltuloza, và các chất tương tự. Sacarit có thể là chất bảo vệ sấy khô ở nhiệt độ thấp. Theo khía cạnh khác, sacarit trong bản mô tả này là disacarit không khử, như sucroza.

Trong bản mô tả này, “chất hoạt động bề mặt” được dùng để chỉ chất làm giảm sức căng bề mặt của chất lỏng. Chất hoạt động bề mặt này có thể là chất hoạt động bề mặt không ion. Theo một khía cạnh, các ví dụ về chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả này bao gồm polysorbat (polyoxyetylen sorbitan monolaurat, Ví dụ, polysorbat 20 và polysorbat 80); TRITON (t-Octylphenoxypolyetoxyetanol, chất tẩy rửa không ion, do Union Carbide subsidiary of Dow Chemical Co., Midland MI cung cấp); natri đodexyl sulfat (SDS); natri laurel sulfat; natri octyl glycosit; lauryl-, myristyl-, linoleyl-, hoặc stearyl-sulfobetain; lauryl-, myristyl-, linoleyl- hoặc stearyl-sarcosin; linoleyl-, myristyl-, hoặc xetyl-betain; lauroamidopropyl-, cocamidopropyl-, linoleamidopropyl-, myristamidopropyl-, palmidopropyl-, hoặc isostearamidopropyl-betain (ví dụ như lauroamidopropyl); myristamidopropyl-, palmidopropyl-, hoặc isostearamidopropyl-

đimetylamin; natri methyl cocoyl-, hoặc đinatri methyl oleyl-aurat; sorbitan monopalmitat; và nhóm MONAQUAT (do Mona Industries, Inc., Paterson, N.J. cung cấp); polyetyl glycol (PEG), polypropylen glycol (PPG), và các copolyme của poloxyetylen và poloxypropylen glycol (ví dụ như Pluronic/Poloxamer, PF68 etc); v.v.. Theo khía cạnh khác, chất hoạt động bề mặt trong bản mô tả này là polysorbat 80.

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả này với nghĩa rộng nhất và cụ thể bao gồm các kháng thể đơn dòng với chiều dài đầy đủ, các globulin miễn dịch, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa hiệu (ví dụ như các kháng thể đặc hiệu kép) được tạo thành từ ít nhất hai kháng thể với chiều dài đầy đủ, ví dụ, mỗi kháng thể được tạo thành từ một kháng nguyên hoặc epitop khác nhau, và các đoạn gắn kết kháng nguyên riêng biệt, bao gồm dAb, scFv, Fab, F(ab)₂, Fab', kể cả các kháng thể của người, được làm giống của người và các kháng thể của các loài không phải người và các dạng gắn kết kháng nguyên tái tổ hợp như các đơn thể và nhị thể.

Lượng phân tử gam và tỷ lệ phân tử của kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ so với các tá được nêu trong bản mô tả được tính toán dựa trên giả thiết là kháng thể có phân tử lượng gần đúng bằng khoảng 150.000 dalton. Phân tử lượng thực của kháng thể có thể không phải 150.000 dalton, tùy thuộc vào thành phần axit amin hoặc cải biến sau dịch mã, ví dụ, phụ thuộc vào dòng tế bào được dùng để biểu hiện kháng thể. Phân tử lượng thực của kháng thể có thể là 150.000 dalton +/- 5%.

Thuật ngữ “kháng thể của người” bao gồm kháng thể có trình tự có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng phôi của người, như kháng thể có nguồn gốc từ chuột nhắt chuyển gen mang các gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, chuột nhắt đã được biến đổi gen XENOMOUSE (do Abgenix, Fremont, CA cung cấp), HUMAB-MOUSE®, chuột nhắt chuyển nhiễm sắc thể KIRIN TC MOUSE™, KMMOUSE® (do MEDAREX, Princeton, NJ cung cấp)), các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn của người, tế bào u tủy của người, hoặc tế bào B của người.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể thu được từ quần thể gồm các kháng thể về cơ bản đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng biệt chứa trong quần thể này giống hệt nhau và/hoặc gắn kết với cùng epitop, ngoại trừ các biến thể có thể được tạo ra trong quá trình sản xuất kháng thể đơn dòng,

các biến thể như vậy thường có mặt với lượng nhỏ. Ngược lại với các chế phẩm kháng thể đa dòng mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau trực tiếp kháng lại các yếu tố quyết định kháng nguyên (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng trực tiếp kháng lại một yếu tố quyết định đơn nhất trên kháng nguyên đó. Bỏ ngữ “đơn dòng” biểu thị đặc tính của kháng thể thu được từ quần thể gồm các kháng thể về cơ bản đồng nhất, và không nên được hiểu là đặc tính mong muốn của kháng thể theo phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra theo phương pháp tế bào lai được mô tả đầu tiên bởi Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), hoặc có thể được tạo ra theo các phương pháp ADN tái tổ hợp (xem patent Mỹ số 4,816,567 chẳng hạn). “Các kháng thể đơn dòng” cũng có thể được phân lập từ các thư viện kháng thể thực khuẩn bằng cách áp dụng các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu: Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) và Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) chẳng hạn.

Các kháng thể đơn dòng trong bản mô tả này cụ thể bao gồm các kháng thể “khảm”, trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ giống hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ một loài cụ thể hoặc thuộc một lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi (các chuỗi) này giống hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ một loài khác hoặc thuộc một lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như các đoạn của các kháng thể này, miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn (patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Các kháng thể khảm đáng quan tâm trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể “được làm giống của động vật linh trưởng” chứa trình tự gắn kết kháng nguyên thuộc miền thay đổi có nguồn gốc từ một động vật linh trưởng không phải người (ví dụ như Old World Monkey, Ape v.v.) và trình tự vùng ổn định của người.

“Các đoạn gắn kết kháng nguyên” của globulin miễn dịch được làm giống của người được điều chế trong chế phẩm theo sáng chế chứa ít nhất vùng thay đổi của các chuỗi nặng và/hoặc các chuỗi nhẹ của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Ví dụ, đoạn gắn kết kháng nguyên của vedolizumab chứa các gốc axit amin 20-131 của trình tự chuỗi nhẹ được làm giống của người SEQ ID NO:4. Ví dụ về các đoạn gắn kết kháng nguyên bao gồm các đoạn Fab, các đoạn Fab', các đoạn scFv và F(ab')₂ của globulin miễn dịch

được làm giống của người đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các đoạn gắn kết kháng nguyên của globulin miễn dịch được làm giống của người theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách phân cắt nhờ enzym hoặc theo các kỹ thuật tái tổ hợp. Chẳng hạn, việc phân cắt nhờ papain hoặc pepsin có thể được áp dụng để tạo ra các đoạn Fab hoặc $F(ab')_2$ tương ứng. Các kháng thể cũng có thể được tạo ra ở nhiều dạng cắt cụt bằng cách sử dụng các gen kháng thể, trong đó một hoặc nhiều codon kết thúc được đưa vào trước vị trí kết thúc tự nhiên. Ví dụ, cấu trúc tái tổ hợp mã hoá chuỗi nặng của đoạn $F(ab')_2$ có thể được thiết kế để bao gồm các trình tự ADN mã hoá miền CH_1 và vùng bản lề của chuỗi nặng này. Theo một khía cạnh, các đoạn gắn kết kháng nguyên ức chế $\alpha 4\beta 7$ integrin gắn kết với một hoặc nhiều phối tử của nó (ví dụ như MAdCAM addressin niêm mạc (ví dụ, MAdCAM-1), fibronectin).

Sự phân hủy các kháng thể bởi papain tạo ra hai đoạn gắn kết kháng nguyên giống hệt nhau, được gọi là các đoạn “Fab”, mỗi đoạn có một vị trí gắn kết kháng nguyên duy nhất, và một đoạn “Fc” còn lại mà tên của nó phản ánh khả năng dễ dàng kết tinh của nó. Việc xử lý bằng pepsin tạo ra một đoạn $F(ab')_2$ có hai vị trí gắn kết kháng nguyên và nó cũng có khả năng liên kết chéo kháng nguyên.

“Fv” là đoạn kháng thể chứa một đime gồm một miền thay đổi chuỗi nặng và một miền thay đổi chuỗi nhẹ liên kết không đồng hóa trị với nhau.

Đoạn Fab còn chứa miền ổn định của chuỗi nhẹ và miền ổn định thứ nhất (CH_1) của chuỗi nặng. Các đoạn Fab' khác với các đoạn Fab ở chỗ có bổ sung một vài gốc ở đầu tận cùng carboxy của miền CH_1 của chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề của kháng thể. Trong bản mô tả này, Fab'-SH được dùng để chỉ Fab', trong đó gốc (các gốc) xystein của miền ổn định mang ít nhất một nhóm thiol tự do. Các đoạn kháng thể $F(ab')_2$ được tạo ra trước tiên ở dạng các cặp đoạn Fab' có xystein bản lề giữa chúng. Các phản ứng ngẫu hợp hóa học của các đoạn kháng thể đã được biết rõ.

Các đoạn kháng thể “Fv chuỗi đơn” hoặc “scFv” bao gồm các miền V_H và V_L của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Theo một khía cạnh, polypeptit Fv còn chứa một liên kết polypeptit giữa các miền V_H và V_L , cho phép scFv này tạo ra cấu trúc mong muốn để gắn kết kháng nguyên. Để biết rõ về

scFv, xem tài liệu: Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Thuật ngữ “nhị thể” được dùng để chỉ các đoạn kháng thể nhỏ với hai vị trí gắn kết kháng nguyên, các đoạn này chứa một miền thay đổi thuộc chuỗi nặng (V_H) liên kết với miền thay đổi thuộc chuỗi nhẹ (V_L) trong cùng một chuỗi polypeptit (V_H-V_L). Bằng cách sử dụng một liên kết mà quá ngắn để cho phép cặp đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, các miền này buộc phải cặp đôi với các miền bổ trợ của một chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Các nhị thể được mô tả đầy đủ hơn trong tài liệu: EP 404,097; WO 93/11161; và Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) chẳng hạn.

“Kháng thể với chiều dài đầy đủ” là kháng thể chứa một vùng thay đổi gắn kết kháng nguyên cũng như một miền ổn định thuộc chuỗi nhẹ (C_L) và các miền ổn định thuộc chuỗi nặng, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Các miền ổn định có thể là miền ổn định trình tự nguyên thể (ví dụ như miền ổn định trình tự nguyên thể ở người) hoặc các biến thể trình tự axit amin của nó. Theo một khía cạnh, kháng thể với chiều dài đầy đủ có một hoặc nhiều chức năng cảm ứng.

Kháng thể “biến thể trình tự axit amin” trong bản mô tả này là kháng thể có trình tự axit amin khác với kháng thể của loài chính. Thông thường, các biến thể trình tự axit amin sẽ có mức tương đồng về trình tự axit amin ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95% với kháng thể của loài chính. Các biến thể trình tự axit amin có các phần tử thể, khuyết đoạn, và/hoặc bổ sung ở các vị trí nhất định bên trong hoặc liền kề với trình tự axit amin của kháng thể của loài chính này, nhưng vẫn giữ được hoạt tính gắn kết kháng nguyên. Các biến thể trong trình tự của vùng ổn định của kháng thể sẽ ít ảnh hưởng đến hoạt tính gắn kết kháng nguyên so với các biến thể trong vùng thay đổi. Trong vùng thay đổi, các biến thể trình tự axit amin sẽ có mức tương đồng ít nhất khoảng 90%, tương đồng ít nhất khoảng 95%, tương đồng ít nhất khoảng 97%, tương đồng ít nhất khoảng 98%, hoặc tương đồng ít nhất khoảng 99% với kháng thể của loài chính.

“Mức tương đồng” được định nghĩa là tỷ lệ phần trăm các gốc trong biến thể trình tự axit amin giống hệt sau khi so sánh các trình tự và đưa khoảng trống vào, nếu

cần thiết, để đạt được phần trăm tương đồng tối đa. Các phương pháp và các chương trình máy tính để so sánh trình tự là đã biết trong lĩnh vực này.

“Kháng thể đơn dòng dùng để điều trị bệnh” là kháng thể được dùng để điều trị bệnh cho đối tượng là người. Các kháng thể đơn dòng dùng để điều trị bệnh được bộc lộ trong bản mô tả bao gồm các kháng thể kháng $\alpha\beta 7$.

Kháng thể “biến thể glycosyl hoá” trong bản mô tả này là kháng thể có một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon gắn vào nó khác với một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon gắn vào kháng thể của loài chính. Ví dụ về các biến thể glycosyl hoá trong bản mô tả này bao gồm kháng thể có cấu trúc oligosacarit G1 hoặc G2, thay cho cấu trúc oligosacarit G0, gắn vào vùng Fc của nó, kháng thể có một hoặc hai gốc hydrat cacbon gắn vào một hoặc hai chuỗi nhẹ của nó, kháng thể không có gốc hydrat cacbon gắn vào một hoặc hai chuỗi nặng của kháng thể, v.v., và tổ hợp các biến thể glycosyl hoá này.

Kháng thể có “chức năng cảm ứng” dùng để chỉ các kháng thể mà hoạt tính sinh học của chúng là do vùng Fc (vùng Fc của trình tự nguyên thể hoặc vùng Fc trong biến thể trình tự axit amin) của kháng thể. Ví dụ về chức năng cảm ứng của kháng thể bao gồm gắn kết C1q; tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể; gắn kết thụ thể Fc; tính độc tế bào gián tiếp qua tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC); sự thực bào; điều tiết giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ như thụ thể tế bào B; BCR), và các chức năng tương tự.

Tuỳ thuộc vào trình tự axit amin của miền ổn định của các chuỗi nặng của chúng, các kháng thể với chiều dài đầy đủ có thể được chia thành “các lớp” khác nhau. Có năm lớp kháng thể với chiều dài đầy đủ chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài lớp trong số này còn có thể được chia thành “các phân lớp” (isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, và IgA2. Miền ổn định chuỗi nặng tương ứng với các lớp kháng thể khác nhau này tương ứng được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ . Các dưới đơn vị cấu trúc và cấu hình ba chiều của các lớp globulin miễn dịch khác nhau là đã được biết rõ.

“Các chuỗi nhẹ” của các kháng thể từ loài động vật có xương sống có thể được chia thành một trong hai loại khác biệt rõ rệt, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên các trình tự axit amin của miền ổn định của chúng.

“Tính độc tế bào gián tiếp qua tế bào phụ thuộc kháng thể” và “ADCC” liên quan đến phản ứng gián tiếp qua tế bào, trong đó tế bào có độc tính tế bào không đặc hiệu biểu hiện các thụ thể Fc (FcR) (ví dụ như tế bào giết tự nhiên (Natural Killer - NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) nhận biết kháng thể gắn kết vào tế bào đích và sau đó gây tiêu tế bào đích. Các tế bào chủ yếu qua trung gian ADCC, tế bào NK, chỉ biểu hiện FcγRIII, trong khi các bạch cầu đơn nhân to biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện của FcR ở tế bào tạo máu được tóm tắt trong Bảng 3 ở trang 464 của tài liệu: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đáng quan tâm, có thể thực hiện thử nghiệm ADCC in vitro, như thử nghiệm được mô tả trong patent Mỹ số 5,500,362 hoặc 5,821,337. Tế bào hiệu quả thông dụng cho những thử nghiệm như vậy bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại biên (peripheral blood mononuclear cells - PBMC) và tế bào giết tự nhiên (Natural Killer - NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm có thể được đánh giá in vivo, ví dụ, ở mô hình động vật như mô hình được bộc lộ trong tài liệu: Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

Thuật ngữ “thụ thể Fc” hoặc “FcR” được sử dụng để mô tả thụ thể gắn kết với vùng Fc của kháng thể. Theo một khía cạnh, FcR là FcR của người có trình tự nguyên thể. Theo khía cạnh khác, FcR là thụ thể gắn kết kháng thể IgG (thụ thể gama) và bao gồm các thụ thể thuộc phân lớp FcγRI, FcγRII, và FcγRIII, bao gồm các biến thể alen và theo cách khác các dạng ghép nối của các thụ thể này. Các thụ thể FcγRII bao gồm FcγRIIA (“thụ thể hoạt hóa”) và FcγRIIB (“thụ thể ức chế”), có các trình tự axit amin tương tự chủ yếu khác nhau ở các miền bào chất của nó. Thụ thể hoạt hóa FcγRIIA bao gồm một kiểu hoạt hoá trên cơ sở thụ thể miễn dịch tyrosin (immunoreceptor tyrosine-based activation motif - ITAM) trong miền bào chất của nó. Thụ thể ức chế FcγRIIB bao gồm một kiểu ức chế trên cơ sở thụ thể miễn dịch tyrosin (ITIM) trong miền bào chất của nó. (xem tổng quan: M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR được xem xét trong tài liệu: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); và de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:33-41 (1995). Các FcR khác, kể cả các FcR sẽ được nhận dạng trong tương lai, được bao hàm bởi thuật ngữ “FcR” trong bản mô tả này. Thuật ngữ này còn bao gồm thụ thể mới sinh, FcRn, chịu trách nhiệm cho sự di chuyển của các IgG mẹ đến

bào thai (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) và Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

Thuật ngữ “vùng siêu biến” được dùng trong bản mô tả này để chỉ gốc axit amin của kháng thể chịu trách nhiệm cho việc gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến thường bao gồm các gốc axit amin từ “vùng xác định hỗ trợ” hay “CDR” (ví dụ như gốc 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) trong miền thay đổi của chuỗi nhẹ và 31-35 (H1), 50-65 (H2) và 95-102 (H3) trong miền thay đổi của chuỗi nặng; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) và/hoặc các gốc axit amin từ “vùng siêu biến” (ví dụ như gốc 26-32 (L1), 50-52 (L2) và 91-96 (L3) trong miền thay đổi trên chuỗi nhẹ và 26-32 (H1), 53-55 (H2) và 96-101 (H3) trong miền thay đổi trên chuỗi nặng; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Các gốc “vùng khung” hay các gốc “FR” là các gốc mà miền thay đổi của chúng không phải là các gốc vùng siêu biến như được xác định trong bản mô tả này. Vùng siêu biến hoặc CDR của nó có thể được chuyển từ một chuỗi kháng thể đến một chuỗi kháng thể khác hoặc đến một protein khác để có được tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên với kháng thể (phức hợp) được tạo ra hoặc protein được gắn kết.

Các dạng “được làm giống của người” của các kháng thể không phải từ người (ví dụ, từ loại gặm nhấm) là các kháng thể khả chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không của người. Phần lớn, các kháng thể được làm giống của người là các globulin miễn dịch của người (kháng thể thể nhận) trong đó gốc từ vùng siêu biến của thể nhận này được thay bằng gốc từ vùng siêu biến của loài không phải người (kháng thể thể cho) như chuột nhắt, chuột cống, thỏ hoặc động vật linh trưởng không phải người mà có đặc tính, ái lực, và khả năng mong muốn. Trong một số trường hợp, gốc thuộc vùng khung (FR) của globulin miễn dịch của người được thay bằng gốc tương ứng không của người. Hơn nữa, các kháng thể được làm giống của người có thể chứa các gốc không được tìm thấy trong kháng thể thể nhận hoặc trong kháng thể thể cho. Những cải biến này được thực hiện để cải thiện hơn nữa hiệu suất kháng thể. Nhìn chung, kháng thể được làm giống của người về cơ bản chứa toàn bộ ít nhất một, và thường là hai, miền thay đổi, trong đó toàn bộ hoặc về cơ bản toàn bộ vùng siêu biến tương ứng với các vùng siêu biến của globulin miễn dịch không của

người và toàn bộ hoặc về cơ bản toàn bộ FR là các FR của trình tự globulin miễn dịch của người. Tuy ý, kháng thể được làm giống của người còn chứa ít nhất một phần vùng ổn định globulin miễn dịch (Fc), thường là vùng ổn định của globulin miễn dịch của người. Để biết thêm chi tiết, xem tài liệu: Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); và Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Kháng thể “hoàn thiện về mặt ái lực” là kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều vùng siêu biến của nó dẫn đến sự cải thiện ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên, so với kháng thể gốc mà không có những thay đổi này. Theo một khía cạnh, các kháng thể hoàn thiện về mặt ái lực sẽ có ái lực cỡ nanomol hoặc thậm chí picomol đối với kháng nguyên đích. Các kháng thể hoàn thiện về mặt ái lực được tạo ra theo các quy trình đã biết trong lĩnh vực. Tài liệu Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) mô tả sự hoàn thiện ái lực bằng cách xáo trộn miền VH và VL. Đột biến ngẫu nhiên của các gốc thuộc CDR và/hoặc vùng khung được mô tả trong tài liệu: Barbas et al., *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); và Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Kháng thể “phân lập” là kháng thể được nhận biết và được tách và/hoặc thu nhận từ hợp phần của môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể này sẽ được tinh chế (1) đến hơn 95% khối lượng protein như được xác định theo phương pháp Lowry, và theo cách khác, hơn 99% khối lượng, (2) đến mức đủ để thu được ít nhất 15 gốc thuộc đầu tận cùng N hoặc trình tự axit amin bên trong bằng cách sử dụng thiết bị xác định trình tự dạng cốc xoay, hoặc (3) đến đồng nhất theo SDS-PAGE trong các điều kiện khử hoặc không khử bằng cách sử dụng thuốc nhuộm Coomassie xanh da trời hoặc bạc. Kháng thể phân lập bao gồm kháng thể in situ trong tế bào tái tổ hợp do ít nhất một hợp phần của môi trường tự nhiên của kháng thể sẽ không có mặt. Tuy nhiên, thông thường kháng thể phân lập sẽ được điều chế bằng ít nhất một bước tinh chế.

Thuật ngữ “điều trị bệnh” được dùng để chỉ cả phương pháp điều trị bệnh nhằm mục đích chữa bệnh và phương pháp phòng ngừa hoặc ngăn ngừa. Các cá thể cần điều trị bao gồm các cá thể đã mắc bệnh cũng như các cá thể cần phòng ngừa bệnh hoặc sự tái phát bệnh. Vì vậy, bệnh nhân cần điều trị bệnh trong bản mô tả có thể được chẩn đoán là mắc bệnh hoặc có thể mắc bệnh hoặc dễ mắc bệnh. Thuật ngữ “bệnh nhân” và “đối tượng” được sử dụng thay cho nhau trong bản mô tả.

Kháng thể được bào chế hầu như tinh khiết và mong muốn là hầu như đồng nhất (nghĩa là không chứa các protein tạp nhiễm, v.v.). Kháng thể “hầu như tinh khiết” có nghĩa là chế phẩm chứa kháng thể với lượng ít nhất khoảng 90% khối lượng, tính trên tổng khối lượng protein trong chế phẩm, ít nhất khoảng 95% hoặc 97% khối lượng. Kháng thể “hầu như đồng nhất” có nghĩa là chế phẩm chứa protein, trong đó ít nhất khoảng 99% khối lượng protein là kháng thể đặc hiệu, ví dụ, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, tính theo tổng khối lượng protein.

Thuật ngữ “thuyên giảm lâm sàng” được dùng trong bản mô tả này cho đối tượng viêm loét đại tràng dùng để chỉ điểm số Mayo hoàn chỉnh bằng 2 hoặc thấp hơn và không có cá thể nào có điểm phụ lớn hơn 1 điểm. Thuật ngữ “thuyên giảm lâm sàng” đối với bệnh Crohn được dùng để chỉ điểm số CDAI bằng 150 điểm hoặc thấp hơn.

Thuật ngữ “đáp ứng lâm sàng” được dùng trong bản mô tả này cho các đối tượng viêm loét đại tràng dùng để chỉ mức giảm điểm Mayo hoàn chỉnh 3 điểm hoặc nhiều hơn và 30% so với trị số gốc, (hoặc điểm số Mayo một phần bằng 2 hoặc lớn hơn và 25% hoặc lớn hơn so với trị số gốc, nếu việc cho điểm Mayo hoàn chỉnh không được thực hiện vào lúc thăm khám) kèm theo sự giảm điểm số phụ chảy máu trực tràng 1 hoặc lớn hơn hoặc điểm số chảy máu trực tràng tuyệt đối bằng 1 hoặc thấp hơn. Thuật ngữ “đáp ứng lâm sàng” được dùng trong bản mô tả này cho các đối tượng mắc bệnh Crohn để chỉ sự giảm điểm số CDAI 70 điểm hoặc nhiều hơn so với trị số gốc (tuần 0).

Thuật ngữ “làm lành niêm mạc” được dùng trong bản mô tả này cho các đối tượng bị viêm loét đại tràng để chỉ điểm số phụ nội soi bằng 1 hoặc thấp hơn.

Thuật ngữ “thất bại trong điều trị” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tình trạng bệnh trở nên tệ hơn, cần đến các thuốc cứu trợ hoặc can thiệp phẫu thuật dùng cho điều trị viêm loét đại tràng hoặc bệnh Crohn. Thuốc cứu trợ là thuốc mới bất kỳ hoặc sự gia tăng liều lượng bất kỳ của thuốc ban đầu cần để điều trị các triệu chứng mới hoặc các triệu chứng chưa được giải quyết trong bệnh viêm loét đại tràng hoặc bệnh Crohn (ngoài các thuốc chống tiêu chảy để phòng trừ tiêu chảy mạn tính).

Chế phẩm

Như nêu trong bản mô tả, đã khám phá ra rằng các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ là rất ổn định khi ở trạng thái khô, ví dụ, chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp bằng một lượng dư (tính theo số mol) đường không khử. Cụ thể, chế phẩm được đông khô, trong đó tỷ lệ giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1, được thể hiện trong bản mô tả này là ổn định trong ít nhất 2 năm.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định. Theo một khía cạnh, chế phẩm này chứa chất đệm, ít nhất một chất ổn định và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một khía cạnh, chế phẩm khô chứa một hoặc nhiều đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, trong đó tỷ lệ giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1. Chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều axit amin tự do. Một hoặc nhiều axit amin cũng có thể đóng vai trò làm chất đệm. Theo một khía cạnh, một hoặc nhiều axit amin có thể đóng vai trò làm chất ổn định. Chế phẩm tùy ý có thể còn bao gồm ít nhất một chất hoạt động bề mặt. Theo một phương án, chế phẩm là khô, ví dụ, được đông khô. Kháng thể trong chế phẩm có thể là kháng thể với chiều dài đầy đủ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, như đoạn Fab, Fv, scFv, Fab' hoặc F(ab')₂.

Chế phẩm có thể chứa đường không khử mong muốn bất kỳ. Theo một khía cạnh, đường không khử có thể chứa trong chế phẩm bao gồm, ví dụ, manitol, sorbital, sucroza, trehaloza, rafinoza, stachyoza, meleziotoza, đextran, maltitol, lactitol, isomaltuloza, palatinit và hỗn hợp của chúng. Theo khía cạnh khác, đường không khử là sucroza, trehaloza, manitol, và sorbitol. Lượng tuyệt đối đường không khử trong chế phẩm là không quan trọng, nhưng tỷ lệ giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 400:1. Theo khía cạnh khác, tỷ lệ giữa đường không khử và

kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) ít nhất là khoảng 600:1; ít nhất là khoảng 625:1; ít nhất là khoảng 650:1; ít nhất là khoảng 675:1, ít nhất là khoảng 700:1; ít nhất là khoảng 750:1, ít nhất là khoảng 800:1, ít nhất là khoảng 1000:1, ít nhất là khoảng 1200:1, ít nhất là khoảng 1400:1, ít nhất là khoảng 1500:1, ít nhất là khoảng 1600:1, ít nhất là khoảng 1700:1, ít nhất là khoảng 1800:1, ít nhất là khoảng 1900:1, hoặc ít nhất là khoảng 2000:1. Thông thường, mong muốn rằng đường không khử có mặt với lượng làm giảm mức hình thành kết tụ tan trong chế phẩm lỏng, như mức hình thành kết tụ xảy ra khi làm lạnh và làm tan giá và/hoặc khi làm khô và hoàn nguyên. Tỷ lệ giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn khoảng 730:1 có thể làm giảm một chút mức hình thành kết tụ hòa tan ở trạng thái được đông khô. Tỷ lệ khối lượng đường:protein có thể lớn hơn 1,5:1 (khối lượng). Theo khía cạnh khác, nồng độ đường không khử đối với chế phẩm lỏng (ví dụ, trước khi làm khô hoặc sau khi hoàn nguyên) nằm trong khoảng từ 10mM đến 1M, ví dụ, nằm trong khoảng từ 60mM đến 600mM, nằm trong khoảng từ 100mM đến 450mM, nằm trong khoảng từ 200mM đến 350mM, nằm trong khoảng từ 250mM đến 325mM, và nằm trong khoảng từ 275mM đến 300mM. Theo khía cạnh khác, lượng đường không khử trong chế phẩm khô (ví dụ, được đông khô) nằm trong khoảng từ 40% đến 70% (khối lượng của chế phẩm khô). Theo khía cạnh khác, lượng đường không khử trong chế phẩm khô (ví dụ, được đông khô) nằm trong khoảng từ 40% đến 60%, nằm trong khoảng từ 45% đến 55% hoặc khoảng 51% (khối lượng). Theo các khía cạnh khác, lượng đường không khử trong chế phẩm khô (ví dụ, được đông khô) lớn hơn khoảng 51% (khối lượng của chế phẩm khô) khi lượng protein bằng khoảng 31% (khối lượng của chế phẩm khô) hoặc tỷ lệ khối lượng giữa đường không khử và protein trong chế phẩm khô lớn hơn khoảng 1,6:1. Theo khía cạnh khác nữa, sucroza là đường không khử để dùng trong chế phẩm.

Chế phẩm có thể chứa axit amin tự do mong muốn bất kỳ, có thể ở dạng L, dạng D hoặc hỗn hợp mong muốn bất kỳ của các dạng này. Theo một khía cạnh, axit amin tự do có thể được chứa trong chế phẩm bao gồm, ví dụ, histidin, alanin, arginin, glyxin, axit glutamic, serin, lysin, tryptophan, valin, xystein và hỗn hợp của chúng. Một số axit amin có thể làm ổn định các protein kháng lại quá trình thoái hóa trong quá trình sản xuất, sấy, làm khô ở nhiệt độ thấp và/hoặc bảo quản, ví dụ, nhờ các liên kết hydro, các

cầu muối, các đặc tính chống oxy hoá, hoặc các tương tác kỵ nước hoặc bằng cách loại trừ ra khỏi bề mặt protein. Các axit amin có thể hoạt động như các chất điều biến tương lực hoặc có thể làm giảm độ nhớt của chế phẩm. Theo khía cạnh khác, các axit amin tự do, như histidin và arginin, có thể đóng vai trò làm chất bảo vệ ở nhiệt độ thấp và chất bảo vệ quá trình làm khô ở nhiệt độ thấp, và không kết tinh khi làm khô ở nhiệt độ thấp ở dạng hợp phần của chế phẩm. Các axit amin tự do, như axit glutamic và histidin, ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp, có thể đóng vai trò làm các chất đệm trong dung dịch nước có độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7,5. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm chứa histidin, hoặc histidin và arginin. Theo khía cạnh khác nữa, nồng độ axit amin tự do trong chế phẩm lỏng nằm trong khoảng từ 10mM đến 0,5M, ví dụ, nằm trong khoảng từ 15mM đến 300mM, nằm trong khoảng từ 20mM đến 200mM, hoặc nằm trong khoảng từ 25mM đến 150mM, bằng khoảng 50mM hoặc khoảng 125mM. Theo khía cạnh khác nữa, lượng histidin trong chế phẩm khô (ví dụ, chế phẩm được đông khô) nằm trong khoảng từ 1% đến 10% (tính theo khối lượng chế phẩm khô), hoặc từ khoảng 3% đến 6% (khối lượng). Theo một số phương án, lượng histidin trong chế phẩm khô (ví dụ, chế phẩm được đông khô) lớn hơn khoảng 4% (tính theo khối lượng chế phẩm khô) khi lượng protein bằng khoảng 31% (tính theo khối lượng chế phẩm khô) hoặc tỷ lệ khối lượng giữa histidin và protein trong chế phẩm khô lớn hơn khoảng 0,15:1. Theo khía cạnh khác nữa, lượng arginin trong chế phẩm khô (ví dụ, chế phẩm được đông khô) nằm trong khoảng từ 4% đến 20% (tính theo khối lượng chế phẩm khô), hoặc từ khoảng 10% đến 15% (khối lượng). Theo một số phương án, lượng arginin trong chế phẩm khô (ví dụ, được đông khô) lớn hơn khoảng 13% (tính theo khối lượng chế phẩm khô) khi lượng protein bằng khoảng 31% (tính theo khối lượng chế phẩm khô) hoặc tỷ lệ khối lượng giữa arginin và protein trong chế phẩm khô lớn hơn khoảng 0,4:1. Theo các phương án kết hợp các axit amin, như histidin và arginin, tỷ lệ mol giữa axit amin tổng và kháng thể có thể ít nhất là 200:1, nằm trong khoảng từ 200:1 đến 500:1, hoặc ít nhất là 400:1.

Tuỳ ý, chế phẩm còn có thể chứa ít nhất một chất hoạt động bề mặt. Theo một khía cạnh, các chất hoạt động bề mặt có thể được chứa trong chế phẩm bao gồm, ví dụ, polysorbat 20, polysorbat 80, poloxamer (Pluronic®) và hỗn hợp của nó. Khi có mặt, chất hoạt động bề mặt này thường được chứa với lượng làm giảm sự hình thành kết tụ

không hòa tan của kháng thể, ví dụ, trong quá trình đóng chai, làm lạnh, làm khô, sấy khô ở nhiệt độ thấp và/hoặc hoàn nguyên. Nồng độ chất hoạt động bề mặt, ví dụ, trong chế phẩm khô sơ bộ (ví dụ, được đông khô) hoặc chế phẩm sau hoàn nguyên, thường nằm trong khoảng từ 0,0001% đến 1,0%, nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,1%, ví dụ bằng khoảng 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08,% hoặc 0,09% (khối lượng/thể tích), nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,07% hoặc 0,06% (khối lượng/thể tích). Lượng chất hoạt động bề mặt, ví dụ, trong chế phẩm khô (ví dụ, được đông khô) thường nằm trong khoảng từ 0,01% đến 3,0% (khối lượng), nằm trong khoảng từ 0,10% đến 1,0%, ví dụ bằng khoảng 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35%, 0,40%, hoặc 0,50% (khối lượng). Theo khía cạnh khác, tỷ lệ mol chất hoạt động bề mặt:kháng thể bằng khoảng 1:1. Kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ có thể có mặt với lượng mong muốn bất kỳ trong chế phẩm, với điều kiện là tỷ lệ giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn khoảng 600:1. Tuy nhiên, chế phẩm có thể chứa kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ với nồng độ cao. Ví dụ, chế phẩm lỏng có thể chứa ít nhất khoảng 10mg/ml, ít nhất khoảng 20mg/ml, ít nhất khoảng 30mg/ml, ít nhất khoảng 40mg/ml, ít nhất khoảng 50mg/ml, ít nhất khoảng 60 ml/ml, ít nhất khoảng 70mg/ml, ít nhất khoảng 80mg/ml, ít nhất khoảng 90mg/ml, ít nhất khoảng 100mg/ml, từ khoảng 40mg/ml đến khoảng 80mg/ml kháng thể kháng $\alpha\beta 7$, khoảng 60mg/ml kháng thể kháng $\alpha\beta 7$. Chế phẩm khô (ví dụ, được đông khô) có thể chứa ít nhất khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, hoặc khoảng 31% hoặc khoảng 32 % kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ theo khối lượng.

Nếu cần, chế phẩm có thể còn bao gồm chất tạo chelat kim loại và/hoặc một chất chống oxy hoá, cũng như tá dược dược dụng. Chất tạo chelat kim loại bao gồm, ví dụ, các hợp chất metylamin, etylendiamin, desferoxamin, trientin, histidin, malat, phosphonat, ví dụ, axit etidronic, axit etylendiamintetraaxetic (EDTA), axit etylenglycoltetraaxetic (EGTA), và các chất tương tự. Các chất chống oxy hoá thích hợp bao gồm, ví dụ, axit xitric, axit uric, axit ascorbic, axit lipoic, glutathion, tocopherol, caroten, lycopen, xystein và các chất tương tự.

Chế phẩm có thể là lỏng hoặc rắn. Chế phẩm lỏng có thể là dung dịch nước hoặc hỗn dịch, được bào chế trong dung môi nước thích hợp, như nước hoặc hỗn hợp

nước/chất hữu cơ, như hỗn hợp rượu trong nước. Chế phẩm lỏng có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, hoặc nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5, như bằng khoảng 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 hoặc 6,5. Chế phẩm lỏng có thể được làm lạnh (ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C) hoặc làm đông lạnh (ví dụ, ở -20°C hoặc -80°C) để bảo quản. Chế phẩm rắn có thể được bào chế theo cách thích hợp bất kỳ và có thể ở dạng bánh hoặc bột chẳng hạn. Chế phẩm rắn được bào chế bằng cách làm khô chế phẩm lỏng như nêu trong bản mô tả, ví dụ bằng cách làm khô ở nhiệt độ thấp, sấy phun, làm khô bằng không khí trên màng (ví dụ, để phân phối qua da), trộn vào trong nhũ tương lipid và làm khô ở dạng hình cầu để phân phối qua đường miệng hoặc ở dạng màng để phân phối thuốc qua da. Nếu chế phẩm là chế phẩm rắn, thì chế phẩm này có thể có hàm lượng ẩm không lớn hơn khoảng 5%, không lớn hơn khoảng 4,5%, không lớn hơn khoảng 4%, không lớn hơn khoảng 3,5%, không lớn hơn khoảng 3%, không lớn hơn khoảng 2,5%, không lớn hơn khoảng 2%, không lớn hơn khoảng 1,5%, không lớn hơn khoảng 1%, hoặc là hầu như khan. Chế phẩm rắn có thể được hòa tan, nghĩa là được hoàn nguyên, trong môi trường hoặc dung môi thích hợp để trở thành chất lỏng thích hợp để sử dụng. Các dung môi thích hợp để hoàn nguyên chế phẩm rắn bao gồm nước, nước muối đẳng trương, dung dịch đệm, ví dụ, nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer (lactat hoặc dextroza), môi trường thiết yếu tối thiểu, dung dịch rượu/nước, dung dịch dextroza, v.v.. Lượng dung môi có thể tạo ra nồng độ protein trị liệu cao hơn, bằng, hoặc thấp hơn nồng độ trước khi sấy. Theo một khía cạnh, nồng độ kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được hoàn nguyên bằng nồng độ trong chế phẩm lỏng trước khi sấy khô.

Chế phẩm có thể được làm vô trùng, và điều này có thể được thực hiện theo các quy trình mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ để tạo ra dược phẩm vô trùng thích hợp để dùng cho đối tượng là người, trước khi, hoặc sau khi, bào chế chế phẩm đó. Chế phẩm có thể được làm vô trùng ở dạng lỏng, ví dụ, trước khi sấy và/hoặc sau khi hoàn nguyên bằng cách lọc qua các cỡ lỗ nhỏ, bằng cách xử lý vô khuẩn hoặc bằng cách cho tiếp xúc với bức xạ cực tím. Các cỡ lỗ lọc có thể là 0,1 μm hoặc 0,2 μm để lọc các vi sinh vật hoặc từ 10nm đến 20nm để lọc các hạt virus. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, chế phẩm đã sấy khô có thể được làm vô trùng, ví dụ, bằng

cách cho tiếp xúc với bức xạ gama. Theo một khía cạnh, chế phẩm lỏng chứa kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ được vô trùng bằng cách lọc trước khi sấy.

Theo một khía cạnh, chế phẩm là ổn định trong khi bảo quản. Theo khía cạnh khác, chế phẩm ổn định trong khi bảo quản ở trạng thái khô. Độ ổn định có thể được kiểm tra bằng cách đánh giá độ ổn định vật lý, độ ổn định hóa học, và/hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể trong chế phẩm trong khoảng thời gian bảo chế cũng như sau khi bảo quản ở nhiệt độ được chỉ ra. Độ ổn định vật lý và/hoặc hóa học của chế phẩm lỏng hoặc bột khô được hoàn nguyên có thể được đánh giá định tính và/hoặc định lượng theo nhiều cách khác nhau (xem, ví dụ, *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*, Rodriguez-Diaz et al. eds. Informa Healthcare (2005)), bao gồm cả việc đánh giá mức hình thành kết tụ (ví dụ bằng cách áp dụng sắc ký loại trừ theo kích thước (hoặc lọc qua gel) (size exclusion chromatography - SEC), đo khối phổ theo kỹ thuật ion hóa theo phương pháp khử hấp phụ lazer được hỗ trợ bởi chất nền và phân tách các ion dựa trên thời gian bay (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry - MALDI-TOF MS), siêu ly tâm phân tích, tán xạ ánh sáng (phổ tương quan photon, tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS), tán xạ ánh sáng lazer đa góc (multi-angle laser light scattering - MALLS)), phân tích hình ảnh trên kính hiển vi dựa trên dòng chảy, đếm trở kháng điện tử (coulter), hệ thống xác định mức độ che sáng hoặc hệ thống đếm hạt chất lỏng khác, bằng cách đo độ đục, bằng cách ly tâm theo gradien tỷ trọng và/hoặc bằng cách quan sát bằng mắt thường); bằng cách đánh giá tính không đồng nhất về mặt điện tích có sử dụng sắc ký trao đổi cation (xem cả: Vlasak and Ionescu, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468-481 (2008) và Harris et al. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752:233-245 (2001)), điện di điểm đẳng điện (isoelectric focusing - IEF), chẳng hạn kỹ thuật mao quản (capillary technique - cIEF) hoặc điện di vùng mao quản; phân tích trình tự đầu tận cùng amino hoặc đầu tận cùng carboxy; phân tích khối phổ; phân tích SDS-PAGE hoặc hoặc SEC để so sánh các kháng thể phân đoạn, nguyên vẹn và multimer (nghĩa là, dimer, trimer, v.v.); lập bản đồ peptit (ví dụ tryptic hoặc LYS-và các peptit tương tự); đánh giá hoạt tính sinh học hoặc chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể; và các phương pháp tương tự. Hoạt tính sinh học hoặc chức năng gắn kết kháng nguyên, ví dụ, chức năng gắn kết của kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-

1) hoặc ức chế việc gắn kết của tế bào biểu hiện integrin $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1), ví dụ, MAdCAM đã được cố định (ví dụ, MAdCAM-1), có thể được đánh giá bằng cách áp dụng các kỹ thuật khác nhau mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết (xem ví dụ, Soler et al., J. Pharmacol. Exper. Ther. 330:864-875 (2009)).

Độ ổn định của chế phẩm ở trạng thái rắn còn có thể được đánh giá định tính và/hoặc định lượng theo nhiều cách khác nhau, bao gồm các thử nghiệm trực tiếp, như xác định cấu trúc tinh thể theo phương pháp nhiễu xạ tia X trên mẫu bột (X-Ray Powder Diffraction - XRPD); đánh giá cấu trúc kháng thể ở trạng thái rắn bằng cách áp dụng quang phổ hồng ngoại biến đổi chuỗi Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR); và đo mức truyền nhiệt trong chất rắn đã được đông khô (nóng chảy, chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh, v.v..) bằng cách áp dụng phương pháp phân tích nhiệt lượng bằng tia quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC, ví dụ, để đánh giá mức độ biến tính) và các thử nghiệm gián tiếp như đo hàm lượng ẩm theo thử nghiệm Karl Fisher, ví dụ, để ngoại suy khả năng không ổn định về mặt hóa học qua quá trình thủy phân. Việc xác định hàm lượng ẩm của chế phẩm khô có thể cho biết chế phẩm sẽ trải qua quá trình thoái hóa hóa học hoặc vật lý như thế nào, trong đó độ ẩm cao hơn dẫn đến thoái hóa nhiều hơn.

Độ ổn định có thể được đo ở nhiệt độ nhất định trong khoảng thời gian nhất định. Theo một khía cạnh, chế phẩm khô (ví dụ, chế phẩm đã được đông khô) là ổn định ở nhiệt độ khoảng 40°C, độ ẩm tương đối 75% trong ít nhất khoảng thời gian 2 đến 4 tuần, ít nhất khoảng 2 tháng, ít nhất khoảng 3 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 9 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, hoặc ít nhất khoảng 18 tháng. Theo khía cạnh khác, chế phẩm (lỏng hoặc khô (ví dụ, đã được đông khô)) là ổn định ở nhiệt độ khoảng 5°C và/hoặc 25°C và độ ẩm tương đối 60% trong khoảng thời gian ít nhất 3 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 9 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, ít nhất khoảng 24 tháng, ít nhất khoảng 30 tháng, ít nhất khoảng 36 tháng, hoặc ít nhất khoảng 48 tháng. Theo khía cạnh khác, chế phẩm (lỏng hoặc khô (ví dụ, đã được đông khô)) là ổn định ở nhiệt độ khoảng -20°C trong ít nhất khoảng 3 tháng, ít nhất khoảng 6 tháng, ít nhất khoảng 9 tháng, ít nhất khoảng 12 tháng, ít nhất khoảng 18 tháng, ít nhất khoảng 24 tháng, ít nhất khoảng 30 tháng, ít nhất khoảng 36

tháng, ít nhất khoảng 42 tháng, hoặc ít nhất khoảng 48 tháng. Hơn nữa, theo một số phương án, chế phẩm lỏng có thể ổn định sau khi làm lạnh (đến -80°C chẳng hạn) và làm tan giá, ví dụ, sau 1, 2 hoặc 3 chu trình làm lạnh và làm tan giá.

Tính không ổn định có thể bao gồm một hoặc nhiều một hoặc nhiều hiện tượng bất kỳ trong số: kết tụ (ví dụ, kết tụ hòa tan không cộng hóa trị (gây ra do các tương tác kỵ nước hoặc tích điện), kết tụ hòa tan cộng hóa trị (ví dụ, do sự sắp xếp lại /xáo trộn liên kết disulfid), kết tụ không hòa tan (do sự biến tính protein ở bề mặt lỏng/khí và lỏng/rắn)), khử amit (ví dụ như khử amit bằng Asn), oxy hoá (ví dụ như oxy hoá bằng Met), đồng phân hoá (ví dụ như đồng phân hóa bằng Asp), biến tính, cắt bỏ/thủy phân/phân đoạn (ví dụ như phân đoạn vùng bản lề), tạo succinimit, kéo dài đầu tận cùng N, xử lý đầu tận cùng C, sự khác biệt glycosyl hoá, và các hiện tượng tương tự.

Chế phẩm ổn định có thể góp phần làm giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có tính sinh miễn dịch có thể dẫn đến đáp ứng kháng thể người-kháng người (human-anti-human antibody - HAHA) ở đối tượng người hoặc các bệnh nhân. Các bệnh nhân có đáp ứng HAHA đối với kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể có các hiện tượng bất lợi (ví dụ, phản ứng truyền tại chỗ) trong khi điều trị bệnh hoặc có thể loại trừ kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ một cách nhanh chóng, dẫn đến liều dùng thấp hơn liều điều trị theo kế hoạch. Báo cáo (Feagen et al. (2005) N. Engl. J. Med. 352:2499-2507) về nghiên cứu ban đầu về điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ cho thấy các kháng thể kháng người của người phát triển vào khoảng tuần thứ 8 ở 44% bệnh nhân được điều trị bệnh. Kháng thể trong nghiên cứu này được bảo quản ở dạng lỏng và không hề chứa polysorbat.

Theo một số phương án, chế phẩm có thể làm tăng tỷ lệ bệnh nhân không có đáp ứng với HAHA lên ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80% hoặc ít nhất 90% bệnh nhân so với kết quả về HAHA của chế phẩm kém ổn định.

Theo một số phương án, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ chứa $\geq 50\%$ dạng đồng chức năng chính tích điện, $\geq 55\%$ dạng đồng chức năng chính tích điện, hoặc từ 65% đến 70% dạng đồng chức năng chính tích điện. Theo các khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể ổn định kháng $\alpha 4\beta 7$ chứa $\leq 45\%$ dạng đồng chức năng tích điện chứa tính axit, $\leq 40\%$ dạng đồng chức năng tích điện có tính axit, $\leq 30\%$ dạng đồng chức

năng tích điện có tính axit hoặc từ 22% đến 28% dạng đồng chức năng có tính axit. Cũng theo các khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ổn định chứa $\leq 25\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, $\leq 20\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, $\leq 15\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, khoảng 5% dạng đồng chức năng có tính bazơ hoặc khoảng 10% dạng đồng chức năng có tính bazơ. Theo một khía cạnh, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ổn định chứa $\geq 55\%$ dạng đồng chức năng chính, $\leq 30\%$ dạng đồng chức năng có tính axit và/hoặc $\leq 20\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, ví dụ, như được xác định bởi CEX. Theo khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ổn định chứa $\geq 50\%$ dạng đồng chức năng chính, $\leq 45\%$ dạng đồng chức năng có tính axit và/hoặc $< 10\%$ dạng đồng chức năng có tính bazơ, ví dụ, như được xác định bởi CIEF.

Theo một số khía cạnh, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ ở dạng rắn khô có hàm lượng ẩm $\leq 10\%$, hàm lượng ẩm $\leq 5\%$ hoặc hàm lượng ẩm $< 2,5\%$. Thời gian cần thiết để hoàn nguyên là ≤ 60 phút, ≤ 50 phút hoặc ≤ 40 phút hoặc ≤ 30 phút hoặc ≤ 20 phút.

Hàm lượng monome và/hoặc hàm lượng kết tụ (ví dụ, đime, trime, tetrame, pentame, oligome và kết tụ bậc cao hơn), nghĩa là, trong chế phẩm lỏng, hoặc trong chế phẩm khô sau khi hoàn nguyên, có thể được xác định bằng SEC, MALDI-TOF MS, phân tích siêu ly tâm, tán xạ ánh sáng (DLS hoặc MALLS), hoặc phương pháp đo kích cỡ nano, như phân tích theo dõi các hạt nano (nanoparticle tracking analysis – NTA), NanoSight Ltd, Wiltshire, UK). Có thể phân giải, mô tả đặc trưng và định lượng kết tụ theo một số cách, bao gồm gia tăng chiều dài của cột tách SEC, ví dụ, bằng một cột dài hơn hoặc bằng cách gắn thành dãy gồm hai hoặc nhiều hơn hai cột SEC phù hợp với cột SEC phân tích ban đầu, phân tích định lượng SEC bổ sung các monome nhờ tán xạ ánh sáng, hoặc bằng cách áp dụng NTA.

Theo một phương án, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ chứa $\geq 90\%$ kháng thể monome, $\geq 95\%$ kháng thể monome, hoặc từ 97% đến 99% kháng thể monome. Theo một phương án khác, phần lớn nguyên liệu trong chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ có bán kính trung bình $\leq 20\text{nm}$, $\leq 15\text{nm}$, $\leq 10\text{nm}$, hoặc nằm trong khoảng từ 5nm đến 7nm. Theo một khía cạnh, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ chứa $\geq 80\%$ lượng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo phân tích protein. Theo một khía cạnh, có $\geq 90\%$ chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Theo khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ chứa $\leq 10\%$ kết tụ,

$\leq 5\%$ kết tụ, $\leq 2,5\%$ kết tụ, $\leq 1,5\%$ kết tụ, $\leq 1,0\%$ kết tụ hoặc $\leq 0,5\%$ kết tụ. Theo khía cạnh khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định chứa $\geq 96\%$ monome và/hoặc $\leq 2,5\%$ kết tụ. Theo khía cạnh khác nữa, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ổn định chứa khoảng 99% monome và/hoặc khoảng $< 1\%$ kết tụ.

Kích cỡ hạt, ví dụ, của kết tụ hoặc tá dược không hòa tan, nghĩa là, trong chế phẩm được hoàn nguyên có thể được xác định bằng độ đục (ví dụ, hệ thống đếm hạt chất lỏng (HIAC) bằng Hach Ultra Analytics (Grants Pass, OR)), kính hiển vi, máy đếm hạt điện tử, hệ thống dựa trên hình ảnh qua kính hiển vi hoặc kỹ thuật số (ví dụ, dựa trên dòng chảy) như hình ảnh vi lưu (microfluidics imaging - MFI) do Brightwell (Ottawa, CA) cung cấp hoặc thiết bị phân tích hạt dựa trên hình ảnh FLOWCAM® do Fluid Imaging Technologies (Yarmouth, ME) cung cấp. Theo một khía cạnh, kích cỡ hạt trong chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ bằng khoảng $30\mu\text{m}$, khoảng $25\mu\text{m}$, khoảng $10\mu\text{m}$, khoảng $5\mu\text{m}$, khoảng $2\mu\text{m}$ hoặc $1\mu\text{m}$ hoặc nhỏ hơn. Lượng các hạt cần được giảm tới mức tối thiểu trong chế phẩm kháng thể. Theo một khía cạnh, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có ít hơn 6000 hạt có đường kính $\geq 10\mu\text{m}$ và/hoặc ít hơn 600 hạt có đường kính $\geq 25\mu\text{m}$ trong một liều (Dược điển Mỹ (U.S. Pharmacopoeia), Chương 788, phương pháp đếm dựa trên độ đục; một nửa của lượng này được định lượng theo phương pháp định lượng trên kính hiển vi). Theo khía cạnh khác nữa, lượng hạt trong một mililit, ví dụ, theo phương pháp đo MFI, trong liều chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, ví dụ, chế phẩm được hoàn nguyên, nằm trong khoảng từ 500 đến 2000 hạt, hoặc từ 1000 đến 3000 hạt có kích thước nằm trong khoảng từ $2\mu\text{m}$ đến $10\mu\text{m}$ trong một ml, khoảng 50 đến 350 hạt $\geq 10\mu\text{m}$ trong một ml và khoảng 0 đến 50 hạt $\geq 25\mu\text{m}$ trong một ml.

Theo một phương án, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có ái lực gắn kết nằm trong khoảng từ 60% đến 140% so với kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ tiêu chuẩn dùng để so sánh. Theo một khía cạnh, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong chế phẩm nêu trong bản mô tả gắn kết với $\alpha 4\beta 7$, ví dụ, trên tế bào (WO98/06248 hoặc Patent Mỹ số 7,147,851) với trị số nằm trong khoảng từ 80% đến 120% trị số của chất chuẩn so sánh. Theo một phương án khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có khả năng ức chế ít nhất 50% hoặc ít nhất 60% việc gắn kết của tế bào biểu hiện integrin $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM, ví dụ,

MAdCAM-1, MAdCAM-Ig thể kháng (xem Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 20070122404, còn được gọi là chất chuẩn để so sánh).

Như đã nêu trên, việc làm lạnh chế phẩm được đặc biệt dự tính đến trong bản mô tả này. Do vậy, chế phẩm có thể được kiểm tra độ ổn định sau khi làm lạnh và làm tan giá. Theo đó, kháng thể trong chế phẩm lỏng có thể là ổn định sau khi làm lạnh và làm tan giá chế phẩm, ví dụ kháng thể có thể là ổn định sau một, hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều chu trình làm lạnh/làm tan giá.

Theo một số phương án, chế phẩm là chế phẩm lỏng chứa ít nhất khoảng 50mg/ml đến 100mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm (ví dụ, histidin), và ít nhất khoảng 9% (khối lượng) đường không khử (chẳng hạn, sucroza, trehaloza hoặc manitol). Theo một phương án, chế phẩm bao gồm ít nhất từ khoảng 50 đến 80mg/ml, khoảng 60mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm (ví dụ, histidin), axit amin tự do (ví dụ, arginin) và ít nhất khoảng 9% hoặc 10% (khối lượng) đường không khử (chẳng hạn, sucroza, trehaloza hoặc manitol).

Theo một phương án khác, chế phẩm bao gồm ít nhất khoảng 60mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm (ví dụ, histidin), axit amin tự do (ví dụ, arginin) và ít nhất khoảng 10% (khối lượng) đường không khử (ví dụ, sucroza, trehaloza hoặc manitol). Theo các phương án này, nồng độ đệm nằm trong khoảng từ 15mM đến 75mM, nằm trong khoảng từ 25mM đến 65mM, hoặc khoảng 50mM. Nồng độ axit amin tự do nằm trong khoảng từ 50mM đến 250mM, nằm trong khoảng từ 75mM đến 200mM, nằm trong khoảng từ 100mM đến 150mM hoặc khoảng 125mM.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm khô, rắn (ví dụ, chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp), chứa hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, histidin, arginin, và polysorbat 80, và tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1.

Theo một phương án khác, chế phẩm là chế phẩm khô, rắn, vô định hình (ví dụ, chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp), chứa hỗn hợp gồm đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, histidin, arginin, và polysorbat 80, và tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) lớn hơn 600:1.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp chứa đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, histidin, arginin và polysorbat 80, và tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) trong chế phẩm lớn hơn 600:1.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp chứa đường không khử, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, histidin, arginin và polysorbat 80, trong đó tỷ lệ mol giữa đường không khử và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) trong chế phẩm lớn hơn 600:1 và tỷ lệ mol giữa arginin và kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) trong chế phẩm lớn hơn 250:1.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm lỏng và chứa ít nhất khoảng 60mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, ít nhất khoảng 10% (khối lượng/thể tích) đường không khử, và ít nhất khoảng 125mM một hoặc nhiều axit amin tự do.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm lỏng và chứa ít nhất khoảng 60mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, ít nhất khoảng 10% (khối lượng/thể tích) đường không khử, và ít nhất khoảng 175mM một hoặc nhiều axit amin tự do.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm lỏng và chứa khoảng từ 60mg/ml đến 80mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, chất đệm và ít nhất khoảng 10% (khối lượng) đường.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm lỏng và chứa khoảng từ 60mg/ml đến 80mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, histidin và ít nhất khoảng 10% (khối lượng) sucroza.

Theo một phương án, chế phẩm được đông khô và bảo quản ở dạng liều đơn trong một lọ. Lọ này mong muốn được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C cho đến khi nó được dùng cho đối tượng cần điều trị bệnh. Ví dụ, lọ này có thể là lọ có dung tích 20ml hoặc 50ml (ví dụ cho liều 60mg/ml). Lọ này có thể chứa ít nhất khoảng 120mg, ít nhất khoảng 180mg, ít nhất khoảng 240mg, ít nhất khoảng 300mg, ít nhất khoảng 360mg, ít nhất khoảng 540mg, hoặc ít nhất khoảng 900mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một khía cạnh, lọ này chứa khoảng 300mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Một hoặc nhiều chất mang, tá dược hoặc chất ổn định được dụng khác như các chất được mô tả trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Hendrickson, R. Ed. (2005) có thể được đưa vào chế phẩm với điều kiện là chúng không làm ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính mong muốn của chế phẩm. Các chất mang, tá dược hoặc chất ổn định chấp nhận được là không độc đối với thể nhận ở các liều lượng và nồng độ được sử dụng và bao gồm: các chất đệm bổ sung; các đồng dung môi; các chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và methionin; chất tạo chelat như EDTA; phức hợp kim loại (ví dụ, phức hợp Zn-protein); polyme dễ phân huỷ sinh học như polyeste; chất bảo quản; và/hoặc các ion trái dấu tạo muối như natri.

Các kháng thể $\alpha 4\beta 7$

Các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ thích hợp để dùng trong chế phẩm bao gồm các kháng thể từ nguồn mong muốn bất kỳ, như các kháng thể của người với chiều dài đầy đủ, các kháng thể của chuột, các kháng thể của thỏ và các kháng thể tương tự, và các kháng thể được thiết kế mong muốn bất kỳ, như các kháng thể khảm, các kháng thể được làm giống của người, và các kháng thể tương tự. Đoạn gắn kết kháng nguyên của loại kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này, như các đoạn Fab, Fv, scFv, Fab' và F(ab')₂, cũng thích hợp để dùng trong chế phẩm.

Kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể gắn kết với epitop trên chuỗi $\alpha 4$ (ví dụ, MAb 21,6 được làm giống của người (patent Mỹ số 5,840,299 của Bendig và đồng tác giả), trên chuỗi $\beta 7$ (ví dụ, FIB504 hoặc dẫn xuất được làm giống của người (ví dụ, patent Mỹ số 7,528,236 của Fong và đồng tác giả)), hoặc gắn kết với epitop tổ hợp được tạo ra bằng cách kết hợp chuỗi $\alpha 4$ với chuỗi $\beta 7$. Theo một khía cạnh, kháng thể gắn kết epitop tổ hợp trên phức $\alpha 4\beta 7$, nhưng không gắn kết epitop trên chuỗi $\alpha 4$ hoặc chuỗi $\beta 7$ trừ khi các chuỗi này được kết hợp với nhau. Sự kết hợp của integrin $\alpha 4$ với integrin $\beta 7$ có thể tạo ra epitop tổ hợp bằng cách đưa các gốc có mặt trên cả hai chuỗi cùng chứa epitop này lại gần nhau hoặc bằng cách cho tiếp cận về mặt cấu hình trên một chuỗi, ví dụ, chuỗi integrin $\alpha 4$ hoặc chuỗi integrin $\beta 7$, vị trí gắn kết epitop mà nó khó gắn kết với kháng thể khi không có mặt đối tác integrin thích hợp hoặc khi không hoạt hoá integrin. Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ gắn kết cả hai chuỗi integrin $\alpha 4$ và integrin $\beta 7$, và do vậy, nó là đặc hiệu đối với phức integrin $\alpha 4\beta 7$. Các kháng thể

như vậy có thể gắn kết $\alpha 4\beta 7$ nhưng không gắn kết $\alpha 4\beta 1$, và/hoặc không gắn kết $\alpha E\beta 7$ chẳng hạn. Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ gắn kết với epitop giống hoặc về cơ bản giống với kháng thể Act-1 (Lazarovits, A. I. et al., J. Immunol., 133(4): 1857-1862 (1984), Schweighoffer et al., J. Immunol., 151(2): 717-729, 1993; Bednarczyk et al., J. Biol. Chem., 269(11): 8348-8354, 1994). Dòng tế bào lai ACT-1 của chuột, tạo ra kháng thể đơn dòng Act-1 của chuột, được Millennium Pharmaceuticals, Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, Mass. 02139, U.S.A. nộp lưu theo điều khoản của Hiệp ước Budapest ngày 22 tháng 8 năm 2001, tại Cơ quan lưu giữ chủng giống của Mỹ American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A., với số truy cập PTA-3663. Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ là kháng thể của người hoặc protein gắn kết $\alpha 4\beta 7$ có sử dụng các CDR được đề xuất theo công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2010/0254975.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ức chế sự gắn kết của $\alpha 4\beta 7$ với một hoặc nhiều phối tử của nó (ví dụ như addressin niêm mạc, ví dụ, MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1), fibronectin, và/hoặc addressin mạch (VCAM)). Các MAdCAM của động vật linh trưởng được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 96/24673, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ức chế sự gắn kết của $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1) và/hoặc fibronectin mà không ức chế sự gắn kết của VCAM.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ để dùng trong chế phẩm là các phiên bản đã được làm giống của người của kháng thể Act-1 của chuột nhất. Các phương pháp thích hợp để điều chế các kháng thể được làm giống của người đã được biết rõ trong lĩnh vực. Thông thường, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người sẽ chứa chuỗi nặng chứa 3 vùng xác định hỗ trợ chuỗi nặng (các CDR: CDR1, SEQ ID NO:8, CDR2, SEQ ID NO:9 và CDR3, SEQ ID NO:10) của kháng thể Act-1 của chuột nhất và các vùng khung chuỗi nặng thích hợp của người; và còn chứa chuỗi nhẹ chứa 3 CDR của chuỗi nhẹ (CDR1, SEQ ID NO:11, CDR2, SEQ ID NO:12 và CDR3, SEQ ID NO:13) của kháng thể Act-1 của chuột nhất và vùng khung chuỗi nhẹ thích hợp của người. Kháng thể Act-1 được làm giống của người có thể chứa vùng khung thích hợp của người, bao gồm vùng khung liên ứng, có hoặc không có với các phần tử thể axit

amin. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin thuộc vùng khung có thể được thay bằng một axit amin khác, như axit amin ở vị trí tương ứng trên kháng thể Act-1 chuột nhắt. Vùng ổn định của người hoặc một phần của nó, nếu có mặt, có thể có nguồn gốc từ các chuỗi nhẹ κ hoặc λ , và/hoặc các chuỗi nặng γ (ví dụ, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ , α (ví dụ, $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ hoặc ϵ của các kháng thể của người, kể cả các biến thể alen. Một vùng ổn định cụ thể (ví dụ như IgG1), các biến thể hoặc các phần của nó có thể được dùng để biến đổi chức năng cảm ứng. Ví dụ, vùng ổn định đã được đột biến (biến thể) có thể được kết hợp vào protein dung hợp để làm giảm đến mức tối thiểu khả năng gắn kết với các thụ thể Fc và/hoặc khả năng cố định bổ thể (xem ví dụ, GB 2,209,757 B của Winter và đồng tác giả; WO 89/07142 của Morrison và đồng tác giả; WO 94/29351 của Morgan và đồng tác giả, ngày 22 tháng 12 năm 1994). Các phiên bản kháng thể Act-1 đã được làm giống của người được mô tả trong các công bố đơn PCT số WO98/06248 và WO07/61679, toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo khía cạnh khác, các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người để dùng trong chế phẩm chứa vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa các axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO:2, và vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa các axit amin từ 20 đến 131 của SEQ ID NO:4 hoặc các axit amin từ 21 đến 132 của SEQ ID NO:5. Nếu cần, có thể có mặt các vùng ổn định thích hợp ở người có thể. Ví dụ, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người có thể chứa chuỗi nặng chứa các axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO:2 và chuỗi nhẹ chứa các axit amin từ 21 đến 239 của SEQ ID NO:5. Theo một ví dụ khác, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người có thể bao gồm chuỗi nặng chứa các axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO:2 và chuỗi nhẹ chứa các axit amin từ 20 đến 238 của SEQ ID NO:4. Hình 4 mô tả sự so sánh các chuỗi nhẹ chung của các kháng thể của người với các kháng thể của chuột. Phép so sánh này cho thấy chuỗi nhẹ được làm giống của người của vedolizumab (ví dụ, Chemical Abstract Service (CAS, American Chemical Society) số đăng ký 943609-66-3), với hai gốc của chuột nhắt được thay bằng hai gốc của người, giống của người hơn so với chuỗi nhẹ của LDP-02 (Hình 3). Ngoài ra, LDP-02 có alanin linh động kỵ nước ở một mức độ nào đó ở vị trí 114 và một vị trí ưa nước (Aspartate 115) mà trong vedolizumab được

thay bằng threonin chứa hydroxyl ưa nước ở mức độ không đáng kể ở vị trí 114 và gốc valin kỵ nước ở vị trí 115 có khả năng quay mặt vào bên trong.

Các thay thế khác đối với trình tự kháng thể có thể là, ví dụ, đột biến ở vùng khung chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, như đột biến isoleuxin thành valin ở gốc 2 của SEQ ID NO:14; đột biến methionin thành valin ở gốc 4 của SEQ ID NO:14; đột biến alanin thành glyxin ở gốc 24 của SEQ ID NO:15; đột biến arginin thành lysin ở gốc 38 của SEQ ID NO:15; đột biến alanin thành arginin ở gốc 40 của SEQ ID NO:15; đột biến methionin thành isoleuxin ở gốc 48 của SEQ ID NO:15; đột biến isoleuxin thành leuxin ở gốc 69 của SEQ ID NO:15; đột biến arginin thành valin ở gốc 71 của SEQ ID NO:15; đột biến threonin thành isoleuxin ở gốc 73 của SEQ ID NO:15; hoặc kết hợp chúng theo cách bất kỳ; và sự thay thế các CDR chuỗi nặng bằng các CDR (CDR1, SEQ ID NO:8, CDR2, SEQ ID NO:9 và CDR3, SEQ ID NO:10) của kháng thể Act-1 của chuột nhắt; và sự thay thế các CDR chuỗi nhẹ bằng CDR chuỗi nhẹ (CDR1, SEQ ID NO:11, CDR2, SEQ ID NO:12 và CDR3, SEQ ID NO:13) của kháng thể Act-1 của chuột nhắt.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người để dùng trong chế phẩm chứa vùng biến đổi trên chuỗi nặng có mức độ đồng nhất về mặt trình tự khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với các axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO:2, và vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có mức độ đồng nhất về mặt trình tự khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với các axit amin từ 20 đến 131 của SEQ ID NO:4 hoặc các axit amin từ 21 đến 132 của SEQ ID NO:5. Mức độ đồng nhất về axit amin có thể được xác định bằng cách áp dụng thuật toán so sánh trình tự thích hợp, như hệ thống Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), bằng cách sử dụng các thông số mặc định. Theo một phương án, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ để dùng trong chế phẩm là vedolizumab (CAS, American Chemical Society, số đăng ký 943609-66-3).

Các kháng thể $\alpha 4\beta 7$ khác cũng có thể được dùng trong chế phẩm này và các phác đồ liều nêu trong bản mô tả. Ví dụ, các kháng thể $\alpha 4\beta 7$ được mô tả trong US 2010/0254975 (Amgen, Inc.), toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng

cách viện dẫn, là thích hợp để dùng trong các chế phẩm và phương pháp điều trị bệnh viêm ruột ở cá thể.

Kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện các trình tự axit nucleic mã hoá mỗi chuỗi trong tế bào sống, ví dụ, tế bào trong giống cây. Nhiều loại hệ thống vật truyền biểu hiện vật chủ có thể được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể theo sáng chế. Các hệ thống biểu hiện vật chủ là chất dẫn thuốc mà nhờ nó các trình tự mã hóa quan tâm có thể được sản xuất và sau đó được tinh chế, nhưng cũng là tế bào mà có thể biểu hiện kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ in situ, khi được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với các trình tự mã hóa nucleotit thích hợp. Các hệ thống này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các vi sinh vật như vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*, *B. subtilis*) đã được biến nạp với các vật truyền biểu hiện ADN thể thực khuẩn vi khuẩn, ADN plasmit hoặc ADN cosmit tái tổ hợp chứa các trình tự mã hóa kháng thể; nấm men (ví dụ, *Saccharomyces*, *Pichia*) được biến nạp với các vật truyền biểu hiện nấm men tái tổ hợp chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hệ tế bào côn trùng được gây nhiễm với các vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ, baculovirus) chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hệ tế bào thực vật được gây nhiễm với các vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ, virus gây bệnh đốm ở súp lơ (cauliflower mosaic virus – CaMV); virus khảm thuốc lá (tobacco mosaic virus - TMV) hoặc được biến nạp với các vật truyền biểu hiện plasmit tái tổ hợp (ví dụ, Ti plasmit) chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hoặc hệ tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0) chứa cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp chứa gen khởi đầu có nguồn gốc từ bộ gen của tế bào động vật có vú (ví dụ, gen khởi đầu metallothionein) hoặc virus từ động vật có vú (ví dụ, gen khởi đầu muộn adenovirus; gen khởi đầu 7,5K ở virus gây bệnh đậu mùa). Ví dụ, tế bào động vật có vú như tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (Chinese hamster ovary cells - CHO), cùng với vật truyền như yếu tố khởi đầu gen sớm là hợp chất trung gian chính từ cytomegalovirus người, là hệ biểu hiện hữu hiệu các kháng thể (Foecking et al., Gen 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

Trong hệ vi khuẩn, một số vật truyền biểu hiện có thể được chọn một cách thuận lợi tùy thuộc vào ứng dụng dự định đối với phân tử kháng thể cần biểu hiện. Ví dụ, khi một lượng lớn protein như vậy cần được tạo ra, để tạo ra dược phẩm chứa phân tử kháng thể, thì mong muốn có được vật truyền chi phối mức biểu hiện cao các sản phẩm

protein dung hợp mà được tinh chế một cách dễ dàng. Các vật truyền như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vật truyền pUR278 biểu hiện ở *E. coli* (Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)), trong đó trình tự mã hóa kháng thể có thể gắn riêng rẽ vào vật truyền trong khung với vùng mã hóa lac Z sao cho protein dung hợp được tạo ra; vật truyền pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); và các vật truyền tương tự. Vật truyền pGEX cũng có thể được sử dụng để biểu hiện các polypeptit lạ ở dạng protein dung hợp với glutathion S-transferaza (GST). Nói chung, các protein dung hợp này hòa tan và có thể dễ dàng được tinh chế từ tế bào được phân giải bằng cách hấp phụ và gắn kết với các hạt glutathion-agarosa chất nền, sau đó rửa giải với sự có mặt của glutathion tự do. Vật truyền pGEX được thiết kế để bao gồm trombin hoặc các vị trí phân cắt yếu tố Xa proteaza sao cho sản phẩm gen đích đã được tách dòng có thể được tách ra khỏi gốc GST.

Trong hệ côn trùng, virus đa diện nhân *Autographa californica* (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus - AcNPV) được sử dụng làm vật truyền để biểu hiện gen lạ. Virus này phát triển trong tế bào *Spodoptera frugiperda*. Trình tự mã hóa kháng thể có thể được tách dòng riêng biệt thành vùng không thiết yếu (ví dụ gen polyhedrin) của virus và được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu AcNPV (ví dụ gen khởi đầu polyhedrin).

Trong các tế bào chủ động vật có vú, có thể sử dụng một số hệ biểu hiện trên cơ sở virus. Trong các trường hợp mà adenovirus được dùng làm vật truyền biểu hiện, trình tự mã hóa kháng thể đáng quan tâm có thể được gắn vào một phức điều khiển phiên mã/dịch mã ở adenovirus, ví dụ, gen khởi đầu muộn và trình tự dẫn đầu chạc ba. Sau đó, gen khảm này có thể được cài xen vào hệ gen adenovirus bằng cách tái tổ hợp in vitro hoặc in vivo. Việc cài xen vào vùng không thiết yếu của hệ gen virus (ví dụ, vùng E1 hoặc E3) sẽ tạo ra virus tái tổ hợp sống sót và có khả năng biểu hiện phân tử kháng thể ở các vật chủ được cấy nhiễm (xem: Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984) chẳng hạn). Tín hiệu khởi đầu đặc hiệu cũng có thể là cần thiết để dịch mã có hiệu quả các trình tự mã hóa kháng thể đã được cài xen. Các tín hiệu này bao gồm codon khởi đầu ATG và các trình tự liền kề. Hơn nữa, codon khởi đầu này cần phải cùng pha với khung đọc của trình tự mã hóa mong muốn để đảm bảo

dịch mã toàn bộ đoạn cài xen. Các tín hiệu điều khiển dịch mã ngoại sinh và các codon khởi đầu có thể có nhiều nguồn gốc, cả tự nhiên và tổng hợp. Hiệu quả biểu hiện có thể được gia tăng do bao gồm các yếu tố tăng cường phiên mã thích hợp, gen kết thúc phiên mã, v.v... (xem Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987)).

Ngoài ra, chủng tế bào chủ điều biến sự biểu hiện của các trình tự cài xen, hoặc cải biến và xử lý các sản phẩm gen theo cách đặc hiệu mong muốn, có thể được lựa chọn. Các cải biến (ví dụ, sự glycosyl hoá) và xử lý (ví dụ, phân cắt) như vậy đối với các sản phẩm protein có thể quan trọng đối với chức năng của protein. Các tế bào chủ khác có các cơ chế đặc trưng và đặc hiệu đối với việc xử lý sau dịch mã và cải biến các protein các và sản phẩm gen. Các dòng tế bào hoặc hệ vật chủ thích hợp có thể được chọn để đảm bảo cải biến và xử lý đúng các protein đã được biểu hiện này. Nhằm mục đích này, các tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn có tổ chức tế bào để xử lý một cách thích hợp việc phiên mã sơ cấp, glycosyl hoá, và phosphoryl hoá sản phẩm gen có thể được áp dụng. Các tế bào chủ động vật có vú như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (Chinese hamster ovary - CHO), NS0, HeLa, VERY, thận chuột đồng mới sinh (baby hamster kidney - BHK), thận khỉ (COS), MDCK, 293, 3T3, WI38, tế bào caxinom gan người (ví dụ, Hep G2), dòng tế bào ung thư vú như, ví dụ, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 và T47D, và dòng tế bào tuyến vú bình thường như, ví dụ, CRL7030 và Hs578Bst.

Bộ máy glycosyl hoá của các loại tế bào khác nhau có thể tạo ra các kháng thể với hợp phần glycosyl hoá khác với hợp phần ở các loại tế bào khác, hoặc các loại tế bào không có sự glycosyl hoá, như tế bào vi khuẩn. Theo một khía cạnh, các loại tế bào dùng để sản xuất kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ là tế bào động vật có vú, như tế bào NS0 hoặc CHO. Theo một khía cạnh, tế bào động vật có vú có thể bao gồm khuyết đoạn của enzym tham gia vào quá trình trao đổi chất của tế bào và gen ngoại sinh đáng quan tâm có thể liên kết linh hoạt với enzym thay thế, ví dụ, trong cấu trúc hoặc vật truyền để đưa vào tế bào, ví dụ, bằng cách biến nạp hoặc chuyển nhiễm. Cấu trúc hoặc vật truyền với gen ngoại sinh này tạo cho tế bào mà có cấu trúc hoặc vật truyền này một lợi thế lựa chọn để khuyến khích sự sản xuất polypeptit được mã hoá bởi gen ngoại sinh này. Theo một phương án, tế bào CHO là tế bào DG44 (Chasin và Urlaub (1980) *PNAS USA* 77:4216) chứa gen dihydrofolat reductaza bị khuyết đoạn hoặc làm mất hoạt tính.

Theo một phương án khác, tế bào CHO là tế bào CHO K1 có gen glutamin syntaza bị khuyết đoạn hoặc làm mất hoạt tính (xem patent Mỹ số 5,122,464 hoặc 5,827,739 chẳng hạn).

Chế phẩm rắn

Chế phẩm rắn theo sáng chế thường được bào chế bằng cách sấy chế phẩm lỏng. Phương pháp sấy thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng, như sấy khô ở nhiệt độ thấp hoặc sấy phun. Sấy khô ở nhiệt độ thấp bao gồm làm lạnh chế phẩm lỏng, thường trong đồ chứa sẽ được dùng để bảo quản, vận chuyển và phân phối chế phẩm (ví dụ như lọ) (xem tài liệu: Gatlin and Nail, Protein Protein Purification Engineering, ed. Roger G. Harrison, Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994) chẳng hạn). Khi chế phẩm được làm lạnh, áp suất khí quyển giảm và nhiệt độ được điều chỉnh để cho phép loại bỏ dung môi đã làm lạnh ví dụ, bằng cách làm thăng hoa. Bước này trong quy trình sấy khô ở nhiệt độ thấp đôi khi còn được gọi là làm khô sơ bộ. Nếu cần, sau đó có thể tăng nhiệt độ để loại bỏ dung môi bất kỳ vẫn liên kết với chế phẩm khô bằng cách làm bay hơi. Bước này trong quy trình sấy khô ở nhiệt độ thấp đôi khi còn được gọi là làm khô phụ. Khi chế phẩm đạt đến độ khô mong muốn, quy trình làm khô kết thúc và đồ chứa được đậy kín. Chế phẩm rắn cuối đôi khi còn được gọi là “chế phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp” hoặc “bánh”. Quy trình sấy khô ở nhiệt độ thấp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị thích hợp bất kỳ. Thiết bị sấy khô ở nhiệt độ thấp thích hợp sẵn có từ một số nguồn thương mại (ví dụ, SP Scientific, Stone Ridge, NY).

Nhiều thiết bị thích hợp có thể được sử dụng để sấy chế phẩm lỏng để tạo ra chế phẩm rắn (ví dụ, chế phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp). Thông thường, chế phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp được điều chế bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực bằng cách sử dụng khoang kín chứa các kệ, trên đó có đặt các lọ chế phẩm lỏng cần làm khô. Nhiệt độ của các kệ, cũng như tốc độ làm nguội và gia nhiệt, cũng như áp suất bên trong khoang, có thể được điều chỉnh. Cần phải hiểu rằng các thông số quy trình khác nhau được thảo luận trong bản mô tả này dùng để chỉ các quy trình được thực hiện bằng cách sử dụng các loại thiết bị này. Nếu cần, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng điều chỉnh các thông số nêu trong bản mô tả để thích hợp với các loại thiết bị làm khô khác.

Nhiệt độ và lượng chân không thích hợp đối với bước làm khô sơ bộ và bước làm khô phụ có thể được xác định dễ dàng bởi chuyên gia trung bình trong lĩnh vực. Nói chung, chế phẩm được làm lạnh ở nhiệt độ khoảng -30°C hoặc thấp hơn, như -40°C hoặc -50°C . Tốc độ làm nguội có thể ảnh hưởng đến lượng và kích cỡ của tinh thể đá trong chất gian bào. Bước làm khô sơ bộ thường được thực hiện ở nhiệt độ ẩm hơn khoảng 10°C , khoảng 20°C , khoảng 30°C , khoảng 40°C hoặc khoảng 50°C so với nhiệt độ làm lạnh. Theo một khía cạnh, các điều kiện làm khô sơ bộ có thể được thiết lập để giữ cho kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh hoặc nhiệt độ làm xẹp của chế phẩm. Ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ làm xẹp, chất gian bào đã được làm lạnh ở trạng thái vô định hình có thể chảy (xẹp), khiến cho các phân tử protein có thể không được bao quanh bởi chất gian bào cứng và rắn, và các phân tử protein có thể không ổn định trong chất gian bào đã bị xẹp. Ngoài ra, có thể khó làm khô hoàn toàn chế phẩm nếu xảy ra hiện tượng xẹp. Lượng ẩm cao hơn tạo ra trong chế phẩm có thể dẫn đến tốc độ thoái hóa protein cao hơn và rút ngắn khoảng thời gian mà sản phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp có thể được bảo quản trước khi chất lượng của nó giảm đến mức không chấp nhận được. Theo một khía cạnh, nhiệt độ của kệ và áp suất khoang được chọn lọc để duy trì nhiệt độ sản phẩm thấp hơn nhiệt độ làm xẹp trong quá trình làm khô sơ bộ. Nhiệt độ chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh của chế phẩm đã làm lạnh có thể được xác định theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, theo phương pháp phân tích nhiệt lượng bằng tia quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC). Nhiệt độ làm xẹp có thể được đo theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ như phương pháp soi kính hiển vi sấy khô ở nhiệt độ thấp. Tỷ lệ giữa đường không khử và protein (mol:mol) và lượng các thành phần khác của chế phẩm sẽ ảnh hưởng đến nhiệt độ chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh và nhiệt độ làm xẹp. Theo một số phương án, nhiệt độ chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh đối với chế phẩm kháng thể $\alpha 4\beta 7$ nằm trong khoảng từ -35°C đến -10°C , nằm trong khoảng từ -35°C đến -25°C , hoặc nằm trong khoảng từ -35°C đến -29°C . Theo một phương án khác, nhiệt độ chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh của chế phẩm kháng thể $\alpha 4\beta 7$ là khoảng -29°C . Theo một số phương án, nhiệt độ chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh của chế phẩm kháng thể $\alpha 4\beta 7$ là khoảng -30°C , khoảng -31°C , khoảng -32°C , khoảng -33°C , khoảng -34°C , khoảng -35°C hoặc khoảng -36°C . Theo

một số phương án, nhiệt độ làm xẹp của chế phẩm kháng thể $\alpha 4\beta 7$ nằm trong khoảng từ -30°C đến 0°C , nằm trong khoảng từ -28°C đến -25°C , hoặc nằm trong khoảng từ -20°C đến -10°C . Theo một phương án khác, nhiệt độ làm xẹp của chế phẩm kháng thể $\alpha 4\beta 7$ là khoảng -26°C . Không mong muốn bị giới hạn bởi lý thuyết bất kỳ, tốc độ tăng càng nhanh, nhiệt độ làm xẹp của sản phẩm càng cao. Bước làm khô sơ bộ có thể loại bỏ ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70% dung môi hoặc nhiều hơn. Theo một khía cạnh, bước làm khô sơ bộ loại bỏ nhiều hơn 80% dung môi ra khỏi chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Bước làm khô sơ bộ phụ thuộc vào nhiệt độ của kệ và áp suất. Các điều kiện làm khô sơ bộ có thể được xác định theo kinh nghiệm sấy khô ở nhiệt độ thấp với các thông số quy trình khác nhau. Bước làm khô sơ bộ cũng có thể được tạo mô hình toán học dựa trên nhiệt độ sản phẩm. Phương trình truyền nhiệt và khối lượng (Milton et al. (1997) PDA J of Pharm Sci & Tech, 51: 7-16), kết hợp với các hiểu biết về R_p và K_v cho phép hiểu rõ sự kết hợp và tương tác giữa các biến đầu vào bao gồm các biến đầu vào quy trình như nhiệt độ kệ và áp suất và các biến chế phẩm đạt được ở dạng trị số R_p . Các mô hình này có thể trợ giúp việc xác định các thông số được dùng cho một quy trình hữu hiệu dựa trên giới hạn nhiệt độ sản phẩm bởi nhiệt độ làm xẹp và công suất thiết bị.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A_p(P_o - P_c)}{R_p}$$

Phương trình 1

$$\ln P_o = -6144,96/T_p + 24,0185$$

Phương trình 2

$$\frac{dQ}{dt} = A_v K_v (T_s - T_p)$$

Phương trình 3

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \frac{dm}{dt}$$

Phương trình 4

Phương trình 1 liên quan đến tốc độ thăng hoa (dm/dt) trong quá trình làm khô sơ bộ theo diện tích phần gạch ngang bên trong của đồ chứa (A_p), áp suất hơi của nước đá (P_o), áp suất của khoang sấy (P_c), và trở kháng chuyển khối được chuẩn hóa theo diện tích của bánh lọc và cữ chặn (R_p). P_o ở bề mặt chung thăng hoa có thể được xác định từ Phương trình 2, trong đó P_o có liên quan đến nhiệt độ của sản phẩm đá ở bề

mặt chung thăng hoa, mà nó xấp xỉ bằng nhiệt độ sản phẩm (T_p), có thể được xác định bằng cặp nhiệt điện ở đáy của lọ hoặc có thể thu được từ các phương trình nêu trên khi xác định được các biến khác. Phương trình 3 liên quan đến tốc độ truyền nhiệt từ kệ đến lọ, trong đó A_v là diện tích của lọ, K_v là hệ số truyền nhiệt của lọ, T_s là nhiệt độ của kệ, và T_p là nhiệt độ sản phẩm. Phương trình 4 kết hợp các phương trình chuyển khối và truyền nhiệt, trong đó ΔH_s là nhiệt thăng hoa.

Như có thể thấy từ các phương trình cho bước làm khô sơ bộ, nhiệt độ kệ (T_s), nhiệt độ sản phẩm (T_p), áp suất khoang (P_c), trở kháng chuyển khối của bánh lọc (R_p), và hệ số truyền nhiệt (K_v) có thể ảnh hưởng đến tốc độ thăng hoa.

Bước tùy chọn sau khi làm lạnh và trước khi làm khô sơ bộ là tôi. Trong bước này, nhiệt độ kệ của chất làm đông khô tăng lên trên nhiệt độ chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh của chế phẩm trong một khoảng thời gian ngắn, ví dụ, khoảng 2 giờ đến 6 giờ, khoảng 3 giờ đến 5 giờ, hoặc khoảng 4 giờ, sau đó nhiệt độ kệ giảm lại xuống đến dưới nhiệt độ chuyển tiếp sang trạng thái thủy tinh của chế phẩm. Bước tôi có thể được áp dụng để làm kết tinh các chất độn và để tạo thành các tinh thể nước đá lớn hơn, đồng nhất hơn. Quy trình tôi có thể ảnh hưởng đến thời gian hoàn nguyên do bánh lọc khô sau khi tôi có diện tích bề mặt lớn hơn bánh lọc khô chưa được tôi. Bước tôi của chế phẩm kháng thể $\alpha 4\beta 7$ có thể nằm trong khoảng từ -30°C đến -10°C hoặc nằm trong khoảng từ -25°C đến -15°C . Theo một khía cạnh, nhiệt độ tôi đối với chế phẩm kháng thể $\alpha 4\beta 7$ là khoảng -20°C .

Bước làm khô phụ thường được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ làm lạnh của chế phẩm lỏng. Ví dụ, bước làm khô phụ có thể được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 10°C , khoảng 20°C , khoảng 30°C , khoảng 40°C hoặc khoảng 50°C . Theo một khía cạnh, nhiệt độ của bước làm khô phụ là nhiệt độ trong phòng, ví dụ, 20°C đến 30°C . Thời gian làm khô phụ cần phải đủ để làm giảm lượng ẩm xuống $<5\%$.

Theo khía cạnh khác, chu trình sấy khô ở nhiệt độ thấp bao gồm bước làm lạnh ở khoảng -45°C , tôi ở khoảng -20°C , làm lạnh lại ở khoảng -45°C , làm khô sơ bộ ở khoảng -24°C và 150mTorr (19,99Pa), và bước làm khô phụ ở khoảng 27°C và 150mTorr (19,99Pa).

R_p bị ảnh hưởng bởi hàm lượng chất rắn của DP làm lạnh và bởi các quá trình nhiệt của DP (các giai đoạn làm lạnh, tôi, và làm lạnh lại) ảnh hưởng đến cấu trúc lỗ của bánh lọc. Quá trình nhiệt cũng có thể ảnh hưởng đến giai đoạn làm khô phụ, trong đó diện tích bề mặt lớn hơn có thể giúp cho việc khử hút nước (Pikal et al. (1990) *Int. J. Pharm.*, 60: 203-217). Các thông số quy trình hữu dụng để kiểm soát trong các giai đoạn làm khô ở nhiệt độ thấp sơ bộ và phụ có thể là nhiệt độ kệ và áp suất khoang trong mỗi giai đoạn của chu trình làm khô.

Đối với quy mô lớn, tải lượng đông khô và hàm lượng chất rắn có thể ảnh hưởng đến chu trình làm khô. Thời gian làm khô sơ bộ có thể bị ảnh hưởng bởi hàm lượng chất rắn trong chế phẩm. Ở hàm lượng chất rắn cao hơn, ví dụ, khi tổng hàm lượng chất rắn (tá dược và/hoặc protein) thay đổi lớn hơn 10% khối lượng/thể tích hoặc hơn 15% khối lượng/thể tích, ví dụ, chênh lệch từ 50% đến 100% so với chế phẩm mà thời gian làm khô của nó đã được xác định, thời gian làm khô có thể bị ảnh hưởng. Ví dụ, chế phẩm có hàm lượng chất rắn cao có thể có thời gian làm khô dài hơn chế phẩm có hàm lượng chất rắn thấp. Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm sử dụng công suất thiết bị làm đông khô có thể thay đổi trong khoảng từ 25% đến 100%. Ở % công suất nạp cao hơn, thời gian làm khô sơ bộ có thể tăng lên tới 2 lần so với % công suất nạp thấp hơn. Mức chênh lệch về thời gian làm khô sơ bộ ở các % tải nạp khác nhau sẽ tăng khi hàm lượng chất rắn tăng. Theo một phương án, hàm lượng chất rắn nhỏ hơn 20% đến 25% và tải nạp nằm trong khoảng từ 25% đến 100%.

Kích thước lọ có thể được chọn dựa trên diện tích bề mặt sẽ được tiếp xúc với kệ và với chân không trong quá trình sấy khô ở nhiệt độ thấp. Thời gian làm khô tỷ lệ tuyến tính với chiều cao bánh, do vậy kích thước lọ có thể được chọn dựa trên chiều cao bánh mà được xác định là hợp lý. Lọ có đường kính lớn so với thể tích có thể tạo ra mức tiếp xúc cao với kệ để truyền nhiệt hữu hiệu trong chu trình sấy khô ở nhiệt độ thấp. Dung dịch kháng thể loãng trong thể tích lớn chất lỏng sẽ cần nhiều thời gian hơn để làm khô. Sự cân xứng giữa kích cỡ lọ và thể tích chế phẩm cần phải được tính đến, do lọ lớn hơn có thể tốn chi phí hơn để bảo quản và vận chuyển và có khoảng không lớn hơn tỷ lệ bào chế, và có thể bộc lộ tỷ lệ chế phẩm cao do sự giảm độ ẩm khi bảo quản trong thời gian dài. Đối với liều lượng 300mg, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể có thể tích là 3ml, 5ml, 6ml, 10ml, 20ml, 50ml hoặc 100ml trước khi sấy khô ở

nhiệt độ thấp. Theo một khía cạnh, kích thước lọ là 20ml đối với dung dịch 60mg/ml ở liều 300mg.

Sau khi sấy khô ở nhiệt độ thấp, lọ có thể được đậy kín, ví dụ, được nút, trong chân không. Theo cách khác, khí, ví dụ, không khí khô hoặc nitơ, có thể được đưa vào lọ trước khi đậy kín. Khi quan tâm đến sự oxy hoá, khí được đưa vào khoang sấy khô ở nhiệt độ thấp có thể bao gồm khí làm chậm hoặc ngăn ngừa sự oxy hoá sản phẩm đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp. Theo một khía cạnh, khí này là khí chưa được oxy hóa, ví dụ, nitơ, hoặc khí trơ, ví dụ, heli, neon, argon, krypton hoặc xenon. Theo khía cạnh khác, khí này là nitơ hoặc argon.

Theo một số phương án, thể tích của chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trước sấy khô ở nhiệt độ thấp bằng thể tích dung dịch được hoàn nguyên trước khi sử dụng. Ví dụ, chế phẩm có thể tích khoảng 5,5ml trước sấy khô ở nhiệt độ thấp có thể được hoàn nguyên đến thể tích khoảng 5,5ml, bằng cách bổ sung một lượng chất lỏng, ví dụ như nước hoặc nước muối, mà tính đến cả thể tích chất rắn khô. Theo các phương án khác, có thể mong muốn làm khô ở nhiệt độ thấp chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong một thể tích khác với thể tích dung dịch đã được hoàn nguyên. Ví dụ, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể được đông khô ở dạng dung dịch loãng, ví dụ như 0,25x, 0,5x, hoặc 0,75x và được hoàn nguyên đến 1x bằng cách bổ sung ít chất lỏng hơn, ví dụ, ít hơn 75%, ít hơn một nửa, ít hơn hoặc 25% so với thể tích trước sấy khô ở nhiệt độ thấp. Theo một phương án, liều 300mg có thể được đông khô ở dạng dung dịch kháng thể 30mg/ml trong 5% sucroza và được hoàn nguyên thành dung dịch kháng thể 60mg/ml trong 10% sucroza. Theo cách khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ đã được đông khô có thể được hoàn nguyên thành dung dịch loãng hơn chế phẩm trước khi được làm khô ở nhiệt độ thấp.

Điều trị bệnh bằng chế phẩm kháng thể

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn ở vật chủ bao gồm bước cho đối tượng sử dụng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ nêu trong bản mô tả với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn, ví dụ, ở người. Đối tượng người có thể là người trưởng thành (ví dụ, 18 tuổi hoặc lớn hơn), thanh thiếu niên, hoặc trẻ em. Đối tượng người có thể là người 65 tuổi hoặc già hơn. Trái với các

phác đồ điều trị khác, đối tượng người 65 tuổi hoặc già hơn không cần sự thay đổi bất kỳ về phác đồ điều trị nêu trong bản mô tả, và có thể được cho dùng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ thông thường nêu trong bản mô tả.

Đối tượng có thể không có đáp ứng thích hợp với, mất đáp ứng với, hoặc không dung nạp được việc điều trị bệnh bằng chất điều biến miễn dịch, chất đối kháng TNF- α , hoặc hỗn hợp của chúng. Bệnh nhân có thể đã được điều trị trước đó bằng ít nhất một corticosteroid (ví dụ, prednison) cho bệnh viêm ruột. Đáp ứng không thỏa đáng với các corticosteroid là các dấu hiệu và các triệu chứng bệnh dai dẳng mặc dù đã trải qua ít nhất một phác đồ điều trị cảm ứng 4 tuần bao gồm liều tương đương với 30mg prednison hằng ngày qua đường miệng trong 2 tuần hoặc qua đường tĩnh mạch trong 1 tuần. Sự mất đáp ứng với corticosteroid là hai nỗ lực thất bại nhằm làm giảm lượng corticosteroid xuống dưới liều tương đương với 10mg prednison dùng hằng ngày qua đường miệng. Đối tượng không dung nạp corticosteroid bao gồm những người đã từng mắc hội chứng Cushing, tiền loãng xương/loãng xương, tăng glucoza huyết, chứng mất ngủ và/hoặc nhiễm khuẩn.

Chất điều biến miễn dịch có thể là azathioprin, 6-mercaptopurin, hoặc methotrexat dùng qua đường miệng. Đáp ứng không thỏa đáng với chất điều biến miễn dịch là các dấu hiệu và các triệu chứng bệnh dai dẳng mặc dù đã trải qua ít nhất một phác đồ 8 tuần hoặc dùng azathioprin ($\geq 1,5\text{mg/kg}$), 6-mercaptopurin ($\geq 0,75\text{ mg/kg}$), hoặc methotrexat ($\geq 12,5\text{mg/tuần}$) qua đường miệng. Không dung nạp chất điều biến miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hiện tượng buồn nôn/nôn, đau bụng, viêm tụy, LFT bất thường, chứng giảm lympho bào, đột biến gen TPMT và/hoặc nhiễm khuẩn.

Theo một khía cạnh, đối tượng có thể không có đáp ứng thích hợp, mất đáp ứng, hoặc không dung nạp với việc điều trị bệnh bằng chất đối kháng TNF- α . Ví dụ, chất đối kháng TNF- α là chất ức chế hoạt tính sinh học của TNF- α , và tốt hơn là gắn kết TNF- α , như kháng thể đơn dòng, ví dụ, REMICADE (infliximab), HUMIRA (adalimumab), CIMZIA (certolizumab pegol), SIMPONI (golimumab) hoặc protein dung hợp thụ thể tuần hoàn như ENBREL (etanercept) chẳng hạn. Đáp ứng không thỏa đáng với chất đối kháng TNF- α là các dấu hiệu và các triệu chứng bệnh dai dẳng mặc

dù đã trải qua ít nhất một phác đồ cảm ứng infliximab 5mg/kg qua đường tĩnh mạch (IV) trong 4 tuần, 2 liều cách nhau ít nhất 2 tuần; một liều tiêm dưới da 80mg adalimumab, sau đó là một liều 40mg cách nhau ít nhất hai tuần; hoặc 400mg certolizumab pegol dưới da, 2 liều cách nhau ít nhất 2 tuần. Mất đáp ứng với chất đối kháng TNF- α là sự tái phát của các triệu chứng trong quá trình duy trì liều sau khi thu được lợi ích lâm sàng trước đó. Hiện tượng không dung nạp chất đối kháng TNF- α bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng liên quan đến tiêm truyền, mất myêlin, bệnh tim do xung huyết, và/hoặc nhiễm khuẩn.

Sự không duy trì mức thuyên giảm, được dùng trong bản mô tả này cho đối tượng mắc bệnh viêm loét đại tràng, để chỉ sự gia tăng điểm số Mayo ít nhất 3 điểm và điểm Baron cải biến ít nhất 2.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (1) có thể gắn kết integrin $\alpha 4\beta 7$ in vitro và/hoặc in vivo; và (2) có thể điều biến hoạt tính hoặc chức năng của integrin $\alpha 4\beta 7$, như (a) chức năng gắn kết (ví dụ, khả năng gắn kết của integrin $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1), fibronectin và/hoặc VCAM-1) và/hoặc (b) chức năng thâm nhập bạch cầu, bao gồm sự phục hồi và/hoặc sự tích tụ bạch cầu trong mô (ví dụ, khả năng ức chế sự di chuyển của tế bào lympho đến mô niêm mạc ruột). Theo một phương án, kháng thể trong chế phẩm có thể gắn kết integrin $\alpha 4\beta 7$, và có thể ức chế việc gắn kết của integrin $\alpha 4\beta 7$ vào một hoặc nhiều phối tử của nó (ví dụ, MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1), VCAM-1, fibronectin), bằng cách đó ức chế hiện tượng thâm nhập bạch cầu ở mô (bao gồm sự phục hồi và/hoặc sự tích tụ bạch cầu trong mô). Theo một phương án khác, kháng thể trong chế phẩm có thể gắn kết integrin $\alpha 4\beta 7$, và có thể ức chế chọn lọc việc gắn kết của integrin $\alpha 4\beta 7$ vào một hoặc nhiều phối tử của nó (ví dụ, MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1), VCAM-1, fibronectin), bằng cách đó ức chế hiện tượng thâm nhập bạch cầu ở mô (bao gồm sự phục hồi và/hoặc tích tụ bạch cầu trong mô). Chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể ức chế sự bám dính tế bào của các tế bào mang integrin $\alpha 4\beta 7$ vào các tế bào nội mô mạch trong niêm mạc mô, bao gồm mô có liên quan đến ruột, cơ quan lympho hoặc bạch cầu (đặc biệt là các tế bào lympho như tế bào T hoặc B) in vitro và/hoặc in vivo. Theo một phương án khác nữa, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo sáng chế có thể ức chế tương tác giữa $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1) và/hoặc fibronectin.

Cũng theo một phương án khác, chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo sáng chế có thể ức chế chọn lọc tương tác giữa $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1) và/hoặc fibronectin, ví dụ, mà không ức chế tương tác giữa $\alpha 4\beta 7$ và VCAM.

Chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo sáng chế có thể được sử dụng để điều biến (ví dụ, ức chế (làm giảm hoặc ngăn ngừa)) chức năng gắn kết và/hoặc chức năng thâm nhập bạch cầu (ví dụ, tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân to) của integrin $\alpha 4\beta 7$. Ví dụ, globulin miễn dịch được làm giống của người ức chế việc gắn kết giữa integrin $\alpha 4\beta 7$ vào phối tử (nghĩa là, một hoặc nhiều phối tử) có thể được dùng theo phương pháp điều trị bệnh có liên quan đến hiện tượng thâm nhập bạch cầu (ví dụ, tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân to) của mô (bao gồm sự phục hồi và/hoặc tích tụ bạch cầu trong mô), đặc biệt là mô có biểu hiện phân tử MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1).

Lượng hữu hiệu chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo sáng chế (nghĩa là, một hoặc nhiều) được dùng cho cá thể (ví dụ, động vật có vú, như người hoặc động vật linh trưởng khác) để điều trị bệnh này. Ví dụ, các bệnh viêm nhiễm, bao gồm bệnh có liên quan đến hiện tượng thâm nhập bạch cầu của hệ tiêu hoá (bao gồm nội mô có liên quan đến ruột), các mô niêm mạc khác, hoặc mô biểu hiện phân tử MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1) (ví dụ, mô có liên quan đến ruột, như tĩnh mạch nhỏ thuộc lớp hạ niêm mạc của ruột non và ruột già; và tuyến vú (ví dụ, tuyến vú tiết sữa)), có thể được điều trị theo phương pháp theo sáng chế. Tương tự, cá thể mắc bệnh liên quan đến hiện tượng thâm nhập bạch cầu của mô do việc gắn kết bạch cầu vào tế bào (ví dụ, các tế bào nội mô) biểu hiện MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1) có thể được điều trị theo sáng chế này.

Theo một phương án, bệnh có thể được điều trị như vậy bao gồm bệnh viêm ruột (IBD), như viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, chứng viêm ruột hồi, bệnh ỉa chảy mỡ, bệnh ỉa chảy mỡ (bệnh celiac - nontropical Sprue), bệnh đường ruột có liên quan đến bệnh khớp nhiễm khuẩn huyết thanh âm tính, bệnh viêm ruột kết kính hiển vi hoặc bệnh viêm ruột kết collagen, bệnh viêm dạ dày ưa eosin, hoặc bệnh viêm nang cùng của ruột hồi sau khi phẫu thuật đại trực tràng, và phẫu thuật nối thông hồi tràng-hậu môn. Tốt hơn là, bệnh viêm ruột là bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng. Bệnh viêm loét đại tràng có thể ở mức độ viêm loét đại tràng từ vừa phải đến nghiêm trọng. Việc điều trị

có thể làm lành niêm mạc ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng. Việc điều trị bệnh cũng có thể làm giảm, loại bỏ, hoặc làm giảm và loại bỏ việc sử dụng corticosteroid ở bệnh nhân.

Bệnh viêm tụy và bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin là các bệnh khác có thể được điều trị bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế. Đã có thông báo rằng MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1) được biểu hiện bởi một số mạch trong tụy ngoại tiết từ NOD (tiểu đường không béo phì) chuột nhắt, cũng như từ chuột nhắt BALB/c và SJL. Việc biểu hiện của MAdCAM-1 được cho là đã gây ra trên nội mô trong các đảo nhỏ bị viêm của tụy của chuột nhắt NOD, và MAdCAM-1 là addressin ưu thế được biểu hiện bởi nội mô đảo NOD ở giai đoạn sớm của viêm đảo tụy (Hanninen, A., et al., J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993)). Việc điều trị bệnh cho chuột nhắt NOD bằng các kháng thể kháng MAdCAM (kháng MAdCAM-1 chẳng hạn) hoặc kháng thể kháng $\beta 7$ ngăn ngừa sự phát triển bệnh đái tháo đường (Yang et al., Diabetes, 46:1542-1547 (1997)). Ngoài ra, sự tích tụ của các tế bào lympho biểu hiện $\alpha 4\beta 7$ trong các đảo này được quan sát, và MAdCAM-1 có liên quan đến việc gắn kết của tế bào u lympho nhờ $\alpha 4\beta 7$ vào mạch từ các đảo bị viêm (Hanninen, A., et al., J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993)) hoặc đến hệ tiêu hoá trong u lympho tế bào vỏ não (Geissmann et al., Am. J. Pathol., 153:1701-1705 (1998)).

Ví dụ về các bệnh viêm nhiễm có liên quan đến niêm mạc mô có thể được xử lý bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế bao gồm bệnh viêm túi mật, bệnh viêm đường mật (Adams and Eksteen Nature Reviews 6:244-251 (2006) Grant et al., Hepatology 33:1065-1072 (2001)), ví dụ, bệnh viêm đường mật gây cứng xơ cấp, bệnh Behcet, ví dụ, ở ruột, hoặc viêm quanh ống mật (ống mật và mô xung quanh gan), và bệnh gây ra do vật chủ kháng lại mảnh ghép (ví dụ, trong hệ tiêu hoá (ví dụ, sau khi cấy ghép tủy xương) (Petrovic et al. Blood 103:1542-1547 (2004)). Như được thấy ở bệnh Crohn, hiện tượng viêm thường vượt ra ngoài bề mặt niêm mạc, nhờ đó các bệnh viêm nhiễm mạn tính, như bệnh sarcoid, bệnh viêm dạ dày mạn tính, ví dụ, bệnh viêm dạ dày tự miễn (Katakai et al., Int. Immunol., 14:167-175 (2002)) và các tình trạng bệnh tự phát có thể được điều trị.

Sáng chế còn mô tả phương pháp ức chế hiện tượng thâm nhập bạch cầu của mô niêm mạc. Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị ung thư (ví dụ, khối u dương tính $\alpha 4\beta 7$, như u lympho). Ví dụ khác về các bệnh viêm nhiễm có liên quan đến niêm mạc mô có thể được điều trị bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế bao gồm chứng viêm vú (tuyến vú) và hội chứng ruột dễ bị kích thích.

Các bệnh hoặc các tác nhân gây bệnh mà nguyên nhân gây bệnh của nó là do tương tác giữa MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1) và $\alpha 4\beta 7$ có thể được điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trong chế phẩm nêu trong bản mô tả. Ví dụ về các bệnh như vậy bao gồm các rối loạn thiếu hụt miễn dịch, như các rối loạn gây ra bởi virus gây suy giảm miễn dịch ở người (xem: WO2008140602 chẳng hạn).

Chế phẩm theo sáng chế được dùng với lượng hữu hiệu mà ức chế việc gắn kết giữa integrin $\alpha 4\beta 7$ với phối tử của nó. Để điều trị, lượng hữu hiệu sẽ đủ để đạt được tác dụng trị liệu (kể cả phòng ngừa) mong muốn (như lượng đủ để làm giảm hoặc ngăn ngừa việc gắn kết qua trung gian integrin $\alpha 4\beta 7$ và/hoặc việc truyền tín hiệu, bằng cách đó ức chế sự bám dính và thâm nhập bạch cầu và/hoặc đáp ứng tế bào có liên quan). Lượng hữu hiệu kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, ví dụ, hiệu giá hữu hiệu đủ để duy trì trạng thái bảo hòa, ví dụ, trung hòa, của integrin $\alpha 4\beta 7$, có thể gây ra đáp ứng lâm sàng hoặc sự thuyên giảm bệnh viêm ruột. Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng ở dạng liều đơn vị hoặc đa liều. Liều dùng có thể được xác định theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực và có thể phụ thuộc, ví dụ, vào tuổi của cá thể, độ nhạy cảm, mức độ dung nạp và tình trạng sức khỏe nói chung. Ví dụ về phương thức sử dụng bao gồm dùng tại chỗ như qua mũi hoặc dùng bằng cách hít hoặc dùng qua da, đường tiêu hoá, như qua ống xông hoặc thuốc đạn, và dùng ngoài đường tiêu hoá, như qua đường tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, tiêm trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dùng trong dịch kính. Các liều lượng thích hợp đối với các kháng thể có thể nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg thể trọng đến 10,0mg/kg thể trọng cho mỗi lần điều trị, ví dụ nằm trong khoảng từ 2mg/kg đến 7mg/kg, nằm trong khoảng từ 3mg/kg đến khoảng 6mg/kg, hoặc nằm trong khoảng từ 3,5mg/kg đến 5mg/kg. Theo các phương án cụ thể, liều lượng được dùng bằng khoảng 0,3mg/kg, khoảng 0,5mg/kg, khoảng 1mg/kg, khoảng 2mg/kg, khoảng 3mg/kg, khoảng 4mg/kg, khoảng 5mg/kg, khoảng 6mg/kg, khoảng 7mg/kg, khoảng 8mg/kg, khoảng 9mg/kg, hoặc khoảng 10mg/kg.

Dạng liều cuối cùng để sử dụng, ví dụ, sau khi pha loãng kháng thể đã được hoàn nguyên (ví dụ, trong hệ truyền nước muối hoặc 5% dextroza) của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể nằm trong khoảng từ 0,5mg/ml đến 5mg/ml. Dạng liều cuối cùng có thể ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,4mg/ml, nằm trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,3mg/ml, nằm trong khoảng từ 1,0mg/ml đến 1,2mg/ml, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,1mg/ml, nằm trong khoảng từ 1,1mg/ml đến 1,4mg/ml, nằm trong khoảng từ 1,1mg/ml đến 1,3mg/ml, nằm trong khoảng từ 1,1mg/ml đến 1,2mg/ml, nằm trong khoảng từ 1,2mg/ml đến 1,4mg/ml, nằm trong khoảng từ 1,2mg/ml đến 1,3mg/ml, hoặc từ khoảng 1,3mg/ml đến 1,4mg/ml. Dạng liều cuối cùng có thể ở nồng độ khoảng 0,6mg/ml, 0,8mg/ml, 1,0mg/ml, 1,1mg/ml, khoảng 1,2mg/ml, khoảng 1,3mg/ml, khoảng 1,4mg/ml, khoảng 1,5mg/ml, khoảng 1,6mg/ml, khoảng 1,8mg/ml hoặc khoảng 2,0mg/ml. Theo một phương án, tổng liều là 180mg. Theo một phương án khác, tổng liều là 300mg. Liều 300mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ có thể được pha loãng trong 250ml nước muối hoặc dung dịch dextroza 5% để dùng.

Theo một số khía cạnh, sáng chế mô tả phác đồ liều có hai pha, pha cảm ứng và pha duy trì. Trong pha cảm ứng, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng theo cách nhanh chóng tạo ra lượng hữu hiệu kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó thích hợp cho các mục đích nhất định, như gây ra tính chống miễn dịch ở kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc gây ra đáp ứng lâm sàng và cải thiện các triệu chứng của bệnh viêm ruột. Bệnh nhân có thể sử dụng quy trình điều trị pha cảm ứng khi được điều trị trước tiên bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, khi được điều trị bệnh sau khi không điều trị trong thời gian dài, ví dụ, hơn ba tháng, hơn bốn tháng, hơn sáu tháng, hơn chín tháng, hơn một năm, hơn mười tám tháng hoặc hơn hai năm kể từ khi điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ hoặc trong suốt giai đoạn duy trì điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ nếu có sự tái phát của các triệu chứng bệnh viêm ruột, ví dụ, tái phát sau khi thuyên giảm bệnh. Theo một số phương án, phác đồ pha cảm ứng tạo ra nồng độ thấp nhất trong huyết thanh trung bình là cao hơn, ví dụ, nồng độ ngay trước liều lượng tiếp theo, so với nồng độ huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình được duy trì trong suốt phác đồ duy trì.

Trong giai đoạn duy trì, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được dùng theo cách duy trì đáp ứng đạt được bằng cách điều trị bệnh cảm ứng bằng kháng

thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở mức ổn định. Phác đồ duy trì có thể ngăn ngừa sự quay trở lại của các triệu chứng hoặc sự tái phát bệnh viêm ruột. Phác đồ duy trì có thể mang lại sự thuận tiện cho bệnh nhân, chẳng hạn như, phác đồ duy trì là phác đồ liều đơn giản hoặc yêu cầu việc điều trị ít thường xuyên hơn. Theo một số phương án, phác đồ duy trì có thể bao gồm bước sử dụng kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, ở dạng chế phẩm nêu trong bản mô tả, theo cách định trước được chọn từ nhóm bao gồm liều lượng thấp, sử dụng không thường xuyên, tự sử dụng và kết hợp các cách này.

Theo một phương án, ví dụ, trong pha điều trị cảm ứng, phác đồ liều đề xuất lượng hữu hiệu kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên trong chế phẩm nêu trong bản mô tả dùng để gây ra sự thuyên giảm bệnh viêm ruột ở người bệnh. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ đủ để đạt được khoảng $5\mu\text{g/ml}$ đến $60\mu\text{g/ml}$, khoảng $15\mu\text{g/ml}$ đến $45\mu\text{g/ml}$, khoảng $20\mu\text{g/ml}$ đến $30\mu\text{g/ml}$, hoặc khoảng $25\mu\text{g/ml}$ đến $35\mu\text{g/ml}$ nồng độ trung bình thấp nhất của kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ trong huyết thanh ở cuối pha cảm ứng. Khoảng thời gian của pha cảm ứng có thể là khoảng bốn tuần, khoảng năm tuần, khoảng sáu tuần, khoảng bảy tuần, hoặc khoảng tám tuần điều trị bệnh. Theo một số phương án, phác đồ cảm ứng có thể sử dụng chế độ được chọn từ nhóm bao gồm liều cao, sử dụng thường xuyên, và kết hợp liều cao và sử dụng thường xuyên kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, ở dạng chế phẩm nêu trong bản mô tả. Liều cảm ứng có thể là một, hoặc một số lượng lớn hơn một liều, ví dụ, ít nhất hai liều. Trong toàn bộ pha cảm ứng, liều có thể được dùng một lần mỗi ngày, hai ngày một lần, hai lần một tuần, một lần một tuần, mười ngày một lần, hai tuần một lần hoặc ba tuần một lần. Theo một số phương án, liều cảm ứng được dùng trong vòng hai tuần đầu tiên của quá trình điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha\beta 7$. Theo một phương án, việc phân liều cảm ứng có thể là một lần vào lúc bắt đầu điều trị bệnh (ngày 0) và một lần vào khoảng hai tuần sau khi bắt đầu điều trị bệnh. Theo một phương án khác, pha cảm ứng kéo dài trong sáu tuần. Theo một phương án khác, pha cảm ứng kéo dài trong sáu tuần và một số lượng lớn liều cảm ứng được dùng trong hai tuần đầu tiên.

Theo một số phương án, ví dụ, khi bắt đầu điều trị bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột nghiêm trọng (ví dụ, ở các bệnh nhân thất bại theo điều trị bằng kháng $\text{TNF}\alpha$),

pha cảm ứng cần phải có khoảng thời gian dài hơn so với các bệnh nhân mắc bệnh ở mức độ nhẹ hoặc vừa phải. Theo một số phương án, pha cảm ứng đối với bệnh nhân mắc bệnh nghiêm trọng có thể có khoảng thời gian ít nhất 6 tuần, ít nhất 8 tuần, ít nhất 10 tuần, ít nhất 12 tuần hoặc ít nhất 14 tuần. Theo một phương án, phác đồ liều cảm ứng đối với bệnh nhân mắc bệnh nghiêm trọng có thể bao gồm một liều tại thời điểm tuần 0 (bắt đầu điều trị), một liều tại thời điểm tuần 2 và một liều tại thời điểm tuần 6. Theo một phương án khác, phác đồ liều cảm ứng đối với bệnh nhân mắc bệnh nghiêm trọng có thể bao gồm một liều tại thời điểm tuần 0 (bắt đầu điều trị), một liều tại thời điểm tuần 2, một liều tại thời điểm tuần 6 và một liều tại thời điểm tuần 10.

Theo một phương án, ví dụ, trong giai đoạn duy trì điều trị, phác đồ liều duy trì nồng độ huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình, ví dụ, nồng độ bình ổn ngay trước liều lượng tiếp theo, nằm trong khoảng từ 5 μ g/ml đến 25 μ g/ml, nằm trong khoảng từ 7 μ g/ml đến 20 μ g/ml, nằm trong khoảng từ 5 μ g/ml đến 10 μ g/ml, nằm trong khoảng từ 10 μ g/ml đến 20 μ g/ml, nằm trong khoảng từ 15 μ g/ml đến 25 μ g/ml hoặc từ khoảng 9 μ g/ml đến 13 μ g/ml kháng thể kháng $\alpha\beta 7$. Theo một phương án khác, phác đồ liều ví dụ, trong giai đoạn duy trì điều trị bệnh, duy trì nồng độ huyết thanh ở trạng thái ổn định trung bình bằng khoảng 20 μ g/ml đến 30 μ g/ml, khoảng 20 μ g/ml đến 55 μ g/ml, khoảng 30 μ g/ml đến 45 μ g/ml, khoảng 45 μ g/ml đến 55 μ g/ml hoặc khoảng 35 μ g/ml đến 40 μ g/ml kháng thể kháng $\alpha\beta 7$.

Liều có thể được dùng mỗi tuần một lần, 2 tuần một lần, 3 tuần một lần, 4 tuần một lần, 6 tuần một lần, 8 tuần một lần hoặc 10 tuần một lần. Liều lượng cao hơn hoặc thường xuyên hơn, ví dụ, mỗi tuần một lần, 2 tuần một lần, 3 tuần một lần hoặc 4 tuần một lần có thể là hữu hiệu để làm thuyên giảm bệnh hoạt động hoặc để điều trị cho bệnh nhân, ví dụ, để gây dung nạp đối với kháng thể kháng $\alpha\beta 7$. Liều ít thường xuyên, ví dụ, 4 tuần một lần, 5 tuần một lần, 6 tuần một lần, 8 tuần một lần hoặc 10 tuần một lần, có thể là hữu hiệu để điều trị phòng ngừa, ví dụ, để duy trì sự thuyên giảm của bệnh nhân mắc bệnh mạn tính. Theo một khía cạnh, phác đồ điều trị là điều trị bệnh ở ngày 0, khoảng tuần thứ 2, khoảng tuần thứ 6 và sau đó cứ 4 hoặc 8 tuần một lần. Theo một phương án, phác đồ duy trì là 8 tuần một liều. Theo một phương án, trong đó bệnh nhân đang được áp dụng phác đồ duy trì 8 tuần một lần thấy xuất hiện

trở lại một hoặc nhiều triệu chứng bệnh, ví dụ, bị tái phát, thì tần xuất liều có thể được tăng lên, ví dụ, thành 4 tuần một lần.

Liều có thể được dùng cho bệnh nhân trong khoảng 20 phút, khoảng 25 phút, khoảng 30 phút, khoảng 35 phút, hoặc khoảng 40 phút.

Phác đồ liều có thể được tối ưu hóa để gây ra đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột. Theo một số phương án, phác đồ liều không làm thay đổi tỷ lệ giữa CD4 và CD8 trong dịch não tủy của các bệnh nhân tham gia điều trị.

Theo một số khía cạnh, thuyên giảm lâm sàng lâu bền, ví dụ, thuyên giảm lâm sàng được duy trì liên tục qua ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn lần thăm khám đồng thời với sự chăm sóc của bác sỹ điều trị trong vòng sáu tháng hoặc một năm sau khi bắt đầu điều trị bệnh, có thể đạt được bằng phác đồ liều đã được tối ưu hóa.

Theo một số khía cạnh, đáp ứng lâm sàng bền, ví dụ, đáp ứng lâm sàng được duy trì liên tục trong ít nhất 6 tháng, ít nhất 9 tháng, ít nhất một năm, sau khi bắt đầu điều trị, có thể đạt được bằng phác đồ liều đã được tối ưu hóa.

Theo một phương án, phác đồ liều bao gồm liều ban đầu 300mg, liều thứ hai tiếp theo 300mg khoảng hai tuần sau khi dùng liều ban đầu, liều thứ ba tiếp theo 300mg tại thời điểm khoảng sáu tuần sau khi dùng liều ban đầu, sau đó là liều thứ tư và các liều tiếp theo 300mg bốn tuần một lần hoặc tám tuần một lần sau khi dùng liều thứ ba tiếp theo.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị, liều hoặc phác đồ liều làm giảm khả năng bệnh nhân sẽ phát triển đáp ứng HAHA đối với kháng thể kháng $\alpha\beta 7$. Sự phát triển của HAHA, ví dụ, như được đo bởi các kháng thể phản ứng với kháng thể kháng $\alpha\beta 7$, có thể làm tăng mức độ thanh thải của kháng thể kháng $\alpha\beta 7$, ví dụ, làm giảm nồng độ của kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ trong huyết thanh, ví dụ, làm giảm số lượng kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ liên kết với integrin $\alpha\beta 7$, vì vậy khiến cho việc điều trị bệnh kém hiệu quả. Theo một số phương án, để ngăn ngừa HAHA, bệnh nhân có thể được điều trị bằng phác đồ cảm ứng, sau đó là phác đồ duy trì. Theo một số phương án, không có thời gian nghỉ giữa phác đồ cảm ứng và phác đồ duy trì. Theo một số phương án, phác đồ cảm ứng bao gồm việc dùng một lượng lớn các liều kháng thể kháng $\alpha\beta 7$

cho bệnh nhân. Để ngăn ngừa HAHA, bệnh nhân có thể được điều trị bằng liều ban đầu cao, ví dụ, ít nhất 1,5mg/kg, ít nhất 2mg/kg, ít nhất 2,5mg/kg, ít nhất 3mg/kg, ít nhất 5mg/kg, ít nhất 8mg/kg, ít nhất 10mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 2mg/kg đến 6mg/kg, hoặc sử dụng thường xuyên ban đầu, ví dụ, khoảng mỗi tuần một lần, khoảng hai tuần một lần hoặc khoảng ba tuần một lần, liều tiêu chuẩn khi bắt đầu điều trị bệnh bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh duy trì ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% bệnh nhân âm tính HAHA. Theo các phương án khác, phương pháp điều trị bệnh duy trì các bệnh nhân âm tính HAHA trong ít nhất 6 tuần, ít nhất 10 tuần ít nhất 15 tuần, ít nhất sáu tháng, ít nhất 1 năm, ít nhất 2 năm, hoặc trong khoảng thời gian điều trị. Theo một số phương án, các bệnh nhân, hoặc ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50% hoặc ít nhất 60% bệnh nhân phát triển HAHA duy trì hiệu giá thấp, ví dụ, ≤ 125 , kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một phương án, phương pháp điều trị duy trì ít nhất 70% bệnh nhân âm tính HAHA trong ít nhất 12 tuần sau khi bắt đầu điều trị bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

Chế phẩm có thể được dùng cho một cá thể (ví dụ như người) riêng rẽ hoặc cùng với một tác nhân khác. Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng trước, dùng cùng hoặc dùng sau tác nhân khác. Theo một phương án, nhiều hơn một chế phẩm ức chế integrin $\alpha 4\beta 7$ gắn kết vào các phối tử của nó được dùng. Theo phương án này, tác nhân, ví dụ, kháng thể đơn dòng, như kháng thể đơn dòng kháng MAdCAM (ví dụ, kháng MAdCAM-1) hoặc kháng VCAM-1 có thể được dùng. Theo một phương án khác, tác nhân khác ức chế việc gắn kết của bạch cầu vào nội mô phối tử theo con đường khác với con đường $\alpha 4\beta 7$. Tác nhân như vậy có thể ức chế việc gắn kết, ví dụ như của - các tế bào lympho biểu hiện thụ thể 9 (CCR9) chemokin (kiểu C-C) vào chemokin (TECK hoặc CCL25) được biểu hiện ở tuyến ức hoặc một tác nhân ngăn cản việc gắn kết của LFA-1 vào phân tử bám dính gian bào (ICAM). Ví dụ, kháng thể kháng TECK hoặc kháng CCR9 hoặc chất ức chế CCR9 phân tử nhỏ, như các chất ức chế được bộc lộ trong Công bố đơn PCT WO03/099773 hoặc WO04/046092, hoặc kháng thể kháng ICAM-1 hoặc oligonucleotit ngăn ngừa sự biểu hiện của ICAM, được dùng thêm vào chế phẩm theo sáng chế. Theo một phương án khác nữa, một hoạt chất khác (ví dụ, hợp chất chống viêm, như sulfasalazin, azathioprin, 6-mercaptopurin, chất

chống viêm chứa axit 5-aminosalixylic, hợp chất chống viêm phi steroid khác, hợp chất chống viêm steroid, hoặc kháng sinh thường được dùng để kiểm soát IBD (ví dụ như ciprofloxacin, metronidazol), hoặc một tác nhân sinh học khác (ví dụ như chất đối kháng TNF alpha) có thể được dùng cùng với chế phẩm theo sáng chế.

Theo một phương án, liều lượng của thuốc được dùng cùng có thể giảm theo thời gian trong quá trình điều trị bằng chế phẩm chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Ví dụ, bệnh nhân được điều trị bằng steroid (ví dụ như prednison, prednisolon) lúc bắt đầu, hoặc trước khi, điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ sẽ tham gia phác đồ giảm liều steroid bắt đầu ngay từ 6 tuần điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Liều steroid sẽ được giảm đi khoảng 25% trong vòng 4 tuần đến 8 tuần từ khi bắt đầu giảm dần, giảm đi khoảng 50% sau khoảng 8 tuần đến 12 tuần và 75% sau khoảng 12 tuần đến 16 tuần của giai đoạn giảm dần trong quá trình điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$. Theo một khía cạnh, sau khoảng 16 tuần đến 24 tuần điều trị bằng kháng $\alpha 4\beta 7$ chế phẩm kháng thể, liều steroid có thể được ngừng. Theo một ví dụ khác, bệnh nhân được điều trị bằng hợp chất chống viêm, như 6-mercaptopurin vào lúc bắt đầu, hoặc trước khi, điều trị bằng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ sẽ tham gia phác đồ giảm liều hợp chất chống viêm tương tự với phác đồ giảm dần đối với liều steroid như đã nêu trên.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân dùng chế phẩm theo sáng chế với lượng hữu hiệu. Nếu chế phẩm ở dạng chất rắn, ví dụ, trạng thái khô, quy trình sử dụng có thể bao gồm bước chuyển chế phẩm sang trạng thái lỏng. Theo một khía cạnh, chế phẩm khô có thể được hoàn nguyên, ví dụ, bởi chất lỏng như đã nêu trên, dùng để tiêm, ví dụ như trong tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc tiêm dưới da. Theo khía cạnh khác, chế phẩm rắn hoặc khô có thể được dùng khu trú, ví dụ, miếng dán, kem, sol khí hoặc thuốc đạn.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh liên quan đến hiện tượng thâm nhập bạch cầu của mô biểu hiện phân tử MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1). Phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo sáng chế. Theo một phương án, bệnh này là bệnh gây ra do vật chủ kháng lại mảnh ghép. Theo một số phương án, bệnh này là bệnh liên quan đến

hiện tượng thâm nhập bạch cầu của mô do việc gắn kết của bạch cầu biểu hiện integrin $\alpha 4\beta 7$ vào nội mô có liên quan đến ruột biểu hiện phân tử MAdCAM (ví dụ, MAdCAM-1). Theo các phương án khác, bệnh là bệnh viêm dạ dày (ví dụ, bệnh viêm dạ dày ưa eosin hoặc viêm dạ dày tự miễn), bệnh viêm tụy, hoặc bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin. Theo các phương án khác nữa, bệnh này là bệnh viêm túi mật, bệnh viêm đường mật, hoặc bệnh viêm quanh ống mật.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh viêm ruột ở bệnh nhân. Theo một phương án, phương pháp bao gồm việc cho bệnh nhân dùng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ theo sáng chế với lượng hữu hiệu. Theo một số phương án, bệnh viêm ruột là bệnh viêm loét đại tràng hoặc bệnh Crohn. Theo các phương án khác, bệnh viêm ruột là bệnh ỉa chảy mỡ, bệnh đường ruột liên quan đến bệnh khớp nhiễm khuẩn huyết thanh âm tính, bệnh viêm ruột kết kính hiển vi hoặc bệnh viêm ruột kết collagen, viêm dạ dày ruột (ví dụ, bệnh viêm dạ dày ưa eosin), hoặc bệnh viêm nang cùng của ruột hồi.

Theo một số phương án, việc điều trị bệnh bằng kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ không làm thay đổi tỷ lệ giữa các tế bào lympho CD4:CD8. Tỷ lệ CD4:CD8 có thể được đo trong máu, dịch hút hạch bạch huyết, và dịch não-tủy (cerebro-spinal fluid - CSF). Tỷ lệ tế bào lympho CD4+:CD8+ ở CSF ở các cá thể khỏe mạnh thường lớn hơn hoặc bằng khoảng 1. (Svenningsson et al., J. Neuroimmunol. 1995;63:39-46; Svenningsson et al., Ann Neurol. 1993; 34:155-161). Chất điều biến miễn dịch có thể thay đổi tỷ lệ CD4:CD8 đến nhỏ hơn 1.

Sản phẩm

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến sản phẩm chứa được phẩm theo sáng chế và hướng dẫn sử dụng nó. Sản phẩm bao gồm đồ chứa. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, ống (ví dụ, lọ hai ngăn, lọ chế phẩm lỏng cùng với hoặc không cùng với kim tiêm, lọ chế phẩm rắn cùng với hoặc không cùng với lọ hoàn nguyên chất lỏng cùng với hoặc không cùng với kim tiêm), xyranh (như xyranh hai ngăn, xyranh nạp sẵn) và ống nghiệm. Đồ chứa có thể được tạo ra từ nhiều nguyên liệu khác nhau như thủy tinh, kim loại hoặc chất dẻo. Đồ chứa mang chế phẩm và nhãn ở trên hoặc gắn liền với đồ chứa có thể chỉ ra các hướng dẫn sử dụng. Theo một phương án khác, chế

phẩm có thể được bào chế để tự dùng và/hoặc chứa các hướng dẫn để tự dùng. Theo một khía cạnh, đồ chứa mang chế phẩm có thể là lọ dùng một lần. Theo khía cạnh khác, đồ chứa mang chế phẩm có thể là lọ dùng nhiều lần, cho phép dùng chế phẩm lặp lại (ví dụ, dùng từ 2 lần đến 6 lần), ví dụ, bằng cách sử dụng nhiều hơn một phần chế phẩm đã được hoàn nguyên. Sản phẩm có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác mong muốn trên quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, các bộ lọc, kim, xyranh và tờ roi với hướng dẫn sử dụng khác như được lưu ý ở phần trước đây.

Đánh giá lâm sàng và phân tích chất lượng

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp xác định liệu một dược phẩm có đạt tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm hay không. Phương pháp này có thể bao gồm bước đánh giá dược phẩm đã được đông khô (ví dụ, kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người) bao gồm việc kiểm tra chế phẩm để đánh giá về bên ngoài, xác định thời gian hoàn nguyên, xác định hàm lượng ẩm của chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp, đo mức kết tụ trong chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp, đo mức độ phân đoạn, đo mức độ oxy hoá /khử amit, và tùy ý đánh giá hoạt tính sinh học và hiệu lực, trong đó việc đạt tiêu chuẩn định trước cho thấy sản phẩm được chỉ định để dùng trong lâm sàng.

Mức chất lượng chấp nhận được bao gồm độ ẩm $\leq 5,0\%$, thời gian hoàn nguyên ≤ 40 phút, độ pH của chất lỏng đã được hoàn nguyên là $6,3 \pm 0,3$, nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 54,0mg/ml đến 66,0mg/ml, dạng đồng chức năng chính $\geq 55,0\%$ theo CEX, monome $\geq 96,0\%$ theo SEC, (kết tụ) phân tử lượng cao $\leq 2,5\%$, chuỗi H+L $\geq 90\%$ theo SDS-PAGE, mức bám dính tiêu chuẩn tham chiếu nằm trong khoảng từ 60% đến 140%.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn dựa trên phần ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả các tài liệu và các trích dẫn patent được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Phát triển quy trình bào chế chế phẩm

A. Dung dịch kháng thể kháng- $\alpha 4\beta 7$

Các chai chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ở nồng độ cao và đã được làm lạnh (vedolizumab, 50mM histidin, 125mM arginin, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3) được làm tan giá ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian từ 16 giờ đến 24 giờ. Các chai đã làm tan giá được gom lại vào thùng trộn làm bằng thép không gỉ và được trộn. Tiếp theo, chế phẩm được pha loãng bằng dung dịch đệm pha loãng A (50mM histidin, 125mM arginin, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3) đến nồng độ vedolizumab là 80mg/ml và được trộn. Tiếp theo, sucroza được thêm vào bằng cách pha loãng chế phẩm bằng dung dịch đệm pha loãng B chứa sucroza (50mM histidin, 125mM arginin, 40% sucroza, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3). Bước này pha loãng chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ đến chế phẩm lỏng chứa 60mg/ml vedolizumab, 50mM histidin, 125mM arginin, 10% sucroza, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3.

B. Làm đông khô

Chế phẩm lỏng chứa kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ ở nồng độ 60mg/ml trong 50mM histidin, 125mM arginin, 0,06% polysorbat 80, 10% sucroza, ở độ pH 6,3 được nạp vào lọ thủy tinh có dung tích 20ml chứa 5,52ml mỗi lọ và cứ chặn được đặt ở vị trí sấy khô ở nhiệt độ thấp. Các lọ được đặt lên kệ đặt ở khoảng 20°C trong thiết bị làm đông khô. Sau khi đưa tất cả các lọ vào và đóng cửa, nhiệt độ kệ được hạ thấp để làm lạnh dung dịch, khoảng -45°C. Sau 3 giờ ở nhiệt độ này, nhiệt độ của kệ được tăng đến -20°C để tới. Sau khi tới trong bốn giờ, nhiệt độ của kệ được hạ thấp để làm lạnh lại dung dịch đến -45°C. Sau khi làm cho lọ cân bằng ở nhiệt độ này, không khí được rút ra khỏi khoang. Khi áp suất là 150mTorr (19,99Pa), nhiệt độ của kệ được tăng dần đến nhiệt độ làm khô sơ bộ, khoảng -24°C. Bước làm khô sơ bộ được thực hiện cho đến khi toàn bộ tinh thể băng thăng hoa từ lọ. Sau đó, nhiệt độ của kệ được tăng lên đến 27°C để thực hiện bước làm khô phụ trong 16 giờ, cho đến khi độ ẩm nhỏ hơn khoảng 2,5% độ ẩm của chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp. Khi bước làm khô phụ hoàn tất, khí nitơ được nạp lại vào khoang cho đến khi đạt được áp suất môi trường. Các lọ được đẩy nút và được lấy ra khỏi hệ thống làm lạnh khô.

C. Bảo quản và sử dụng kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ đã được đông khô

Lọ chứa kháng thể kháng $\alpha\beta 7$ đã được đông khô được bảo quản ở -70°C , -20°C , 2°C đến 8°C hoặc 25°C trong các khoảng thời gian mong muốn. Khi đã sẵn sàng để sử dụng, lọ được làm cân bằng với nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, toàn bộ hỗn hợp trong lọ được hoàn nguyên bằng xyranh chứa nước dùng để tiêm (water for injection - “WFI”) bằng cách sử dụng kim tiêm cỡ 21 G. Lượng WFI được xác định sao cho thể tích cuối cùng của dung dịch kháng thể đã được hoàn nguyên bằng với thể tích của dung dịch trước khi được sấy khô ở nhiệt độ thấp. Đối với thể tích trước khi sấy khô ở nhiệt độ thấp là 5,52ml, 4,8ml WFI được bổ sung vào. Lọ được xoay nhẹ và sau đó được giữ trong khoảng thời gian 10 phút đến 30 phút để cho phép chế phẩm hoàn nguyên, sau đó dung dịch kháng thể được lấy ra bằng cách sử dụng xyranh và được bổ sung vào túi IV để truyền qua đường tĩnh mạch (IV) cho bệnh nhân.

Ví dụ 1

Dữ liệu so sánh đối với hàm lượng % đường và axit amin khác nhau trong chế phẩm đã được làm khô ở nhiệt độ thấp.

Tiến hành thử nghiệm để xem xét ảnh hưởng của việc thay đổi tỷ lệ mol giữa đường (sucroza và manitol) và protein, tỷ lệ mol giữa arginin và protein, và lượng phân tử gam chất đệm histidin. Đã biết là histidin và arginin không kết tinh trong suốt quy trình sấy khô ở nhiệt độ thấp, khiến cho chúng trở thành các chất bảo vệ kết tinh hoặc chất bảo vệ lạnh đông tiềm năng. 1,5ml chế phẩm được nạp vào lọ có dung tích 5ml đã được đông khô bằng bước làm khô sơ bộ ở -30°C , 150mT và làm khô phụ ở 20°C , 150mT. Độ ổn định của chế phẩm lạnh khô được hoàn nguyên thành 1,5ml sau khi đặt trong các điều kiện bảo quản khác nhau được thể hiện trong các Bảng 1 đến 3 (tổng cộng là 60mg/ml thu được từ hai thử nghiệm). Hình 6A thể hiện các mô hình dự đoán về sự thay đổi tỷ lệ phần trăm monome, phần trăm kết tụ, và phần trăm dạng đồng chức năng chính khi được bảo quản ở 40°C khi thay đổi độ pH và tỷ lệ mol giữa đường và arginin. Độ ổn định của chế phẩm tốt nhất ở độ pH thấp và tỷ lệ mol giữa (đường + arginin) và protein là cao. Ở lượng phân tử gam histidin được kiểm tra, histidin không ảnh hưởng đến độ ổn định của chế phẩm. Tất cả các chế phẩm có độ ẩm nằm trong khoảng từ 1% đến 2% trong suốt quá trình bảo quản.

Bảng 1: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm monome khi bảo quản ở 5°C, 25°C/độ ẩm tương đối 60%, và 40°C/độ ẩm tương đối 75% trong 3 tháng. Tỷ lệ phần trăm monome được xác định bằng cách áp dụng sắc ký loại từ theo kích thước (SEC).

Chế phẩm 60mg/ml vedolizumab +	% Monome theo SEC			
	t=0	5°C 3 tháng	25°C độ ẩm tương đối 60% 3 tháng	40°C độ ẩm tương đối 75% 3 tháng
25mM histidin, 75mM arginin, 2% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,3	98,1	98,1	97,8	96,5
25mM histidin, 75mM arginin, 4% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,9	98,0	98,2	98,0	97,5
50mM histidin, 125mM arginin, 2% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,7	98,0	98,3	98,1	97,4
50mM histidin, 125mM arginin, 4% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,9	98,0	98,3	98,1	97,4
50mM histidin, 125mM arginin, 6% sucroza, 1,5% manitol, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3	98,7	98,4	98,4	98,1
50mM histidin, 125mM arginin, 9% sucroza, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3	98,7	98,3	98,1	98,3

Bảng 2: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm kết tụ khi bảo quản ở 5°C, 25°C/độ ẩm tương đối 60%, và 40°C/độ ẩm tương đối 75% trong 3 tháng. Tỷ lệ phần trăm monome được xác định bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC).

Chế phẩm 60mg/ml vedolizumab +	% kết tụ theo SEC			
	t=0	5°C 3 tháng	25°C độ ẩm tương đối 60% 3 tháng	40°C độ ẩm tương đối 75% 3 tháng
25mM histidin, 75mM arginin, 2% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,3	0,42	0,53	0,89	1,99
25mM histidin, 75mM arginin, 4% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,9	0,41	0,51	0,62	1,15
50mM histidin, 125mM arginin, 2% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,7	0,42	0,47	0,60	1,23
50mM histidin, 125mM arginin, 4% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,9	0,36	0,44	0,52	0,82
50mM histidin, 125mM arginin, 6% sucroza, 1,5% manitol, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3	0,53	0,49	0,51	0,56
50mM histidin, 125mM arginin, 9% sucroza, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3	0,51	0,51	0,59	0,56

Bảng 3: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng chính khi được bảo quản ở 5°C, 25°C/độ ẩm tương đối 60%, và 40°C/độ ẩm tương đối 75% trong 3 tháng. Dạng đồng chức năng chính được đo bằng cách áp dụng sắc ký trao đổi cation (CEX).

Công thức 60mg/ml vedolizumab +	% dạng đồng chức năng chính theo CEX			
	t=0	5°C 3 tháng	25°C độ ẩm tương đối 60% 3 tháng	40°C độ ẩm tương đối 75% 3 tháng
25mM histidin, 75mM arginin, 2% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,3	70,5	68,8	67,4	66,3
25mM histidin, 75mM arginin, 4% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,9	70,8	98,9	68,0	67,7
50mM histidin, 125mM arginin, 2% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,7	70,5	68,9	67,8	66,5
50mM histidin, 125mM arginin, 4% sucroza, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,9	70,6	68,9	68,0	67,4
50mM histidin, 125mM arginin, 6% sucroza, 1,5% manitol, 0,06% polysorbat 80, pH 6,3	69,6	69,5	69,3	67,4
50mM histidin, 125mM arginin, 9% sucroza, 0,06% polysorbat 80, pH 6,3	69,5	69,3	69,2	68,1

Hình 6A là các mô hình dự đoán dựa trên phân tích thống kê dữ liệu ở 40°C từ các Bảng 1 đến 3. Mô hình về sự thay đổi tỷ lệ phần trăm monome mỗi tháng ở 40°C theo phân tích SEC là $-3,10 + (0,386) \cdot \text{độ pH} + 0,000516 \cdot ((\text{số mol đường} + \text{số mol arginin}) / \text{số mol protein})$. Mô hình về sự thay đổi tỷ lệ phần trăm kết tụ mỗi tháng ở 40°C theo phân tích SEC là $2,43 - (0,263) \cdot \text{độ pH} - 0,000787 \cdot ((\text{số mol đường} + \text{số mol arginin}) / \text{số mol protein})$. Mô hình về sự thay đổi tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng chính mỗi tháng ở 40°C bằng cách phân tích CEX là $-2,54 + (0,109) \cdot \text{độ pH} - 0,00130 \cdot ((\text{số mol đường} + \text{số mol arginin}) / \text{số mol protein})$. Dòng ở giữa cho thấy kết

quả của các mô hình dự đoán và dòng ở ngoài cùng cho thấy giới hạn độ tin cậy 95% đối với các mô hình dự đoán.

Hình 6B là mô hình thay thế dựa trên phân tích thống kê dữ liệu ở 40°C từ các bảng 1 đến 3 khi các hệ số đầu vào là độ pH, tỷ lệ mol đường:protein, và tỷ lệ mol arginin:protein. Mô hình về sự thay đổi tỷ lệ phần trăm monome mỗi tháng ở 40°C theo phân tích SEC là $-3,02 + (0,370) \cdot \text{độ pH} + 0,000482 \cdot ((\text{số mol đường})/(\text{số mol protein})) + 0,000657 \cdot ((\text{số mol arginin})/(\text{số mol protein}))$. Mô hình về sự thay đổi tỷ lệ phần trăm kết tụ mỗi tháng ở 40°C theo phân tích SEC là $2,35 - (0,244) \cdot \text{độ pH} - 0,000727 \cdot ((\text{số mol đường})/(\text{số mol protein})) - 0,00102 \cdot ((\text{số mol arginin})/(\text{số mol protein}))$. Mô hình về sự thay đổi tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng chính mỗi tháng ở 40°C bằng cách phân tích CEX là $-2,92 + (0,210) \cdot \text{độ pH} + 0,00164 \cdot ((\text{số mol đường})/(\text{số mol protein})) - 0,000220 \cdot ((\text{số mol arginin})/(\text{số mol protein}))$. Dòng ở giữa là kết quả của các mô hình dự đoán và dòng ở ngoài cùng là giới hạn độ tin cậy 95% đối với các mô hình dự đoán này.

Ví dụ 2

Dữ liệu độ ổn định

Ba mẻ chế phẩm ổn định ban đầu (mẻ A, B, và C) được thử nghiệm về độ ổn định sau khi bảo quản ở điều kiện bảo quản quy định (5°C và 25°C/độ ẩm tương đối 60% trong thời gian lên tới 24 tháng). Cả ba mẻ chứa cùng chế phẩm lỏng đã được đông khô: 60mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, 50mM histidin, 125mM arginin, 10% sucroza, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3. Đối với mẻ A, 3,5ml dung dịch được nạp vào lọ loại dung tích 20ml và được đông khô, đối với mẻ B và C, 5,52ml dung dịch được nạp vào lọ loại dung tích 20ml và được đông khô.

Trong một nghiên cứu khác, dược phẩm đơn nhất chứa 60mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, 50mM histidin, 125mM arginin, 10% sucroza, 0,06% polysorbat 80, độ pH 6,3 được đông khô trong hai thể tích, lần lượt 3,5ml và 9,5ml, để thu được các mẻ mẫu R và S, độ ổn định được phân tích sau 38 tháng. Các mẫu trắng là NT (không được kiểm tra).

Dữ liệu (các bảng 4 đến 19) cho thấy rằng chế phẩm kháng thể vẫn ổn định khi được bảo quản trong khoảng thời gian lên tới 38 tháng ở 5°C và lên tới 30 tháng ở

25°C/độ ẩm tương đối 60%. Tất cả các thuộc tính của sản phẩm vẫn được duy trì trong giới hạn định rõ qua thời điểm 38 tháng.

Bảng 4: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm monome theo SEC khi được bảo quản ở 5°C.

Thời gian (tháng)	Mê A	Mê B	Mê C	Mê R	Mê S
0	99,8	99,8	99,8	98,9	98,8
1	99,8	99,1	99,2	98,8	99,2
3	99,8	99,1	99,1	98,8	98,8
6	99,8	99,8	99,8	98,9	99,0
9	99,1	99,2	99,2	99,2	99,1
12	99,4	99,0	99,0	98,8	98,9
15	99,4	99,1	99,1		
18	99,5	99,4	99,4	98,9	98,9
24	99,4	99,2	99,2	99,0	99,0
30		99,2	99,2		
38				99,3	99,3

Bảng 5: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm kết tụ theo SEC khi được bảo quản ở 5°C.

Thời gian (tháng)	Mê A	Mê B	Mê C	Mê R	Mê S
0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
9	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
12	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
15	0,2	0,2	0,2		
18	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
24	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
30		0,2	0,2		
38				0,2	0,2

Bảng 6: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng chính theo CEX khi được bảo quản ở 5°C.

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	68,6	69,9	69,5	71,7	71,6
1	67,5	68,9	68,8	71,2	72,0
3	68,7	68,8	68,7	70,4	70,3
6	67,7	68,2	68,2	71,9	71,9
9	70,0	68,3	67,8	69,2	69,7
12	67,8	68,3	68,1	70,8	70,9
15	66,9	67,5	67,5		
18	67,4	67,0	66,7	71,0	70,8
24	68,1	69,6	69,1	71,3	70,9
30		68,5	68,6		
38				73,6	73,1

Bảng 7: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng có tính axit theo CEX khi được bảo quản ở 5°C.

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	22,8	20,8	21,4	20,3	20,6
1	21,9	21,7	22,3	21,6	20,3
3	21,7	22,2	22,8	22,0	22,0
6	22,9	23,1	23,6	21,1	21,4
9	19,8	22,2	22,9	21,8	21,8
12	22,9	21,3	22,1	21,2	21,2
15	22,7	22,3	22,8		
18	22,8	22,3	22,6	21,1	21,5
24	21,7	22,1	22,9	20,6	20,7
30		22,8	23,2		
38				18,9	19,1

Bảng 8: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng có kiểm tính theo CEX khi được bảo quản ở 5°C.

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	8,5	9,3	9,1	8,1	7,8
1	10,7	9,4	8,9	7,3	7,7
3	9,7	9,0	8,5	7,6	7,8
6	9,5	8,7	8,2	7,0	6,7
9	10,2	9,6	9,3	9,0	8,4
12	9,3	10,3	9,9	8,0	7,9
15	10,4	10,1	9,7		
18	9,8	10,7	10,7	7,9	7,7
24	10,2	8,3	8,1	8,1	8,3
30		8,7	8,2		
38				7,5	7,7

Bảng 9: Thay đổi về tỷ lệ % (H+L) theo phân tích SDS PAGE trong điều kiện khử khi được bảo quản ở 5°C.

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	98	98	98	96	96
1	98	94	98	98	98
3	98	98	98	98	98
6	98	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	97	98	98
15	97	98	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	98	98	99	99
30		97	97		
38				99	99

Bảng 10: Thay đổi về hiệu quả gắn kết khi được bảo quản ở 5°C.

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	107	106	105	93	102
1	106	106	103	103	111
3	101	109	108	91	98
6	97	106	105	114	121
9	100	93	88	102	102
12	103	101	87	119	116
15	105	90	94		
18	86	101	96	95	104
24	92	82	95	81	101
30		87	94		
38				89	91

Bảng 11: Thay đổi về độ ẩm % theo KF khi được bảo quản ở 5°C

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	0,5	0,6	0,6	0,8	1,0
1	0,5	0,4	0,6		
3	0,5	0,6	0,6		
6	0,6	0,7	0,5	0,8	1,3
12	0,6	0,6	0,7	0,9	0,9
24	0,5	0,7	0,7	0,9	0,9
30		0,7	0,7		

Bảng 12: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm monome theo SEC khi được bảo quản ở 25°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	99,8	99,8	99,8	98,9	98,8
1	99,8	99,1	99,2	98,7	98,7
3	99,8	99,0	99,0	98,6	98,5
6	99,8	99,7	99,7	98,9	98,9
9	99,0	99,1	99,1	99,1	99,1
12	99,3	98,9	98,9	98,8	98,9
15	99,3	99,0	99,0		
18	99,4	99,3	99,3	98,7	98,9
24	99,2	99,1	99,1	98,9	98,9
30		99,0	99,0		

Bảng 13: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm kết tụ theo SEC khi được bảo quản ở 25°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
6	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
9	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
12	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
15	0,3	0,3	0,3		
18	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
30		0,4	0,3		

Bảng 14: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng chính theo CEX khi được bảo quản ở 25°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	68,6	69,9	69,5	71,7	71,6
1	67,2	68,4	68,6	71,2	71,0
3	68,1	68,6	68,2	70,3	70,3
6	65,9	67,8	67,8	71,5	71,1
9	69,3	67,5	66,3	68,6	69,0
12	66,7	67,5	67,4	70,1	70,2
15	66,2	66,6	66,8		
18	66,1	65,8	64,9	70,0	70,3
24	66,7	68,4	68,2	70,6	70,1
30		67,2	67,2		

Bảng 15: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng có tính axit theo CEX khi được bảo quản ở 25°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	22,8	20,8	21,4	20,3	20,6
1	21,9	21,8	22,2	21,4	21,6
3	21,7	22,2	22,8	21,8	22,0
6	22,6	22,9	23,5	21,1	21,4
9	19,9	22,1	23,1	21,8	21,8
12	23,0	21,4	22,0	21,3	21,3
15	22,5	22,1	22,7		
18	22,6	22,1	22,6	21,3	21,5
24	21,7	21,9	22,6	20,7	20,7
30		22,7	23,2		

Bảng 16: Thay đổi về tỷ lệ phần trăm dạng đồng chức năng có kiểm tính theo CEX khi được bảo quản ở 25°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	8,5	9,3	9,1	8,1	7,8
1	10,8	9,8	9,2	7,4	7,3
3	10,3	9,3	9,0	7,8	7,7
6	11,5	9,3	8,7	7,4	7,5
9	10,8	10,4	10,6	9,7	9,3
12	10,3	11,1	10,7	8,7	8,5
15	11,3	11,2	10,6		
18	11,2	12,1	12,5	8,7	8,2
24	11,6	9,7	9,1	8,7	9,2
30		10,2	9,6		

Bảng 17: Thay đổi về tỷ lệ % (H+L) theo SDS PAGE trong điều kiện khử khi được bảo quản ở 25°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	98	98	98	96	96
1	98	98	98	98	98
3	97	98	98	98	98
6	97	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	96	98	98
15	97	97	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	97	98	99	99
30		97	98		

Bảng 18: Thay đổi về hiệu quả gắn kết khi được bảo quản ở 25°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	107	106	105	93	102
1	115	103	109		
3	92	113	100	96	94
6	109	89	97	101	114
9	97	89	85	97	102
12	83	91	123		
15	96	91	96		
18	106	123	87	92	102
24	103	82	90	98	94
30		84	114		

Bảng 19: Thay đổi về tỷ lệ % độ ẩm theo KF khi được bảo quản ở 25°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian (tháng)	Mẻ A	Mẻ B	Mẻ C	Mẻ R	Mẻ S
0	0,5	0,6	0,6	0,8	1,0
1	0,5	0,6	0,5		
3	0,5	0,7	0,6		
6	0,5	0,7	0,7	1,3	1,2
12	0,6	0,8	0,6	0,9	1,0
24	0,7	0,8	0,6	1,1	1,0
30		0,8	0,7		

Sắc ký trao đổi cation (CEX)

Gradient phosphat/natri clorua trên cột trao đổi cation yếu được sử dụng trong hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao để phân tách các loại chế phẩm kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ mang điện tích và xác định thành phần điện tích của các loại kháng thể. Các dạng đồng

chức năng có tính axit rửa giải ra trước dạng đồng chức năng chính và các dạng đồng chức năng có kiềm tính rửa giải ra sau dạng đồng chức năng chính.

Dữ liệu về độ ổn định đối với tất cả các mẻ vedolizumab được tạo ra bằng cách áp dụng thử nghiệm CEX nêu trong các bảng 3, 6 đến 8 và 14 đến 16. Các bảng này cho thấy rằng ở các điều kiện bảo quản như vậy, tỷ lệ % dạng đồng chức năng chính không có xu hướng giảm xuống dưới 55,0%.

Sắc ký loại trừ theo kích thước (Size Exclusion Chromatography - SEC)

SEC được thực hiện bằng cách sử dụng cột SEC dùng cho phân tích (do Tosoh Bioscience, LLC, King of Prussia, PA cung cấp). Pha động là dung dịch muối đệm phosphat và độ hấp thụ được theo dõi ở 280nm.

Dữ liệu độ ổn định được tạo ra bằng cách áp dụng thử nghiệm SEC được nêu trong các Bảng 1, 2, 4, 5, 12 và 13. Các bảng này cho thấy rằng không điều kiện nào trong số các điều kiện bảo quản đã liệt kê làm giảm tỷ lệ % monome xuống dưới 96,0%. Tương tự, tỷ lệ % kết tụ vẫn duy trì $\leq 2,5\%$ ở tất cả các mẻ trong các điều kiện bảo quản đã liệt kê.

Thử nghiệm SDS-PAGE

SDS-PAGE được thực hiện bằng cách sử dụng gel Tris-Glyxin của Invitrogen (Carlsbad, CA), 4% đến 20% trong điều kiện khử và 4% đến 12% trong điều kiện không khử. Mẫu chế phẩm kháng thể đã hoàn nguyên được pha loãng trong dung dịch đệm chế phẩm lỏng, sau đó được pha loãng từ một đến hai lần bằng dung dịch đệm mẫu Tris-Glyxin SDS (2X, Invitrogen) cùng 10% 2-mercaptoetanol (dung dịch đệm mẫu khử) hoặc không cùng 2-mercaptoetanol (dung dịch đệm mẫu không khử). Các mẫu được gia nhiệt sơ bộ và được nạp để so sánh với các chất đánh dấu phân tử lượng (Invitrogen). Các gel được nhuộm màu xanh da trời coomassie thể keo (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các dải protein được phân tích bằng phép đo tỷ trọng để nhận biết tỷ lệ % chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đối với các gel khử và % IgG đối với các gel không khử.

Dữ liệu về độ ổn định được tạo ra bằng cách áp dụng thử nghiệm SDS-PAGE trong điều kiện khử được nêu trong các Bảng 9 và 17. Không quan sát thấy sự thay đổi

đáng kể nào về tỷ lệ % các chuỗi nặng và nhẹ (H+L) trong tất cả các điều kiện bảo quản đã liệt kê đối với tất cả các lô kiểm tra độ ổn định. Kiểu gắn kết là tương tự với kiểu gắn kết của chất chuẩn tham chiếu và tỷ lệ % (H+L) được duy trì không đổi ở mức $\geq 90\%$.

Hiệu quả gắn kết

Tế bào HuT78 (u lympho tế bào T ở người, American Type Culture Collection, Manassas, VA) được tạo hỗn dịch trong 1% BSA trong PBS, 0,01% natri azit được cho tiếp xúc với các dịch pha loãng tuần tự của kháng thể thử nghiệm sơ cấp. Sau khi ủ trên nước đá, tế bào được rửa và được xử lý bằng kháng thể thứ cấp được gắn nhãn huỳnh quang. Sau khi rửa tiếp, tế bào được cố định và được tạo hỗn dịch trong chất phản ứng FACS để phân tích theo phương pháp đếm tế bào trong dòng chảy (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ); xem cả patent Mỹ số 7,147,851.

Hiệu quả gắn kết của vedolizumab được xác định so với chất chuẩn tham chiếu và được thông báo dưới dạng tỷ lệ % so với chất chuẩn tham chiếu và EC50. Dữ liệu về độ ổn định được nêu trong Bảng 10 và Bảng 18. Dữ liệu về tỷ lệ % so với chất chuẩn tham chiếu cho thấy tính biến thiên nhưng vẫn duy trì trong giới hạn đặc trưng trong tất cả các điều kiện bảo quản. Không có lô vedolizumab nào đã được đánh giá thể hiện xu hướng giảm hiệu quả gắn kết ở các điều kiện bảo quản được liệt kê.

Độ ẩm xác định theo Karl Fischer

Chế phẩm được định phân với metanol để xác định độ ẩm theo phương pháp so màu của Karl Fischer. Dữ liệu độ ẩm được nêu trong Bảng 11 và Bảng 19. Tất cả các lô vedolizumab được đánh giá có độ ẩm thấp hơn 5% trong tất cả các điều kiện bảo quản.

Điện di điểm đẳng điện vùng mao quản (Capillary Isoelectric Focusing - cIEF)

cIEF được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống cIEF phát hiện toàn bộ cột iCE280 (do Convergent Biosciences, Toronto, Ontario cung cấp). Việc lựa chọn chất điện ly lưỡng tính có thể theo đề nghị của nhà sản xuất hoặc có thể là hỗn hợp gồm các chất điện ly lưỡng tính hiện có trên thị trường. Cách kết hợp có thể áp dụng là hỗn hợp gồm 3-10 và 5-8 PHARMALYTE™ (do GE Healthcare, Piscataway, NJ cung cấp).

Ví dụ 3: Tạo mô hình thang điểm của quy trình sấy khô ở nhiệt độ thấp

Chất lượng theo thiết kế được sử dụng khi xử lý tải lượng trong thiết bị làm khô ở nhiệt độ thấp và hàm lượng chất rắn của chế phẩm. Tải lượng thay đổi trong khoảng từ 33% đến 100%. Hàm lượng chất rắn trong chế phẩm thay đổi trong khoảng từ 9% đến 27% bằng cách đưa tải lượng của chế phẩm là 0,5x, 1,0x và 1,5x chế phẩm đích. Các chế phẩm này có T_g tương tự. Với hàm lượng chất rắn (%) cao hơn, thời gian làm khô sơ bộ tăng. Ngoài ra, ở hàm lượng chất rắn cao hơn, nhiệt độ sản phẩm tăng do R_p lớn hơn. Tải lượng cũng ảnh hưởng đến cả hai giai đoạn làm khô (Hình 8).

Ví dụ 4: Nghiên cứu độ an toàn phi lâm sàng

Nghiên cứu được thiết kế nhằm so sánh ảnh hưởng của natalizumab và vedolizumab lên theo dõi miễn dịch của CNS ở khi rezut EAE. Tám con khi được cho dùng liều đối chứng giả được mỗi tuần một lần. Bảy con khi được cho dùng liều natalizumab 30mg/kg trong mỗi tuần một lần. Bảy con khi được cho dùng liều vedolizumab 30mg/kg trong mỗi tuần một lần. Các triệu chứng lâm sàng của EAE được quan sát; tần suất và tỷ lệ phân nhóm bạch cầu trong CSF được xác định theo phương pháp đếm tế bào trong dòng chảy; tổng tải lượng thương tổn T2 trong não được xác định bằng cách áp dụng MRI; và tải lượng thương tổn và mức độ mất myelin của não được đo bằng cách sử dụng mô bệnh học.

Vedolizumab không làm chậm sự khởi phát các triệu chứng lâm sàng của EAE so với mẫu đối chứng giả được. Nó không làm giảm tỷ lệ mắc phải EAE, cũng như không làm giảm cường độ điểm đánh giá lâm sàng. Natalizumab làm chậm đáng kể ($p < 0,05$) sự khởi phát các triệu chứng lâm sàng của EAE so với mẫu đối chứng giả được. Hợp chất này làm giảm tỷ lệ mắc phải EAE và cường độ điểm đánh giá lâm sàng. (Hình 9)

Vedolizumab không ngăn ngừa hiện tượng thâm nhập CSF bởi bạch cầu, các tế bào lympho T (các tế bào lympho T hỗ trợ, các tế bào lympho T gây độc tế bào), các tế bào lympho B, tế bào giết tự nhiên, hoặc các bạch cầu đơn nhân to. Ngược lại, natalizumab ức chế hiện tượng thâm nhập CSF.

Vedolizumab không ức chế sự tích tụ của những thương tổn ở não, như được phát hiện bởi các trị số T2 tăng và MTR giảm khi xác định thông qua MRI.

Natalizumab ngăn ngừa sự hình thành thương tổn ở tất cả các con vật trừ một con vật. Mức độ ức chế đáng kể ($p < 0,05$) sự thâm nhập và sự mất myelin ở não được xác định theo mô học.

Integrin $\alpha 4\beta 7$ được bảo hoà bằng vedolizumab trong suốt quá trình nghiên cứu, như được chỉ ra bởi thử nghiệm gắn kết cạnh tranh giữa vedolizumab được phân liều in vivo và kháng thể đơn dòng kháng $\alpha 4\beta 7$ phân tích được bổ sung vào ex vivo. mAb kháng $\alpha 4\beta 7$ phân tích không gắn kết với các tế bào lympho T trợ giúp mang trí nhớ miễn dịch ở các con vật được dùng liều vedolizumab. Vì vậy, việc vedolizumab không có tác dụng trong CNS là do hệ sinh vật học nhiệt đới thuộc dải dạ dày-ruột non của integrin $\alpha 4\beta 7$.

Tóm lại, vedolizumab (chất đối kháng $\alpha 4\beta 7$) không ức chế EAE. Ngược lại, natalizumab (chất đối kháng $\alpha 4\beta 1$ và $\alpha 4\beta 7$) ức chế EAE. Integrin $\alpha 4\beta 1$ gây ra hiện tượng thâm nhập CNS ở EAE. Do vậy, vedolizumab có thể có nguy cơ khiến cho các bệnh nhân bị mắc nhiễm khuẩn cơ hội hệ thống (PML) từ trước giảm hơn so với natalizumab do nó không đối kháng integrin $\alpha 4\beta 1$ và làm suy yếu chức năng theo dõi miễn dịch của CNS ở khi rezu EAE.

Ví dụ 5: Nghiên cứu lâm sàng pha I với Vedolizumab

Bốn mươi chín đối tượng khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên và nhận liều đơn được phẩm cần nghiên cứu: 39 đối tượng nhận vedolizumab (5mg/ml kháng thể, 20mM xitrat/axit xitric, 125mM natri clorua, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,0 (được bảo quản trong thời gian dài ở -70°C và lên tới 3 tháng ở -20°C)) và 10 đối tượng nhận giả được. Trong số 39 đối tượng nhận vedolizumab, có 8 đối tượng mỗi đối tượng nhận một liều 0,2, 2,0, 6,0, và 10,0mg/kg và 7 đối tượng nhận vedolizumab theo liều 0,5mg/kg. Cả 49 đối tượng đều hoàn thành nghiên cứu.

Không có sự khác biệt đáng chú ý trong số các đối tượng nhận vedolizumab về cả đặc tính nhân khẩu học hoặc giá trị đường gốc. Tuổi trung bình nằm trong khoảng từ 35,4 đến 51,0 tuổi; mỗi đối tượng có tuổi nằm trong khoảng từ 21 đến 63 tuổi.

Kết quả PK

Vedolizumab được dùng ở dạng truyền qua đường tĩnh mạch 30 phút với liều lượng nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg đến 10,0mg/kg. Các trị số C_{max} và diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc trong huyết thanh theo thời gian (AUC) tăng khi liều tăng. C_{max} được hiệu chỉnh theo liều là gần như nhau ở các đối tượng thuộc cùng nhóm, cho thấy liều lượng này tỷ lệ thuận với thông số đó. Trị số diện tích bên dưới nồng độ thuốc trong huyết thanh được bình thường hóa theo liều trong khoảng thời gian từ 0 đến vô cực (AUC_{0-inf}) tăng khi liều tăng lên tới 2,0mg/kg, cho thấy có sự tăng không tuyến tính AUC_{0-inf} khi liều lượng tăng trong khoảng liều thấp hơn được dùng trong nghiên cứu này. Sau đó, AUC_{0-inf} tăng tỷ lệ thuận với liều lượng, cho thấy tính tuyến tính của AUC_{0-inf} trong khoảng liều từ 2,0mg/kg đến 10,0mg/kg. Lượng tăng AUC_{0-inf} lớn hơn khoảng 2,4 lần được mong đợi ở liều lượng 10,0mg/kg so với liều lượng 0,2mg/kg.

Tương tự, đánh giá độ thanh thải, thể tích phân phối, và thời gian bán thải cuối phụ thuộc liều trong khảng liều từ 0,2mg/kg đến 2,0mg/kg. Khi tăng liều, độ thanh thải giảm, thể tích phân phối tăng, và kết quả là thời gian bán thải cuối kéo dài. Tuy nhiên, ở liều lượng nằm trong khoảng từ 2mg/kg đến 10,0mg/kg, không có sự thay đổi rõ rệt về các thông số này, gợi ý sự bão hòa của quy trình thải loại nhanh vedolizumab ở nồng độ thấp. Quy trình thải loại tuyến tính chậm hơn dường như gây ra phân đoạn độ thanh thải lớn của vedolizumab ở các liều lượng cao hơn.

Ở một số đối tượng phát triển HAHA đối với vedolizumab, quan sát thấy độ thanh thải của vedolizumab nhanh hơn so với đối tượng không có HAHA với mức liều tương ứng.

Bảng 20: Tổng quan PK của Vedolizumab bằng cách cho dùng Vedolizumab qua đường tĩnh mạch với liều lượng nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg đến 10,0mg/kg ở các đối tượng khỏe mạnh (nhóm phân tích PK)

Thông số	Liều lượng VDZ	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình nhân	% CV	Giá trị trung vị	Cực tiểu	Cực đại
C _{max} (µg/ml)	0,2mg/kg	4	5,65	0,629	5,62	11,1	5,45	5,13	6,56
	0,5mg/kg	4	10,6	2,09	10,4	19,7	10,6	8,07	13,1
	2,0mg/kg	7	59,3	11,6	58,4	19,6	58,4	47,6	78,4
	6,0mg/kg	6	151	19,1	150	12,6	157	120	168
	10,0mg/kg	7	243	22,1	243	9,07	242	213	281
AUC _{0-tcuối cùng} (ngày*µg/ml)	0,2mg/kg	4	31,6	4,98	31,3	15,8	31,6	25,7	37,5
	0,5mg/kg	4	127	48,0	119	37,9	129	70,9	178
	2,0mg/kg	7	964	147	955	15,2	972	772	1170
	6,0mg/kg	6	3090	749	3020	24,2	2830	2360	4100
	10,0mg/kg	7	4870	624	4840	12,8	4750	4120	5870
AUC _{0-inf} (ngày*µg/ml)	0,2mg/kg	4	39,5	5,79	39,1	14,7	40,2	31,7	45,7
	0,5mg/kg	4	134	48,9	127	36,5	134	79,2	188
	2,0mg/kg	7	979	146	969	14,9	993	784	1180
	6,0mg/kg	6	3100	750	3030	24,2	2840	2390	4110
	10,0mg/kg	7	4880	637	4850	13,0	4750	4130	5920
V _z (l)	0,2mg/kg	4	4,02	0,151	4,02	3,76	4,03	3,83	4,18
	0,5mg/kg	4	4,92	0,620	4,89	12,6	4,66	4,52	5,84
	2,0mg/kg	7	3,34	0,665	3,28	19,9	3,23	2,29	4,27
	6,0mg/kg	6	2,98	0,644	2,92	21,6	2,98	2,06	3,98
	10,0mg/kg	7	2,89	1,02	2,73	35,2	2,98	1,49	4,58
CL (l/ngày)	0,2mg/kg	4	0,413	0,042	0,412	10,1	0,395	0,388	0,476
	0,5mg/kg	4	0,310	0,106	0,297	34,3	0,291	0,212	0,446
	2,0mg/kg	7	0,165	0,018	0,164	10,7	0,162	0,145	0,194
	6,0mg/kg	6	0,140	0,031	0,136	22,0	0,145	0,083	0,166
	10,0mg/kg	7	0,140	0,024	0,139	16,9	0,135	0,103	0,171
t _{1/2} (ngày)	0,2mg/kg	4	6,79	0,736	6,76	10,8	6,95	5,79	7,47
	0,5mg/kg	4	11,7	2,83	11,4	24,2	11,4	9,09	14,8

	2,0mg/kg	7	14,1	2,67	13,9	18,9	14,3	10,6	17,5
	6,0mg/kg	6	15,1	3,15	14,8	20,9	14,0	11,9	20,3
	10,0mg/kg	7	14,8	7,38	13,7	49,8	12,5	8,26	30,7

Các chữ viết tắt: AUC_{0-inf} =diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc theo thời gian, ngoại suy đến vô cực; $AUC_{0-t_{cuối cùng}}$ = diện tích dưới đường cong nồng độ thuốc theo thời gian từ thời điểm bắt đầu sử dụng đến thời điểm xác định cuối cùng mà ở đó nồng độ cao hơn giới hạn dưới của định lượng; CL =tổng độ thanh thải; C_{max} = nồng độ thuốc tối đa; $t_{1/2}$ =thời gian bán thải cuối cùng; V_z =thể tích phân bố dựa trên pha cuối.

Sau khi đạt đến C_{max} , nồng độ của Vedolizumab trong huyết thanh thường giảm xuống theo kiểu số mũ đơn cho đến khi nồng độ đạt khoảng từ 1mg/l đến 10mg/l. Sau đó, nồng độ này dường như giảm theo kiểu không tuyến tính.

Các trị số C_{max} và AUC tăng khi liều lượng tăng. Đối với dữ liệu sẵn có, C_{max} đã được hiệu chỉnh theo liều lượng là xấp xỉ với cùng nhóm thử nghiệm, cho thấy liều lượng tỷ lệ thuận với thông số này. AUC_{0-inf} được bình thường hóa theo liều lượng sẽ tăng khi liều lượng tăng tới 2,0mg/kg, cho thấy có sự tăng không tuyến tính ở AUC_{0-inf} khi liều lượng tăng trong khoảng liều lượng thấp hơn được dùng trong nghiên cứu này. Sau đó, AUC_{0-inf} tăng tỷ lệ thuận với liều lượng, cho thấy tính tuyến tính của AUC_{0-inf} trong khoảng liều lượng từ 2,0mg/kg đến 10,0mg/kg. Mức tăng AUC_{0-inf} lớn hơn khoảng 2,4 lần được mong đợi ở liều lượng 10,0mg/kg so với liều lượng 0,2mg/kg.

Kết quả PD

Các thông số PD của Vedolizumab sau khi truyền vedolizumab qua đường tĩnh mạch với liều lượng nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg đến 10,0mg/kg trong 30 phút cho nhóm thử nghiệm được tóm tắt trong Bảng 21 và Bảng 22 tương ứng đối với Act-1 và MAdCAM.

Bảng 21: Tổng quan về dược động học của Vedolizumab, phần trăm mức ức chế của %Act-1⁺ [CD4⁺ CD45RO^{cao}], bằng cách cho nhóm thử nghiệm dùng qua đường tĩnh mạch liều 0,2mg/kg đến 10,0mg/kg Vedolizumab ở các đối tượng khỏe mạnh (Thiết lập phân tích PD)

Thông số	Liều lượng VDZ	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình nhân	%CV	Giá trị trung vị	Cực tiểu	Cực đại
E _{max} (% ức chế)	0,2mg/kg	4	99,6	0,387	99,6	0,388	99,6	99,1	100
	0,5mg/kg	4	99,5	0,599	99,5	0,602	99,5	98,9	100
	2,0mg/kg	6	99,9	0,172	99,9	0,172	100	99,6	100
	6,0mg/kg	6	100	0,000	100	0,000	100	100	100
	10,0mg/kg	6	99,7	0,326	99,7	0,327	99,8	99,3	100
AUEC _{0-inf} (% ức chế*d)	0,2mg/kg	4	4030	1010	3920	25,2	4090	2760	5160
	0,5mg/kg	4	6430	1450	6300	22,6	6530	4860	7810
	2,0mg/kg	6	13200	623	13200	4,72	12900	12800	14500
	6,0mg/kg	6	16700	3030	16500	18,1	16300	13300	20100
	10,0mg/kg	6	19300	644	19300	3,33	19600	18200	19900

AUEC_{0-inf}=diện tích bên dưới đường cong hiệu lực của thuốc theo thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm nồng độ cuối cùng không đạt zero; E_{max}=hiệu lực tối đa của thuốc

Bảng 22: Tổng quan về dược động học của Vedolizumab, phần trăm ức chế của %MADCAM⁺ [CD4⁺ CD45RO^{cao}], bằng cách cho nhóm thử nghiệm dùng liều Vedolizumab 0,2mg/kg đến 10,0 mg/kg qua đường tĩnh mạch ở các đối tượng khỏe mạnh (thiết lập phân tích PD)

Thông số	Liều lượng VDZ	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình nhân	%CV	Giá trị trung vị	Cực tiểu	Cực đại
E _{max} (% ức chế)	0,2mg/kg	4	99,2	0,537	99,2	0,542	99,4	98,4	99,6
	0,5mg/kg	4	99,6	0,323	99,6	0,324	99,5	99,3	100
	2,0mg/kg	6	99,7	0,365	99,7	0,366	99,7	99,2	100
	6,0mg/kg	6	99,8	0,279	99,8	0,280	100	99,4	100
	10,0mg/kg	6	100	0,000	100	0,000	100	100	100
AUEC _{0-inf} (% ức	0,2 mg/kg	4	4000	576	3970	14,4	4210	3160	4440
	0,5mg/kg	4	6770	1400	6660	20,6	6840	5170	8230

chế độ)	2,0mg/kg	6	13000	796	13000	6,12	13000	11700	13900
	6,0mg/kg	6	16200	3320	15900	20,5	15800	11800	20000
	10,0mg/kg	6	17700	1330	17700	7,5	17700	16500	19000

AUEC_{0-inf}=diện tích bên dưới đường cong hiệu lực của thuốc theo thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm nồng độ cuối cùng không đạt zero; E_{max}=hiệu lực tối đa của thuốc

Vedolizumab ức chế các thông số PD, Act-1 và MAdCAM-1-Fc, gần như cực đại ở tất cả các thời điểm mà tại đó vedolizumab được xác định trong huyết thanh. Khi nồng độ vedolizumab giảm xuống dưới giới hạn phát hiện của thử nghiệm, mức ức chế của Act-1 và MAdCAM-1-Fc trở về gần bằng mức đường gốc.

Ở một số đối tượng bị HAHA đối với vedolizumab, quan sát thấy sự mất bão hòa thụ thể $\alpha 4\beta 7$ nhanh hơn so với đối tượng không bị HAHA ở mức liều lượng tương ứng.

Kết quả về độ an toàn

Vedolizumab nói chung an toàn và được dung nạp tốt ở các liều đơn dùng qua đường tĩnh mạch đến 10,0mg/kg. Không xảy ra tử vong, trường hợp bất lợi nghiêm trọng (SAE) hoặc AE dẫn đến việc dừng nghiên cứu trong suốt quá trình nghiên cứu.

Tính sinh miễn dịch/Sự tạo thành kháng thể kháng người của người (Human Antihuman Antibody - HAHA)

Một (10%) đối tượng trong nhóm giả dược và 21 (54%) đối tượng trong các nhóm dùng liều vedolizumab kết hợp có HAHA dương tính ở một số thời điểm trong suốt quá trình nghiên cứu. Mặc dù quan sát thấy các mẫu HAHA dương tính ở tất cả các nhóm liều lượng, độ chuẩn HAHA >125 được phát hiện chỉ ở 2 nhóm liều lượng vedolizumab thấp nhất. Sự ức chế tạo thành HAHA theo cách phụ thuộc liều đã được quan sát thấy trước đó với vedolizumab. Mười chín trong số 22 đối tượng được điều trị bằng vedolizumab dương tính với HAHA đã được trung hòa HAHA.

Bảng 23: Tổng quan về việc phát hiện các kháng thể kháng người ở người: Quần thể an toàn

	Giả được N=10	0,2mg/kg VDZ N=8	0,5mg/kg VDZ N=7	2,0mg/kg VDZ N=8	6,0mg/kg VDZ N=8	10,0mg/kg VDZ N=8	VDZ kết hợp N=39
Số đối tượng được thử nghiệm	10	8	7	8	8	8	39
Dương tính với HAHA bất kỳ, n (%)	1 (10)	6 (75)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	21 (54)
Chuẩn độ HAHA cao nhất <125, n (%)	1 (10)	4 (50)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	17 (44)
Chuẩn độ HAHA cao nhất ≥125, n (%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)
Số người dương tính với HAHA trung tính, n (%)	0	5 (63)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	19 (49)
Chuẩn độ HAHA trung hòa cao nhất <125, n (%)	0	3 (38)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	15 (38)
Chuẩn độ HAHA trung hòa cao nhất ≥125, n (%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)

Một đối tượng trong nhóm giả dược và 11 đối tượng trong nhóm vedolizumab vẫn dương tính với HAHA.

Bảng 24: Tình trạng kháng thể kháng người ở người nói chung (quần thể an toàn)

	Giả được N=10	0,2mg/kg VDZ N=8	0,5mg/kg VDZ N=7	2,0mg/kg VDZ N=8	6,0mg/kg VDZ N=8	10,0mg/kg VDZ N=8	VDZ kết hợp N=39
Âm tính với HAHA ^a n (%)	9 (90)	2 (25)	3 (43)	6 (75)	5 (63)	2 (25)	18 (46)
HAHA được phân lập ^b n (%)	0	2 (25)	1 (14)	1 (13)	1 (13)	5 (63)	10 (26)
Số đối tượng vẫn có HAHA ^c n(%)	1 (10)	4 (50)	3 (43)	1 (13)	2 (25)	1 (13)	11 (28)

a âm tính với HAHA: Các đối tượng không có kết quả HAHA dương tính

b HAHA được phân lập: Các đối tượng với chỉ 1 mẫu HAHA dương tính với chuẩn độ <25

c vẫn dương tính với HAHA: Các đối tượng với 2 hoặc nhiều mẫu HAHA dương tính, hoặc 1 mẫu dương tính với chuẩn độ ≥25

Kết luận

Nghiên cứu giai đoạn 1 này đã mô tả đặc trưng PK/PD và profin an toàn ban đầu của vedolizumab có nguồn gốc từ tế bào CHO. Kết quả của nghiên cứu này được sử dụng để hỗ trợ việc lựa chọn liều cho các thử nghiệm chủ chốt giai đoạn 3 ở bệnh viêm ruột.

Vedolizumab đã chứng tỏ tính tỷ lệ thuận của liều trong khoảng liều được thử nghiệm đối với các thông số C_{max}; tuy nhiên, quan sát thấy sự thay đổi AUC_{0-inf}, CL, V_z, và t_{1/2} theo cách phụ thuộc liều ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg đến 2,0mg/kg, cho thấy PK của vedolizumab là phi tuyến tính. Ở các mức liều lượng lớn hơn 2,0mg/kg, không quan sát thấy sự thay đổi nào khác về các thông số, cho thấy sự bão hòa quá trình thải loại nhanh đối với vedolizumab ở nồng độ thấp. Các quá trình thải loại tuyến tính chậm hơn có thể là do phần lớn độ thanh thải của vedolizumab ở các liều lượng cao hơn.

Vedolizumab ức chế các thông số PD, Act-1 và MAdCAM-1-Fc, ở mức bằng hoặc gần bằng mức cực đại ở tất cả các thời điểm khi vedolizumab được xác định trong huyết thanh. Khi nồng độ vedolizumab giảm xuống dưới giới hạn phát hiện của thử nghiệm, mức ức chế của Act-1 và MAdCAM-1-Fc trở về gần với mức đường gốc.

Ở một số đối tượng phát triển HAHA đối với vedolizumab, quan sát thấy mức thanh thải vedolizumab nhanh hơn và sự mất bảo hòa của thụ thể $\alpha 4\beta 7$ so với đối tượng âm tính HAHA ở mức liều lượng tương ứng.

Vedolizumab được dung nạp tốt. Không xảy ra tử vong, SAE, hoặc AE dẫn đến phải dừng nghiên cứu dùng thuốc trong suốt quá trình nghiên cứu, cũng như không quan sát thấy mối quan hệ liều lượng-tính độc bất kỳ. Không có nhiễm khuẩn cơ hội toàn thân nào (kể cả PML) hoặc khối u được báo cáo.

Không giống như các chất đối kháng $\alpha 4$ không đặc hiệu, vedolizumab không liên quan đến lympho bào hoặc sự gia tăng trung bình các tế bào ưa eosin, các bạch cầu ưa kiềm, hoặc các bạch cầu đơn nhân to trong hệ tuần hoàn, cũng như không có bằng chứng bất kỳ nào về sự suy kiệt của các tế bào lympho.

Vedolizumab gây ra sự tạo thành HAHA, nhưng các chuẩn độ cao nhất (>125) chỉ được quan sát ở 2 nhóm liều thấp nhất, phát hiện này xác nhận các nhận xét trước đó về hiện tượng giảm mức sinh miễn dịch theo liều. Dữ liệu này cho thấy rằng việc sử dụng vedolizumab với liều cao hơn có thể làm giảm thiểu sự tạo thành HAHA một cách đáng kể trong lâm sàng.

Tóm lại, vedolizumab nói chung là an toàn và được dung nạp tốt khi được dùng với các liều đơn nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg đến 10,0mg/kg cho các đối tượng khỏe mạnh.

Ví dụ 6: Xác định ảnh hưởng của vedolizumab lên tỷ lệ CD4:CD8

Các đối tượng khỏe mạnh ở lứa tuổi 18 đến 45 được điều trị bằng một liều đơn 450mg vedolizumab được hoàn nguyên từ chế phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp chứa 10% sucroza và được pha loãng thành hệ dung dịch truyền chứa 0,9% nước muối. Dịch não tủy (Cerebrospinal fluid - CSF) được gom bằng cách chọc dò tủy sống trước (đường

gốc) và 5 tuần sau liều đơn 450mg vedolizumab. Mỗi đối tượng đóng vai trò làm mẫu đối chứng của chính họ.

Thời điểm 5-tuần được lựa chọn dựa trên một nghiên cứu trước đó cho thấy rằng các bệnh nhân MS được điều trị bằng natalizumab đã thể hiện tác động đến tỷ lệ tế bào lympho CD4+:CD8+ trong CSF và giảm mức độ thương tổn ở não sau khi dùng một liều duy nhất (Stuve et al., Arch Neurol.2006;63:1383-1387; Stuve et al., Ann Neurol. 2006;59:743-747. Miller et al., N Engl J Med. 2003;348(1):15-23); và cũng do tại thời điểm 5 tuần, liều 450mg vedolizumab là đủ để làm bão hòa đích và tạo ra nồng độ huyết thanh vượt quá nồng độ thấp nhất ở trạng thái ổn định ước tính liên quan đến phác đồ liều giai đoạn 3 là 300mg 4 tuần một lần.

Khoảng 15ml CSF thu được từ mỗi đối tượng để xác định kiểu hình miễn dịch. Các mẫu CSF được tham gia vào nghiên cứu này nếu chúng đạt tiêu chí sau đây: ≤ 10 RBC/ μ l mỗi mẫu (để giảm đến mức tối thiểu sự nhiễm tạp máu ngoại biên); kết quả nuôi cấy CSF âm tính; số lượng tế bào lympho T thích đáng ở mỗi mẫu dòng chảy tế bào; và không phát hiện thấy các kháng thể kháng vedolizumab trong huyết thanh.

Nồng độ vedolizumab trung vị tuần 5 (34,80 μ g/ml) và nồng độ vedolizumab trong huyết thanh ở mỗi đối tượng (nằm trong khoảng từ 24,9 μ g/ml đến 47,9 μ g/ml) tại thời điểm tuần 5 là lớn hơn nồng độ thấp nhất ở trạng thái ổn định trung bình đề ra (~24 μ g/ml) đối với phác đồ liều giai đoạn 3. Mức độ bão hòa thụ thể $\alpha 4\beta 7$ cao (>90%) được quan sát tại thời điểm tuần 5 như được đo theo MAdCAM-1-Fc, biểu thị sự bão hòa của vedolizumab ở các đích của nó tại thời điểm đánh giá điểm cuối.

Vedolizumab không được phát hiện trong mẫu CSF bất kỳ (giới hạn phát hiện = 0,125 μ g/ml).

Tác động đến số lượng và tỷ lệ tế bào lympho T CD4+ và CD8+

Vedolizumab không làm giảm đáng kể tỷ lệ CD4+:CD8+ (Bảng 56). Không có vật chủ nào có tỷ lệ CD4+:CD8+ sau khi dùng thuốc < 1 ($p < 0,0001$ (thử nghiệm t 1-phía)). Vedolizumab không làm giảm đáng kể số tế bào lympho T CD4+ hoặc CD8+ trong CSF. Ngoài ra, không có sự thay đổi đáng kể về tỷ lệ % tế bào lympho T CD4+ và CD8+ trong CSF (Bảng 26). Ngoài ra, không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể nào về WBC máu ngoại biên, các tế bào lympho T nhớ CD4+ và CD8+ (Bảng 27).

Bảng 25: Tác động của việc điều trị bệnh đến tỷ lệ CD4+:CD8+ trong CSF (Nhóm có thể đánh giá, n=13)

	Đường gốc	Tuần 5	Chênh lệch tỷ lệ CD4+:CD8+ †
Tỷ lệ CD4+:CD8+ Khoảng (SE) trung bình	3,59 (0,273) 1,53-5,67	3,60 (0,265)* 1,42-5,15	0,01 (0,197)
90% CI 2 phía đối với tỷ lệ	3,00-4,19	3,132, 4,077	
90% CI 2 phía đối với chênh lệch			-0,337, 0,363

CI = khoảng tin cậy

* $p < 0,0001$ (thử nghiệm t một mẫu một phía đối với $H_0: \mu < 1$ so với $H_1: \mu \geq 1$).

†Chênh lệch được định nghĩa là tỷ lệ tại thời điểm tuần 5 trừ đi tỷ lệ đường gốc

Bảng 26: Tác động của việc điều trị bệnh đến số tế bào lympho CD4+ và CD8+ trong CSF (Nhóm có thể đánh giá, n=13)

	Đường gốc	Tuần 5
CD4+ dưới dạng % tế bào lympho, trung bình (SD)	75,160 (7,3831)	74,215 (6,3732)
CD8+ dưới dạng tỷ lệ % tế bào lympho, trung bình (SD)	22,272 (5,4320)	22,007 (6,1624)

Bảng 27: Số lympho bào T nhớ máu ngoại biên (RO+) (Nhóm có thể đánh giá, n=13)

	Đường gốc	Tuần 5
	Trung bình (SD)	Trung bình (SD)
CD4+CD45RO+	27,85 (4,98)	27,06 (5,02)
CD8+CD45RO+(%)	11,24 (3,40)	10,78 (2,98)

Tóm tắt

Vedolizumab không tác động đến số tế bào CD4+ và CD8+ trong CSF hoặc tỷ lệ CD4+:CD8+ ở những người tình nguyện khỏe mạnh sau khi dùng một liều 450mg. Không có đối tượng nào có tỷ lệ CD4+:CD8+ trong CSF sau khi dùng thuốc giảm đến

nhỏ hơn 1. Không phát hiện thấy vedolizumab trong CSF. Ngoài ra, không quan sát thấy sự thay đổi nào về WBC tổng hoặc tập hợp con lympho bào T nhớ CD4+ và CD8+ trong máu ngoại biên. Sự bão hòa ($\alpha 4\beta 7$) đích trong máu xảy ra ở tất cả các đối tượng tại thời điểm đánh giá điểm cuối. Lượng và tỷ lệ tế bào lympho CD4+ và CD8+ trong CSF là tương tự với lượng và tỷ lệ đã được thông báo trước đây trong các tài liệu.

Kết quả này phù hợp với việc vedolizumab không tác động đến sự giám sát miễn dịch sinh lý ở CNS và sự viêm CNS bệnh lý ở khi (xem ví dụ 4).

Ví dụ 7: Sử dụng vedolizumab trong lâm sàng trong thời gian dài để điều trị IBD

Nghiên cứu mở rộng về tính an toàn nhân mở giai đoạn 2 được thực hiện để đánh giá dược động học (PK), dược lực học (PD), tính an toàn, và hiệu quả của vedolizumab trong thời gian dài. Các bệnh nhân ở lứa tuổi từ 18 đến 75 tuổi, và đã từng tham gia vào nghiên cứu về PK/PD/tính an toàn trước đó ở các bệnh nhân viêm loét đại tràng hoặc có các triệu chứng IBD trong ít nhất 2 tháng được sàng lọc bằng cách nội soi và/hoặc mô bệnh học và/hoặc X quang trong vòng 36 tháng.

Tất cả các bệnh nhân được nhận phác đồ liều 2mg/kg hoặc 6mg/kg vedolizumab qua đường tĩnh mạch (5mg/ml kháng thể, 20mM xitrat/axit xitric, 125mM natri clorua, 0,05% polysorbat 80, độ pH 6,0 (được bảo quản trong thời gian dài ở -70°C và đến 3 tháng ở -20°C)) vào ngày 1, 15 và 43, sau đó là liều 8 tuần một lần trong khoảng thời gian đến 78 tuần. Các bệnh nhân là các bệnh nhân chưa từng được điều trị bệnh viêm loét đại tràng hoặc mắc bệnh Crohn, hoặc các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng đã từng tham gia vào thử nghiệm lâm sàng trước đó.

Hiệu quả/chất lượng sống (quality of life - QoL); điểm số Mayo một phần (partial Mayo score - PMS), chỉ số hoạt tính bệnh Crohn (CDAI), và Danh mục câu hỏi về bệnh viêm ruột (Inflammatory Bowel Disease Questionnaire - IBDQ) được sử dụng để đánh giá kết quả nghiên cứu.

Kết quả PK

Nồng độ vedolizumab trung bình trước khi truyền tỷ lệ với liều lượng, và vẫn ổn định và có thể phát hiện được trong toàn bộ nghiên cứu.

Kết quả PD

Các thụ thể (%ACT-1 + [CD4+CD45RO HIGH] và %MADCAM+[CD4+CD45RO HIGH] được ức chế gần như hoàn toàn trong toàn bộ quá trình nghiên cứu ở tất cả các mức liều lượng.

Điểm số Mayo một phần

PMS trung bình đường gốc ở các bệnh nhân chưa từng điều trị viêm loét đại tràng (5,4) cao hơn so với các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng tái diễn (2,3). Vào ngày thứ 43, PMS trung bình giảm rõ rệt đối với cả các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng tái phát và các bệnh nhân chưa từng điều trị viêm loét đại tràng. Vào ngày thứ 155, điểm số trung bình của hai nhóm là tương tự nhau. PMS trung bình tiếp tục giảm trong ngày thứ 267, và chứng lại sau đó.

Chỉ số hoạt tính bệnh Crohn

CDAI trung bình của các bệnh nhân mắc CD giảm từ 294,6 tại đường gốc xuống 237,7 vào ngày thứ 43, và tiếp tục giảm cho đến ngày 155 (156,1).

IBDQ

Các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng tái diễn có điểm số IBDQ trung bình cao nhất tại đường gốc. Vào ngày thứ 43, điểm số IBDQ trung bình tăng lên ở cả ba nhóm bệnh. Điểm số IBDQ trung bình tiếp tục tăng theo thời gian ở cả 3 nhóm bệnh, đạt đến trị số tối đa vào ngày thứ 155 đối với các bệnh nhân mắc bệnh Crohn, và vào ngày thứ 491 đối với các bệnh nhân chưa từng điều trị viêm loét đại tràng và các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng tái phát.

Protein phản ứng C

Cả bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng tái phát và các bệnh nhân mắc bệnh Crohn có mức CRP trung bình giảm cho đến ngày thứ 155 và sau đó chứng lại. Các bệnh nhân chưa từng điều trị viêm loét đại tràng có mức CRP trung bình đường gốc thấp hơn so với các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng tái phát (2,28 so với 7,09). Mức CRP trung bình ở các bệnh nhân chưa từng điều trị viêm loét đại tràng hầu như không thay đổi tại tất cả các thời điểm đánh giá.

Các kết quả khác về độ an toàn

Không có sự nhiễm khuẩn cơ hội hệ thống nào (kể cả PML) được thông báo trong quá trình nghiên cứu. Một bệnh nhân dương tính theo xét nghiệm virus huyết JC tại thời điểm duy nhất, mặc dù âm tính đối với JCV tại tất cả các thời điểm khác. Ba trong số 72 bệnh nhân (4%) có kết quả HAMA dương tính (hai trong số họ dương tính tạm thời). Nghiên cứu này không cho thấy bằng chứng về tính độc trong gan, lympho bào, hoặc giảm bạch cầu lympho, hoặc các thay đổi bất kỳ khác có liên quan đến thuốc ở mức độ phòng thí nghiệm.

Kết luận

Vedolizumab được dùng ở liều 2,0mg/kg hoặc 6,0mg/kg 8 tuần một lần trong thời gian đến 78 tuần để đạt được trạng thái bão hòa thụ thể đích, có liên quan đến sự giảm hoạt tính trung bình của bệnh lâu dài và cải thiện điểm số IBDQ, nói chung là an toàn và được dung nạp tốt, và thể hiện độ sinh miễn dịch chấp nhận được.

Ví dụ 8: Gây đáp ứng và sự thuyên giảm ở các bệnh nhân mắc bệnh Crohn ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng

Nghiên cứu đa tâm đối chứng bằng giả dược, mù kép, ngẫu nhiên được thực hiện để đánh giá tác dụng gây đáp ứng của vedolizumab ở liều 300mg (được hoàn nguyên từ chế phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp chứa 60mg/ml kháng thể trong 50mM histidin, 125mM arginin, 0,06% polysorbat 80, 10% sucroza, ở độ pH 6,3), ở các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng TNF α tại thời điểm tuần 6 (sau 2 liều tại thời điểm 0 tuần và 2 tuần) và tại thời điểm tuần 10 (sau 3 liều). Nghiên cứu này được thực hiện ở 416 bệnh nhân, 75% trong số họ thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng TNF α , và 25% trong số họ chưa từng sử dụng TNF α . Nhân khẩu học và các thuốc IBD đi kèm được cân bằng trong các nhóm điều trị. Các đặc tính bệnh đường gốc cũng được cân bằng trong các nhóm điều trị, ngoại trừ hoạt tính bệnh đường gốc.

Điểm cuối sơ bộ được chỉ định cho nghiên cứu này là mức thuyên giảm (%) tại thời điểm tuần 6 trong nhóm thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng TNF- α . Các điểm cuối phụ then chốt được đánh giá (quy trình thử nghiệm sau đó) là: mức thuyên giảm (%) tại thời điểm tuần 6 trong toàn bộ quần thể, mức thuyên giảm (%) tại thời điểm tuần 10 trong nhóm thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng TNF- α và toàn bộ quần thể (bằng cách áp dụng quy trình Hochberg), mức

thuyên giảm (%) duy trì tại thời điểm tuần 6 và tuần 10 trong nhóm thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α và toàn bộ quần thể (bằng cách áp dụng quy trình Hochberg), và đáp ứng tăng cường (%) tại thời điểm tuần 6 trong nhóm thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α .

Bảng 28: CDAI đường gốc:

	Giả dược	Vedolizumab	Trị số p
ITT TNF: Trung bình (Độ lệch chuẩn)	306,1 (55,43)	316,1 (52,63)	0,0945
ITT tổng: Trung bình (Độ lệch chuẩn)	301,3 (54,97)	313,9 (53,17)	0,0153

Bảng 29: Kết quả nghiên cứu gây đáp ứng: điểm cuối sơ bộ và điểm cuối phụ then chốt

Điểm cuối	ITT TNF (N=315)				ITT tổng (N=416)			
	PLA N=15 7	VDZ N=15 8	Chênh lệch (RR)	Trị số P	PLA N=20 7	VDZ N=20 9	Chênh lệch (RR)	Trị số P
Mức thuyên giảm sơ bộ tại thời điểm tuần 6	12,1 %	15,2 %	3,0% (1,2)	0,4332				
Mức thuyên giảm phụ thứ nhất tại thời điểm tuần 6					12,1 %	19,1 %	6,9% (1,6)	0,0478
Mức thuyên giảm phụ thứ hai tại thời điểm tuần 10	12,1 %	26,6 %	14,4% (2,2)	0,0012	13%	28,7 %	15,5% (2,2)	<0,0001
Mức thuyên giảm duy trì (tại cả thời điểm tuần 6 và tuần 10)	8,3 %	12,0 %	3,7 % (1,4)	0,2755	8,2 %	15,3 %	7% (1,9)	0,0249
Đáp ứng gia tăng (CDAI100)	22,3 %	39,2 %	16,9% (1,8)	0,0011				

Bảng 30: Kết quả ở các bệnh nhân chưa từng sử dụng chất đối kháng kháng TNF- α (n=101, 24% trong tổng số bệnh nhân)

	Giả dược %	Vedolizumab%	Chênh lệch %	95% CI
Thuyên giảm tại thời điểm tuần 6	12	31,4	19,1	(3,3, 35,0)
Thuyên giảm tại thời điểm tuần 10	16	35,3	19,2	(2,4, 35,8)

Bảng 31: Kết quả nghiên cứu: Thuyên giảm lâm sàng tại thời điểm tuần 6 và tuần 10, Phân nhóm chủ yếu—Thất bại trong việc điều trị bằng Tx trước đây, Tổng ITT

Phân nhóm	Biến số	Giả dược	VDZ	Chênh lệch	95% CI
Thất bại trong việc điều trị bằng kháng TNF trước đây (75% ITT)	N	156	155		
	Thuyên giảm tại thời điểm tuần 6 (%)	12,8	14,8	2	(-5,7, 9,7)
	Thuyên giảm tại thời điểm tuần 10 (%)	12,8	26,5	13,6	(4,9, 22,3)
Thất bại trong việc điều trị bằng điều biến miễn dịch nhưng thành công trong việc điều trị bằng kháng TNF trước đây (21% ITT)	N	45	44		
	Thuyên giảm tại thời điểm tuần 6 (%)	11,1	31,8	20,7	(-0,5, 39,7)
	Thuyên giảm tại thời điểm tuần 10 (%)	15,6	31,8	16,3	(-1,1, 33,6)
Chỉ thất bại trong việc điều trị bằng corticosteroid trước đây (3% ITT)	N	5	9		
	Thuyên giảm tại thời điểm tuần 6 (%)	0	33,3	33,3	(-23,9, 75,7)
	Thuyên giảm tại thời điểm tuần 10 (%)	0	44,4	44,4	(-13,4, 85,3)

Nghiên cứu này cho thấy rằng các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng TNF- α cần 3 liều để làm thuyên giảm bệnh. Tỷ lệ thuyên giảm ở các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng TNF- α tăng giữa tuần 6 và tuần 10, nhưng chỉ tăng ở nhóm vedolizumab (không tăng ở nhóm giả dược). Tỷ lệ thuyên giảm đối với các bệnh nhân chưa từng điều trị bằng chất đối kháng TNF- α về cơ bản là không tăng giữa tuần 6 và tuần 10. Nhóm thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng TNF- α với mức độ mức độ nghiêm trọng của bệnh cao, 43% chưa từng đáp ứng với chất đối kháng TNF- α , và 45% mất đáp ứng.

Ví dụ 9: Gây đáp ứng và duy trì đáp ứng và làm thuyên giảm bệnh ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng

Một thử nghiệm bao gồm hai nghiên cứu đa tâm, mù kép ngẫu nhiên được thiết kế để đánh giá mức gây đáp ứng và duy trì đáp ứng và mức thuyên giảm bệnh ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm loét đại tràng ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng. Các đặc tính bệnh nhân khẩu học và đường gốc được so sánh trong tất cả các nhóm điều trị.

Nghiên cứu gây đáp ứng, bằng cách dùng qua đường tĩnh mạch, so sánh giả dược với vedolizumab, ở liều lượng 300mg được hoàn nguyên từ chế phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp chứa 60mg/ml kháng thể trong 50mM histidin, 125mM arginin, 0,06% polysorbat 80, 10% sucroza, ở độ pH 6,3, với thời điểm cuối là 6 tuần sau 2 liều vedolizumab.

Nghiên cứu duy trì đáp ứng, bằng cách sử dụng chế phẩm và đường dùng giống với nghiên cứu gây đáp ứng, so sánh giả dược với vedolizumab được phân liều bốn tuần một lần, và giả dược với vedolizumab được phân liều tám tuần một lần. Tất cả các bệnh nhân ở độ tuổi từ 18 đến 80, đã được chẩn đoán mắc bệnh viêm loét đại tràng ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng; đã cho thấy, trong giai đoạn 5 năm trước, đáp ứng không thích hợp với, mất đáp ứng với, hoặc không dung nạp ít nhất một phương pháp trị liệu thông thường (ví dụ corticosteroid); và có thể nhận liều có tác dụng trị liệu theo phương pháp trị liệu thông thường đối với IBD. Thời điểm cuối của nghiên cứu này là 52 tuần, phân tích quần thể có đáp ứng cảm ứng. Cả hai pha của thử nghiệm này đều đạt đến các điểm cuối sơ bộ của chúng, nghĩa là, đáp ứng lâm sàng trong giai đoạn gây đáp ứng và thuyên giảm lâm sàng trong giai đoạn duy trì đáp ứng.

Các mẫu máu được gom để xác định nồng độ vedolizumab trong suốt quá trình nghiên cứu. Nồng độ trung bình của vedolizumab trong huyết thanh ở cuối pha cảm ứng nằm trong khoảng từ 20µg/ml đến 30µg/ml. Nồng độ thấp nhất trung bình của vedolizumab trong huyết thanh ở trạng thái ổn định sau 30 phút truyền qua đường tĩnh mạch (IV) với liều 300mg nằm trong khoảng từ 9µg/ml đến 13µg/ml đối với phác đồ q8wks và nằm trong khoảng từ 35µg/ml đến 40µg/ml đối với phác đồ q4wks. Ở cuối quá trình truyền, nồng độ vedolizumab trung vị trong huyết tương nằm trong khoảng từ 98µg/ml đến 101µg/ml đối với phác đồ q8ks (8 tuần) và nằm trong khoảng từ 129µg/ml đến 137µg/ml đối với phác đồ q4 wks (4 tuần).

Tóm tắt về các đáp ứng trong các nghiên cứu gây đáp ứng và duy trì đáp ứng được đưa ra trong các Bảng 32 đến 35. Tỷ lệ các bệnh nhân được điều trị bằng vedolizumab đạt được đáp ứng lâm sàng, thuyên giảm bệnh, và lành niêm mạc tại thời điểm 6 tuần cao hơn đáng kể so với bệnh nhân dùng giả dược (Bảng 32). 39% nhóm được dự định điều trị trong pha cảm ứng không có khả năng kháng TNF α trước đó. Tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và tỷ lệ thuyên giảm bệnh ở các bệnh nhân sử dụng vedolizumab cao hơn các bệnh nhân sử dụng giả dược, trong đó có cả các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng kháng TNF trước đó và các bệnh nhân không tiếp xúc với kháng TNF trước đó. Trong các phân tích sơ bộ cho đến tuần thứ 6, tỷ lệ các trường hợp bất lợi (adverse event - AE), trường hợp bất lợi nghiêm trọng, và các trường hợp bất lợi dẫn đến việc ngừng nghiên cứu ở nhóm giả dược cao hơn nhóm vedolizumab. Tỷ lệ bệnh nhân dùng vedolizumab đạt được sự thuyên giảm lâm sàng, lành niêm mạc, và thuyên giảm không sử dụng corticosteroid ở 52 tuần và đáp ứng bền và sự thuyên giảm bệnh cao hơn đáng kể so với các bệnh nhân sử dụng giả dược (Bảng 33). 32% nhóm nghiên cứu duy trì đáp ứng thất bại trong việc điều trị bằng kháng TNF α trước đó. Sự thuyên giảm lâm sàng và tỷ lệ đáp ứng lâm sàng bền ở vedolizumab là cao hơn đáng kể so với giả dược ở cả bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng TNF và các bệnh nhân chưa từng sử dụng TNF. Trong nhóm an toàn (N=895) đối với các tuần 0 đến 52, tỷ lệ trường hợp bất lợi (AE), AE nghiêm trọng, và nhiễm khuẩn nghiêm trọng giữa các nhóm vedolizumab và giả dược là tương tự nhau. Không quan sát thấy sự gia tăng về tỷ lệ nhiễm khuẩn cơ hội hoặc nhiễm khuẩn ruột ở nhóm vedolizumab.

Bảng 32: Kết quả nghiên cứu cảm ứng — Điểm cuối sơ bộ và điểm cuối phụ then chốt

Các điểm cuối hiệu quả	Giả dược	Vedolizumab	Chênh lệch/RR	Trị số P
Đáp ứng lâm sàng (%)	25,5%	47,1%	21,7%/1,8	<0,0001
Thuyên giảm lâm sàng (%)	5,4%	16,9%	11,5%/3,1	0,0010
Lành niêm mạc (%)	24,8%	40,9	16,1%/1,6	0,0013

Bảng 33: Kết quả nghiên cứu duy trì đáp ứng — Điểm cuối sơ bộ và điểm cuối phụ then chốt

Các điểm cuối hiệu quả	Giả dược N=126	VDZ Q8 N=122	VDZ Q4 N=125	Chênh lệch/RR Q8 so với Pb Q4 so với Pb	Trị số P
Sự thuyên giảm lâm sàng (%)	15,9	41,8	44,8	26,1/2,7 29,1/2,8	<0,0001 <0,0001
Đáp ứng bền (%)	23,8	56,6	52,0	32,8/2,4 28,5/2,2	<0,0001 <0,0001
Lành niêm mạc (%)	19,8	51,6	56,0	32,0/2,6 36,3/2,8	<0,0001 <0,0001
Sự thuyên giảm bền (%)	8,7	20,5	24,0	11,8/2,4 15,3/2,8	0,0090 0,0011
Sự thuyên giảm không dùng corticosteroid (%)	13,9 n=72	31,4 n=70	45,2 N=73	17,6/2,3 31,4/3,3	0,0133 <0,0001

Bảng 34: Nghiên cứu gây đáp ứng: Đáp ứng lâm sàng và thuyên giảm tại thời điểm 6 tuần ở các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó và các bệnh nhân không tiếp xúc với kháng TNF, nhóm ITT

Các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (39%)				
Điểm cuối	Giả dược N=63	Vedolizumab N=82	Chênh lệch	95% CI
Đáp ứng lâm sàng (%)	20,6	39,0	18,4	3,9, 32,9
Thuyên giảm lâm sàng (%)	3,2	9,8	6,6	-9,8, 22,8
Các bệnh nhân không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α (55%)				
	Giả dược N=76	Vedolizumab N=130	Chênh lệch	95% CI
Đáp ứng lâm sàng (%)	26,3	53,1	26,8	13,7, 39,9
Thuyên giảm lâm sàng (%)	6,6	23,1	16,5	2,4, 30,2

Bảng 35: Thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng lâm sàng bền tại thời điểm 52 tuần: Các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó hoặc không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α , nhóm ITT

Các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (32%)					
Điểm cuối	Giả dược N=38	VDZ Q8Wks N=43	VDZ Q4Wks N=40	Chênh lệch Q8wks so với giả dược Q4 wks so với giả dược	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	5,3	37,2	35,0	31,9 29,7	10,3, 51,4 7,4, 49,4
Đáp ứng lâm sàng bền (%)	15,8	46,5	42,5	30,7 26,7	11,8, 49,6 7,5, 45,9
Các bệnh nhân không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α (60%)					
	Giả dược N=79	VDZ Q8wks N=72	VDZ Q4wks N=73	Chênh lệch Q8wks so với giả dược Q4wks so với giả dược	95% CI

Thuyên giảm lâm sàng (%)	19,0	45,8	47,9	26,8 29,0	12,4, 41,2 14,6, 43,3
Đáp ứng lâm sàng bền (%)	26,6	65,3	56,2	38,7 29,6	24,0, 53,4 14,6, 44,6

Ví dụ 10: Cảm ứng và duy trì đáp ứng và thuyên giảm ở các bệnh nhân mắc bệnh Crohn ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng

Một thử nghiệm bao gồm hai nghiên cứu đa tâm, mù kép, ngẫu nhiên được thiết kế để đánh giá sự cảm ứng và duy trì đáp ứng và sự thuyên giảm ở các bệnh nhân mắc bệnh Crohn ở mức độ từ vừa phải đến nghiêm trọng. Các đặc tính bệnh nhân khẩu học và đường gốc được so sánh trong tất cả các nhóm điều trị.

Nghiên cứu gây đáp ứng, bằng cách dùng qua đường tĩnh mạch, so sánh giả được với vedolizumab, ở liều lượng 300mg được hoàn nguyên từ chế phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp chứa 60mg/ml kháng thể trong 50mM histidin, 125mM arginin, 0,06% polysorbat 80, 10% sucroza, ở độ pH 6,3, với điểm cuối tại thời điểm 6 tuần sau 2 liều vedolizumab.

Nghiên cứu duy trì, bằng cách sử dụng chế phẩm và đường dùng giống với nghiên cứu gây đáp ứng, so sánh giả được với vedolizumab được phân liều bốn tuần một lần, và giả được với vedolizumab được phân liều tám tuần một lần. Điểm cuối của nghiên cứu này là tại thời điểm 52 tuần, phân tích nhóm có đáp ứng cảm ứng.

Bất ngờ là, nghiên cứu này cho thấy rằng các nhóm Q4 và Q8 tuần cho các kết quả rất giống nhau. Tóm tắt về các đáp ứng của các nghiên cứu gây và duy trì đáp ứng được thể hiện trong các bảng 36 đến 39. Tỷ lệ bệnh nhân được điều trị bằng vedolizumab đạt được sự thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng gia tăng cao hơn đáng kể so với tỷ lệ bệnh nhân dùng giả được (Bảng 36). Tỷ lệ thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng gia tăng ở các bệnh nhân sử dụng vedolizumab cao hơn các bệnh nhân sử dụng giả được trong số cả các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng kháng TNF trước đó và các bệnh nhân không tiếp xúc với kháng TNF trước đó. Tỷ lệ các trường hợp bất lợi (AE), AE nghiêm trọng, và nhiễm khuẩn nghiêm trọng giữa các nhóm vedolizumab

và các nhóm giả dược là tương tự nhau. Không quan sát thấy sự gia tăng về nhiễm khuẩn cơ hội hoặc nhiễm khuẩn ruột ở nhóm vedolizumab.

Bảng 36: Kết quả nghiên cứu gây đáp ứng — Điểm cuối sơ bộ và điểm cuối phụ

Các điểm cuối	Giả dược N=148	Vedolizumab N=220	Chênh lệch được điều chỉnh/RR	Trị số P
Thuyên giảm lâm sàng (%)	6,8%	14,5%	7,8%/2,1	0,0206
Đáp ứng gia tăng (%)	25,7%	31,4%	5,7%/1,2	0,2322
Thay đổi CRP trung bình (µg/ml)	-3,6 N=147	-2,9 N=220		0,9288

Bảng 37: Kết quả nghiên cứu duy trì đáp ứng — Điểm cuối sơ bộ và điểm cuối phụ then chốt

Các điểm cuối hiệu quả	Giả dược N=153	VDZ Q8 N=154	VDZ Q4 N=154	Chênh lệch được điều chỉnh/RR Q8 so với Pb Q4 so với Pb	Trị số P
Thuyên giảm lâm sàng (%)	21,6	39,0	36,4	17,4/1,8 14,7/1,7	0,0007 0,0042
Đáp ứng gia tăng (%)	30,1	43,5	45,5	13,4/1,4 15,3/1,5	0,0132 0,0053
Thuyên giảm không dùng corticosteroid (%)	15,9 N=82	31,7 N=82	28,8 N=80	15,9/2,0 12,9/1,8	0,0154 0,0450
Thuyên giảm bền (%)	14,4	21,4	16,2	7,2/1,5 2,0/1,1	0,1036 0,6413

Bảng 38: Thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng gia tăng tại thời điểm 6 tuần ở các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó và không tiếp xúc với kháng TNF trước đó, nhóm ITT

Các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (48%)				
Điểm cuối	Giả dược N=70	Vedolizumab N=105	Chênh lệch	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	4,3	10,5	6,2	(-9,1, 21,3)
Đáp ứng gia tăng (%)	22,9	23,8	1,0	(-11,8, 13,7)
Các bệnh nhân không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (50%)				
	Giả dược N=76	Vedolizumab N=130109	Chênh lệch	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	9,2	17,4	8,2	(-1,4, 17,9)
Đáp ứng gia tăng (%)	30,3	42,2	11,9	(-1,9, 25,8)

Bảng 39: Thuyên giảm lâm sàng và đáp ứng gia tăng tại thời điểm 52 tuần: Các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó hoặc không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α trước đó, nhóm ITT

Các bệnh nhân thất bại trong việc điều trị bằng chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (51%)					
Điểm cuối	Giả dược N=78	VDZ Q8Wks N=82	VDZ Q4Wks N=77	Chênh lệch Q8wks so với giả dược Q4 wks so với giả dược	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	12,8	28,0	27,3	15,2 14,5	(3,0, 27,5) (2,0, 26,9)
Đáp ứng gia tăng (%)	20,5	29,3	37,7	8,8 17,1	(-4,6, 22,1) (3,1, 31,2)
Các bệnh nhân không tiếp xúc với chất đối kháng kháng TNF- α trước đó (45%)					

	Giả được N=71	VDZ Q8wks N=66	VDZ Q4wks N=71	Chênh lệch Q8wks so với giả được Q4wks so với giả được	95% CI
Thuyên giảm lâm sàng (%)	26,8	51,1	46,5	24,8 19,7	(8,9, 40,6) (4,2, 35,2)
Đáp ứng gia tăng (%)	38,0	60,6	53,5	22,6 15,5	(6,3, 38,9) (-0,7, 31,7)

Bảng 40: Tóm tắt trình tự

SEQ ID NO	Trình tự được thể hiện	Mô tả
1	Hình 1	ADN mã hoá chuỗi nặng của globulin miễn dịch kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người
2	Hình 1	Trình tự axit amin của chuỗi nặng của globulin miễn dịch kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người
3	Hình 2	ADN mã hoá chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người
4	Hình 2	Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm giống của người
5	Hình 3	Chuỗi nhẹ trưởng thành được làm giống của người của LDP-02
6	Hình 4	Vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa chung của người
7	Hình 4	Vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa chung của chuột
8	được viện dẫn ở trang 30 SYWMH	CDR1 của chuỗi nặng của kháng thể ACT-1 ở chuột nhất
9	được viện dẫn ở trang 30	CDR2 của chuỗi nặng của kháng thể ACT-1 ở chuột nhất

	EIDPSESNTNYNQKF KG	
10	được viện dẫn ở trang 30 GGYDGWDYAIDY	CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể ACT-1 ở chuột nhắt
11	được viện dẫn ở trang 30 RSSQSLAKSYGNTYLS	CDR1 của chuỗi nhẹ của kháng thể ACT-1 của chuột nhắt
12	được viện dẫn ở trang 31 GISNRFS	CDR2 của chuỗi nhẹ của kháng thể ACT-1 của chuột nhắt
13	được viện dẫn ở trang 31 LQGTHQPYT	CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể ACT-1 của chuột nhắt
14	Hình 7	vùng biến đổi kappa trên chuỗi nhẹ ở kháng thể GM607 CL của người
15	Hình 7	vùng biến đổi trên chuỗi nặng kháng thể 21/28 CL của người

Mặc dù sáng chế được thể hiện cụ thể và được mô tả có viện dẫn đến các phương án ưu tiên của nó, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có thể thực hiện các thay đổi khác nhau về hình thức và chi tiết đối với các phương án này mà không đi chệch khỏi phạm vi của sáng chế được bao hàm bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm ổn định chứa sucroza, ít nhất khoảng 120 mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, và arginin, trong đó dược phẩm này là dược phẩm được đông khô, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất 50% dạng đồng chức năng chính của kháng thể như được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (CEX), trong đó tỷ lệ mol của sucroza so với kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) là ít nhất khoảng 650:1, trong đó tỷ lệ mol arginin so với kháng thể (mol:mol) là lớn hơn 250:1, và trong đó kháng thể này được làm cho có đặc tính giống người, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa vùng quyết định bổ cứu 1 (CDR1) nêu trong SEQ ID NO: 8, CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 9, và CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 10, và chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 11, CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 12, và CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 13.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này còn chứa chất đệm.
3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó chất đệm này là histidin.
4. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này còn chứa chất hoạt động bề mặt.
5. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất khoảng 5% đến khoảng 10% kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ trước khi đông khô.
6. Dược phẩm ổn định chứa sucroza, ít nhất khoảng 120 mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, histidin, arginin, và polysorbat 80, trong đó dược phẩm này là dược phẩm được đông khô, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất 50% dạng đồng chức năng chính của kháng thể như được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (CEX), trong đó tỷ lệ mol của sucroza so với kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) là ít nhất khoảng 650:1, trong đó tỷ lệ mol của histidin và arginin so với kháng thể (mol:mol) là từ khoảng 200:1 đến khoảng 500:1 và trong đó kháng thể này được làm cho có đặc tính giống người, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa vùng quyết định bổ cứu 1 (CDR1) nêu trong SEQ ID NO: 8, CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 9, và CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 10, và chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 11, CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 12, và CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 13.
7. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể này là vedolizumab.

8. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó kháng thể này là vedolizumab.
9. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các axit amin từ 20 đến 131 của SEQ ID NO: 4.
10. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này ở trong lọ, và lọ chứa khoảng 300 mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.
11. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó lượng histidin là từ 3% đến 6% (khối lượng/khối lượng dược phẩm khô).
12. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này ổn định ở nhiệt độ 25°C và độ ẩm tương đối (RH) 60% trong ít nhất 12 tháng.
13. Dược phẩm ổn định chứa từ 45% đến 55% sucroza (khối lượng/khối lượng dược phẩm khô), ít nhất khoảng 240 mg kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ được làm cho có đặc tính giống người, histidin, từ khoảng 10% đến khoảng 15% khối lượng/khối lượng là arginin, và polysorbat 80, trong đó dược phẩm này là dược phẩm được đông khô, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất 50% dạng đồng chức năng chính của kháng thể như được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (CEX), và trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các axit amin từ 20-131 của SEQ ID NO: 4, và vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 2.
14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó kháng thể này là vedolizumab.
15. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó tỷ lệ sucroza so với kháng thể là ít nhất 700:1.
16. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó dược phẩm này chứa 300 mg kháng thể.
17. Chế phẩm lỏng, hoàn nguyên chứa từ khoảng 50 mg/ml đến khoảng 80 mg/ml kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, từ khoảng 250 mM đến khoảng 325 mM sucroza, từ khoảng 75 mM đến khoảng 200 mM arginin, từ khoảng 25 mM đến khoảng 150 mM histidin, và từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,1% polysorbat 80, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất 50% dạng đồng chức năng chính của kháng thể như được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (CEX), trong đó kháng thể này là IgG1 và chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các axit amin 20-131 của SEQ ID NO: 4 và vùng biến đổi của

chuỗi nặng chứa các axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 2, và trong đó chế phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến 6,5.

18. Chế phẩm theo điểm 17, trong đó chế phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 6,1 đến 6,5.

19. Chế phẩm theo điểm 17, trong đó kháng thể là vedolizumab.

20. Chế phẩm theo điểm 19, trong đó chế phẩm này chứa 300 mg vedolizumab.

21. Chế phẩm theo điểm 17, trong đó chế phẩm này chứa từ khoảng 25 mM đến khoảng 65 mM histidin.

22. Chế phẩm theo điểm 17, trong đó chế phẩm này chứa từ khoảng 100 mM đến khoảng 150 mM arginin.

23. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa lớn hơn khoảng 13% arginin (khối lượng/khối lượng dược phẩm đông khô) khi lượng protein là khoảng 31% (khối lượng/khối lượng dược phẩm đông khô).

24. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó dược phẩm này chứa lớn hơn khoảng 13% arginin (khối lượng/khối lượng dược phẩm đông khô) khi lượng protein là khoảng 31% (khối lượng/khối lượng dược phẩm đông khô).

25. Chế phẩm theo điểm 17, trong đó chế phẩm này chứa lớn hơn khoảng 13% arginin (khối lượng/khối lượng chế phẩm đông khô) khi lượng protein là khoảng 31% (khối lượng/khối lượng chế phẩm đông khô).

26. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các axit amin từ 20 đến 131 của SEQ ID NO: 4.

27. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất khoảng 25% (theo khối lượng) kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$.

28. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất 55% dạng đồng chức năng chính của kháng thể như được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (CEX).

29. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó dược phẩm này có độ pH từ khoảng 5,5 đến 6,5

khi hoàn nguyên.

30. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó dược phẩm này có độ pH từ khoảng 5,5 đến 6,5 khi hoàn nguyên.

31. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể là IgG1.

32. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó kháng thể là IgG1.

33. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó kháng thể là IgG1.

34. Chế phẩm chứa liều 300mg vedolizumab với nồng độ vedolizumab là 60mg/ml trong 50mM histidin, 125mM arginin, 0,06% polysorbat 80, 10% sucroza ở độ pH=6,3 được hoàn nguyên từ chế phẩm đông khô.

35. Chế phẩm theo điểm 34, trong đó chế phẩm đông khô có $\geq 55\%$ dạng đồng chức năng chính.

36. Chế phẩm theo điểm 34, trong đó chế phẩm đông khô có $\geq 95\%$ kháng thể dạng monome.

37. Chế phẩm theo điểm 34, trong đó chế phẩm đông khô có $\leq 2,5\%$ chất kết tụ.

HÌNH 1A

Chuỗi nặng LDP02 của ADN - chứa các vị trí tách dòng (chữ thường), trình tự Kozak (chữ in) và trình tự dẫn (chữ thường)

```
gaattcggagatcgaCTCAcCAtgggagggagctgatactctctcttgtagcaacagctacagggtgccaccccag
gigCAATTGGTGCAgTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAgCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCTGCAAGGGTCTGCTACACCTTCACcAGCTACTGGATGCATTGGG
TGAGGCAGGCGCTGGCCAAcGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAACTACAATCAAAATTCAGGGACGGTCACATTGACT
GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGCCCTGGGCTGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAACTCAGGGCCCTGACCAGGGCGTGcACACCTTCCCCGGC
TGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCcAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC
ACATGCCCAOCGTGCCcAGCAcCTGAACCTCGGGGGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAAGACAAGCCGCGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCCACCA
GGACTGGCTGAATGGC
```

AAGGAGTACAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAGCCAAGGCCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCT
 GCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGCTGCTGACTCCGACGGCTC
 CTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAtaatctagaca

Chuỗi nặng LDP02 mới của protein (khoảng cách giữa VHL, VH và IgG1-FcRmut của người)

MGWSCIIILFLVATATGVHS
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFSTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGRIDP
 SESNTNYNQKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLSRSEDTAVYYCARGGYDGDWDY
AIDYWGQGTLLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELAGAPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

HÌNH 1B

HÌNH 2

Chuỗi nhẹ LDP02 của ADN - chứa các vị trí tách dòng (chữ thường), trình tự Kozak (chữ in) và trình tự dẫn (chữ thường)

```
gaattcgaagatcgaTCACCaaggaggagctgtatcatctctcttctgtagcaacagctacagggtccactccgat
GTAGTGATGACTCAAAGTCCACTCTCCCTGCCCTGTCACCCCTGGAGAACACAGC
TTCTATCTCTTGCAAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAGAGTTATGGGAACACCT
ATTTGTCTTGGTACCTGCAGAAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
GGGATTTCCACACAGATTTCTGGGTGCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGTT
CAGGACAGATTTCACACTCAAGATCTCGGAGTAGAGGTGAGGCTGAGGACGTGGG
AGTGTTACTGCTTACAAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTCGGACAGGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAATCTGGAATGCTCTGTGTGCTGCTGCTGA
ATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAATCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCCTGCCGAAGTCACCCATCAGGCCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagtctagagcagc
```

Chuỗi nhẹ LDP02 mới của protein (khoảng cách giữa VKL, VK và c Kappa của người)

```
MGWSCIIILFLVATAIGVHS
DVVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLOKPGQSPQLLIYGI
SNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQPYTFGQGTKVEI
K
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSITYSLSSLTSLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

HÌNH 3

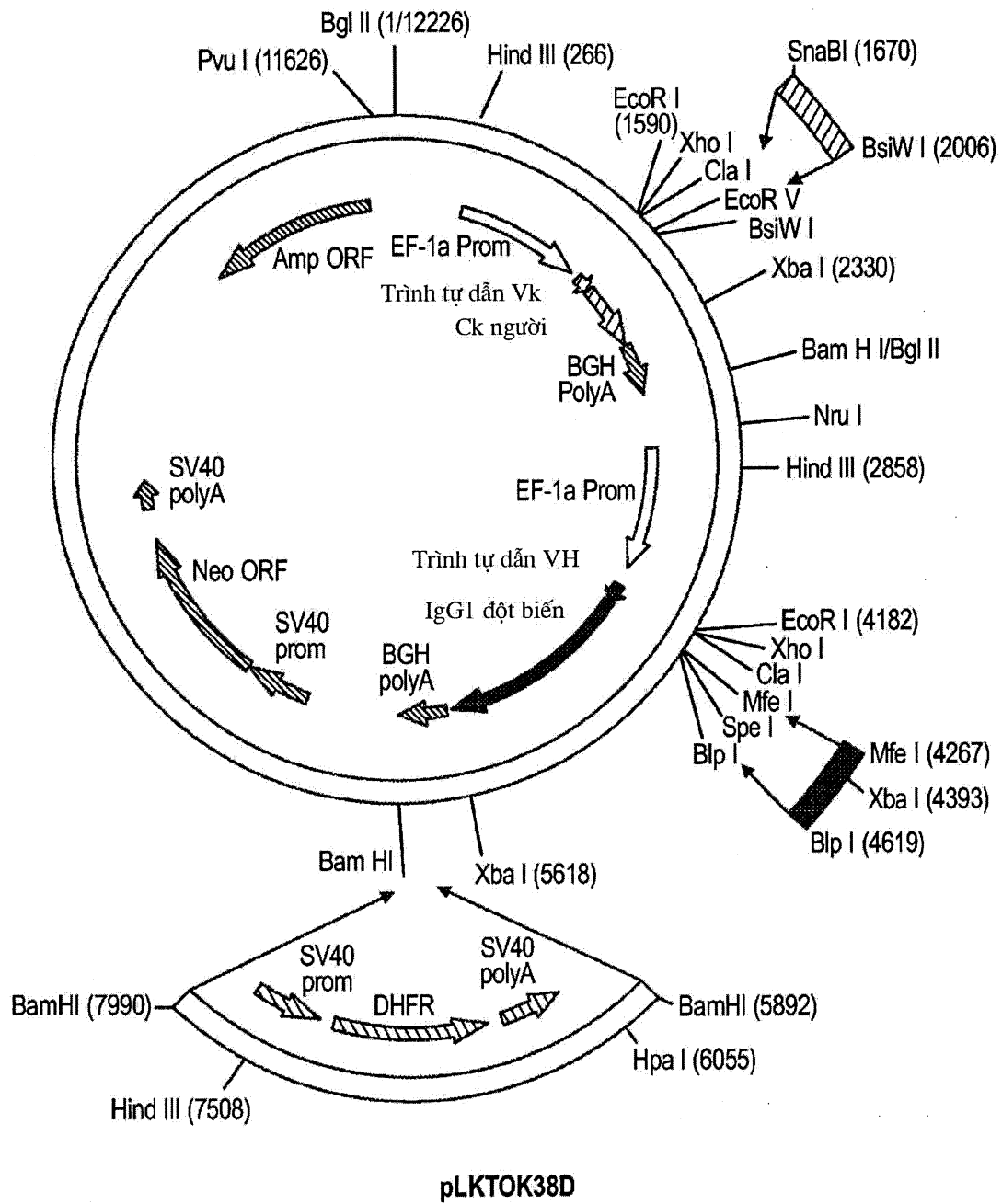
	So sánh cặp đôi MLN02 mới - không sig	LDP-02-không sig.txt	
A 1	DVVMTQSPLSLPTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ	50	
B 1	DVVMTQSPLSLPTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ	50	
51	LLIYGISNRFSGVDPDRFSGSGGTFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGT HQP	100	
51	LLIYGISNRFSGVDPDRFSGSGGTFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGT HQP	100	
101	YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAK	150	
101	YTFGQGTKVEIKRADAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAK	150	
151	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACE	200	
151	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACE	200	
201	VTHQGLSSPVT KSFNRGEC	219	
201	VTHQGLSSPVT KSFNRGEC	219	

HÌNH 4

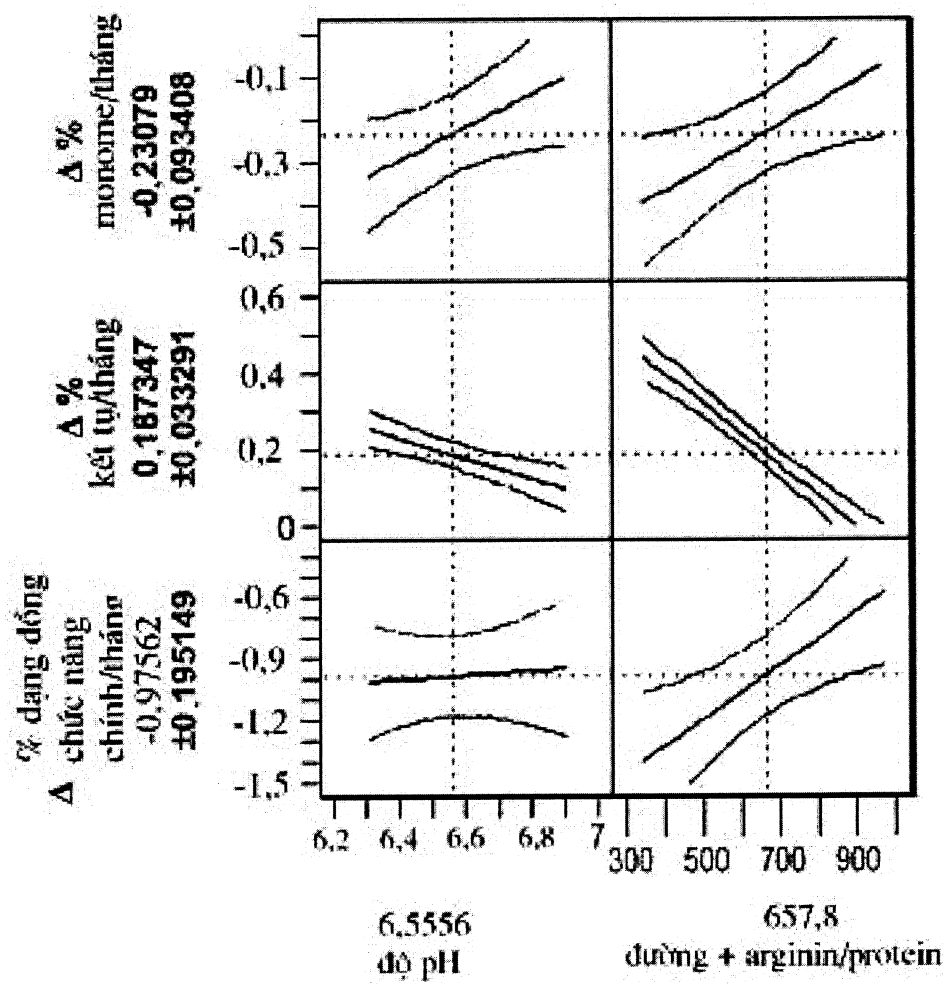
So sánh cặp đôi hàng số kappa ở người MI: hàng số kappa ở loài gặm nhấm.txt

```
A 1 rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsg 50
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
B 1 radaaptvsiifppsseqltsggasvvcllnnfypkdinvkwidgserqn 50
.   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .
51 nsqesvteqdkdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtk 100
| :|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
51 gvlnswtddqdkdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivk 100

101 sfnrgec 107
|   |   |   |
101 sfnrnec 107
```

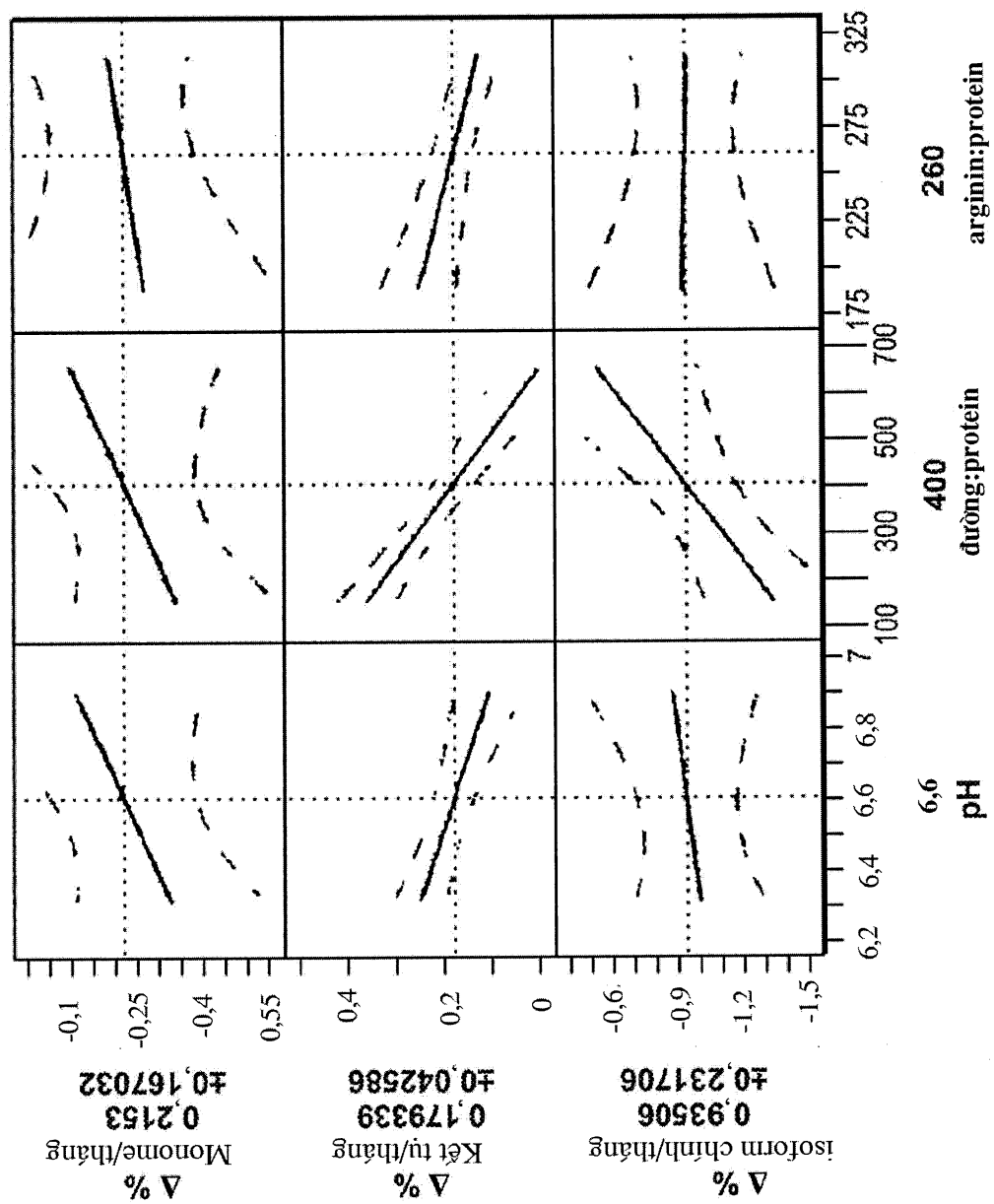


HÌNH 5



HÌNH 6A

Profin dự đoán



HÌNH 6B

vùng biến đổi thuộc chuỗi nhẹ
kappa ở kháng thể GM607'Cl

SEQ ID NO: 14

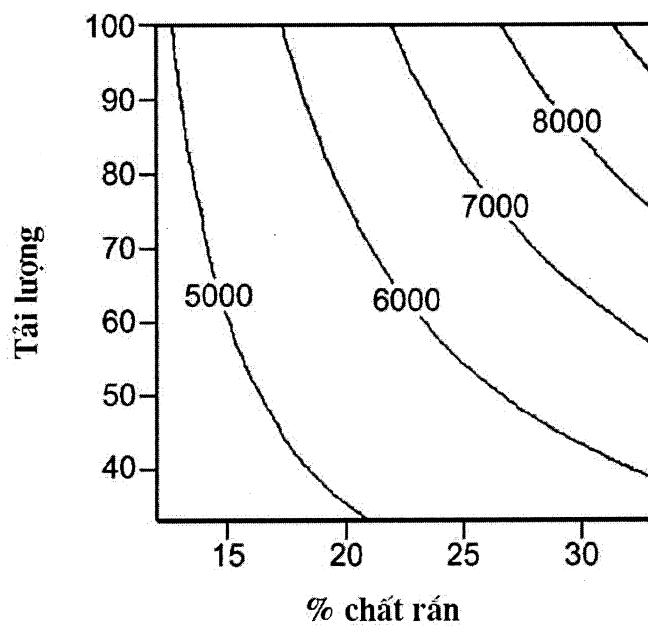
HÌNH 7

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

vùng biến đổi trên chuỗi nặng
ở kháng thể 21/28'CL

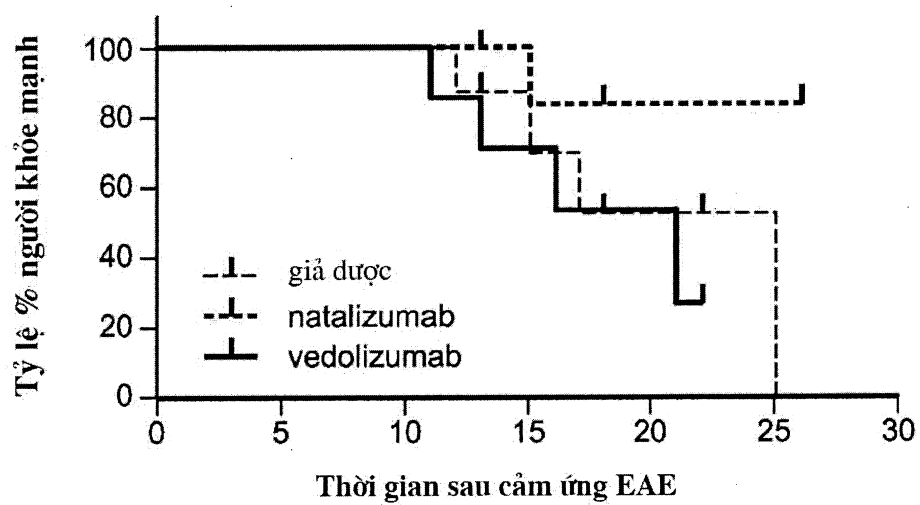
SEQ ID NO: 15

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



HÌNH 8

Khởi phát triệu chứng lâm sàng đầu tiên



HÌNH 9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> DƯỢC PHẨM VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG $\alpha 4\beta 7$

<130> 079259-0615

<140>

<141>

<150> 61/585,859

<151> 2012-01-12

<150> 61/550,545

<151> 2011-10-24

<150> 61/481,533

<151> 2011-05-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1445

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 1

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa
60

cagctacagg tgtccactcc caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gttaagaagc
120

ctggggcttc agtgaaggtg tcctgcaagg gttctggcta caccttcacc agctactgga
180

tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gtctagagtg gatcggagag attgatcctt
240

ctgagagtaa tactaactac aatcaaaaat tcaagggacg cgtcacattg actgtagaca
300

tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct
360

actattgtgc aagaggggggt tacgacggat gggactatgc tattgactac tgggggtcaag
420

gcaccctggt caccgtcagc tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccttggcac
480

cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact
540

tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct
600

```

tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct
660
ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca
720
aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc
780
cagcacctga actcgcgggg gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca
840
ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag
900
accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca
960
agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc
1020
accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag
1080
cccccacga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca
1140
ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtca
1200
aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca
1260
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc
1320
tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg
1380
aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataatcta
1440
gagca
1445

```

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 2

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10          15

```

```

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20          25          30

```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 3

<211> 751

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 3

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa
60

```

cagctacagg  tgtccactcc  gatgtagtga  tgactcaaag  tccactctcc  ctgcctgtca
120
cccctggaga  accagcttct  atctcttgca  ggtctagtca  gagtcttgca  aagagttatg
180
ggaacaccta  tttgtcttgg  tacctgcaga  agcctggcca  gtctccacag  ctctcatct
240
atgggatttc  caacagattt  tctgggggtgc  cagacagggt  cagtggcagt  gggttcaggga
300
cagatttcac  actcaagatc  tcgcgagtag  aggctgagga  cgtgggagtg  tattactgct
360
tacaaggtac  acatcagccg  tacacgttcg  gacaggggac  caaggtggag  atcaagcgta
420
cgttggtgc  accatctgtc  ttcattcttc  cgccatctga  tgagcagttg  aaatctggaa
480
ctgcctctgt  tgtgtgcctg  ctgaataact  tctatcccag  agaggccaaa  gtacagtgga
540
aggtggataa  cgccctccaa  tcgggtaact  cccaggagag  tgtcacagag  caggacagca
600
aggacagcac  ctacagcctc  agcagcaccc  tgaccctgag  caaagcagac  tacgagaaac
660
acaaagtcta  cgctgcgaa  gtcacccatc  agggcctgag  ctcgcccgtc  acaaagagct
720
tcaacagggg          agagtgttag          tctagagcag          c
751

```

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 4

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10          15

```

```

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30

```

```

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
          35          40          45

```

```

Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
          50          55          60

```

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 5

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 5

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile 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 Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 6
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

26192

35

40

45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 7
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 8
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 9
 Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 10
 Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 11
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 12
 Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 13
 Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 14
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 15

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 Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115