



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

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



1-0027891

(51)⁷ A61K 39/395; C07K 16/28; A61K 9/00; (13) B
A61K 47/18; A61K 47/26

(21) 1-2015-00751 (22) 11/06/2013
(86) PCT/IB2013/054777 11/06/2013 (87) WO2013/186700 19/12/2013
(30) 61/658,472 12/06/2012 US
(45) 25/04/2021 397 (43) 25/08/2015 329A
(73) NOVARTIS AG (CH)
Lichtstrasse 35, CH-4056, Basel, Switzerland
(72) Marta COSENZA (IT); Christoph STARK (DE).
(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) CHẾ PHẨM DẠNG NƯỚC, DỤNG CỤ PHÂN PHỐI VÀ ỐNG TIÊM ĐÃ ĐƯỢC
LÀM ĐẦY SẴN CHỨA CHẾ PHẨM DẠNG NƯỚC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dạng nước, cụ thể là các kháng thể kháng BAFFR được bào chế ở dạng chế phẩm lỏng chứa hoạt chất kháng thể ở nồng độ cao để phân phối đến bệnh nhân mà không gây kết tụ kháng thể ở mức cao. Dược phẩm dạng nước có thể chứa một hoặc nhiều đường, tác nhân đệm, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc axit amin tự do. Sáng chế còn đề cập đến dụng cụ phân phối chứa chế phẩm dạng nước và ống tiêm đã được làm đầy sẵn chứa chế phẩm dạng nước.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm dạng nước, cụ thể là chế phẩm dạng nước chứa kháng thể kháng BAFFR (thụ thể BAFF). Sáng chế còn đề cập đến dụng cụ phân phối chứa chế phẩm dạng nước và ống tiêm đã được làm đầy sẵn chứa chế phẩm dạng nước.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cặp BAFFR:BAFF có liên quan mật thiết đến sự trưởng thành của các tế bào B chuyển tiếp, sự sống sót và hoạt hóa của các tế bào B trưởng thành, và chuyển đổi nhóm isotyp để đáp lại các kháng nguyên phụ thuộc tế bào T. BAFF và thụ thể BAFFR của nó cũng quan trọng đối với sự sống sót và sinh trưởng của các tế bào B ác tính. Ngoài ra, BAFFR thường không được biểu hiện trên các tế bào tiền thân của tế bào B, nhưng gần đây người ta đã chỉ ra là BAFFR được biểu hiện ở các tế bào ALL (bạch cầu lympho bào cấp tính dòng B – B lineage acute lymphoblastic leukemia) ở người (Parameswaran, 2010, *Cancer Res.* 70(11) 4346-4356). Việc loại bỏ tế bào B tự phản ứng và phong tỏa sự sống sót/sự hoạt hóa không thích hợp nhờ lượng dư BAFF ở các bệnh nhân mắc các rối loạn tự miễn hoặc bệnh ung thư là đích điều trị đã được công nhận. Do đó, kháng thể kháng BAFFR, cụ thể là kháng thể có khả năng gây độc tính đối với tế bào gián tiếp qua tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) và phong tỏa phối tử liên kết với BAFFR có thể là tác nhân điều trị bệnh hữu hiệu đối với các bệnh tự miễn và các khối u tân tạo tế bào B.

Các kháng thể kháng BAFFR đã được biết từ WO 2010/007082 chẳng hạn và bao gồm các kháng thể được đặc trưng ở chỗ chứa miền V_H có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1 và miền V_L có trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2. Kháng thể MOR6654 là một kháng thể như vậy (IgG1 kappa). Kháng thể này có trình tự axit amin của chuỗi nặng được thể hiện bằng SEQ ID NO: 9 và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng SEQ ID NO: 10. Kháng thể này có thể được biểu hiện từ SEQ ID NO: 14 và 15, tốt hơn là trong tế bào chủ không có mặt fucosyl-transferaza, ví dụ, trong dòng tế bào của động vật có vú chứa gen FUT8(-/-) bất hoạt, để tạo ra kháng thể chức năng kháng BAFFR không được fucosyl hóa với

ADCC được tăng cường. Kháng thể này trong bản mô tả này được gọi là MOR6654B. Các cách khác để tạo ra các kháng thể không được fucosyl hóa là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các kháng thể có tác dụng điều trị bệnh thường được bào chế ở dạng dung dịch nước dùng ngay để dùng ngoài đường tiêu hóa hoặc ở dạng đông khô để hoàn nguyên bằng chất pha loãng thích hợp trước khi dùng.

Đơn quốc tế số PCT/EP2011/072248 bộc lộ dạng đông khô, mà có thể được hoàn nguyên để tạo ra dung dịch với hoạt chất kháng thể ở nồng độ cao và sự kết tụ kháng thể ở mức thấp để phân phối đến bệnh nhân. Nồng độ cao của kháng thể có thể được sử dụng do chúng làm giảm thể tích liều mà phải được phân phối đến bệnh nhân. Thể tích liều đã giảm làm giảm đến mức tối thiểu thời gian cần thiết để phân phối liều cố định đến bệnh nhân.

Tuy nhiên, các dược phẩm đã được bào chế chứa kháng thể ở nồng độ cao có thể có thời hạn bảo quản ngắn và các kháng thể đã được bào chế có thể bị mất hoạt tính sinh học do tính không ổn định về mặt hóa học và vật lý trong khi bảo quản. Trong số đó, sự kết tụ, khử amit hóa và oxy hóa được biết là các nguyên nhân phổ biến nhất gây ra sự thoái biến kháng thể. Ngoài ra, sự kết tụ có thể có khả năng dẫn đến gia tăng đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân, dẫn đến mối bận tâm về tính an toàn. Do đó, sự kết tụ kháng thể trong các dược phẩm cần phải được giảm đến mức tối thiểu hoặc được phòng ngừa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm dạng nước, dụng cụ phân phối chứa chế phẩm dạng nước, xiranh đã nạp chứa chế phẩm dạng nước nhằm khắc phục các nhược điểm trong các giải pháp kỹ thuật đã biết.

Cụ thể là, một mục đích của sáng chế là tạo ra các dược phẩm khác và dược phẩm cải tiến chứa các kháng thể kháng BAFFR, được bào chế sao cho cho phép các kháng thể kháng BAFFR có mặt ở nồng độ cao đồng thời không hoặc hầu như không kết tụ kháng thể.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là tạo ra chế phẩm kháng thể kháng BAFFR thích hợp để dùng dưới da. Lợi ích của việc tiêm dưới da là ở chỗ nó cho phép chuyên viên y tế thực hiện việc tiêm theo cách can thiệp khá nhanh đối với bệnh nhân. Ngoài ra, bệnh nhân có thể được huấn luyện để tự thực hiện việc tiêm dưới da.

Mục đích này đạt được nhờ các dược phẩm dạng nước theo sáng chế.

Các dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa các kháng thể kháng BAFFR ở nồng độ cao, nhưng không chứa hoặc về cơ bản không chứa các kháng thể kết tụ và vì vậy đặc biệt thích hợp để dùng dưới da.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các chế phẩm dạng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và chứa

- (i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ nằm trong khoảng từ 18mg/ml đến 165mg/ml, và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,
- (ii) chất làm ổn định,
- (iii) tác nhân đệm,
- (iv) chất hoạt động bề mặt, và, tùy ý,
- (v) axit amin.

Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5 và chứa

- (i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ nằm trong khoảng từ 18mg/ml đến 165mg/ml, và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,
- (ii) sucroza, trehaloza hoặc manitol làm chất làm ổn định,
- (iii) histidin, xitrat hoặc succinat làm tác nhân đệm,
- (iv) polysorbate 20, poloxame 188 hoặc hydroxypropyl-b-xyclodextrin làm chất hoạt động bề mặt, và, tùy ý,
- (v) arginin làm axit amin.

Theo một phương án, chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau chứa kháng thể kháng BAFFR ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20mg/ml đến 150mg/ml, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 80mg/ml đến 150mg/ml, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 100mg/ml đến 150mg/ml.

Theo một phương án, chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau chứa đường làm chất làm ổn định, đặc biệt là sucroza, manitol hoặc trehaloza, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 80mM đến 300mM, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 120mM đến 270mM, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 120mM đến 220mM.

Theo một phương án, chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau chứa chất hoạt động bề mặt, đặc biệt là polysorbate 20 hoặc poloxame 188, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,1%, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 0,02% đến 0,06%.

Theo một phương án, chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau chứa tác nhân đệm, đặc biệt là histidin, xitrat hoặc succinat, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5mM đến 50mM, đặc biệt là ở nồng độ nằm trong khoảng từ 15mM đến 25mM, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 18mM đến 22mM, đặc biệt là 20mM.

Theo một phương án, chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau còn chứa axit amin, đặc biệt là arginin hoặc arginin-HCl, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2mM đến 80mM.

Theo một phương án, chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau chứa sucroza hoặc trehaloza ở nồng độ nằm trong khoảng từ 110mM đến 250mM.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5 và chứa

(i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ nằm trong khoảng từ 18mg/ml đến 165mg/ml, và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1,

CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,

- (ii) 80mM đến 300mM sucroza, trehaloza hoặc manitol làm chất làm ổn định,
- (iii) 5mM đến 50mM histidin, xitrat hoặc succinat làm tác nhân đệm,
- (iv) 0,01% đến 0,1% polysorbate 20 hoặc poloxame 188, hoặc 1mM đến 3mM hydroxypropyl-b-xyclodextrin làm chất hoạt động bề mặt, và tùy ý,
- (v) 2mM đến 80mM arginin, đặc biệt là arginin-HCl.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5 chứa

- (i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ nằm trong khoảng từ 20mg/ml đến 150mg/ml và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,
- (ii) 110mM đến 250mM sucroza hoặc trehaloza làm chất làm ổn định,
- (iii) 15mM đến 25mM histidin, xitrat hoặc succinat làm tác nhân đệm,
- (iv) lên đến 0,02% đến 0,06% polysorbate 20 hoặc poloxame 188 hoặc 2mM đến 3mM hydroxypropyl-b-xyclodextrin làm chất hoạt động bề mặt, và tùy ý,
- (v) 2mM đến 80mM arginin, đặc biệt là arginin-HCl.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5 và chứa

- (i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ nằm trong khoảng từ 20mg/ml đến 150mg/ml và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,
- (ii) 120mM đến 220mM sucroza hoặc trehaloza làm chất làm ổn định,
- (iii) 18mM đến 22mM histidin, xitrat hoặc succinat làm tác nhân đệm,
- (iv) lên đến 0,02% đến 0,06% polysorbate 20 hoặc poloxame 188 hoặc 2,5mM hydroxypropyl-b-xyclodextrin làm chất hoạt động bề mặt, và tùy ý
- (v) 2mM đến 80mM arginin, đặc biệt là arginin-HCl.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước có độ pH bằng 6,0 và chứa

- (i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ 150mg/ml và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,
- (ii) 220mM sucroza làm chất làm ổn định,
- (iii) 20mM histidin làm tác nhân đệm,
- (iv) 0,04% polysorbate 20 làm chất hoạt động bề mặt.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước có độ pH bằng 6,0 và chứa

- (i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ 150mg/ml và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,
- (ii) 220mM trehaloza làm chất làm ổn định,
- (iii) 20mM histidin làm tác nhân đệm,
- (iv) 0,04% polysorbate 20 làm chất hoạt động bề mặt.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước có độ pH bằng 6,0 và chứa

- (i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ 150mg/ml và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,
- (ii) 120mM sucroza hoặc trehaloza làm chất làm ổn định,
- (iii) 20mM histidin làm tác nhân đệm,
- (iv) 0,04% polysorbate 20 làm chất hoạt động bề mặt, và
- (v) 50mM arginin, đặc biệt là arginin-HCl.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước có độ pH bằng 6,0 và chứa

- (i) kháng thể kháng BAFFR, trong đó kháng thể này có nồng độ 20mg/ml và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8,
- (ii) 220mM sucroza hoặc trehaloza làm chất làm ổn định,
- (iii) 20mM histidin làm tác nhân đệm, và
- (iv) 0,04% polysorbate 20 làm chất hoạt động bề mặt.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau, trong đó kháng thể kháng BAFFR chứa miền V_H với trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và miền V_L với trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án khác của sáng chế, chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau, trong đó kháng thể kháng BAFFR chứa vùng chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 9 và vùng chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án, kháng thể kháng BAFFR là kháng thể kháng BAFFR không được fucosyl hóa.

Sáng chế còn đề xuất dụng cụ phân phối chứa chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau.

Dụng cụ phân phối này có thể được tạo ra ở dạng ống tiêm đã được làm đầy sẵn chứa chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phân phối kháng thể kháng BAFFR ở động vật có vú, bao gồm bước cho động vật có vú đã nêu dùng chế phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau, đặc biệt là ở dạng dụng cụ phân phối như ống tiêm đã được làm đầy sẵn.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm hoặc dụng cụ phân phối, hoặc ống tiêm đã được làm đầy sẵn theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án

khác nhau, để dùng trong việc điều trị bệnh hoặc rối loạn mà được gián tiếp gây ra bởi thụ thể BAFF hoặc có thể điều trị được bằng cách tiêu diệt hoặc làm suy yếu tế bào B.

Cụ thể, chế phẩm hoặc dụng cụ phân phối, hoặc ống tiêm đã được làm đầy sẵn theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau có thể được dùng để điều trị các bệnh tự miễn, khối u tân tạo tế bào B, như u bạch huyết, bệnh bạch cầu hoặc u tủy, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh ban đỏ toàn thân, hội chứng Sjögren hoặc bệnh pemphigut thông thường.

Sáng chế ít nhất một phần dựa trên các đặc tính của các kháng thể đã được bào chế như MOR6654 và MOR6654B, mà chúng duy trì tính ổn định đáng kể và các đặc tính về hoạt tính sinh học khi được bào chế ở nồng độ cao ở dạng chế phẩm lỏng (dạng nước).

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ dược phẩm “dạng nước” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chế phẩm thích hợp để dùng làm thuốc, trong đó chất mang dạng nước là nước cất. Chế phẩm thích hợp để dùng làm thuốc có thể là vô trùng, đồng nhất và/hoặc đẳng trương. Các dược phẩm dạng nước có thể được bào chế một cách trực tiếp ở dạng nước, ví dụ, trong ống tiêm đã được làm đầy sẵn để sử dụng (“các chế phẩm lỏng”) hoặc ở dạng đông khô để được hoàn nguyên ngay trước khi dùng.

Thuật ngữ “dược phẩm dạng nước” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chế phẩm lỏng hoặc chế phẩm đông khô được hoàn nguyên. Theo một số phương án, các dược phẩm dạng nước theo sáng chế là thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng là người. Theo một phương án cụ thể, các dược phẩm dạng nước theo sáng chế là thích hợp để dùng dưới da.

Cụm từ “dùng ngoài đường tiêu hóa” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là cách dùng khác cách dùng trong ruột và dùng khu trú, thường bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm động mạch, nội tủy mạch, trong bao, trong hốc mắt, trong tim, trong da, trong khoang màng bụng, trong khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, ngoài màng cứng và trong xương ức.

Hiện nay, việc sử dụng các kháng thể làm hoạt chất trong dược phẩm là phổ biến, bao gồm các sản phẩm HERCEPTIN™ (trastuzumab), RITUXAN™ (rituximab), SYNAGIS™ (palivizumab), v.v.. Các kỹ thuật để tinh chế các kháng thể điều trị bệnh đến mức tinh khiết để dùng trong dược phẩm là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chế phẩm này thường không gây sốt, ví dụ, mỗi liều chứa <1 EU (đơn vị nội độc tố, đơn vị đo lường tiêu chuẩn), và tốt hơn là mỗi liều chứa $<0,1$ EU. Tốt hơn, nếu chế phẩm này không chứa gluten.

Theo các phương án cụ thể, dược phẩm dạng nước theo sáng chế có lượng kháng thể kết tụ hoặc thoái biến từ thấp đến không thể phát hiện được, với khả năng mất hoạt tính sinh học từ rất thấp đến không mất trong quá trình sản xuất, bào chế, vận chuyển và bảo quản trong thời gian dài, nồng độ của kháng thể kháng BAFFR này ít nhất là khoảng 50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml, 200mg/ml, 250mg/ml, hoặc 300mg/ml.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm dạng nước chứa các kháng thể kháng BAFFR ở nồng độ cao.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã biết rằng các dược phẩm dạng nước có nồng độ cao như vậy có thể được pha loãng trước khi tiêm, ví dụ, khi cần có nồng độ kháng thể thấp hơn để can thiệp điều trị bệnh cụ thể hoặc khi điều trị cho các bệnh nhân có thể trọng thấp hơn, kể cả trẻ nhỏ. Nồng độ thích hợp có thể là 25mg/ml hoặc 10mg/ml. Theo cách khác, chế phẩm gốc có thể được tạo ra với nồng độ thấp hơn như vậy.

Thuật ngữ "kháng thể" được dùng trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể nguyên vẹn và đoạn liên kết kháng nguyên bất kỳ (nghĩa là, "phần liên kết kháng nguyên") hoặc chuỗi đơn của chúng. "Kháng thể" có trong tự nhiên là glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi của chuỗi nặng (trong bản mô tả này được viết tắt là V_H) và vùng ổn định của chuỗi nặng. Vùng ổn định của chuỗi nặng bao gồm ba hoặc bốn miền, tùy theo isotyp, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} và C_{H4} . Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi của chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được gọi tắt là V_L) và vùng ổn

định của chuỗi nhẹ. Vùng ổn định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền, C_L . Vùng V_H và vùng V_L còn có thể chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng xác định tính hỗ trợ (CDR), nằm rải rác với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm ba CDR và bốn FR nằm từ đầu tận cùng amin đến đầu tận cùng carboxy theo trình tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng thay đổi của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ chứa một miền liên kết mà tương tác với kháng nguyên. Các vùng ổn định của các kháng thể có thể làm trung gian cho việc liên kết giữa globulin miễn dịch với mô hoặc các yếu tố vật chủ, bao gồm các tế bào khác nhau thuộc hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu ứng) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ thống bổ thể kinh điển.

Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc đơn giản là "phần kháng nguyên") được dùng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể với chiều dài đầy đủ hoặc một hoặc nhiều đoạn kháng thể mà vẫn có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, một phần của BAFR). Đã chứng minh được rằng chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các đoạn của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các ví dụ về đoạn liên kết được bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm đoạn Fab, đoạn hóa trị một bao gồm các miền V_L , V_H , C_L và C_H1 ; đoạn $F(ab)_2$, đoạn hóa trị hai chứa hai đoạn Fab được liên kết bằng cầu disulfua tại vùng bản lề; đoạn Fd chứa miền V_H và miền C_H1 ; đoạn Fv chứa miền V_L và miền V_H của một nhánh của kháng thể; đoạn dAb (Ward et al., 1989 *Nature* 341:544-546), mà bao gồm miền V_H ; và vùng xác định tính hỗ trợ đã được phân lập (CDR).

Hơn nữa, mặc dù hai miền của đoạn Fv, V_L và V_H được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được kết hợp, bằng cách áp dụng các phương pháp tái tổ hợp, nhờ nhóm liên kết tổng hợp cho phép chúng được tạo ra ở dạng protein mạch đơn trong đó cặp vùng V_L và vùng V_H tạo ra các phân tử hóa trị một (còn được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv); xem tài liệu Bird et al., 1988 *Science* 242:423-426; và Huston et al., 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883 chẳng hạn). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng dự tính được bao hàm trong thuật ngữ "vùng liên kết kháng nguyên" của kháng thể. Các đoạn kháng thể này thu được bằng cách áp dụng các kỹ thuật thông thường

mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, và các đoạn này được sàng lọc để dùng theo cách tương tự như các kháng thể nguyên vẹn.

Thuật ngữ "kháng thể đã được phân lập" được dùng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể hầu như không chứa các kháng thể khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau, ví dụ, kháng thể đã được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với BAFFR của người hầu như không chứa kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu với các kháng nguyên khác không phải BAFFR. Tuy nhiên, kháng thể đã được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với BAFFR có thể có hoạt tính phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như các phân tử BAFFR từ các loài khác. Hơn thế nữa, kháng thể đã được phân lập có thể hầu như không chứa các vật liệu tế bào và/hoặc các hóa chất khác.

Các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm kháng thể đơn dòng" được dùng trong bản mô tả này để chỉ chế phẩm chứa các phân tử kháng thể chỉ có một thành phần phân tử. Chế phẩm kháng thể đơn dòng biểu thị tính đặc hiệu liên kết và ái lực duy nhất đối với một epitop cụ thể.

Thuật ngữ "kháng thể của người" được dùng trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể có các vùng thay đổi, trong đó cả bộ khung và các vùng CDR đều thu được từ các trình tự có nguồn gốc từ người. Hơn thế nữa, khi kháng thể chứa vùng ổn định, thì vùng ổn định này cũng thu được từ các trình tự người như vậy, ví dụ, các trình tự dòng mầm phôi từ người, hoặc thể đột biến của các trình tự dòng mầm phôi từ người hoặc kháng thể chứa các trình tự khung liên ứng thu được từ quá trình phân tích các trình tự khung người, ví dụ, như đã được bộc lộ trong Knappik, et al. (2000. *J Mol Biol* 296, 57-86).

Các cấu trúc và vị trí của miền thay đổi globulin miễn dịch, ví dụ, CDR, có thể được xác định bằng cách sử dụng các sơ đồ đánh số đã biết, ví dụ, sơ đồ đánh số Kabat, sơ đồ đánh số Chothia, kết hợp Kabat và Chothia (AbM), v.v. (xem, ví dụ: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.; Al Lazikani et al. (1997) *J. Mol. Bio.* 273:927-948). Trong toàn bộ bản mô tả này, vùng xác định tính hỗ trợ ("CDR") được

xác định theo định nghĩa của Kabat trừ CDRH1 là đoạn đuôi gồm các axit amin được xác định bằng cách kết hợp cả định nghĩa Kabat và Chothia đối với CDR này.

Các kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào theo cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đột biến điểm *in vitro* hoặc đột biến sinh dưỡng *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể của người" được dùng trong bản mô tả này không được dự định bao gồm các kháng thể mà trong đó các trình tự CDR thu được từ tế bào dòng mầm phôi của loài động vật có vú khác, như chuột, được ghép lên các trình tự khung của người.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng của người" được dùng để chỉ các kháng thể biểu lộ tính đặc hiệu liên kết đơn mà có các vùng thay đổi trong đó cả bộ khung và các vùng CDR đều thu được từ các trình tự của người.

Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp của người" được dùng trong bản mô tả này bao gồm tất cả các kháng thể của người mà được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc được phân lập theo cách tái tổ hợp, như các kháng thể phân lập được từ động vật (ví dụ, chuột) mà được chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể với các gen globulin miễn dịch của người hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó, các kháng thể phân lập được từ tế bào chủ đã được biến nạp để biểu hiện kháng thể của người, ví dụ, từ tế bào biến nạp, các kháng thể phân lập được từ thư viện kháng thể của người tổ hợp, tái tổ hợp, và các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc được phân lập theo các cách bất kỳ khác bao gồm việc cắt ghép tất cả hoặc một phần của gen globulin miễn dịch của người, các trình tự thành các trình tự ADN khác. Các kháng thể tái tổ hợp của người này có các vùng thay đổi, trong đó bộ khung và các vùng CDR thu được từ các trình tự globulin miễn dịch của tế bào dòng mầm phôi của người. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, các kháng thể tái tổ hợp của người này có thể được gây đột biến *in vitro* (hoặc, đột biến sinh dưỡng *in vivo* khi động vật chuyển gen đối với các trình tự Ig của người được sử dụng) và do đó, các trình tự axit amin của các vùng V_H và các vùng V_L của các kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, mặc dù thu được từ và liên quan đến các trình tự V_H và các trình tự V_L của tế bào dòng mầm phôi của người, có thể vốn

không tồn tại trong tự nhiên trong kho các tế bào dòng mầm phôi của kháng thể của người *in vivo*.

Thuật ngữ "isotyp" được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm kháng thể (ví dụ, IgM, IgA, IgD, IgE và IgG như IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4) mà được cung cấp bởi các gen vùng ổn định của chuỗi nặng.

Các thuật ngữ "kháng thể nhận biết kháng nguyên" và "kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên" được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này với thuật ngữ "kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu với kháng nguyên".

Thuật ngữ, kháng thể mà "liên kết một cách đặc hiệu với polypeptit BAFFR" hoặc "kháng thể kháng BAFFR" được dùng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể mà liên kết với polypeptit BAFFR của người có trình tự SEQ ID NO: 13 với K_D bằng 100nM hoặc nhỏ hơn, bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, bằng 1nM hoặc nhỏ hơn. Kháng thể mà "phản ứng chéo với kháng nguyên khác ngoài BAFFR" dùng để chỉ kháng thể mà liên kết với kháng nguyên đó với K_D bằng $0,5 \times 10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, bằng $5 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, hoặc bằng $2 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn. Kháng thể mà "không phản ứng chéo với kháng nguyên cụ thể" được dùng để chỉ kháng thể mà liên kết với kháng nguyên đó với K_D bằng $1,5 \times 10^{-8}M$ hoặc lớn hơn, hoặc K_D bằng 5 đến $10 \times 10^{-8}M$ hoặc $1 \times 10^{-7}M$ hoặc lớn hơn. Theo các phương án nhất định, các kháng thể không phản ứng chéo với kháng nguyên như vậy có khả năng liên kết về cơ bản không thể phát hiện được với các protein này trong các thử nghiệm liên kết tiêu chuẩn.

Theo một phương án, nồng độ cao của kháng thể kháng BAFFR trong được phẩm dạng nước theo sáng chế ít nhất là 50mg/ml. Theo một phương án, nồng độ cao ít nhất là 100mg/ml. Theo một phương án, nồng độ cao ít nhất là 150mg/ml. Theo một phương án, nồng độ cao ít nhất là 200mg/ml. Theo một phương án, nồng độ cao ít nhất là 250mg/ml. Theo một phương án, nồng độ cao ít nhất là 270mg/ml. Theo một phương án, nồng độ cao ít nhất là 300mg/ml.

Theo một phương án, được phẩm dạng nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng BAFFR, ví dụ, MOR6654, đặc biệt là MOR6654B, với lượng nằm trong khoảng từ 50mg/ml đến 300mg/ml.

Theo một phương án, dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng BAFFR, ví dụ, MOR6654, đặc biệt là MOR6654B, với lượng nằm trong khoảng từ 75mg/ml đến 270mg/ml.

Theo một phương án, dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng BAFFR, ví dụ, MOR6654, đặc biệt là MOR6654B, với lượng nằm trong khoảng từ 100mg/ml đến 250mg/ml.

Theo một phương án, dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng BAFFR, ví dụ, MOR6654, đặc biệt là MOR6654B, với lượng nằm trong khoảng từ 100mg/ml đến 200mg/ml.

Theo một phương án, dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa 150mg/ml kháng thể kháng BAFFR, ví dụ, MOR6654, đặc biệt là MOR6654B.

Theo một phương án, dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng BAFFR, ví dụ, MOR6654, đặc biệt là MOR6654B, với lượng 20mg/ml.

Theo một phương án, dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa kháng thể kháng BAFFR, ví dụ, MOR6654, đặc biệt là MOR6654B, với lượng khoảng 50mg/ml, khoảng 60mg/ml, khoảng 70mg/ml, khoảng 80mg/ml, khoảng 90mg/ml, khoảng 100mg/ml, khoảng 110mg/ml, khoảng 120mg/ml, khoảng 130mg/ml, khoảng 140mg/ml, khoảng 150mg/ml, khoảng 160mg/ml, khoảng 170mg/ml, khoảng 180mg/ml, khoảng 190mg/ml, khoảng 200mg/ml, khoảng 210mg/ml, khoảng 220mg/ml, khoảng 230mg/ml, khoảng 240mg/ml, khoảng 250mg/ml, khoảng 270mg/ml hoặc khoảng 300mg/ml.

Hơn nữa, các dược phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau là các dược phẩm ổn định mà, ngay cả sau khi bảo quản trong 4 tuần ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C, ít hơn 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,05% hoặc 0,01% tổng lượng kháng thể kháng BAFFR bị kết tụ như đo được theo phương pháp SEC-HPLC.

Các dược phẩm dạng nước theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau là các dược phẩm ổn định mà, ngay cả sau khi bảo quản trong thời gian 2 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C, ít hơn 5%, 4%,

3%, 2%, 1%, 0,05% hoặc 0,01% tổng lượng kháng thể kháng BAFFR bị kết tụ như đo được theo phương pháp SEC-HPLC.

Ngoài kháng thể kháng BAFFR, các dược phẩm dạng nước có thể còn chứa các thành phần khác như một hoặc nhiều thành phần sau: (i) chất làm ổn định; (ii) tác nhân đệm; (iii) chất hoạt động bề mặt; và (iv) axit amin tự do. Việc đưa từng thành phần trong số thành phần bổ sung này vào có thể tạo ra dược phẩm có mức kết tụ kháng thể kháng BAFFR thấp.

Chất làm ổn định thích hợp để sử dụng với sáng chế có thể đóng vai trò, ví dụ, làm các tác nhân tăng cường độ nhớt, các chất đệm, các tác nhân hòa tan, và/hoặc các chất tương tự. Chất làm ổn định có thể là ion hoặc không ion (ví dụ, các đường). Ví dụ về các đường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các monosacarit, ví dụ, fructoza, maltoza, galactoza, glucoza, D-manoza, sorboza và các đường tương tự; các đisacarit, ví dụ lactoza, sucroza, trehaloza, xellobioza, và các đường tương tự; các polysacarit, ví dụ rafinoza, melequitoza, maltodextrin, các dextran, tinh bột, và các chất tương tự; và các alditol, như manitol, xylitol, maltitol, lactitol, xylitol sorbitol (gluxitol) và các chất tương tự. Ví dụ, đường có thể là sucroza, trehaloza, rafinoza, maltoza, sorbitol hoặc manitol. Đường có thể là rượu đường hoặc đường amino. Sucroza là đặc biệt hữu dụng. Ví dụ về chất làm ổn định có bản chất ion bao gồm các muối như NaCl hoặc các thành phần axit amin như arginin-HCl.

Các chất đệm thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, muối của axit hữu cơ như các muối của axit citric, axit ascorbic, axit gluconic, axit cacbonic, axit tartaric, axit succinic, axit axetic hoặc axit phthalic; Tris, thometamin hydroclorua, hoặc dung dịch đệm phosphat. Ngoài ra, các thành phần axit amin cũng có thể được dùng làm tác nhân đệm. Các thành phần axit amin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, glyxin và histidin. Dung dịch đệm histidin là đặc biệt hữu dụng.

Các dược phẩm dạng nước bao gồm tác nhân đệm hoặc tác nhân điều chỉnh độ pH này để kiểm soát độ pH ở mức độ tốt hơn. Theo một phương án, dược phẩm dạng nước theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0, nằm trong khoảng từ

5,0 đến 7,0, nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,0, hoặc nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Theo khía cạnh cụ thể, được phẩm dạng nước theo sáng chế có độ pH khoảng 6,0.

Thuật ngữ “chất hoạt động bề mặt” được dùng trong bản mô tả này để chỉ các chất hữu cơ có cấu trúc lưỡng tính; tức là chúng được cấu thành bởi các nhóm có xu hướng hòa tan đối lập, thường là một mạch hydrocacbon hòa tan trong dầu và một nhóm ion hòa tan trong nước. Các chất hoạt động bề mặt có thể được phân loại, tùy theo điện tích của phần có hoạt tính bề mặt, thành các anion, cation và các chất phân tán để dùng cho các được phẩm và các chế phẩm khác nhau chứa các nguyên liệu sinh học.

Các chất hoạt động bề mặt thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất hoạt động bề mặt không ion, các chất hoạt động bề mặt ion và các chất hoạt động bề mặt ion lưỡng tính. Các chất hoạt động bề mặt điển hình để sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, este của sorbitan và axit béo (ví dụ, sorbitan monocaprylat, sorbitan monolaurat, sorbitan monopalmitat), sorbitan trioleat, este của axit béo với glycerin (ví dụ, glycerin monocaprylat, glycerin monomyristat, glycerin monostearat), este của axit béo với polyglycerin (ví dụ, decaglyxeryl monostearat, decaglyxeryl distearat, decaglyxeryl monolinoleat), este của axit béo với polyoxyetylen sorbitan (ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monolaurat, polyoxyetylen sorbitan monooleat, polyoxyetylen sorbitan monostearat, polyoxyetylen sorbitan monopalmitat, polyoxyetylen sorbitan trioleat, polyoxyetylen sorbitan tristearat), este của axit béo với polyoxyetylen sorbitol (ví dụ, polyoxyetylen sorbitol tetrastearat, polyoxyetylen sorbitol tetraoleat), este của axit béo với polyoxyetylen glycerin (ví dụ, polyoxyetylen glyxeryl monostearat), este của axit béo với polyetylen glycol (ví dụ, polyetylen glycol distearat), polyoxyetylen alkyl ete (ví dụ, polyoxyetylen lauryl ete), polyoxyetylen polyoxypropylen alkyl ete (ví dụ, polyoxyetylen polyoxypropylen glycol, polyoxyetylen polyoxypropylen propyl ete, polyoxyetylen polyoxypropylen xetyl ete), polyoxyetylen alkylphenyl ete (ví dụ, polyoxyetylen nonylphenyl ete), polyoxyetylen từ dầu thầu dầu đã được hydro hóa (ví dụ, polyoxyetylen từ dầu thầu dầu, polyoxyetylen từ dầu thầu dầu đã được hydro hóa), các chất dẫn xuất polyoxyetylen từ sáp ong (ví dụ, polyoxyetylen sorbitol từ sáp ong),

các chất dẫn xuất polyoxyetylen từ mỡ lông cừu (ví dụ, polyoxyetylen từ mỡ lông cừu), và các amit của axit béo với polyoxyetylen (ví dụ, amit của axit stearic với polyoxyetylen); C₁₀-C₁₈ alkyl sulfat (ví dụ, natri xetyl sulfat, natri lauryl sulfat, natri oleyl sulfat), polyoxyetylen C₁₀-C₁₈ alkyl ete sulfat với trung bình từ 2 đến 4 mol đơn vị etylen oxit được bổ sung (ví dụ, natri polyoxyetylen lauryl sulfat), và các muối của C₁-C₁₈ alkyl sulfosuccinat este (ví dụ, *natri* lauryl sulfosuccinat este); và các chất hoạt động bề mặt có trong tự nhiên như lexitin, glyxerophospholipit, sphingophospholipit (ví dụ, sphingomyelin), và các este của axit béo C₁₂-C₁₈ với sucroza. Chế phẩm có thể chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt trong số các hợp chất này. Các chất hoạt động bề mặt được ưu tiên là polyoxyetylen este của sorbitan và axit béo ví dụ polysorbate 20, 40, 60 hoặc 80. Polysorbate 20 (Tween 20) là đặc biệt hữu dụng.

Các axit amin tự do thích hợp để dùng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, arginin, lysin, histidin, ornithin, isoleuxin, leuxin, alanin, glyxin axit glutamic hoặc axit aspartic. Việc đưa các axit amin kiềm tính tức là arginin, lysin và/hoặc histidin này vào được ưu tiên. Nếu chế phẩm chứa histidin, thì hợp chất này có thể vừa đóng vai trò làm tác nhân đệm và vừa đóng vai trò axit amin tự do, nhưng khi dung dịch đệm histidin được sử dụng, thì chế phẩm tiêu biểu bao gồm axit amin tự do không phải histidin, ví dụ bao gồm dung dịch đệm histidin và lysin. Axit amin có thể có mặt ở dạng D- và/hoặc L- của nó, nhưng dạng L- là tiêu biểu. Axit amin có thể có mặt ở dạng muối thích hợp bất kỳ ví dụ muối hydroclorua, như arginin-HCl.

Các tá dược được dự tính khác, mà có thể được dùng trong các dược phẩm dạng nước theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các tác nhân tạo vị, các tác nhân diệt vi khuẩn, các chất làm ngọt, các chất chống oxy hóa, các tác nhân chống tĩnh điện, các lipid như các phospholipit hoặc các axit béo, các steroid như cholesterol, các tá dược protein như albumin huyết thanh (albumin huyết thanh người), albumin người tái tổ hợp, gelatin, casein, các ion trái dấu tạo ra muối như natri và các nhóm tương tự. Các tá dược này và các tá dược đã biết khác và/hoặc các chất phụ gia thích hợp để dùng trong các chế phẩm theo sáng chế là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, như được liệt kê trong "*The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4th edition, Rowe et al., Eds., American

Pharmaceuticals Association (2003); và Remington: *the Science and Practice of Pharmacy*, 21th edition, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005).

Các dược phẩm dạng nước theo sáng chế có thể còn bao gồm các hoạt chất khác ngoài kháng thể kháng BAFFR. Các tác nhân dược lý khác có thể bao gồm, ví dụ, các hợp chất hóa trị liệu.

Các bệnh và các rối loạn nhằm tới

Các dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa các kháng thể kháng BAFFR có thể được dùng để điều trị, làm giảm hoặc phòng ngừa nhiều loại bệnh hoặc rối loạn. Các dược phẩm chứa các kháng thể kháng BAFFR là đặc biệt hữu dụng để điều trị các rối loạn liên quan đến BAFFR như các rối loạn tự miễn, ví dụ, bệnh ban đỏ toàn thân, hội chứng Sjögren, bệnh pemphigut nói chung, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh xơ cứng rải rác và khối u tân tạo tế bào B như bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (acute lymphoblastic leukemia - ALL) và bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (chronic lymphocytic leukemia - CLL) ở tế bào B.

Thuật ngữ “rối loạn liên quan đến BAFFR” được dùng trong bản mô tả này bao gồm các tình trạng bệnh lý liên quan đến hoặc đặc trưng bởi mức B_{LYS} bất thường và/hoặc các bệnh hoặc các tình trạng bệnh lý mà có thể điều trị được bằng cách làm suy yếu hoặc tiêu diệt tế bào B. Các tình trạng bệnh lý này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tình trạng bệnh lý viêm, các bệnh tự miễn, nhiễm trùng nghiêm trọng, và đào thải khi cấy ghép cơ quan hoặc mô. Các tình trạng bệnh lý này còn bao gồm khối u tân tạo tế bào B.

Ví dụ, các dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa các kháng thể kháng BAFFR có thể được sử dụng để điều trị, làm thuyên giảm hoặc ngăn ngừa sự thải loại khi ghép tim, phổi, tim-phổi kết hợp, gan, thận, tụy, da hoặc giác mạc, bao gồm đào thải mảnh ghép cùng loài hoặc đào thải mảnh ghép khác loài, và để ngăn ngừa bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép, như sau khi cấy ghép tủy xương, và cấy ghép cơ quan có liên quan đến chứng xơ cứng động mạch. Ngoài ra, các dược phẩm dạng nước theo sáng chế có thể được dùng trong cấy ghép cơ quan rắn và trong đào thải cấy ghép cấp tính và mạn tính qua trung gian kháng thể.

Các dược phẩm dạng nước theo sáng chế chứa các kháng thể kháng BAFFR là hữu dụng để điều trị, phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm bệnh tự miễn và các tình trạng bệnh lý viêm, cụ thể là các tình trạng bệnh lý viêm có nguyên nhân bao gồm các bệnh tự miễn như bệnh viêm khớp (ví dụ bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp tiến triển mạn tính và bệnh viêm khớp biến dạng) và các bệnh thấp khớp, bao gồm các tình trạng bệnh lý viêm và các bệnh thấp khớp gây ra hao hụt xương, đau do viêm, bệnh khớp thuộc đốt sống bao gồm bệnh viêm đốt sống dạng thấp, hội chứng Reiter, bệnh viêm khớp phản ứng, bệnh viêm khớp vảy nến, và bệnh viêm khớp do bệnh đường ruột, quá mẫn (bao gồm cả quá mẫn ở đường hô hấp và quá mẫn ở da) và dị ứng. Các bệnh tự miễn đặc trưng mà các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng cho nó bao gồm các rối loạn huyết học tự miễn (bao gồm ví dụ thiếu máu tan huyết, thiếu máu do không thể tái tạo được, thiếu máu hồng cầu tinh khiết và chứng giảm tiểu cầu tự phát), bệnh ưa chảy máu mắc phải loại A, bệnh ngưng kết tổ lạnh, cryoglobulin huyết, ban xuất huyết giảm tiểu cầu do huyết khối, hội chứng Sjögren, bệnh ban đỏ toàn thân, các rối loạn do viêm cơ, viêm đa sụn, bệnh cứng bì, chứng viêm mạch như cryoglobulin huyết, viêm mạch ở những mạch lớn như bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ, đau đa cơ dạng thấp, viêm mạch gây hoại tử, bao gồm chứng viêm mạch có liên quan đến kháng thể bào tương kháng bạch cầu trung tính, bệnh viêm động mạch Takayasu, bệnh viêm đa động mạch nút, ban xuất huyết Henoch-Schonlein, và hội chứng Churg-Strauss, bệnh thần kinh qua trung gian IgM, bệnh viêm khớp đốt sống huyết thanh âm tính, hội chứng lác rung giật mắt, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm da-cơ, chứng viêm mạch do tự kháng thể bào tương kháng bạch cầu trung tính (anti-neutrophil cytoplasmatic autoantibody - ANCA), bệnh viêm gan mạn tính hoạt động, chứng nhược cơ nặng, bệnh vảy nến, hội chứng Steven-Johnson, bệnh pemphigut nói chung, pemphigut tróc, bệnh spru tự phát, tự miễn dịch bệnh viêm ruột (bao gồm ví dụ bệnh viêm ruột kết gây loét, bệnh Crohn và hội chứng rối loạn tiêu hóa), bệnh về mắt do nội tiết, bệnh Graves, bệnh sarcoid, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm tụy-thận thần kinh, bệnh xơ mật nguyên phát, bệnh đái tháo đường vị thành niên (diabetes mellitus type I), bệnh viêm màng mạch nhỏ (trước, giữa và sau cũng như viêm màng bồ đào lan tỏa), bệnh viêm giác mạc-kết mạc khô và bệnh viêm giác mạc-kết mạc mùa xuân, chứng xơ hóa kẽ phổi, bệnh viêm khớp vảy nến và bệnh viêm cuộn tiểu cầu thận (có

kèm theo và không kèm theo hội chứng hư thận, ví dụ bao gồm hội chứng hư thận tự phát hoặc bệnh cầu thận sang thương tối thiểu), bệnh luput gây viêm thận cấp tính, các khối u, bệnh viêm da và giác mạc, bệnh viêm mô cơ, lỏng mảnh cây xương, các rối loạn chuyển hóa, như chứng xơ vữa động mạch, bệnh đái tháo đường, và rối loạn mỡ máu.

Các dược phẩm dạng nước theo sáng chế còn có thể được dùng để phòng ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị bệnh khối u tân tạo tế bào B. Các ví dụ về bệnh và tình trạng bệnh lý này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, u bạch huyết tế bào B không thuộc dạng Hodgkin, như u bạch huyết tế bào lympho nhỏ, u bạch huyết lympho dạng tương bào, u bạch huyết tế bào lớp bao, u bạch huyết nang, u bạch huyết mô lympho có liên quan đến màng nhầy, u bạch huyết tế bào lớn khuếch tán, và u bạch huyết Burkitt; bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu lympho bào tiền thân tế bào B; bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính ở tế bào B (CLL), và đa u tủy. Các khối u tân tạo tế bào B khác được bao hàm trong phạm vi của sáng chế.

Dùng cho bệnh nhân

Dược phẩm theo sáng chế có thể được cho bệnh nhân dùng. Việc dùng thường là bằng cách truyền hoặc dùng qua ống tiêm. Do đó, sáng chế đề xuất dụng cụ phân phối (ví dụ, ống tiêm) bao gồm dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, ống tiêm đã được làm đầy sẵn). Các bệnh nhân sẽ nhận kháng thể kháng BAFFR làm hoạt chất chính với lượng hữu hiệu tức là lượng đủ để điều trị, làm giảm, hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn liên quan. Hiệu quả điều trị bệnh có thể còn bao gồm làm giảm các triệu chứng vật lý. Lượng hữu hiệu tối ưu và nồng độ kháng thể đối với đối tượng cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau, bao gồm sức khỏe theo lứa tuổi và/hoặc giới tính của bệnh nhân, bản chất và mức độ của tình trạng bệnh lý, hoạt tính của kháng thể cụ thể, tốc độ thanh thải nó ra khỏi cơ thể, và cũng như các chất trị liệu khác có thể có bất kỳ được dùng kết hợp với kháng thể. Lượng hữu hiệu được phân phối trong một tình huống nhất định có thể được xác định bởi quyết định của thầy thuốc lâm sàng. Để dùng cho các mục đích của sáng chế, liều hữu hiệu có thể nằm trong khoảng từ 0,005mg/kg đến 50mg/kg, hoặc khoảng từ 0,05mg/kg đến 10mg/kg. Dược phẩm trên cơ sở kháng thể đã biết sẽ đưa ra những hướng dẫn về khía cạnh này, ví dụ

HERCEPTIN™ được dùng với liều nạp ban đầu là 4mg/kg thể trọng và liều duy trì hằng tuần là 2mg/kg thể trọng; RITUXAN™ được dùng hằng tuần ở 375mg/m²; SYNAGIS™ được dùng tiêm bắp ở 15mg/kg thể trọng; v.v..

Sáng chế đề xuất phương pháp phân phối kháng thể đơn dòng cho động vật có vú, bao gồm bước cho bệnh nhân dùng dược phẩm theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất các chế phẩm theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này theo các phương án khác nhau dùng làm thuốc ví dụ để dùng trong phân phối kháng thể cho động vật có vú, hoặc để dùng trong việc điều trị, phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều bệnh và rối loạn bệnh lý nêu trên.

Tốt hơn, nếu động vật có vú là người, nhưng cũng có thể là, ví dụ, ngựa hoặc bò hoặc chó hoặc mèo. Các kháng thể sẽ được chọn một cách lý tưởng để phù hợp với loài đích, ví dụ kháng thể của người để dùng cho người, kháng thể của ngựa để dùng cho ngựa, kháng thể của chó để dùng cho chó, v.v.. Nếu các kháng thể chủ tự nhiên là không sẵn có thì việc chuyển tính đặc hiệu kháng thể từ một loài sang loài khác có thể đạt được bằng cách chuyển các gốc CDR (và nói chung, ngoài ra, một hoặc nhiều gốc thuộc bộ khung) từ kháng thể cho vào bộ khung nhận từ loài chủ, ví dụ như trong quá trình làm giống như của người. Các kháng thể equinized, bovinized, caninized và felinized là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể này sẽ liên kết với BAFFR từ các loài đích, nhưng nó còn có thể phản ứng chéo với BAFFR từ các loài khác.

Liều dùng có thể theo lịch dùng một liều hoặc lịch dùng nhiều liều.

Các thành phần để tạo ra dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp trong vật chứa được đậy kín.

Kháng thể kháng BAFFR

Sáng chế liên quan đến chế phẩm chứa các kháng thể kháng BAFFR và cụ thể hơn MOR6654 và MOR6654B.

Một kháng thể thích hợp mà có thể được chứa trong các dược phẩm theo sáng chế là kháng thể tái tổ hợp của người MOR6654, có đặc trưng về mặt cấu trúc như được bộc lộ cụ thể hơn dưới đây. Trình tự axit amin V_H của kháng thể kháng BAFFR đã được phân lập này được thể hiện trong SEQ ID NO: 1. Trình tự axit amin V_L của

kháng thể kháng BAFFR đã được phân lập được thể hiện trong SEQ ID NO: 2. Ví dụ về trình tự axit amin của chuỗi nặng với chiều dài đầy đủ của kháng thể kháng BAFFR đã được phân lập này được thể hiện trong SEQ ID NO: 9. Ví dụ về trình tự axit amin của chuỗi nhẹ với chiều dài đầy đủ của kháng thể kháng BAFFR đã được phân lập này được thể hiện trong SEQ ID NO: 10. Ví dụ khác về các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng BAFFR đã được phân lập này là các trình tự axit amin lần lượt được mã hóa bởi các trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12. Ví dụ khác về các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể là các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự ADN tương ứng chứa trong plasmid pBW510 được nộp lưu bởi Novartis Pharma AG, Forum 1, CH-4002 Basel, Switzerland, ở DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Đức vào ngày 29 tháng 4 năm 2009 với số truy cập DSM22542.

Các kháng thể kháng BAFFR khác mà có thể được sử dụng để bào chế các dược phẩm theo sáng chế bao gồm các kháng thể kháng BAFFR, với các axit amin mà được gây đột biến bằng cách xóa bỏ, cài xen hoặc thay thế axit amin, không có nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin bị xóa bỏ, cài xen hoặc thay thế trong các vùng chuỗi nặng hoặc các vùng chuỗi nhẹ nêu trên. Theo khía cạnh cụ thể, sự thay đổi axit amin như vậy chỉ xảy ra trong bộ khung và/hoặc các vùng ổn định và các vùng CDR đồng nhất 100% với các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 3, 4 và 5 và các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ có lần lượt trình tự SEQ ID NO: 6, 7, và 8. Theo một phương án cụ thể hơn, những thay đổi mà được thực hiện chỉ là thay thế axit amin bảo toàn ngoài các vùng CDR.

Thay thế axit amin bảo toàn là các phương pháp mà trong đó gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin có mạch bên tương tự. Các họ gồm các gốc axit amin có mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các nhóm này bao gồm các axit amin với mạch bên có tính bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), mạch bên có tính axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), mạch bên phân cực không mang điện tích (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein, tryptophan), mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin), mạch bên phân nhánh ở vị trí beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và

mạch bên thom (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Do đó, một hoặc nhiều gốc axit amin ngoài các vùng CDR của kháng thể kháng BAFFR có thể được thế bằng các gốc axit amin khác từ họ có cùng mạch bên, và kháng thể đã thay đổi có thể được kiểm tra chức năng vẫn giữ lại được, cụ thể là các đặc tính gắn kết tương tự với BAFFR.

Các kháng thể có thể thường được glycosyl hóa. Ví dụ, các glycan liên kết tại N được gắn với miền C_{H2} của chuỗi nặng có thể có ảnh hưởng đến việc gắn kết C1q và FcR, và các kháng thể chưa glycosyl hóa có thể có ái lực thấp hơn hoặc khác đối với các thụ thể này. Cấu trúc glycan cũng có thể ảnh hưởng đến hoạt tính, ví dụ có thể nhận thấy các khác biệt về quá trình chết tế bào qua trung gian bổ thể tùy theo số phân tử đường galactosa (0, 1 hoặc 2) ở đầu tận cùng của mạch hai nhánh của glycan. Tốt hơn là, các glycan của kháng thể không dẫn đến đáp ứng sinh miễn dịch ở người sau khi sử dụng.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể có thể được tạo ra mà có kiểu glycosyl hóa bị biến đổi, như kháng thể được fucosyl hóa ít hoặc không được fucosyl hóa có số gốc fucosyl giảm hoặc không có gốc fucosyl hoặc các kháng thể có cấu trúc GlcNac được tách làm hai phần gia tăng. Các kiểu glycosyl hóa biến đổi như vậy đã được chứng minh là tăng khả năng gây độc đối với tế bào gián tiếp qua tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) của các kháng thể. Các cải biến hydrat cacbon như vậy có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách biểu hiện kháng thể ở tế bào chủ với cơ cấu glycosyl hóa biến đổi. Các tế bào với cơ cấu glycosyl hóa biến đổi đã được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được dùng làm các tế bào chủ để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế trong đó, nhờ đó tạo ra kháng thể với kiểu glycosyl hóa biến đổi. Ví dụ, EP 1,176,195 của Hang và đồng tác giả mô tả dòng tế bào với gen *FUT8* bị phá vỡ chức năng, mà nó mã hóa fucosyl transferaza, sao cho các kháng thể được biểu hiện trong các dòng tế bào này thể hiện sự fucosyl hóa ít hoặc không có các gốc fucosyl. Do đó, theo một phương án, các kháng thể kháng BAFFR được chứa trong các dược phẩm theo sáng chế được tạo ra bằng cách biểu hiện tái tổ hợp trong dòng tế bào mà có kiểu fucosyl hóa giảm hoặc không fucosyl hóa, ví dụ, dòng tế bào

của động vật có vú với sự biểu hiện thiếu hụt của gen *FUT8* mã hóa fucosyltransferaza.

Thuật ngữ MOR6654 được dùng trong bản mô tả này bao hàm loại bất kỳ của kiểu glycosyl hóa. Theo khía cạnh cụ thể, các dược phẩm này chứa kháng thể kháng BAFFR bao gồm MOR6654 như được tạo ra trong dòng tế bào có kiểu fucosyl hóa giảm hoặc không fucosyl hóa, như MOR6654B có kiểu không fucosyl hóa (không có các gốc fucosyl). Công bố đơn PCT số WO 03/035835 của Presta mô tả dòng tế bào CHO biến thể, các tế bào Lec13, có khả năng gắn fucoza vào các hydrat cacbon đã liên kết Asn(297) giảm, đồng thời gây fucosyl hóa các kháng thể được biểu hiện ở tế bào chủ đó ở mức độ giảm (xem cả tài liệu: Shields, R.L. et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Công bố đơn PCT số WO 99/54342 của Umana và đồng tác giả mô tả các dòng tế bào được thiết kế để biểu hiện glycosyl transferaza cải biến glycoprotein (ví dụ, beta(1,4)-N axetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) sao cho các kháng thể được biểu hiện ở các dòng tế bào đã được thiết kế này có cấu trúc GlcNac được chia làm hai phần là tăng, dẫn đến làm tăng hoạt tính ADCC của các kháng thể (cũng xem tài liệu: Umana et al., 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180). Eureka Therapeutics còn mô tả tế bào CHO của động vật có vú được tạo ra nhờ kỹ thuật di truyền có khả năng tạo ra các kháng thể với kiểu glycosyl hóa ở động vật có vú được thay đổi, không có các gốc fucosyl (http://www.eurekainc.com/about_us/companyoverview.html). Theo cách khác, các kháng thể kháng BAFFR có thể được tạo ra trong nấm men hoặc nấm sợi được thiết kế để có kiểu glycosyl hóa tương tự động vật có vú và có khả năng tạo ra các kháng thể không có fucoza dưới dạng glycosyl hóa (xem chẳng hạn EP1297172B1).

Cải biến khác đối với các kháng thể kháng BAFFR theo sáng chế được dự tính theo sáng chế là gắn gốc glycol bằng cách hóa học. Kháng thể có thể được gắn gốc glycol bằng cách hóa học để, ví dụ, làm kéo dài thời gian bán tồn sinh học (ví dụ, trong huyết thanh) của kháng thể. Để gắn gốc glycol bằng cách hóa học vào kháng thể, kháng thể, hoặc đoạn của chúng, thường có thể được cho phản ứng với polyetylen glycol (PEG), như dẫn xuất este hoặc aldehyt có phản ứng của PEG, trong các điều kiện mà trong đó một hoặc nhiều nhóm PEG sẽ được gắn vào kháng thể hoặc đoạn

kháng thể này. Việc gắn gốc glycol bằng cách hóa học có thể được thực hiện nhờ phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với một phân tử PEG phản ứng (hoặc một polyme hòa tan trong nước phản ứng tương tự).

Thuật ngữ "polyetylen glycol" được dùng trong bản mô tả này được dự định bao gồm dạng PEG bất kỳ mà được sử dụng để tạo dẫn xuất các protein khác, như mono (C1-C10) alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol-maleimit. Theo các phương án nhất định, kháng thể được gắn gốc glycol bằng cách hóa học là kháng thể không được glycosyl hóa. Các phương pháp gắn gốc glycol bằng cách hóa học vào các protein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được áp dụng cho các kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, xem EP 0 154 316 của Nishimura và đồng tác giả và EP 0 401 384 của Ishikawa và đồng tác giả.

Cải biến sau dịch mã tự nhiên hoặc không tự nhiên khác bất kỳ của các kháng thể kháng BAFFR (ví dụ, MOR6654) cũng được dự tính là các phương án cụ thể của các kháng thể kháng BAFFR có thể được áp dụng để bào chế các dược phẩm theo sáng chế.

Các kháng thể có thể được bào chế ở dạng không chứa các sản phẩm mà các kháng thể này sẽ được kết hợp tự nhiên cùng. Các thành phần tạp chất của môi trường tự nhiên của kháng thể bao gồm các nguyên liệu như các enzym, các hormon, hoặc các protein của tế bào chủ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Bào chế kháng thể kháng BAFFR

Kháng thể MOR6654 liên kết một cách đặc hiệu với BAFFR và cũng đã được bộc lộ trong Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số WO2010/007082. Kháng thể này là kháng thể kappa IgG1 của người thu được nhờ biểu hiện ở thể thực khuẩn. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của nó gồm SEQ ID NO: 9 và 10. Bảng 1 và bảng 2 dưới đây tóm tắt mô tả đặc trưng trình tự của MOR6654.

Bảng 1: Mô tả vắn tắt về các trình tự được liệt kê trong danh mục trình tự thuộc bảng 2

SEQ ID NO:	Mô tả trình tự
1	Trình tự axit amin của vùng thay đổi (V_H) của chuỗi nặng của MOR6654
2	Trình tự axit amin của vùng thay đổi (V_L) của chuỗi nhẹ của MOR6654
3	Trình tự axit amin của HCDR1 của MOR6654
4	Trình tự axit amin của HCDR2 của MOR6654
5	Trình tự axit amin của HCDR3 của MOR6654
6	Trình tự axit amin của LCDR1 của MOR6654
7	Trình tự axit amin của LCDR2 của MOR6654
8	Trình tự axit amin của LCDR3 của MOR6654
9	Trình tự axit amin của chuỗi nặng với chiều dài đầy đủ của MOR6654
10	Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ với chiều dài đầy đủ của MOR6654
11	Trình tự nucleotit ghi mã SEQ ID NO:1
12	Trình tự nucleotit ghi mã SEQ ID NO:2
13	Trình tự axit amin BAFFR ở người
14	Trình tự nucleotit với chiều dài đầy đủ (bao gồm trình tự dẫn và phần ổn định) của chuỗi nặng MOR6654; nt 1 đến 57 = trình tự dẫn; nt 58 đến 429 = V_H ; nt 430 đến 1419 = vùng ổn định (hlgG1)
15	Trình tự nucleotit với chiều dài đầy đủ (bao gồm trình tự dẫn và phần ổn định) của chuỗi nhẹ MOR6654; nt 1 đến 60 = trình tự dẫn; nt 61 đến 384 = V_L ; nt 385 đến 705 = vùng ổn định (hkappa)

Bảng 2: Danh mục trình tự

SEQ ID NO:	Trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit
1	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGR GLEWLGRYYRSKWYNSYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARYDWVPKIGVFDSWGQGTLLTVSS

2	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFISSSYLSWYQQKPGQAPR LLIYGSSSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQL YSSPMTFGQGTKVEIK
3	GDSVSSNSAAWG
4	RIYYRSKWYNSYAVSVKS
5	YDWVPKIGVFDS
6	RASQFISSSYLS
7	GSSSRAT
8	QQLYSSPMT
9	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGR GLEWLGRIYYRSKWYNSYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARYDWVPKIGVFDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSGFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
10	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFISSSYLSWYQQKPGQAPRL LIYGSSSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQLYS SPMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCAGGCCTGGTCAAGCCCT CTCAGACCCTGTCACTGACCTGCGCCATTTCAGGCGACAGCGT GAGCAGCAACAGCGCCGCTGGGGCTGGATCAGGCAGAGCCC CGGTAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGGATCTACTACAGGTCC AAGTGGTACAACAGCTACGCCGTGAGCGTGAAGAGCAGGATC ACCATCAACCCTGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCACTGCAGC TCAACAGCGTGACCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CAGATACGACTGGGTGCCCAAGATCGGCGTGTTCGACAGCTGG GGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCAAGC
12	GATATCGTGCTGACACAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCC CAGGCGAGAGGGCCACCCTGTCCTGCAGGGCCAGCCAGTTTAT CAGCAGCAGCTACCTGTCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAG GCCCTAGACTGCTGATCTACGGCAGCTCCTCTCGGGCCACCG GCGTGCCCGCCAGGTTTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTT

	CACCCTGACAATCAGCAGCCTGGAGCCCGAGGACTTCGCCGTG TACTACTGCCAGCAGCTGTACAGCTCACCCATGACCTTCGGCC AGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
13	MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRKP AGASSPAPRTALQPQESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALV LALVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGDKDAPEPLDKVILSP GISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSPVPATELGSTELVTTKTAGP EQQ
14	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCCCTTCCTGATGGCCGCTGCCC AGTCAGTGCAGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCAG GCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCACTGACCTGCGCCATT TCAGGCGACAGCGTGAGCAGCAACAGCGCCGCTGGGGCTGG ATCAGGCAGAGCCCCGGTAGGGGCCTGGAATGGCTGGGCAGG ATCTACTACAGGTCCAAGTGGTACAACAGCTACGCCGTGAGCG TGAAGAGCAGGATCACCATCAACCCTGACACCAGCAAGAACC AGTTCTCACTGCAGCTCAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGCGCCAGATACGACTGGGTGCCCAAGATCGGC GTGTTTCGACAGCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCAA GCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTCTGGAAC AGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGC TGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAG CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCAG CCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTCTGTTCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTG AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGG TGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGG CAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGG GAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCC CGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGA CGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGGCAAG
15	ATGAGCGTGCTGACCCAGGTGCTGGCTCTGCTGCTGCTGTGGC TGACCGGCACCAGATGCGATATCGTGCTGACACAGAGCCCCGC

	CACCTGAGCCTGAGCCCAGGCGAGAGGGCCACCCTGTCCTGC AGGGCCAGCCAGTTTATCAGCAGCAGCTACCTGTCCTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCTAGACTGCTGATCTACGGCAG CTCCTCTCGGGCCACCGGCGTGCCCGCCAGGTTTCAGCGGCAGC GGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGGAGC CCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGCTGTACAGCTC ACCCATGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGT ACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGA CCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTG CGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC TTCAACAGGGGCGAGTGC
--	--

Ví dụ về chế phẩm

Mong muốn có được chế phẩm lỏng chứa MOR6654B ở nồng độ cao và do đó các nghiên cứu bào chế được thực hiện. Chế phẩm ở dạng lỏng chứa đường, tác nhân đệm và chất hoạt động bề mặt là ổn định và có thể duy trì nồng độ kháng thể cao.

Kháng thể này có thể được tạo ra ở các tế bào chủ của động vật có vú, như, dòng tế bào CHO đã được chuyển nhiễm với các vật truyền biểu hiện mang các trình tự ghi mã của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ với các trình tự khởi đầu biểu hiện thích hợp.

Tốt hơn là, kháng thể này được tạo ra ở dòng tế bào của động vật có vú, ví dụ dòng tế bào CHO, được cải biến bằng cách sử dụng, ví dụ, công nghệ Potelligent™ (BioWa, Inc.) dẫn đến sự biểu hiện thiếu hụt của gen *FUT8* ghi mã fucosyltransferaza. Kháng thể thu được không được fucosyl hóa và trong bản mô tả này được gọi là MOR6654B.

Việc phát triển chế phẩm MOR6654B lỏng trong lọ hoặc ống tiêm đã được làm đầy sẵn bao gồm hai nghiên cứu. Nghiên cứu sàng lọc thứ nhất được thực hiện để xác định các tá dược trong chế phẩm. Trong nghiên cứu sàng lọc thứ hai, chế phẩm đã lựa chọn được xác nhận trong quá trình đóng gói cấp 1 cuối cùng.

Độ ổn định và kế hoạch phân tích

Các phương pháp phân tích sau được thực hiện: Thử nghiệm UV, sắc ký lỏng cao áp loại trừ theo kích thước, phân tán ánh sáng động học, sắc ký trao đổi cation - sắc ký lỏng cao áp, sắc ký đảo pha - sắc ký lỏng cao áp, thiết bị phân tích ALP, đo độ đục, trị số độ pH, nồng độ mol đồng thẩm áp, MFI (Micro-Flow Imaging), độ nhớt, màu, quan sát bằng mắt.

Xác định độ ổn định

Độ ổn định được xác định sau khi đặt các chế phẩm trong một số điều kiện stress bao gồm khuấy, chu trình làm lạnh đông-tan giá và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (1 tháng ở nhiệt độ 40°C).

Phương pháp đo độ đục

Độ đục được đo theo phương pháp đo độ đục.

Việc đo độ đục của các mẫu được thực hiện bằng cách thủ công như sau (dụng cụ cầm tay Model 2100AN, số: 47901-88, tháng 11 năm 2006, phiên bản 2). Khi bắt đầu phân tích, đường cong hiệu chỉnh đối với dụng cụ được kiểm tra bằng cách phân tích 5 mẫu hiệu chỉnh, bao gồm nước. Nếu các trị số đo được bằng dụng cụ trong vòng 5% trị số tiêu chuẩn, thì đường cong hiệu chỉnh được chấp thuận. Nếu bất kỳ tiêu chuẩn nào không đạt 5% tiêu chí chấp nhận, thì dụng cụ này được hiệu chỉnh lại theo cách thủ công. Sau khi dụng cụ đạt hiệu chỉnh, các mẫu được nạp trong các ống nghiệm đáy bằng 11mm và được phân tích.

Phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (Size Exclusion Chromatographic - SEC)

Trong phương pháp SEC được sử dụng để phân tích chế phẩm dạng lỏng, các thông số phương pháp sau đây được sử dụng:

Cột: TSKgel G3000SWXL

Dung dịch đệm phân tích: 150mM K-phosphat, độ pH = 6,5 +/- 0,1

Lưu tốc: 0,4ml/phút

Nhiệt độ cột: 30°C

Dò: 210nm

Thể tích bơm: 10ul

Nhiệt độ mẫu: khoảng 5°C

Thời gian chạy: 40 phút

Tốc độ lấy mẫu dữ liệu: 1,0 điểm/giây (bước Chromeleon = 1,0)

Phương pháp sắc ký trao đổi cation (Cation Exchanger Chromatography - CEX) HPLC

Bước thứ nhất để phân tích mẫu bằng cách sử dụng phương pháp CEX HPLC là cất tất cả các chế phẩm đến 10mg/ml bằng cách sử dụng nước. Bước thứ hai là lấy mẫu đã pha loãng đến 10mg/ml và pha loãng tiếp bằng pha động A đến 3mg/ml. Tiếp theo, mẫu được nạp vào sắc ký lỏng cao áp và phân tích.

Pha động A: 25mM natri phosphat, độ pH = 6,5

Pha động B: 25mM natri phosphat, 250mM NaCl, độ pH = 6,5

Lưu tốc: 1,0ml/phút

Nhiệt độ cột: 30°C +/- 2°C

Nhiệt độ mẫu: 5°C +/- 2°C

Thể tích bơm: 40 ul

Thời gian chạy (phút): 60

Dò: 215nm

Gradient:

Thời gian	% A	% B
0	100	0
46	0	100
51	0	10
52	100	0
60	100	0

Phương pháp RP HPLC

Phương pháp sắc ký lỏng cao áp pha đảo (RP HPLC) được áp dụng để phân tích các mẫu LB-120 được thực hiện bằng cách tuân theo các thông số phương pháp

RP dưới đây. Gradient trong quy trình thử nghiệm dẫn đến protein được rửa giải trong cột thể tích rỗng.

Các thông số của phương pháp

Thông tin về cột: PoroShell 300SB-C8

Pha động A: 90% (thể tích) H₂O / 10% (thể tích) ACN / 0,1% (thể tích)

TFA

Pha động B: 10% (thể tích) H₂O / 90% (thể tích) ACN / 0,1% (thể tích)

TFA

Lưu tốc: 2ml/phút

Nhiệt độ cột: 80°C

Dò: 210nm

Thể tích bơm: 5µl

Nhiệt độ mẫu: Khoảng 5°C

Thời gian chạy: 6 phút

Gradient:

Thời gian	% A	% B
0	90	10
5	75	25
5,1	90	10
6	90	10

Phương pháp MFI

Tất cả các mẫu có tính ổn định được đánh giá bằng cách sử dụng thiết bị phân tích protein đơn giản hiện hình dòng cỡ micro (Micro-Flow Imaging - MFI), mô hình DPA 4200 với bộ phận đo lưu lượng tức thời 100µm tiêu chuẩn (1,6mm, SP3 có bao bởi Silan, số danh mục sản phẩm 4002-002-001) và vật kính 5x. Phiên bản phần mềm đối với phần mềm hệ thống quan sát MFI là 2-R2.6.2.21.2171.

Các dấu hiệu đặc trưng được lựa chọn và cài đặt thiết bị bao gồm:

Loại bỏ hạt bên rìa – lựa chọn

Nhồi hạt – lựa chọn (ngoại trừ T0)

Thể tích mẫu: 0,5ml

Thể tích làm sạch: 0,15ml

Thể tích mẫu gần đúng: 0,30ml (được tính tự động)

Vào ngày thử nghiệm, ba (thử nghiệm đơn) hoặc bốn (thử nghiệm kép) bơm tiêm đối với mỗi điều kiện được gom vào từng ống nghiệm Nunc 15ml riêng biệt (số danh mục sản phẩm 339651). Toàn bộ công việc được thực hiện trong tủ hút an toàn dùng cho phòng thí nghiệm và các mẫu MFI được kiểm tra khi chưa được pha loãng.

Các trình tự chạy bao gồm chạy mẫu trắng là nước trước khi chạy từng mẫu và chất chuẩn để đảm bảo mức đường nền của các hạt là có lý (thông thường dưới 600 hạt/ml hoặc nhỏ hơn 1% hạt mẫu/ml). Việc rửa bằng 30ml nước hoặc nhiều hơn được sử dụng giữa các mẫu khác nhau và giữa các mẫu và các chất chuẩn trước khi đo các mức đường nền của hạt (mẫu trắng). Nếu các mẫu trắng chưa chấp nhận được, việc rửa bổ sung được thực hiện và một mẫu trắng khác được chạy. Việc rửa bằng 10ml nước được sử dụng giữa các mẫu lặp lại và các chất chuẩn lặp lại để làm sạch bọt khí khỏi hệ thống một cách thích đáng và làm giảm hạt. Nước từ thiết bị millipore Direct-Q typ 1 được sử dụng cho mẫu trắng và sử dụng để rửa (được lọc qua màng lọc cỡ 0,22 μ m, chất lượng 18,2 M Ω). Các đầu pipet Neptune Barrier 1000 μ l được dùng để phân phối mẫu đến cổng vào của mẫu.

Mỗi trình tự mẫu chứa một số chất chuẩn dạng hạt cỡ 5,0 μ m được chứng nhận bởi NIST (National Institute of Standard and Technology) chứa 3000 hạt/ml có cỡ hạt lớn hơn hoặc bằng 3 μ m (Số danh mục sản phẩm CC05, lô 39588, Exp. July 2012) để xác định khả năng tái tạo trong khi chạy. Tính năng của các chất chuẩn được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3. Tóm tắt kết quả phân tích các chất chuẩn dạng hạt NIST bằng cách sử dụng MFI

Thời điểm	Trung bình mẫu trắng	Trung bình chất chuẩn	3 độ lệch chuẩn	số chất chuẩn	Số lô
T0	207	3105	$\pm 16\%$	4	39588, chai số 2
T1	304	2222	$\pm 6\%$	4	39588, chai số 2
T2	337	3109	$\pm 16\%$	7	39588, 042512

Cỡ hạt riêng rẽ được xác định bằng cách áp dụng kỹ thuật phân tích protein đơn giản còn được biết đến như là đường kính tròn tương đương (Equivalent Circular Diameter (ECD)). ECD của một đối tượng được biểu thị bằng micron và là đường kính của hình cầu mà nó có cùng một diện tích bề mặt hai chiều giống như hạt. Nền sản phẩm MFI chuyển diện tích của một vật thể thành trị số ECD bằng cách áp dụng các kỹ thuật chuyển hóa thích hợp để tránh sai số vốn có khi thực hiện tính toán trực tiếp dựa trên cơ sở các kích thước nhìn thấy. Các kỹ thuật chuyển hóa dựa trên việc lập bản đồ toàn bộ khoảng kích thước dụng cụ bằng cách sử dụng các hạt polystyren NIST có thể theo dõi qua vết. Mặc dù việc chuyển hóa là dựa trên các hạt polystyren, khẳng định của người bán hàng là ở chỗ cách vận hành duy nhất của nền sản phẩm MFI sẽ đảm bảo các kết quả thu được từ thiết bị này là không nhạy với các đặc tính nguyên liệu hạt. Do đó, thiết bị này không đòi hỏi hiệu chỉnh đối với các loại mẫu cụ thể để vận hành một cách thích hợp.

Phương pháp đo màu

Màu của mẫu được phân tích bằng cách áp dụng quy trình thử nghiệm tiêu chuẩn. Trị số màu đối với từng mẫu được ghi lại theo định nghĩa về màu trong dược điển Châu Âu (European Pharmacopoeia - EP) (Bảng 4). Ví dụ, từ B1 đến B9 là thang màu nâu như được định nghĩa trong dược điển Châu Âu.

Bảng 4. Khoảng màu đối với dược điển Châu Âu

Từ	Đến	Mô tả
Y7	Y1	Thang màu vàng
B9	B1	Thang màu nâu
BY7	BY1	Thang màu nâu-vàng
GY7	GY1	Thang màu xanh lá cây-vàng
R7	R1	Thang màu đỏ

Thử nghiệm độ ổn định quang học

Các bơm tiêm chứa từng chế phẩm trong số bốn chế phẩm F1 đến F4 như đã được bộc lộ trong Bảng 16 được đưa đến thử nghiệm độ ổn định quang học. Nói chung, mười hai bơm tiêm (ba bơm tiêm cho mỗi chế phẩm) được đặt lên bề mặt của một hộp được phủ bằng giấy in trắng đặt bên dưới nguồn sáng 7,62cm (3,5 inso). Bơm

tiêm được đặt theo thứ tự bằng số như sau (1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4) cách nhau khoảng 1 inso. Bơm tiêm ở hai đầu (1 và 4) được đặt cách 10,88cm (5 inso) tính từ các đầu của nguồn sáng.

Các nguồn sáng là hai đèn huỳnh quang có ánh sáng trắng lạnh (GE Ecolux F20T12-CW-ECO, 20W mỗi đèn) và hai đèn huỳnh quang gần cực tím với sự phân bố phổ từ 320 đến 400nm, 20W mỗi đèn. Thời gian phơi sáng ở nhiệt độ môi trường là 14 ngày đối với các đèn huỳnh quang ánh sáng trắng lạnh và 88 giờ đối với các đèn gần cực tím.

Nghiên cứu khuấy

Ba bơm tiêm đối với mỗi chế phẩm khác nhau cần thử nghiệm được lấy ra từ điều kiện bảo quản lạnh và được gom vào các ống nghiệm hình nón Nunc 15ml và được giữ chặt một cách riêng rẽ vào nền của máy lắc theo quỹ đạo Thermo Scientific MaxQ 2000 và được khuấy ở 150 vòng/phút trong thời gian 24 giờ trong điều kiện sánh sáng và nhiệt độ của môi trường xung quanh.

Nghiên cứu chu trình làm lạnh đông-tan giá (Freeze-Thaw - F/T)

Các bơm tiêm đối với mỗi chế phẩm khác nhau cần được thử nghiệm, được lấy ra từ điều kiện bảo quản lạnh và được gom lại vào các ống nghiệm hình nón Nunc cỡ 15ml. Sau đó, các mẫu đã gom được tham gia 5 chu trình làm lạnh đông (-20°C) và làm tan giá (bằng cách sử dụng nước ở nhiệt độ môi trường).

Nghiên cứu I: Sàng lọc chế phẩm dạng lỏng lần thứ nhất

Thử nghiệm sàng lọc chế phẩm ban đầu đối với chế phẩm lỏng MOR6654B được thiết lập để thử nghiệm, ví dụ, các dung dịch đệm, các chất làm ổn định, các tá dược và các trị số độ pH khác nhau. Vài chế phẩm cũng được nghiên cứu tỉ mỉ để thu được kinh nghiệm trong việc lựa chọn bao bì hàng đầu và để thu được kinh nghiệm về độ ổn định của chế phẩm lỏng MOR6654B ở các loại PFS khác nhau (bơm tiêm nạp trước).

Chuẩn bị mẫu

Các chế phẩm được tạo ra bằng cách sử dụng dược chất (MOR6654B) thu được từ dòng tế bào CHO biểu hiện kháng thể đơn dòng không được fucosyl hóa ở nồng độ

trong nước lên đến 160g/l. Dược chất MOR6654B được trộn với lượng dung dịch tá được loãng thích hợp, được lọc vô trùng, được nạp vô khuẩn vào lọ thủy tinh vô trùng 1ml PFS (thể tích nạp 0,7ml) hoặc 6ml (thể tích nạp 3,6ml) và được nút bằng nút lyo Daikyo D21-7S V10-F7-3WRS RB2-TR. Tất cả các chế phẩm được thử nghiệm có nồng độ MOR6654B là 100g/l.

Bảng 5: Danh mục chế phẩm, sàng lọc chế phẩm lỏng MOR6654B lần thứ nhất (100g/l)

PP (bao bì hàng đầu); HPbCD (hydroxypropyl-b-xyclodextrin)

Dạng	độ pH	Dung dịch đệm 20mM	chất làm ổn định	chất hoạt động bề mặt	PP
1	6,5	Histidin	Trehaloza 270mM	Polysorbate 20 0,04%	PFS
2	6,5	Xitrat	ArgHCl 150mM	Poloxame 188 0,3%	PFS
3	6,5	Histidin	Trehaloza 270mM	Polysorbate 20 0,04%	PFS
4	7	Sucxinat	ArgHCl 150mM	Polysorbate 20 0,04%	PFS
5	7	Xitrat	Trehaloza 270mM	None	PFS
6	7	Histidin	Manitol 270mM	Poloxame 188 0,3%	PFS
7	6	Xitrat	Manitol 270mM	Polysorbate 20 0,04%	PFS
8	6,5	Histidin	Trehaloza 270mM	Polysorbate 20 0,04%	PFS
9	6	Histidin	ArgHCl 150mM	Không	PFS
10	6	Sucxinat	Trehaloza 270mM	Poloxame 188 0,3%	PFS
11	6,5	Sucxinat	Manitol 270mM	Không	PFS
12	6,5	Sucxinat	Trehaloza 270mM	Polysorbate 20 0,04%	PFS
13	6,5	Histidin	Trehaloza 270mM	HPbCD 2,5mM	PFS
14	6,5	Histidin	NaCl 150mM	Polysorbate 20 0,04%	PFS
15	6,5	Histidin	Trehaloza 270mM	Polysorbate 20 0,04%	VIAL
16	6,5	Histidin	Trehaloza 270mM	Poloxame 188 0,3%	VIAL

Kết quả

Các bảng kết quả đối với sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC-HPLC)

Bảng 6. Độ tinh khiết của các mẫu theo SEC trong điều kiện stress là làm lạnh đông-tan giá

Chế phẩm	Các sản phẩm kết tụ	Pic chính	Các sản phẩm thoái biến
1	0,52	99,38	0,10
2	0,59	99,31	0,10
3	0,51	99,39	0,10
4	0,62	99,29	0,08
5	0,62	99,29	0,10
6	1,92	97,94	0,13

Chế phẩm	Các sản phẩm kết tụ	Pic chính	Các sản phẩm thoái biến
7	1,26	98,66	0,08
8	0,53	99,36	0,10
9	0,56	99,35	0,10
10	0,64	99,28	0,08
11	1,75	98,15	0,10
12	0,56	99,38	0,07
13	0,51	99,40	0,09
14	0,72	99,19	0,08
15	0,56	99,35	0,09
16	0,56	99,36	0,09

Bảng 7 Độ tinh khiết của các mẫu theo SEC trong điều kiện stress là lắc

Chế phẩm	Các sản phẩm kết tụ	Pic chính	Các sản phẩm thoái biến
1	0,51	99,37	0,12
2	0,60	99,31	0,09
3	0,52	99,38	0,10
4	0,68	99,23	0,09
5	0,73	99,16	0,11
6	0,70	99,18	0,12
7	0,65	99,25	0,10
8	0,54	99,35	0,11
9	0,53	99,37	0,10
10	0,64	99,27	0,09
11	0,64	99,25	0,10
12	0,58	99,30	0,13
13	0,53	99,37	0,10
14	0,62	99,25	0,13
15	0,57	99,31	0,12
16	0,58	99,30	0,12

Bảng 8 Độ tinh khiết của các mẫu theo SEC trong điều kiện stress nhiệt (40°C)

Chế phẩm	Các sản phẩm kết tụ	Pic chính	Các sản phẩm thoái biến
1	1,09	95,84	3,07
2	1,05	95,93	3,02
3	1,13	95,72	3,15
4	1,34	95,22	3,44
5	2,06	94,06	3,88
6	1,58	94,77	3,65
7	1,33	95,75	2,92
8	1,13	95,75	3,12

Chế phẩm	Các sản phẩm kết tụ	Pic chính	Các sản phẩm thoái biến
9	0,90	95,89	3,21
10	1,24	95,78	2,98
11	1,45	95,48	3,07
12	1,14	95,81	3,05
13	1,02	95,90	3,08
14	1,21	95,63	3,17
15	1,32	94,75	3,92
16	1,51	93,56	4,93

Bảng 9: Độ tinh khiết theo SEC đối với t0, và độ ổn định của các mẫu ở 5°C

Dạng	Các sản phẩm kết tụ	Các sản phẩm kết tụ	Các sản phẩm kết tụ	Các sản phẩm thoái biến	Các sản phẩm thoái biến	Các sản phẩm thoái biến
	T0	3 tháng ở 5°C	6 tháng ở 5°C	T0	3 tháng ở 5°C	6 tháng ở 5°C
1	0,46	0,53	0,54	0,1	0,09	0,12
2	0,54	0,62	0,61	0,09	0,07	0,11
3	0,46	0,56	0,53	0,09	0,09	0,12
4	0,61	0,77	0,76	0,08	0,07	0,12
5	0,59	0,79	0,76	0,1	0,08	0,13
6	0,63	0,75	0,69	0,08	0,08	0,14
7	0,59	0,67	0,57	0,08	0,05	0,11
8	0,5	0,59	0,48	0,1	0,08	0,12
9	0,5	0,57	0,47	0,1	0,08	0,12
10	0,6	0,67	0,51	0,08	0,06	0,12
11	0,57	0,71	0,55	0,09	0,08	0,12
12	0,52	0,61	0,45	0,09	0,06	0,13
13	0,51	0,57	0,42	0,11	0,05	0,11
14	0,55	0,65	0,49	0,07	0,04	0,13
15	0,51	0,61	0,43	0,1	0,09	0,13
16	0,53	0,64	0,44	0,09	0,07	0,14

Bảng 10: Độ tinh khiết theo SEC đối với t0, và độ ổn định của các mẫu ở 25°C

Dạng	Các sản phẩm kết tụ	Các sản phẩm kết tụ	Các sản phẩm kết tụ	Các sản phẩm thoái biến	Các sản phẩm thoái biến	Các sản phẩm thoái biến
No.	T0	3 tháng ở 25°C	6 tháng ở 25°C	T0	3 tháng ở 25°C	6 tháng ở 25°C
1	0,46	0,8	0,56	0,1	1,41	2,47
2	0,54	0,91	0,54	0,09	1,37	2,3
3	0,46	0,78	0,58	0,09	1,26	2,44
4	0,61	1,12	0,81	0,08	1,43	2,62
5	0,59	1,39	1,19	0,1	1,6	2,73
6	0,63	1,1	0,83	0,08	1,42	2,7
7	0,59	0,97	0,57	0,08	1,23	2,18
8	0,5	0,79	0,52	0,1	1,34	2,36
9	0,5	0,75	0,29	0,1	1,27	2,23
10	0,6	0,92	0,5	0,08	1,26	2,22
11	0,57	1,06	0,67	0,09	1,31	2,23
12	0,52	0,84	0,54	0,09	1,28	2,39
13	0,51	0,84	0,47	0,11	1,32	2,33
14	0,55	0,94	0,51	0,07	1,4	2,38
15	0,51	0,94	0,77	0,1	1,55	3,32
16	0,53	1,08	0,93	0,09	1,82	3,42

Bảng 11: Các biến thể tích điện của các mẫu theo CEX trong điều kiện stress là làm lạnh đông-tan giá

Chế phẩm	Biến thể có tính axit	Pic chính	Biến thể có tính bazơ
1	5,18	65,42	29,40
2	5,10	66,21	28,69
3	4,97	66,01	29,01
4	5,27	65,34	29,40
5	5,35	64,79	29,86
6	5,23	65,78	28,99
7	5,38	65,60	29,02
8	5,24	67,21	27,55
9	5,02	64,24	30,74
10	5,56	65,18	29,26
11	5,50	65,04	29,45
12	5,19	66,32	28,49
13	5,45	65,06	29,49
14	5,43	66,04	28,54
15	5,33	66,18	28,49
16	5,24	66,11	28,65

Bảng 12: Biến thể tích điện của các mẫu theo CEX trong điều kiện stress là lắc

Chế phẩm	Biến thể có tính axit	Pic chính	Biến thể có tính bazơ
1	5,09	66,35	28,56
2	5,03	66,83	28,13
3	5,05	66,98	27,97
4	5,07	66,60	28,33
5	5,17	65,47	29,36
6	5,34	66,70	27,97
7	5,36	66,63	28,01
8	5,11	66,95	27,94
9	4,78	66,45	28,77
10	4,99	67,25	27,76
11	5,12	66,21	28,67
12	5,21	67,18	27,60
13	5,41	66,40	28,19
14	5,05	67,29	27,66
15	5,14	66,70	28,16

Chế phẩm	Biến thể có tính axit	Pic chính	Biến thể có tính bazơ
16	5,15	66,84	28,01

Bảng 13: Các biến thể tích điện của các mẫu theo CEX trong điều kiện stress nhiệt (40°C)

Chế phẩm	Biến thể có tính axit	Pic chính	Biến thể có tính bazơ
1	13,41	59,24	27,35
2	12,00	61,63	26,37
3	14,43	58,54	27,03
4	13,59	60,20	26,21
5	14,40	58,18	27,42
6	15,36	58,63	26,01
7	14,83	58,99	26,18
8	14,10	59,34	26,55
9	12,70	58,92	28,38
10	15,17	58,64	26,19
11	14,09	58,86	27,05
12	14,31	59,15	26,54
13	14,54	58,97	26,49
14	12,22	61,15	26,62
15	15,01	58,21	26,79
16	16,54	56,43	27,03

Bảng 14: Biến thể tích điện theo CEX đối với t0, và độ ổn định của các mẫu ở nhiệt độ 5°C

Dạng	Biến thể có tính axit	Biến thể có tính axit	Biến thể có tính axit	Biến thể có tính bazơ	Biến thể có tính bazơ	Biến thể có tính bazơ
Số	T0	3 tháng ở 5°C	6 tháng ở 5°C	T0	3 tháng ở 5°C	6 tháng ở 5°C
1	4,19	6,13	14,43	30,56	25,39	20,14
2	4,73	5,66	14,35	30,18	26,33	20,81
3	4,73	6,33	14,9	29,48	26,66	20,48
4	4,76	5,71	14,08	29,71	26,16	21,53
5	4,8	5,91	14,47	30,69	27,66	20,82
6	4,97	6,22	15,73	29,1	26,14	21,2
7	4,68	5,5	14,33	29,15	25,69	21,45
8	4,75	5,99	14,98	29,12	25,91	20,77
9	4,71	5,54	14,13	30,48	25,89	21,24
10	4,78	5,83	14,55	29,38	26,11	21,12

11	4,89	5,82	14,04	30,24	26,39	21,3
12	4,74	6,2	14,52	28,29	25,8	20,98
13	5,04	6,26	16,13	30,22	25,75	21,43
14	5,02	5,7	14,62	28,86	25,26	21,38
15	5,02	5,9	16,87	29,02	25,81	22,59
16	5,17	6,01	16,92	29,07	25,48	22,52

Bảng 15 Biến thể tích điện theo CEX đối với t0, và độ ổn định của các mẫu ở 25°C

Dạng	Biến thể có tính axit	Biến thể có tính axit	Biến thể có tính axit	Biến thể có tính bazơ	Biến thể có tính bazơ	Biến thể có tính bazơ
Số	T0	3 tháng ở 25°C	6 tháng ở 25°C	T0	3 tháng ở 25°C	6 tháng ở 25°C
1	4,19	7,75	27,71	30,56	24,44	21,16
2	4,73	6,81	22,26	30,18	25,64	20,38
3	4,73	6,81	24,95	29,48	24,38	20,28
4	4,76	8,02	24,73	29,71	24,96	20
5	4,8	7,67	28,55	30,69	23,86	21,46
6	4,97	7,36	25,94	29,1	24,86	18,62
7	4,68	7,05	31,1	29,15	23,96	20,23
8	4,75	7,85	27,67	29,12	24,73	20,93
9	4,71	7,72	29,52	30,48	24,65	19,3
10	4,78	7,87	27,61	29,38	24,76	20,33
11	4,89	8,7	36,3	30,24	23,58	19,85
12	4,74	7,24	25,53	28,29	24,91	20,58
13	5,04	7,41	24,77	30,22	24,14	19,91
14	5,02	7,75	29,63	28,86	25,37	21,95
15	5,02	8,09	28,7	29,02	24,56	20,01
16	5,17	8,18	32,26	29,07	24,94	22,16

Tóm tắt kết quả, sàng lọc chế phẩm lỏng lần thứ nhất

Mười sáu chế phẩm kháng thể đơn dòng, MOR6654B, được để ổn định trong thời gian đến sáu tháng ở nhiệt độ 5°C và 25°C. Ngoài ra, các chế phẩm giống hệt được đặt trong điều kiện stress là khuấy, chu trình F/T lặp lại và điều kiện stress nhiệt (1 tháng ở nhiệt độ 40°C). Nhiều phương pháp phân tích sinh lý và sinh hóa được áp dụng để xác định xem liệu có sự khác biệt giữa các chế phẩm về độ ổn định hay không. Dữ liệu SEC chỉ ra sự khác biệt về độ ổn định trong số các chế phẩm được thử. Ở các mẫu trong điều kiện stress lắc, chế phẩm 5 (độ pH=7 không chứa chất hoạt động bề mặt) thể hiện mức tăng các sản phẩm kết tụ là lớn hơn, chứng minh ảnh hưởng có

lợi của polysorbate. Mức tăng sản phẩm kết tụ cao hơn nhiều được ghi nhận ở chế phẩm manitol và chế phẩm natri clorua trong điều kiện stress là làm lạnh đông-tan giá.

Kết quả của nghiên cứu thứ nhất này có thể được tóm tắt như sau: độ pH thích hợp là 6,0. Chất làm ổn định không ion được thử nghiệm, Trehaloza, là có lợi đối với độ ổn định của chế phẩm. Polysorbate 20 là có lợi đối với độ ổn định của chế phẩm chống lại sự hình thành kết tụ.

Nghiên cứu II: Sàng lọc chế phẩm lỏng lần thứ hai

Chế phẩm kháng thể kháng BAFFR

Ba chế phẩm (F1, F2, và F3) MOR6654B với nồng độ kháng thể cao là 150mg/ml và một chế phẩm với nồng độ kháng thể thấp hơn là 20mg/ml (F4) được đánh giá về độ ổn định. Bốn chế phẩm F1, F2, F3 và F4 được nạp vào bơm tiêm thủy tinh silicon cỡ 1,0ml và chứa dung dịch đệm, đường, chất hoạt động bề mặt và axit amin tự do như được thể hiện trong bảng 16.

Bảng 16: Thành phần của các chế phẩm thử nghiệm

	MOR6654B	Dung dịch đệm	Đường	Chất hoạt động bề mặt	Axit amin
F1	150mg/ml	20mM histidin; 6,0	220mM sucroza	0,04% polysorbate 20	-
F2	150mg/ml	20mM histidin; 6,0	220mM trehaloza	0,04% polysorbate 20	-
F3	150mg/ml	20mM histidin; 6,0	120mM sucroza	0,04% polysorbate 20	50mM arginin-HCl
F4	20mg/ml	20mM histidin; 6,0	220mM sucroza	0,04% polysorbate 20	-

Các mẫu của mỗi chế phẩm được chuẩn bị và kiểm tra về độ ổn định ở ba nhiệt độ khác nhau. Bốn chế phẩm dạng lỏng được đặt trong các điều kiện bảo quản thử nghiệm và kiểm tra độ ổn định sau khi bảo quản ở 2°C đến 8°C ở thời điểm 0 (t_0), và 2 tháng (t_2)

25°C ở thời điểm 0 (t_0) và 2 tháng (t_2)

40°C ở thời điểm 0 (t_0), 1 (t_1) và 2 tháng (t_2)

Ngoài việc bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau, các chế phẩm được để trong nhiều điều kiện stress, như phơi sáng trong thời gian dài, khuấy và nhiều chu trình làm lạnh đông-tan giá (F/T). Từng mẫu được phân tích bằng cách áp dụng nhiều loại phương pháp.

Kết quả và thảo luận, chế phẩm sàng lọc lần thứ hai

Cả bốn chế phẩm được kiểm tra tại cùng một thời điểm, tùy theo điều kiện stress. Tại thời điểm không (t_0), việc đo được thực hiện lặp lại 2 lần, cũng như việc đo được thực hiện sau hai tháng (t_2). Tất cả các mẫu khác chỉ được phân tích với một lần lặp lại duy nhất. Các kết quả thích đáng hơn được báo cáo dưới đây.

Đo độ đục bằng đục kế

Đo độ đục bằng đục kế là phương pháp đo độ đục được áp dụng để phát hiện sự có mặt của các kết tụ hòa tan hoặc để chỉ màu trắng sữa. Kết quả được liệt kê theo đơn vị độ đục khi đo bằng đục kế (nephelometric turbidity unit - NTU).

Bảng 17: Đơn vị độ đục khi đo bằng đục kế (NTU)) đối với các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong khoảng thời gian đến hai tháng.

	t_0	40°C trong 1 tháng	40°C trong thời gian 2 tháng
F1	5,16 / 5,26	6,19	4,00 / 4,07
F2	4,63 / 4,39	4,99	4,12 / 3,95
F3	8,94 / 8,54	9,60	8,34 / 8,33
F4	3,54 / 3,63	4,39	3,40 / 3,39

Kết quả của phương pháp đo độ đục bằng đục kế cho thấy protein này khá ổn định về mặt vật lý, không có sự thay đổi về bề ngoài thậm chí sau hai tháng ở 40°C.

Không bất ngờ là, việc bảo quản ở các nhiệt độ thấp hơn không tạo ra sự thay đổi đáng kể bất kỳ về trị số NTU đối với chế phẩm bất kỳ (Bảng 18). Vẫn chưa biết rõ tại sao chế phẩm 3 có trị số NTU cao hơn.

Bảng 18: Đơn vị độ đục khi đo bằng đục kế (NTU) đối với các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 4°C hoặc 25°C trong thời gian hai tháng.

	t_0	2°C đến 8°C trong thời gian 2 tháng	25°C trong thời gian 2 tháng
F1	5,16 / 5,26	4,56 / 4,48	4,10 / 3,65
F2	4,63 / 4,39	5,56 / 4,09	3,43 / 3,39
F3	8,94 / 8,54	8,11 / 7,95	9,57 / 8,55
F4	3,54 / 3,63	3,43 / 3,47	2,98 / 2,76

Bảng 19: Đơn vị độ đục (NTU)) đối với các chế phẩm MOR6654B trong điều kiện stress là khuấy (agit), nhiễu chu trình F/T (F/T), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (photo).

	t_0	Agit	F/T	Photo
F1	5,16 / 5,26	6,72	6,28	4,02
F2	4,63 / 4,39	5,22	5,26	3,91
F3	8,94 / 8,54	9,58	9,18	8,59
F4	3,54 / 3,63	4,48	4,22	3,15

Cuối cùng, phương pháp đo độ đục bằng đục kế đối với các mẫu trong các điều kiện stress, như khuấy, nhiễu F/T chu trình, và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài chỉ bộc lộ các thay đổi nhỏ ở các chế phẩm bất kỳ trong điều kiện stress bất kỳ. Ví dụ, chế phẩm 1 thể hiện sự gia tăng khoảng 1,5 NTU trong điều kiện stress khuấy và khoảng 1 NTU trong điều kiện stress F/T. Bằng cách so sánh, mức tăng ở chế phẩm 2 là nhỏ hơn 1 NTU trong cả hai điều kiện stress. Tương tự, chế phẩm 4 ở nồng độ thấp hơn, mà còn chứa sucroza, thể hiện sự gia tăng nhẹ khoảng 1 NTU khi khuấy.

Đo theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

Sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC)

Ba loại phân tích sắc ký lỏng cao áp được thực hiện đối với các mẫu này, bắt đầu với sắc ký loại trừ theo kích thước (size exclusion chromatography - SEC). Có

hiện tượng hụt monome rõ ràng như được đo theo phương pháp SEC đối với các mẫu đã được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong một tháng hoặc hai tháng (Bảng 20).

Bảng 20: Độ tinh khiết (theo phần trăm monome) được xác định theo phương pháp SEC-HPLC đối với các mẫu MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong thời gian đến hai tháng.

	t_0	40°C trong 1 tháng	40°C trong thời gian 2 tháng
F1	99,74 / 99,78	92,71	92,08 / 92,27
F2	99,64 / 99,60	93,51	92,39 / 92,61
F3	99,77 / 99,76	93,26	92,43 / 92,32
F4	99,67 / 99,53	93,80	93,58 / 92,87

Có hiện tượng hụt khoảng 7% đến 8% monome như được xác định theo phương pháp SEC đối với các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong thời gian một tháng hoặc hai tháng.

Bảng 21: Độ tinh khiết (theo phần trăm monome) xác định được theo phương pháp SEC-HPLC SEC đối với các mẫu MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 4°C và 25°C trong thời gian hai tháng.

	t_0	2°C đến 8°C trong thời gian 2 tháng	25°C trong thời gian 2 tháng
F1	99,74 / 99,78	99,62 / 99,63	99,35 / 99,58
F2	99,64 / 99,60	99,61 / 99,59	99,50 / 99,35
F3	99,77 / 99,76	99,58 / 99,57	99,18 / 99,26
F4	99,67 / 99,53	99,60 / 99,57	99,26 / 99,42

Đối với các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn, không có hiện tượng hụt monome ở 4°C và chỉ hụt một lượng rất nhỏ khoảng 1% ở 25°C. Khi xem xét các ảnh hưởng của điều kiện stress, có sự giảm nhẹ ở tất cả các chế phẩm khi khuấy và tham gia chu trình F/T, nhưng không có sự khác biệt thực sự giữa các chế phẩm. Bằng cách quang phân, nhận thấy hàm lượng monome giảm nhẹ. Một lần nữa, khác biệt giữa các chế phẩm là không thực sự rõ rệt.

Bảng 22: Đơn vị độ đục (NTU) đối với các chế phẩm MOR6654B trong điều kiện stress khuấy (agit), nhiễu chu trình F/T (F/T), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (photo).

	t_0	Agit	F/T	Photo
F1	99,74 / 99,78	99,29	98,86	98,94
F2	99,64 / 99,60	99,04	98,96	98,86
F3	99,77 / 99,76	98,85	98,98	98,44
F4	99,67 / 99,53	99,01	98,93	98,68

Mặc dù việc kiểm tra hàm lượng monome tổng là có ích, có thể hữu hiệu hơn khi xem xét biên dạng về độ ổn định tổng thể. Các bảng dưới đây tóm tắt tỷ lệ phần trăm của mỗi pic quan sát được ở mỗi vị trí. Để thuận tiện, các pic được sắp xếp theo thứ tự theo thời gian lưu tương ứng (RRT) của chúng để loại bỏ sự thay đổi không đáng kể về thời gian chạy.

Bảng 23. Biên dạng về độ ổn định tổng thể như đo được theo phương pháp SEC đối với các mẫu MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong khoảng thời gian đến hai tháng.

			RRT									
Chế phẩm	Số lần lặp lại	Thời điểm	0,81	0,84	0,88	0,91	0,95	1,00	1,07	1,22	1,38	1,58
Chế phẩm 1	1	0			0,13			99,74		0,04	0,09	
	2	0			0,14			99,78		0,03	0,04	
Chế phẩm 2	1	0			0,31			99,64		0,05		
	2	0			0,33			99,60		0,07		
Chế phẩm 3	1	0			0,17			99,78		0,05	0,05	
	2	0			0,19			99,77		0,05		
Chế phẩm 4	1	0			0,12			99,71				0,17

	2	0			0,17			99,59		0,07		0,17
Chế phẩm 1	1	1		1,12				92,85	5,35	0,68		
Chế phẩm 2	1	1		1,10				93,98	4,43	0,49		
Chế phẩm 3	1	1		0,90		0,07		93,61	4,84	0,58		
Chế phẩm 4	1	1		0,78				94,70	4,03	0,49		
Chế phẩm 1	1	2	0,16		0,18			92,08	6,40	1,18		
	2	2	0,17		0,21			92,27	6,31	1,05		
Chế phẩm 2	1	2			0,44			92,39	6,05	1,12		
	2	2			0,19		0,25	92,61	5,94	1,01		
Chế phẩm 3	1	2			0,14		0,20	92,43	6,27	0,96		
	2	2			0,17		0,19	92,32	6,27	1,05		
Chế phẩm 4	1	2			0,30	0,18		93,58	4,79	1,15		
	2	2			0,29	0,18		92,87	5,39	1,26		

Không phát hiện thấy pic kết tụ có phân tử lượng cao nào tại thời điểm t_0 (Bảng 23), và chỉ có phát hiện thấy ba tạp chất, bao gồm trên pic ở RRT 0,88, mà có lẽ là một oligome thuộc một số loại. Khi bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong thời gian một tháng hoặc hai tháng, hàm lượng monome giảm đáng kể, trong đó hầu hết các sản phẩm thoái biến rửa giải chậm hơn pic chính (Bảng 23). Điều này cho thấy rằng, đối với các chế phẩm này, sự phân mảnh còn khó giải quyết hơn nhiều so với sự kết tụ.

Đối với các mẫu được gia nhiệt ở nhiệt độ 25°C trong thời gian hai tháng, monome hụt rất ít (< 1%) (Bảng 24). Điều này cho thấy rằng năng lượng hoạt hóa biểu kiến đối với chu trình thoái biến sơ cấp là khá lớn, mà sẽ phù hợp với thoái biến nhờ thủy phân. Tương tự với hai pic phân đoạn được nhận thấy ở RRT 1,07 và 1,22, với pic ở 1,07 lớn hơn một chút ở tất cả các mẫu. Trên thực tế, RRT 1,22 là khá nhỏ ở chế phẩm 1 và chế phẩm 2, khiến cho chúng không được hợp nhất trong quá trình chạy. Theo cách khác, chỉ có sự khác biệt rất nhỏ giữa các chế phẩm bảo quản ở nhiệt độ 25°C khi được đánh giá bởi SEC.

Bảng 24. Biên dạng độ ổn định tổng thể như đo được bởi SEC đối với các mẫu MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong thời gian hai tháng.

			RRT								
Chế phẩm	Số lần lặp lại	Thời điểm	0,81	0,88	0,91	0,96	1,00	1,07	1,22	1,38	1,58
25 C											
Chế phẩm 1	1	0		0,13			99,74		0,04	0,09	
	2	0		0,14			99,78		0,03	0,04	
Chế phẩm 2	1	0		0,31			99,64		0,05		
	2	0		0,33			99,60		0,07		
Chế phẩm 3	1	0		0,17			99,78		0,05	0,05	
	2	0		0,19			99,77		0,05		
Chế phẩm 4	1	0		0,12			99,71				0,17
	2	0		0,17			99,59		0,07		0,17
Chế phẩm 1	1	2				0,33	99,35		0,32		
	2	2		0,13			99,58		0,29		
Chế phẩm 2	1	2		0,29			99,50		0,21		
	2	2		0,34			99,35		0,31		
Chế phẩm 3	1	2		0,47			99,18		0,31	0,03	
	2	2		0,41			99,26		0,29	0,03	
Chế phẩm 4	1	2		0,40			99,26		0,33	0,01	
	2	2		0,35			99,42		0,21	0,02	

Đối với các mẫu bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian hai tháng, không có hiện tượng hụt monome nhìn được bằng mắt thường bởi SEC ở một trong hai vị trí (bảng 23). Lượng oligome gần như là giống hệt đối với tất cả các chế phẩm.

Khi các điều kiện stress khác nhau được thử nghiệm (thử nghiệm khuấy, F/T, và bền với ánh sáng), thì nhận thấy sự thoái biến nhẹ bởi SEC. Việc khuấy cũng như việc lặp lại chu trình F/T dường như không gây ra sự thoái biến hóa học đáng kể và sự tăng nhẹ về mức oligome. Tất cả các chế phẩm đều biểu hiện gần như giống nhau.

Bằng cách tiếp xúc với ánh sáng, phương pháp phân tích SEC biểu thị mức phân mảnh cao hơn đối với chế phẩm 3 (Bảng 26).

Bảng 25. Biên dạng độ ổn định tổng thể như đo được theo phương pháp SEC đối với các mẫu MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian hai tháng.

			RRT									
Chế phẩm	Số lần lặp lại	Thời điểm	0,81	0,84	0,88	0,91	1,00	1,07	1,22	1,38	1,58	
4 C												
Chế phẩm 1	1	0			0,13		99,74		0,04	0,09		
	2	0			0,14		99,78		0,03	0,04		
Chế phẩm 2	1	0			0,31		99,64		0,05			
	2	0			0,33		99,60		0,07			
Chế phẩm 3	1	0			0,17		99,78		0,05	0,05		
	2	0			0,19		99,77		0,05			
Chế phẩm 4	1	0			0,12		99,71				0,17	
	2	0			0,17		99,59		0,07		0,17	
Chế phẩm 1	1	2			0,32		99,62		0,06			
	2	2			0,32		99,63		0,05			
Chế phẩm 2	1	2			0,34		99,61		0,05			
	2	2			0,35		99,59		0,06			
Chế phẩm 3	1	2			0,35		99,58		0,07			
	2	2			0,36		99,57		0,07			
Chế phẩm 4	1	2			0,34		99,60		0,05			
	2	2			0,37		99,57		0,06			

Bảng 26. Biên dạng độ ổn định tổng thể như đo được theo phương pháp SEC đối với các chế phẩm MOR6654B được đặt trong điều kiện stress là khuấy (agit), nhiều chu trình F/T (f/t), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (photo).

			RRT										
Chế phẩm	Số lần lặp lại	Thời điểm	0,81	0,88	0,95	1,00	1,07	1,22	1,29	1,38	1,40	1,58	
Chế phẩm 1	1	0		0,13		99,74		0,04		0,09			
	2	0		0,14		99,78		0,03		0,04			
Chế phẩm 2	1	0		0,31		99,64		0,05					
	2	0		0,33		99,60		0,07					
Chế phẩm 3	1	0		0,17		99,78		0,05		0,05			
	2	0		0,19		99,77		0,05					
Chế phẩm 4	1	0		0,12		99,71						0,17	
	2	0		0,17		99,59		0,07				0,17	
Chế phẩm 1	1	agit		0,69		99,31							
Chế phẩm 2	1	agit		0,94		99,06							

Chế phẩm 3	1	agit	0,98	98,89	0,11	0,02		
Chế phẩm 4	1	agit	0,85	99,15				
Chế phẩm 1	1	F/T	0,94	98,85	0,20			
	2	F/T	0,94	98,91	0,15			
Chế phẩm 2	1	F/T	0,90	98,96	0,13			
	2	F/T	0,90	99,00	0,09			
Chế phẩm 3	1	F/T	0,92	98,99	0,09			
	2	F/T	0,92	98,99	0,09			
Chế phẩm 4	1	F/T	0,79	99,09	0,12			
	2	F/T	0,79	99,09	0,10			
Chế phẩm 1	1	photo	0,77	98,94	0,25	0,04		
	2	photo	0,80	98,92	0,25	0,04		
Chế phẩm 2	1	photo	0,87	98,86	0,24	0,03		
	2	photo	0,90	98,84	0,24	0,03		
Chế phẩm 3	1	photo	0,61	0,26 98,44	0,09	0,57	0,03	
	2	photo	0,62	0,25 98,49	0,10	0,52	0,02	
Chế phẩm 4	1	photo	0,91	98,68	0,36	0,05		
	2	photo	0,95	98,56	0,44	0,05		

RP HPLC

RP HPLC cung cấp thông tin về hiện tượng thoái biến hóa học có thể xảy ra ở protein.

Do sự thoái biến hóa học dường như xuất hiện ở MOR6654B, phân tích RP HPLC có thể mang lại khá nhiều thông tin.

Tại thời điểm t_0 , cả bốn chế phẩm đều có độ tinh khiết gần 99,9% theo RP HPLC.

Sau một tháng bảo quản ở nhiệt độ 40°C, độ tinh khiết giảm đến 96%, mặc dù độ tinh khiết này cao hơn đáng kể so với chế phẩm 4. Sự chênh lệch giữa các trị số này bày tỏ sự nghi ngờ liệu trị số này có đúng hay không (Bảng 27).

Tại thời điểm hai tháng, cả bốn chế phẩm đều bị giảm đến 94%, với sự khác biệt nhỏ giữa các chế phẩm, nếu có.

Bảng 27: Độ tinh khiết của các chế phẩm MOR6654B được xác định theo phương pháp RP HPLC sau khi bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong thời gian đến hai tháng

Chế phẩm số	[protein] mg/ml		t_0		t_1	t_2	
1	150	sucroza	99,86	99,89	96,09	93,97	94,01
2	150	trehaloza	99,94	99,92	96,27	94,61	94,12

3	150	sucroza/Arg	99,93	99,93	95,82	94,13	94,30
4	20	sucroza	99,85	99,84	98,44	94,44	94,67

Bảng 28. Độ tinh khiết của các chế phẩm MOR6654B được xác định theo phương pháp RP HPLC sau khi bảo quản ở nhiệt độ 4°C hoặc 25°C trong thời gian hai tháng

Chế phẩm số	[protein] mg/ml		t ₀		t ₂ 4°C		t ₂ 25°C	
1	150	sucroza	99,86	99,89	96,92	96,85	96,63	96,61
2	150	trehaloza	99,94	99,92	97,12	96,99	96,95	96,63
3	150	sucroza/Arg	99,93	99,93	96,88	96,99	96,49	96,46
4	20	sucroza	99,85	99,84	96,81	97,07	96,34	96,41

Việc bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong thời gian hai tháng làm giảm độ tinh khiết đến ~96,5% theo phân tích RP HPLC (Bảng 28). Độ tinh khiết đối với các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 4°C không khác nhau, với độ tinh khiết đạt gần 97%. Một lần nữa, cả bốn chế phẩm đều biểu hiện tương tự.

Nhờ việc được đặt trong các điều kiện stress, độ tinh khiết cũng bị giảm. Ở các nghiên cứu khuấy và F/T, độ tinh khiết nằm trong khoảng từ 97% đến 98% đối với tất cả các chế phẩm. Tuy nhiên, bằng cách tiếp xúc với ánh sáng, mức độ thoái biến lớn hơn. Các chế phẩm ở nồng độ 150mg/ml giảm đến 94% trong khi các chế phẩm ở nồng độ 20mg/ml giảm đến <90%.

Bảng 29. Độ tinh khiết xác định được theo phương pháp RP HPLC của các chế phẩm MOR6654B được đặt trong điều kiện stress là khuấy (agit), nhiễu chu trình F/T (F/T), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (photo).

Chế phẩm số	[protein] mg/ml		t ₀		agit	F/T	photo
1	150	sucroza	99,86	99,89	97,51	98,14	94,47
2	150	trehaloza	99,94	99,92	97,46	97,67	94,45
3	150	sucroza/Arg	99,93	99,93	97,89	96,68	94,82
4	20	sucroza	99,85	99,84	96,74	97,29	89,51

Việc phân tích bằng SEC là có ích để kiểm tra hình thức bên ngoài của các sản phẩm thoái biến cũng như tính toán mức hao hụt pic chính. Đối với các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 40°C, biên dạng thoái biến được tổng kết trong bảng 30. Chỉ một tạp

chất được nhìn thấy ở t₀, trong khi nhiều loại được quan sát khi bảo quản ở nhiệt độ tăng cao. Dường như là độ tinh khiết tương đối cao được nhìn thấy đối với chế phẩm 4 tại thời điểm t₁ chỉ là do không nhìn thấy pic này ở RRT 1,19 (Bảng 30). Nói chung, có sự khác biệt rất nhỏ giữa các chế phẩm bất kỳ trong số bốn chế phẩm về biên dạng độ ổn định như đo được theo phương pháp RP HPLC.

Bảng 30. Biên dạng thoái biến của các chế phẩm MOR6654B xác định được theo phương pháp RP HPLC sau khi bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong thời gian một tháng (đậm) và hai tháng (nghe)

Chế phẩm	Số lần lặp lại	Thời điểm	0,67	0,70	0,76	0,86	0,93	1,00	1,11	1,16	1,19
40 C											
Chế phẩm 1	1	0					0,14	99,86			
	2	0					0,11	99,89			
Chế phẩm 2	1	0					0,11	99,89			
	2	0					0,21	99,79			
Chế phẩm 3	1	0					0,12	99,88			
	2	0					0,11	99,89			
Chế phẩm 4	1	0					0,15	99,85			
	2	0					0,16	99,84			
Chế phẩm 1	1	1		0,01	0,04	1,35		96,09			2,51
Chế phẩm 2	1	1		0,01	0,02	1,44		96,33			2,20
Chế phẩm 3	1	1		0,02	0,06	1,70		95,99			2,24
Chế phẩm 4	1	1		0,01	0,03	1,52		98,44			
Chế phẩm 1	1	2	0,04			2,72		93,97	1,97	1,29	
	2	2	0,05			2,73		94,01		3,21	
Chế phẩm 2	1	2	0,02			2,67		94,61		2,70	
	2	2	0,06			2,73		94,12	1,86	1,24	
Chế phẩm 3	1	2	0,08			2,87		94,13	2,19	0,73	
	2	2	0,08			2,88		94,30		2,74	

Chế phẩm 4	1	2	0,05			2,89		94,44	2,62		
	2	2	0,05			2,72		94,67	2,57		

Đối với các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 25°C, có hai sản phẩm thoái biến chính mà rửa giải ra sau pic chính (Bảng 31). Biên dạng độ ổn định đối với cả bốn chế phẩm về cơ bản là như nhau ở nhiệt độ 25°C khi được đánh giá bằng cách áp dụng phương pháp RP HPLC. Tương tự, các mẫu bảo quản ở 4°C có biên dạng thoái biến tương tự nhau (Bảng 32).

Bảng 31. Biên dạng thoái biến của các chế phẩm MOR6654B xác định được theo phương pháp RP HPLC sau khi bảo quản ở nhiệt độ 25°C tại thời điểm t₀ và sau hai tháng

Chế phẩm	Số lần lặp lại	Thời điểm	0,67	0,76	0,86	0,93	1,00	1,11	1,16	1,19
25°C										
Chế phẩm 1	1	0				0,14	99,86			
	2	0				0,11	99,89			
Chế phẩm 2	1	0				0,11	99,89			
	2	0				0,21	99,79			
Chế phẩm 3	1	0				0,12	99,88			
	2	0				0,11	99,89			
Chế phẩm 4	1	0				0,15	99,85			
	2	0				0,16	99,84			
Chế phẩm 1	1	2			0,64		96,63	2,13		0,60
	2	2			0,56		96,61	2,24		0,59
Chế phẩm 2	1	2			0,55		96,95	1,77		0,72
	2	2			0,56		96,63	2,21		0,60
Chế phẩm 3	1	2			0,63		96,49	2,33		0,55
	2	2			0,65		96,46	2,17		0,72
Chế phẩm 4	1	2			0,55		96,34	2,37		0,74
	2	2			0,54		96,41	2,16		0,88

Bảng 32. Biên dạng thoái biến của các chế phẩm MOR6654B xác định được theo phương pháp RP HPLC sau khi bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong khoảng thời gian lên đến hai tháng

Chế phẩm	Số lần lặp lại	Thời điểm	0,67	0,76	0,86	0,93	1,00	1,11	1,16	1,19
4°C										
Chế phẩm 1	1	0				0,14	99,86			
	2	0				0,11	99,89			
Chế phẩm 2	1	0				0,11	99,89			
	2	0				0,21	99,79			
Chế phẩm 3	1	0				0,12	99,88			
	2	0				0,11	99,89			
Chế phẩm 4	1	0				0,15	99,85			
	2	0				0,16	99,84			
Chế phẩm 1	1	2			0,25		96,92	2,20	0,63	
	2	2			0,24		96,85	2,34	0,58	
Chế phẩm 2	2	2			0,17		97,12	1,87	0,83	
	2	2			0,23		96,99	1,95	0,83	
Chế phẩm 3	1	2			0,16		96,88	2,96		
	2	2			0,17		96,99	2,84		
Chế phẩm 4	1	2			0,23		96,81	2,20	0,76	
	2	2			0,16		97,07	2,06	0,71	

Khi các mẫu được đưa đi khuấy, chỉ một sản phẩm thoái biến xuất hiện và mức độ là tương tự ở tất cả các mẫu (Bảng 33). Chế phẩm 4 dường như kém ổn định hơn một chút so với ba chế phẩm còn lại, có thể do nồng độ protein thấp hơn. Chu trình F/T lặp lại cũng gây ra một số tổn hại ở mức khiêm tốn như được nhận thấy theo phân tích RP HPLC, với biên dạng tương tự với biên dạng được nhận thấy khi khuấy. Điều này được nhận thấy một cách lặp lại trong suốt quá trình thử nghiệm, cho thấy rằng độ nhạy ở bề mặt phân cách của protein này có thể được nhìn thấy bất kể là một mẫu được kiểm tra hoặc mẫu khác được kiểm tra. Dường như là không cần thiết phải tiến hành cả việc đánh giá độ nhạy tổng thể với stress khi đặt ở bề mặt phân cách. Cuối cùng, việc tiếp xúc với ánh sáng tạo ra một số loại, mà có khả năng là những mảnh,

được rửa giải ra sớm. Trong số bốn chế phẩm, lượng các loại mảnh này ở chế phẩm 3 là cao hơn (Bảng 33).

Bảng 33. Biên dạng thoái biến xác định được theo phương pháp RP HPLC của các chế phẩm MOR6654B được đặt trong điều kiện stress là khuấy (agit), nhiễu chu trình F/T (F/T), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (photo).

Chế phẩm	Số lần lặp lại	Điều kiện	0,68	0,75	0,87	0,93	0,96	1,00	1,10	1,16	1,24	1,29
Khuấy												
Chế phẩm 1	1	t0				0,14		99,86				
	2					0,11		99,89				
Chế phẩm 2	1	t0				0,11		99,89				
	2					0,21		99,79				
Chế phẩm 3	1	t0				0,12		99,88				
	2					0,11		99,89				
Chế phẩm 4	1	t0				0,15		99,85				
	2					0,16		99,84				
Chế phẩm 1	1	Agit				0,10		98,07	1,83			
	2					0,12		96,96	2,92			
Chế phẩm 2	1	Agit				0,29		97,52	2,20			
	2					0,13		97,40	2,47			
Chế phẩm 3	1	Agit				0,10		98,14	1,76			
	2					0,11		97,64	2,25			
Chế phẩm 4	1	Agit				0,11		96,79			3,10	
	2					0,11		96,68			3,21	
Chế phẩm 1	1	F/T				0,17		99,31				0,51
	2					0,23		96,96	2,81			
Chế phẩm 2	1	F/T				0,26		97,94	1,80			
	2					0,27		97,40	2,33			
Chế phẩm 3	1	F/T				0,17		96,68	3,15			
Chế phẩm 4	1	F/T				0,12		97,11	2,78			
	2					0,10		97,48	2,42			
Chế phẩm 1	1	photo	0,01		0,62		1,17	94,47	3,73			
	2		0,01		0,63		1,42	96,93		1,02		
Chế phẩm 2	2	photo	0,01		0,65		1,52	94,45	3,38			
	2		0,01		0,68		1,56	94,08	3,68			
Chế phẩm 3	1	photo	0,03		1,36		0,62	94,82	3,17			
	2		0,03		1,40		0,87	93,98	3,73			
Chế phẩm 4	1	photo		0,24	0,98		6,05	89,51	3,23			
	2			0,25	0,93		5,45	89,69	3,68			

Sắc ký trao đổi cation (CEX HPLC)

Phương pháp sắc ký lỏng cao áp thứ ba được áp dụng để đánh giá độ ổn định của bốn chế phẩm MOR6654B là sắc ký trao đổi cation (CEX). Phương pháp này được dự định dùng để xác định các sản phẩm thoái hóa mà có điện tích khác với hợp chất gốc. Ban đầu, cả bốn chế phẩm đều thể hiện một pic chính rộng mà chiếm khoảng 98% tổng diện tích pic (Bảng 34). Khi được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong thời gian một tháng, pic chính này giảm đến 96%, trong đó chế phẩm 4 có độ tinh khiết cao hơn một chút (Bảng 34). Sau khi bảo quản trong thời gian hai tháng ở nhiệt độ 40°C, pic chính này giảm tiếp đến 95%, trong đó chế phẩm 1 có độ tinh khiết lớn nhất.

Bảng 34. Độ tinh khiết như được xác định theo CEX HPLC của các chế phẩm MOR6654B sau khi được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong khoảng thời gian đến hai tháng

			t0		t1	t2	
Chế phẩm số	[protein] mg/ml		CEX		CEX	CEX	
1	150	sucroza	98,30	98,28	96,76	95,76	95,69
2	150	trehaloza	98,35	98,28	96,62	95,17	95,31
3	150	sucroza/Arg	98,34	98,26	96,62	94,75	94,89
4	20	sucroza	98,30	98,22	97,31	95,39	95,13

Bảng 35. Độ tinh khiết như được xác định theo CEX HPLC của các chế phẩm MOR6654B sau khi được bảo quản ở nhiệt độ 4°C và 25°C trong thời gian hai tháng

			t0		t2 4 C		t2 25 C	
Chế phẩm số	[protein] mg/ml		CEX		CEX		CEX	
1	150	sucroza	98,30	98,28	97,29	97,70	97,09	97,36
2	150	trehaloza	98,35	98,28	97,45	97,35	97,31	97,20
3	150	sucroza/Arg	98,34	98,26	97,33	97,45	97,36	97,35
4	20	sucroza	98,30	98,22	97,05	97,38	97,42	97,46

Đối với các chế phẩm MOR6654B được bảo quản trong thời gian hai tháng ở nhiệt độ 25°C, độ tinh khiết giảm từ > 98% đến ~97%, trong đó chế phẩm 4 ổn định

hơn một chút, nhưng chỉ một chút thôi (Bảng 35). Khi được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong cùng khoảng thời gian, có sự giảm độ tinh khiết ở một mức nào đó, tương tự với mức giảm được nhận thấy đối với dữ liệu RP HPLC. Một lần nữa, không hiểu rõ được tại sao có sự thoái biến mạnh hơn nhiều ở các mẫu ở nhiệt độ 4°C so với ở nhiệt độ 25°C, nhưng mức độ thoái biến này là nhỏ và toàn bộ các chế phẩm MOR6654B đều có mức độ thoái biến xấp xỉ như nhau.

Bảng 36. Độ tinh khiết như được xác định theo CEX HPLC của các chế phẩm MOR6654B được đặt trong điều kiện stress là khuấy (agit), nhiễu chu trình F/T (F/T), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (photo).

			t0		agit	F/T	photo
Chế phẩm số	[protein] mg/ml		CEX		CEX	CEX	CEX
1	150	sucroza	98,30	98,28	97,59	97,54	98,91
2	150	trehaloza	98,35	98,28	97,37	97,49	98,82
3	150	sucroza/Ar g	98,34	98,26	97,33	97,96	98,41
4	20	sucroza	98,30	98,22	97,31	97,56	98,82

Bằng cách khuấy các mẫu trong điều kiện chu trình F/T lặp lại, độ tinh khiết giảm theo phân tích CEX HPLC, trong đó cả bốn chế phẩm đều giảm như nhau (Bảng 36). Việc tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài tạo ra sự tổn hao rất nhỏ theo CEX HPLC, trái với điều được nhận thấy với SEC và RP HPLC (lần lượt bảng 26 và bảng 29). Điều này gợi ý rằng các sản phẩm thoái biến đã được tạo ra bởi ánh sáng không khác về mặt điện tích so với hợp chất gốc.

Điện di mao quản khử (rCE-SDS)

Phương pháp điện di mao quản ở đây cho phép xem xét mức độ tổn hao đối với chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC) của kháng thể một cách độc lập. Ngoài ra, nó có thể đưa ra ước lượng về số lượng protein không phải là LC và HC nguyên vẹn như được biểu thị theo hàm lượng mảnh không phải LC/HC. Tại thời điểm t0, có khoảng 25% LC và 70% HC theo diện tích pic, không hiệu chỉnh đối với các khác biệt về cỡ (Bảng 37), với phần còn lại (~5%) được tính như là các loại không phải LC/HC (Bảng 38).

Bảng 37. Tỷ lệ phần trăm LC và HC như được xác định theo rCE-SDS ở các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong thời gian đến hai tháng

			t0				t1		t2			
Chế phẩm số	[protein] mg/ml		LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC
1	150	sucroza	25,0	69,8	25,5	69,4	26,3	64,4	27,5	62,7	27,6	62,3
2	150	trehaloza	25,9	69,4	26,0	69,2	26,9	64,7	27,0	62,3	27,0	61,3
3	150	sucroza/Arg	24,1	70,2	24,5	69,6	27,6	62,8	27,5	61,7	27,2	63,8
4	20	sucroza	24,9	67,8	24,9	67,9	27,3	67,5	26,5	65,0	27,0	63,6

Sau khi bảo quản trong thời gian một tháng ở 40°C, lượng tương đối của LC và HC thay đổi, trong đó LC hiện chiếm ~27% và HC nằm trong khoảng từ 62% đến 68% (Bảng 37). Điều này biểu thị rằng HC bị hụt. Điều này được phản ánh ở mức độ gia tăng rõ rệt về lượng của các loại không phải LC/HC (Bảng 38), khi các lượng này tăng gần gấp đôi so với các mức trước bảo quản.

Bảng 38. Tỷ lệ phần trăm của các loại không phải LC/HC như được xác định theo rCE-SDS ở các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong khoảng thời gian lên đến hai tháng

			t0	t1	t2
Chế phẩm số	[protein]		không phải LC/HC	không phải LC/HC	không phải LC/HC
1	150	sucroza	5,2	9,3	9,9
2	150	trehaloza	4,8	8,4	11,2
3	150	sucroza/Arg	5,8	9,6	9,9
4	20	sucroza	7,3	5,2	9,0

Vào cuối khoảng thời gian hai tháng, có khoảng 10% (hoặc nhiều hơn) các loại không phải LC/HC. Các dữ liệu này gợi ý rằng chế phẩm 4 là mạnh nhất, với sự gia tăng các lượng không phải LC/HC theo tỷ lệ phần trăm là nhỏ nhất.

Bảng 39. Tỷ lệ phần trăm LC và HC như xác định được theo rCE-SDS ở các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian hai tháng

			t0				t2 4 C				
Chế phẩm số	[protein] mg/ml		LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC	không phải LC/HC
1	150	sucroza	25,0	69,8	25,5	69,4	26,4	66,2	26,7	66,8	7,0
2	150	trehaloza	25,9	69,4	26,0	69,2	27,3	68,7	27,3	67,9	4,4
3	150	sucroza/Arg	24,1	70,2	24,5	69,6	27,7	67,3	26,9	66,3	5,9
4	20	sucroza	24,9	67,8	24,9	67,9	25,8	67,6	25,9	67,3	6,7

Khi các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 4°C, vẫn có hiện tượng thoái biến ở một mức nào đó như được nhận thấy bởi rCE-SDS, do mức LC tăng từ ~25% đến ~27% (Bảng 39). Trong trường hợp này, chế phẩm 2 là bền nhất với sự gia tăng một chút về lượng các loại không phải LC/HC.

Bảng 40. Tỷ lệ phần trăm LC và HC như được xác định theo rCE-SDS ở các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong thời gian hai tháng

			t0				t2 25 C				
Chế phẩm số	[protein] mg/ml		LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC	không phải LC/HC
1	150	sucroza	25,0	69,8	25,5	69,4	27,9	67,4	28,0	67,5	4,6
2	150	trehaloza	25,9	69,4	26,0	69,2	27,9	66,1	27,8	67,5	5,3
3	150	sucroza/Arg	24,1	70,2	24,5	69,6	26,4	67,5	26,9	66,0	6,6
4	20	sucroza	24,9	67,8	24,9	67,9	26,1	68,0	26,7	68,0	5,6

Khi được bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong thời gian hai tháng, có sự gia tăng ngang bằng về hàm lượng LC và mức giảm hàm lượng HC (Bảng 40). Lượng các loại không phải LC/HC tăng, nhưng dường như đối với mẫu 40°C là tăng nhiều nhất.

Trong số chúng, chế phẩm 3 dường như có độ ổn định thấp nhất, nhưng các mức chênh lệch là nhỏ.

Bảng 41. Tỷ lệ phần trăm LC và HC như được xác định theo rCE-SDS ở các chế phẩm MOR6654B trong điều kiện stress là khuấy (agit), nhiễu chu trình F/T (F/T), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (photo).

			agit			F/T			photo		
Chế phẩm số	[protein] mg/ml		LC	HC	không phải LC/HC	LC	HC	không phải LC/HC	LC	HC	không phải LC/HC
1	150	sucroza	28,3	67,2	4,5	28,7	67,6	3,7	27,3	66,2	6,5
2	150	trehaloza	28,2	68,3	3,5	27,9	67,7	4,4	27,0	66,1	6,9
3	150	sucroza/Arg	28,3	68,4	3,3	27,6	69,3	3,1	26,6	66,1	7,3
4	20	sucroza	26,9	69,1	4,0	26,9	69,5	3,6	26,2	64,6	9,2

Bộ mẫu cuối cùng được phân tích bởi rCE-SDS là các mẫu trong ba điều kiện stress khác nhau (Bảng 41). Khi các mẫu được khuấy hoặc được tham gia chu trình F/T, không có mức tăng đáng kể về các loại không phải LC/HC đối với chế phẩm bất kỳ trong số bốn chế phẩm MOR6654B. Điều này là phù hợp với các phát hiện khác, là MOR6654B trong các chế phẩm này không rất nhạy với điều kiện stress là đặt ở mặt phân cách. Điều này cũng giúp củng cố quan niệm cho rằng hai thử nghiệm này đưa ra các đánh giá có thể so sánh được về tính ổn định ở mặt phân cách. Việc tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài gây ra sự hao hụt HC ở một mức nào đó và sự gia tăng các mức không phải LC/HC (Bảng 41). Trong số các chế phẩm này, chế phẩm 4 thể hiện sự thay đổi lớn nhất.

Hiện hình dòng cỡ micro (MFI)

Trong vài năm trở lại đây, việc tập trung vào lượng các hạt hữu hình thay thế (sub-visible) trong các sản phẩm protein có thể được dùng để tiêm gia tăng. Kết quả là, nhiều phương pháp phân tích khác nhau đã được phát triển. Một trong số các phương pháp được biết đến rộng rãi nhất là phương pháp hiện hình dòng cỡ micro (microflow imaging - MFI). Kỹ thuật này được dùng để xác định hàm lượng hạt hữu hình thay thế (theo số hạt trên một ml) thuộc các khoảng cỡ hạt khác nhau. Mặc dù dữ liệu được thu thập đến cỡ hạt 100um, chỉ có dữ liệu đến 25um là được thể hiện. Khả năng tái tạo của

dữ liệu MFI là rất tốt. Độ lệch chuẩn tương đối trung bình đối với các lần đo lặp lại là khoảng 5%.

Bảng 42. Hàm lượng hữu hình thay thế (tính bằng hạt/ml) khi đo được bằng cách sử dụng MFI đối với các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong thời gian một tháng (in đậm) và hai tháng (in nghiêng). Các mẫu tại thời điểm t1 không được thử nghiệm lặp lại 2 lần. Theo cách khác, các trị số được thông báo là trị số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

Chế phẩm số	[protein] mg/ml	Tá được	Tổng	1um đến 2 um	2um đến 5um	5um đến 10um	10um đến 25um
1	150	sucroza	24137 $\pm$ 486	18257 $\pm$ 391	4968 $\pm$ 33	518 $\pm$ 6	78 $\pm$ 16
2	150	trehaloza	12614 $\pm$ 660	9580 $\pm$ 661	2298 $\pm$ 64	568 $\pm$ 47	148 $\pm$ 10
3	150	sucroza/Arg	33374 $\pm$ 975	23593 $\pm$ 718	8554 $\pm$ 174	1134 $\pm$ 88	82 $\pm$ 5
4	20	Sucroza	4130 $\pm$ 28	2463 $\pm$ 134	1197 $\pm$ 15	441 $\pm$ 76	26 $\pm$ 14
1	150	Sucroza	46508	36658	7768	1684	326
2	150	trehaloza	22154	14920	5153	1867	214
3	150	sucroza/Arg	34800	22990	9791	1926	82
4	20	sucroza	27372	15663	9660	1943	98
1	150	sucroza	35130 $\pm$ 2897	21931 $\pm$ 1725	8703 $\pm$ 544	3793 $\pm$ 596	683 $\pm$ 34
2	150	trehaloza	24843 $\pm$ 3887	19692 $\pm$ 3789	4246 $\pm$ 39	757 $\pm$ 21	107 $\pm$ 1
3	150	sucroza/Arg	46220 $\pm$ 3152	33038 $\pm$ 849	10853 $\pm$ 1957	2000 $\pm$ 110	239 $\pm$ 109
4	20	sucroza	51835 $\pm$ 1703	33847 $\pm$ 905	14942 $\pm$ 74	2411 $\pm$ 6	127 $\pm$ 11

Thông thường, dữ liệu được tóm tắt đối với MFI chỉ thông báo tổng số lượng hạt (số hạt trên một ml), nhưng điều này có thể là sai lạc, khi các con số này được chiếm ưu thế bởi các phân tử được đếm ở khoảng cỡ hạt 1um đến 2um. Trong khoảng cỡ hạt này, nổi bật là dầu silic và bọt khí, và làm xiên lệch số đếm các hạt trên cơ sở protein. Mặc dù các con số này được đưa ra, tốt hơn là xem xét các hạt có cỡ hạt lớn hơn 2um, có thể lớn hơn 5um. Ngoài ra, để đưa ra trị số trung bình và độ lệch chuẩn của các mẫu, các trị số này là kết quả của các lần chạy lặp lại.

Khi được bảo quản ở nhiệt độ 40°C, số lượng hạt hữu hình thay thế tăng đối với tất cả các chế phẩm (Bảng 42). Đặc biệt lưu ý là chế phẩm 4, khi tổng lượng hạt bé hơn 5000 hạt trên một ml ở t0, thấp hơn nhiều so với các chế phẩm ở nồng độ cao hơn khác. Sau một tháng, tất cả các chế phẩm đều vượt quá 20000 hạt trên một ml, mặc dù sự gia tăng đối với chế phẩm 3 là khá nhỏ (Bảng 42). Tại thời điểm hai tháng, chỉ có

chế phẩm 2 có ít hơn 30000 hạt trên một ml. Sự khác biệt này là đáng chú ý hơn đối với các hạt có cỡ hạt từ 2 đến 5 μ m (trong đó chế phẩm này chứa ít hơn 5000 hạt trên một ml) và 5 đến 10 μ m, khi các mức này là bé hơn 1000 hạt trên một ml, trong đó chỉ có chế phẩm 1 là gần sát về tổng lượng các hạt hữu hình thay thế có mặt.

Bảng 43. Hàm lượng hữu hình thay thế (số hạt/ml) như đo được bằng cách sử dụng MFI đối với các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong thời gian hai tháng (in đậm). Các trị số được báo cáo là các trị số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

Chế phẩm số	[protein] mg/ml	Tá được	Tổng lượng	1 μ m đến 2 μ m	2 đến 5 μ m	5 đến 10 μ m	10 đến 25 μ m
1	150	sucroza	24137 $\pm$ 486	18257 $\pm$ 391	4968 $\pm$ 33	518 $\pm$ 6	78 $\pm$ 16
2	150	trehaloza	12614 $\pm$ 660	9580 $\pm$ 661	2298 $\pm$ 64	568 $\pm$ 47	148 $\pm$ 10
3	150	sucroza/Arg	33374 $\pm$ 975	23593 $\pm$ 718	8554 $\pm$ 174	1134 $\pm$ 88	82 $\pm$ 5
4	20	sucroza	4130 $\pm$ 28	2463 $\pm$ 134	1197 $\pm$ 15	441 $\pm$ 76	26 $\pm$ 14
1	150	sucroza	21362 $\pm$ 600	14928 $\pm$ 192	5420 $\pm$ 648	907 $\pm$ 124	101 $\pm$ 20
2	150	trehaloza	35948 $\pm$ 1900	24189 $\pm$ 2258	9257 $\pm$ 252	2416 $\pm$ 609	70 $\pm$ 13
3	150	sucroza/Arg	67603 $\pm$ 1743	49362 $\pm$ 2758	12381 $\pm$ 154	4303 $\pm$ 282	1243 $\pm$ 560
4	20	sucroza	48163 $\pm$ 2420	31446 $\pm$ 950	15394 $\pm$ 1356	1240 $\pm$ 126	83 $\pm$ 13

Khi các mẫu MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong thời gian hai tháng, có hiện tượng tăng số hạt hữu hình thay thế ở tất cả các chế phẩm, mặc dù mức tăng ở chế phẩm 1 là rất nhỏ (Bảng 43). Đối với chế phẩm 1, chỉ có sự gia tăng một chút các hạt có cỡ hạt nằm trong khoảng từ 5 μ m đến 10 μ m. Theo cách khác, hầu như không có sự thay đổi. Trong khi đó, có sự tăng khá nhiều ở tất cả các chế phẩm khác, đặc biệt là ở các cỡ hạt nằm trong khoảng từ 2 μ m đến 25 μ m. Cụ thể, chế phẩm 3 và chế phẩm 4 có sự gia tăng đáng kể ở hầu hết các khoảng cỡ hạt.

Đối với các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian hai tháng, có sự thay đổi một chút về mức hạt hữu hình thay thế. Chế phẩm 1 chỉ chỉ ra sự gia tăng nhẹ về số hạt có cỡ hạt nằm trong khoảng từ 5mm đến 10mm, với sự giảm nhẹ ở tất cả các khoảng cỡ hạt khác. Chế phẩm 2 chỉ cho thấy sự tăng nhẹ với các khoảng cỡ hạt khác nhau, trong khi chế phẩm 3 thể hiện sự giảm nhẹ tổng lượng hạt. Bằng cách so sánh, thấy rằng chế phẩm 4, mà bắt đầu với tải lượng hạt hữu hình

thay thế là rất thấp (chỉ cao hơn một chút so với nước tinh khiết), thể hiện mức tăng đáng kể về số hạt trên một ml ở tất cả các khoảng cỡ hạt.

Khi các chế phẩm MOR6654B trong điều kiện stress là khuấy, chu trình F/T và tiếp xúc với ánh sáng, thì có sự gia tăng rõ rệt chỉ đối với các mẫu bền đối với ánh sáng (Bảng 44). Cả điều kiện khuấy và chu trình F/T đều gây ra sự gia tăng mức hạt từ nhỏ đến vừa phải, đặc biệt là khi không tính đến các hạt dưới 2 μ m. Mặt khác, phơi sáng trong thời gian dài dẫn đến sự hình thành hạt hữu hình thay thế có cỡ hạt tăng (Bảng 44). Điều này là đặc biệt đúng đối với chế phẩm 3 và chế phẩm 4. Bằng cách so sánh, nhận thấy chế phẩm 1 hầu như không thay đổi về tải lượng hạt hữu hình thay thế tổng thể.

Bảng 44. Hàm lượng hữu hình thay thế (số hạt/ml) như đo được bằng cách sử dụng MFI đối với các chế phẩm MOR6654B trong điều kiện stress là khuấy (**in đậm**), nhiễu chu trình F/T (*in nghiêng*), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (gạch chân). Các trị số được công bố đối với thời điểm t₀ là các trị số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

His (histidin); P20 (polysorbate 20); Arg (arginin)

Chế phẩm số	[protein] mg/ml	Các tá dược	Tổng lượng	1 μ m đến 2 μ m	2 đến 5 μ m	5 đến 10 μ m	10 đến 25 μ m
1	150	Sucroza/PS20/His	24137 $\pm$ 486	18257 $\pm$ 391	4968 $\pm$ 33	518 $\pm$ 6	78 $\pm$ 16
2	150	trehaloza/PS20/His	12614 $\pm$ 660	9580 $\pm$ 661	2298 $\pm$ 64	568 $\pm$ 47	148 $\pm$ 10
3	150	sucroza/Arg/PS20/His	33374 $\pm$ 975	23593 $\pm$ 718	8554 $\pm$ 174	1134 $\pm$ 88	82 $\pm$ 5
4	20	sucroza/PS20/His	4130 $\pm$ 28	2463 $\pm$ 134	1197 $\pm$ 15	441 $\pm$ 76	26 $\pm$ 14
1	150	sucroza/PS20/His	22306	14913	6288	1071	33
2	150	trehaloza/PS20/His	35220	21637	9932	3345	301
3	150	sucroza/Arg/PS20/His	26857	16889	7264	2428	220
4	20	sucroza/PS20/His	10528	6511	3355	576	85
<i>1</i>	<i>150</i>	<i>sucroza/PS20/His</i>	<i>35027</i>	<i>26159</i>	<i>7278</i>	<i>1343</i>	<i>226</i>
<i>2</i>	<i>150</i>	<i>trehaloza/PS20/His</i>	<i>23502</i>	<i>17580</i>	<i>4856</i>	<i>979</i>	<i>89</i>
<i>3</i>	<i>150</i>	<i>sucroza/Arg/PS20/His</i>	<i>21686</i>	<i>15257</i>	<i>5256</i>	<i>1104</i>	<i>66</i>

4	20	sucroza/PS20/ His	9667	6078	2198	1340	45
1	150	sucroza/PS20/ His	25417	18711	5723	864	102
2	150	trehaloza/PS20/ His	29238	22107	6160	823	147
3	150	sucroza/Arg/ PS20/His	186398	167017	16314	2790	270
4	20	sucroza/PS20/ His	46159	29359	14428	1224	131

Đo màu

Phương pháp phân tích cuối cùng mà được sử dụng trong nghiên cứu về tính ổn định này là đo màu. Tại thời điểm t₀, bốn chế phẩm đều có màu nâu (Bảng 45), với cường độ màu khác nhau một chút đối với chế phẩm loãng hơn (chế phẩm 4). Việc ủ ở nhiệt độ 40°C trong một hoặc hai tháng dẫn đến sự thay đổi một chút về màu sắc, mặc dù chế phẩm 4 có sự thay đổi ít (Bảng 45). Khi được bảo quản ở các nhiệt độ thấp hơn, có sự thay đổi ít nếu có về màu sắc (Bảng 46). Khi trong điều kiện stress bất kỳ, màu sắc là như nhau (Bảng 47).

Bảng 45. Màu sắc của các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 40°C trong khoảng thời gian lên đến hai tháng

Chế phẩm số	[protein] mg/ml		t ₀		t ₁		t ₂	
1	150	sucroza	B6	B7	B6	B6	B6	B6
2	150	trehaloza	B7	B7	B7	B6	B6	B6
3	150	sucroza/Arg	B6	B6	B6	B6	B6	B6
4	20	sucroza	B8	B8	BY7	BY7	B7	B6

Bảng 46 Màu sắc của các chế phẩm MOR6654B được bảo quản ở nhiệt độ 4°C và 25°C trong thời gian không và hai tháng

Chế phẩm số	[protein] mg/ml		t ₀		t ₂ 4°C		t ₂ 25°C	
1	150	sucroza	B6	B7	B7	B7	B6	B6
2	150	trehaloza	B7	B7	B7	B7	B7	B7

3	150	sucroza/Arg	B6	B6	B6	B6	B6	B6
4	20	sucroza	B8	B8	B8	B9	B8	B8

Bảng 47. Màu sắc của các chế phẩm MOR6654B trong điều kiện stress là khuấy (agit), nhiễu chu trình F/T (F/T), và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài (photo).

Chế phẩm số	[protein] mg/ml		t0		agit		F/T		photo	
1	150	sucroza	B6	B7	B7	B7	B6	B7	B6	B6
2	150	trehaloza	B7	B7	B7	B7	B7	B7	B6	B6
3	150	sucroza/Arg	B6	B6	B6	B6	B6	B6	B6	B6
4	20	sucroza	B8	B8	B8	B8	B8	B8	B7	B7

Tóm tắt thí nghiệm

Nhiều phương pháp phân tích sinh lý và sinh hóa được áp dụng để xác định xem liệu có sự khác biệt về mức độ ổn định giữa các chế phẩm hay không. Trong số các chế phẩm đã chọn được cho sàng lọc lần thứ hai, sự khác biệt nhỏ được nhận thấy bằng cách áp dụng nhiều kỹ thuật phân tích. Việc chỉ bảo quản ở điều kiện ở 40°C và tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài là gây ra sự thoái biến đáng kể. Mặc dù cả bốn chế phẩm có biên dạng độ ổn định rất giống nhau, chế phẩm 1 (150mg/ml MOR6654B, 220mM sucroza, 20mM histidin, 0,04% polysorbate 20, độ pH = 6,0) thể hiện xu hướng thoái biến tổng thể là ít nhất như được xác định theo tập hợp các phương pháp phân tích này. Chế phẩm 1 ổn định hơn trong các điều kiện stress nhiệt và ánh sáng, ít có xu hướng thoái biến và cũng ổn định hơn về mặt sự hình thành hạt trong khoảng cỡ hạt hiện hình thay thế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dạng nước có độ pH bằng 6,0 và chứa kháng thể kháng BAFFR đã được fucosyl hóa ở mức độ thấp hoặc không được fucosyl hóa, trong đó kháng thể này có nồng độ bằng 150mg/ml, và trong đó kháng thể kháng BAFFR này bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt có trình tự SEQ ID NO 3, 4 và 5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt có trình tự SEQ ID NO: 6, 7 và 8, và

- (a) (i) 220mM sucroza làm chất làm ổn định,
(ii) 20mM histidin làm tác nhân đệm,
(iii) 0,04% polysorbat 20 làm chất hoạt động bề mặt; hoặc
- (b) (i) 220mM trehaloza làm chất làm ổn định,
(ii) 20mM histidin làm tác nhân đệm,
(iii) 0,04% polysorbat 20 làm chất hoạt động bề mặt; hoặc
- (c) (i) 120mM sucroza làm chất làm ổn định,
(ii) 20mM histidin làm tác nhân đệm,
(iii) 0,04% polysorbat 20 làm chất hoạt động bề mặt, và
(iv) 50mM arginin, cụ thể là arginin-HCl.

2. Chế phẩm dạng nước theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng BAFFR đã được fucosyl hóa ở mức độ thấp hoặc không được fucosyl hóa chứa miền V_H với axit amin SEQ ID NO:1 và miền V_L với axit amin SEQ ID NO:2.

3. Chế phẩm dạng nước theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó kháng thể kháng BAFFR đã được fucosyl hóa ở mức độ thấp hoặc không được fucosyl hóa chứa vùng chuỗi nặng của SEQ ID NO:9 và vùng chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:10.

4. Dụng cụ phân phối chứa chế phẩm dạng nước theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

5. Ống tiêm đã được làm đầy sẵn chứa chế phẩm dạng nước theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Novartis AG

<120> CHẾ PHẨM DẠNG NƯỚC, DỤNG CỤ PHÂN PHỐI VÀ ỔNG TIÊM ĐÃ ĐƯỢC LÀM ĐẦY SẴN CHỨA CHẾ PHẨM DẠNG NƯỚC NÀY

<130> PAT055133A

<150> US 61/658,472

<151> 2012-06-12

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Ser Tyr Ala
 50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Trp Val Pro Lys Ile Gly Val Phe Asp
 100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

Met Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Gly
 1 5 10

<210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Ser Tyr Ala Val Ser Val
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Asp Trp Val Pro Lys Ile Gly Val Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Ser Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Gln Leu Tyr Ser Ser Pro Met Thr
1 5

<210> 9
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Ser Tyr Ala
 50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Trp Val Pro Lys Ile Gly Val Phe Asp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 10
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ser Pro
 85 90 95
 Met Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 11
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 caggtgcagc tgcagcagag cggcccaggc ctggtcaagc cctctcagac cctgtcactg
 60

acctgcgcca tttcaggcga cagcgtgagc agcaacagcg ccgcctgggg ctggatcagg
 120

cagagccccg gtaggggcct ggaatggctg ggcaggatct actacaggtc caagtggtag
 180

aacagctacg ccgtgagcgt gaagagcagg atcaccatca accctgacac cagcaagaac
 240

cagttctcac tgcagctcaa cagcgtgacc cccgaggaca ccgccgtgta ctactgcgcc
 300

agatacgact ggggtgccaa gatcggcgtg ttcgacagct ggggccaggg caccctgggtg
 360

accgtgtcaa gc
 372

<210> 12
 <211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

gatatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgagcctga gcccaggcga gagggccacc
60

ctgtcctgca gggccagcca gtttatcagc agcagctacc tgtcctggta tcagcagaag
120

cccgccagg cccctagact gctgatctac ggcagctcct ctcgggccac cggcgtgccc
180

gccaggttca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgacaatcag cagcctggag
240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagctgtaca gctcacccat gaccttcggc
300

cagggcacca aggtggagat caag
324

<210> 13

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Pro	Ala	Pro
1				5					10					15	

Thr	Pro	Cys	Val	Pro	Ala	Glu	Cys	Phe	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	His	Cys
			20					25					30		

Val	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Arg	Pro	Lys	Pro	Ala	Gly	Ala
		35					40					45			

Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Gln	Glu	Ser	Val	Gly
	50					55					60				

Ala	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Leu	Phe	Gly
65					70					75					80

Ala	Pro	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Val
				85					90					95	

Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
 100 105 110

Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
 115 120 125

Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
 130 135 140

Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
 145 150 155 160

Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
 165 170 175

Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 180

<210> 14
 <211> 1419
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 atggcctggg tgtggaccct gcccttcctg atggccgctg ccagtcagt gcaggcccag
 60

gtgcagctgc agcagagcgg cccaggcctg gtcaagccct ctgagaccct gtcactgacc
 120

tgcgccattt caggcgacag cgtgagcagc aacagcgccg cctggggctg gatcaggcag
 180

agccccgcta ggggcctgga atggctgggc aggatctact acaggtccaa gtggtacaac
 240

agctacgccg tgagcgtgaa gagcaggatc accatcaacc ctgacaccag caagaaccag
 300

ttctcactgc agctcaacag cgtgaccccc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccaga
 360

tacgactggg tgcccaagat cggcgtgttc gacagctggg gccagggcac cctggtgacc
 420

gtgtcaagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag cagcaagagc
 480

accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg
540

accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg
600

cagagcagcg gcctgtacag cctgtccagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctgggc
660

accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga
720

gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgcccagc cccagagctg
780

ctgggaggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc
840

aggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacct agaggtgaag
900

ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc cagagaggag
960

cagtacaaca gcacctacag ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg
1020

aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgccagcccc catcgaaaag
1080

accatcagca aggccaaggg ccagccacgg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc
1140

cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacccc
1200

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1260

ccccagtg caggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag
1320

tccaggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac
1380

cactacaccc agaagagcct ggcctgtcc cccggcaag
1419

<210> 15
<211> 705
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 15

atgagcgtgc tgacccaggt gctggctctg ctgctgctgt ggctgaccgg caccagatgc
60

gatatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgagcctga gcccaggcga gagggccacc
120

ctgtcctgca gggccagcca gtttatcagc agcagctacc tgtcctggta tcagcagaag
180

cccgccagg cccctagact gctgatctac ggagctcct ctcgggccac cggcgtgccc
240

gccaggttca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcacc tgacaatcag cagcctggag
300

cccaggact tcgccgtgta ctactgccag cagctgtaca gtcacccat gaccttcggc
360

cagggcacca aggtggagat caagcgtacg gtggccgctc ccagcgtgtt catcttcccc
420

cccagcgacg agcagctgaa gagcggcacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc
480

tacccccggg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc
540

caggagagcg tcaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccttg
600

accctgagca aggccgacta cgagaagcat aaggtgtacg cctgcgaggt gaccaccag
660

ggcctgtcca gcccgtgac caagagcttc aacaggggcg agtgc
705